



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Kemijski odsjek

Helena Križan

**Priprema plazmidnih vektora za ekspresiju
proteina dipeptidil-peptidaze 3 (DPP3) i
proteina 3C koji sadrži domenu SH2 (SH2D3C)
u staničnim linijama sisavaca**

Rad predložen povjerenstvu za dodjelu Rektorove nagrade Sveučilišta u Zagrebu

Zagreb, 2024.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za biokemiju proteina i molekulsko modeliranje Zavoda za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković pod voditeljstvom dr. sc. Mihaele Matovine, viši znan. sur. i izv. prof. dr. sc. Jasmine Rokov Plavec sa Zavoda za biokemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Rad je izrađen u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom „Interakcija dipeptidil peptidaze III s proteinom SH2 domain-containing protein 3C – moguća veza između odgovora na oksidativni stres i stanične migracije“, IP-2020-02-6743, voditeljice dr. sc. Mihaele Matovina.

POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

ABE - eng. *adenine base editor*, uređivač adeninske baze

APS - eng. *amonium persulfate*, amonijev persulfat

AREs - eng. *Antioxidant response elements*, elementi antioksidacijskog odgovora

ATP - eng. *adenosine triphosphate*, adenzin trifosfat

BSA - eng. *bovine serum albumin*, albumin iz seruma goveda

Cas - eng. *CRISPR-associated protein*

CAS - eng. *CRK-associated substrate*

Cas 9 - eng. *CRISPR-associated protein 9*

Cas9n - eng. *Cas9 nickase*, Cas9 nikaza

CBE - eng. *cytosine base editor*, uređivač citozinske baze

CDK1 - eng. *cyclin-dependent kinase 1*, ciklin-ovisna kinaza 1

CMV - eng. *human cytomegalovirus*, humani citomegalovirus

CRISPR - eng. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*

crRNA - CRISPR RNA

CUL3 - eng. *cullin 3*

d-Cas9 - eng. *catalytically dead Cas9*, katalitički inaktivni Cas9

DMEM - eng. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA - eng. *deoxyribonucleic acid*, deoksiribonukleinska kiselina

DPP3 - eng. *dipeptidyl-peptidase 3*, dipeptidil-peptidaza 3

EDTA - eng. *ethylenediaminetetraacetic acid*, etilendiamintetraoctena kiselina

EpREs - eng. *Electrophile response elements*, elementi elektrofilnog odgovora

GEF - eng. *guanine nucleotide exchange factor*

gRNA - eng. *guide RNA*, vodička RNA

GST -eng. *glutathione S-transferase*

HA - eng. *human influenza hemagglutinin*

HDR - eng. *homology- directed repair*, popravak usmjeren homologijom

HEK - eng. *human embryonic kidney cells*

His₆ - heksahistidinski privjesak

HIV - eng. *human immunodeficiency virus*

HO-1 - eng. *heme oxygenase-1*, hem oksigenaza-1

HRP - eng. *horseradish peroxidase*, peroksidaza iz hrena

KEAP1 - eng. *Kelch-like ECH-associated protein 1*, Kelchu sličan protein 1 povezan s ECH

KO - eng. *knock out*

LB - Luria-Bertani

MBP - eng. *maltose-binding protein*, maltoza-vezujući protein

MCS - eng. *multiple cloning site*, mjesto višestrukog kloniranja

NADPH - eng. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*

NHEJ - eng. *non-homologous end joining*, nehomologno spajanje krajeva

NQO1 - eng. *NAD(P)H quinone acceptor oxidoreductase 1*, NAD(P)H-kinon-
oksidoreduktaza 1

NRF2 - eng. *nuclear factor E2-related factor 2*, faktor 2 povezan s nuklearnim faktorom E2

NSP - eng. *novel SH2-containing proteins*

NUC - eng. *nuclease lobe*

PAM - eng. *protospacer-adjacent motif*

PBS - eng. *phosphate buffered saline*, , fiziološka otopina puferirana fosfatom

PCR - eng. *polymerase chain reaction*, lančana reakcija polimeraze

PE - eng. *prime editor*

pegRNA - eng. *primer editing guide RNA*

PVDF - eng. *polyvinylidene fluoride*, poliviniliden fluorid

RBX1 - eng. *RING-box protein 1*

REC - eng. *recognition lobe*

REM - eng. *random-and-extensive mutagenesis*

RIPA - eng. *radioimmunoprecipitation assay*

RNA - eng. *ribonucleic acid*, ribonukleinska kiselina

ROS - eng. *reactive oxygen species*, reaktivna kisikova vrsta

rRNA - eng. *ribosomal ribonucleic acid*, ribosomska ribonukleinska kiselina

SARS-CoV-2 - eng. *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*

SDM - eng. *site-directed mutagenesis*, mjesno-specifična mutageneza

SDS - eng. *sodium dodecyl sulfate*, natrijev dodecilsulfat

SDS-PAGE - eng. *sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis*, elektroforeza na poliakrilamidnom gelu uz dodatak natrijevog dodecil-sulfata

sgRNA - eng. *single guide RNA*

SH2 - eng. *Src Homology 2*

SH2D3C - eng. *SH2 domain-containing protein 3C*, protein 3C koji sadrži SH2 domenu

SILAC-MS - eng. *stable isotope labeling by amino acids in cell culture coupled to mass spectrometry*, označavanje aminokiselina stabilnim izotopom u staničnoj kulturi spregnuto sa spektrometrijom masa

sMAF - eng. *small musculo-aponeurotic fibrosarcoma*, mali muskulo-aponeurotični fibrosarkoma protein

SOC - eng. *Super Optimal broth with Catabolite repression*

SV40 - eng. *simian vacuolating virus 40*

TAE - Tris-acetat-EDTA

TALEN - eng. *transcription activator-like effector nuclease*

TB - eng. *treatment buffer*

TBS-T - eng. *tris buffered saline and Tween20*

TEMED - eng. *tetramethylethylenediamine*, N,N,N',N'-tetrametilendiamin

tracrRNA - eng. *trans-activating CRISPR RNA*, trans-aktivirajuća CRISPR RNA

Tris - eng. *trisaminomethane*, tris(hidroksimetil)-aminometan

UV - eng. *ultraviolet*, ultraljubičasto

ZFNs - eng. *zinc-finger nuclease*

SADRŽAJ RADA

§ 1. UVOD.....	1
1.1. Dipeptidil-peptidaza 3 (DPP3)	1
1.2. Protein 3C koji sadrži domenu SH2 (SH2D3C)	3
1.3. Signalni put KEAP1-NRF2	4
1.4. Genetičko inženjerstvo	7
1.4.1. Tehnologija rekombinantne DNA	7
1.4.2. Lančana reakcija polimeraze (PCR).....	8
1.4.3. Kloniranje	9
1.4.4. Mutageneza	10
1.4.5. CRISPR/Cas sustav	11
1.5. Western blot analiza proteina	14
§ 2. CILJEVI	17
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. Materijali	18
3.1.1. Standardne kemikalije.....	18
3.1.2. Plazmidi	19
3.1.3. Markeri veličina DNA i proteina te boje za detekciju.....	20
3.1.4. Enzimi i antitijela.....	20
3.1.5. Sojevi bakterija <i>Escherichia coli</i>	21
3.1.6. Stanična linija sisavaca HEK293FT.....	21
3.2. Metode rada s bakterijama	21
3.2.1. Rad u sterilnim uvjetima	21
3.2.2. Transformacija bakterijskih stanica	21
3.2.3. Priprema bakterijskih kultura	23
3.2.4. Priprema glicerolskih kultura za dugotrajnu pohranu bakterijskih stanica.....	23
3.3. Metode rada s nukleinskim kiselinama.....	23
3.3.1. Izolacija plazmidne DNA	23
3.3.2. Spektrometrijsko mjerenje koncentracije DNA.....	23
3.3.3. Mjesno-specifična mutageneza	24
3.3.4. Linearizacija vektora pcDNA3.....	26
3.3.5. Agarozna gel-elektroforeza.....	26
3.3.6. Izolacija DNA iz agaroznog gela	27
3.3.7. PCR umnažanje konstrukata HA-DPP3, HA-SH2D3C-iso1 i HA-SH2D3C-iso2	27
3.3.8. Rekombinacijsko kloniranje	28

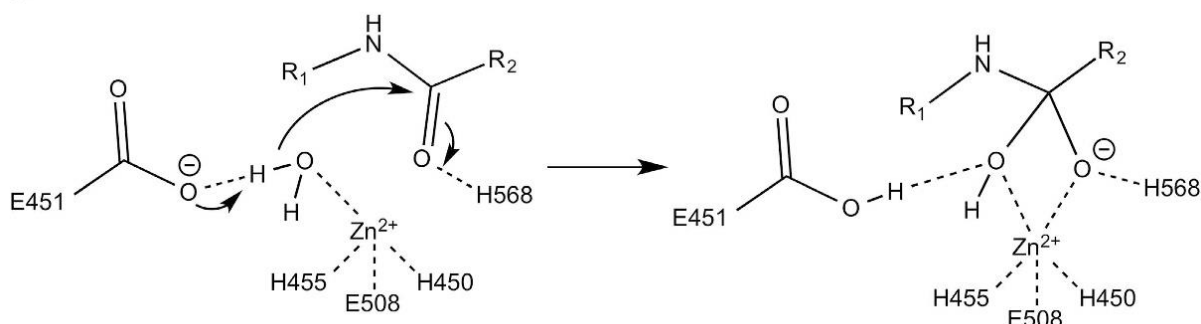
3.3.9. PCR na kolonijama	30
3.3.10. Izolacija DNA iz stanica u kulturi te detekcija mikoplazmi uz pomoć PCR-a	31
3.4. Metode rada s proteinima	33
3.4.1. Izolacija proteina iz humanih stanica	33
3.4.2. Mjerenje koncentracije proteina metodom po Bradfordu	33
3.4.3. Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijeva dodecilsulfata (SDS-PAGE) ...	34
3.4.4. Western blot analiza proteina	35
3.5. Rad sa staničnim linijama sisavaca	36
3.5.1. Uzgoj HEK293FT stanica	36
3.5.2. Transfekcija plazmidnim vektorima	36
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	41
4.1. Priprema plazmidnog vektora za tranzijentnu ekspresiju divljeg tipa proteina DPP3, SH2D3C izoforme 1 i SH2D3C izoforme 2	41
4.1.1. Priprema plazmidnog vektora pcDNA3 za rekombinacijsko kloniranje	41
4.1.2. Priprema gena HA-DPP3, HA-SH2D3C izoforme 1 i HA-SH2D3C izoforme 2 za rekombinacijsko kloniranje	43
4.1.3. Rekombinacijsko kloniranje gena HA-DPP3, HA-SH2D3C izoforme 1 i HA-SH2D3C izoforme 2 u pcDNA3 plazmidni vektor	44
4.1.4. Tranzijentna transfekcija HEKFT stanica plazmidima dobivenima rekombinacijskim kloniranjem	48
4.1.5. Western blot analiza proteina nakon tranzijentne ekspresije u staničnim linijama sisavaca	49
4.2. Priprema plazmidnog vektora za tranzijentnu ekspresiju divljeg tipa proteina DPP3 te mutiranih inačica DPP3_G585A i DPP3_G585E	52
4.2.1. Konstrukcija mutiranih inačica DPP3_G585A i DPP3_G585E	52
4.2.2. Ciljana mutageneza	53
4.2.3. Tranzijentna transfekcija HEK293FT stanica plazmidima dobivenima ciljanom mutagenezom	54
4.2.4. Western blot analiza DPP3 proteina i njegovih mutiranih inačica nakon tranzijentne ekspresije u staničnim linijama sisavaca	55
§ 5. ZAKLJUČAK	58
§ 6. ZAHVALE	59
§ 7. POPIS LITERATURE	LX
SAŽETAK	LXIII
SUMMARY	XV
ŽIVOTOPIS	XVII

§ 1. UVOD

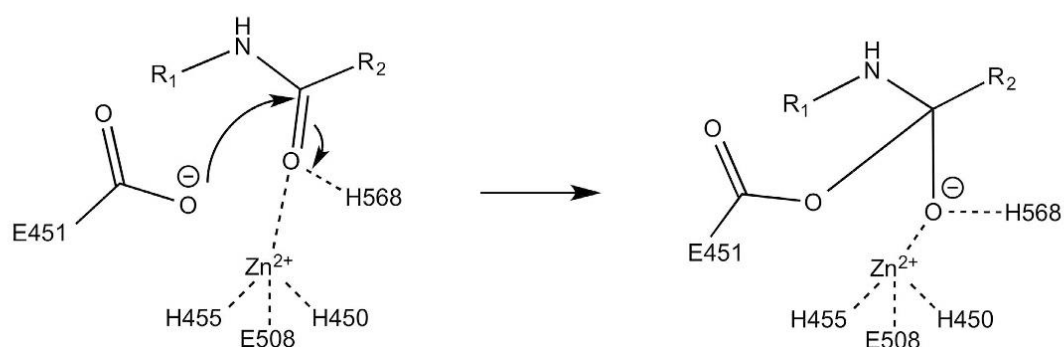
1.1. Dipeptidil-peptidaza 3 (DPP3)

Dipeptidil-peptidaza 3 (DPP3, eng. *dipeptidyl-peptidase 3*) je aminopeptidaza ovisna o cinku, spada u EC 3.4.14.4 klasu enzima.¹ Prvi put je izolirana iz prednjeg režnja hipofize goveda 1967. i pojavljivala se pod raznim imenima poput dipeptidil arilaze 3, dipeptidil aminopeptidaze 3 i enkefalinaze B.² Široko je rasprostranjena u organizmima od bakterija do ljudi³ te je visoko očuvana među višim sisavcima.⁴ Cijepa dipeptide s N-kraja kratkih peptida, veličine 3 do 10 aminoikiselina, te sudjeluje u obrtaju proteina.^{3,5,6} Ograničeno je specifična za dipeptidil arilamidne supstrate i pokazuje izraženu specifičnost za diarginil-2-naftilamid.⁷

a



b

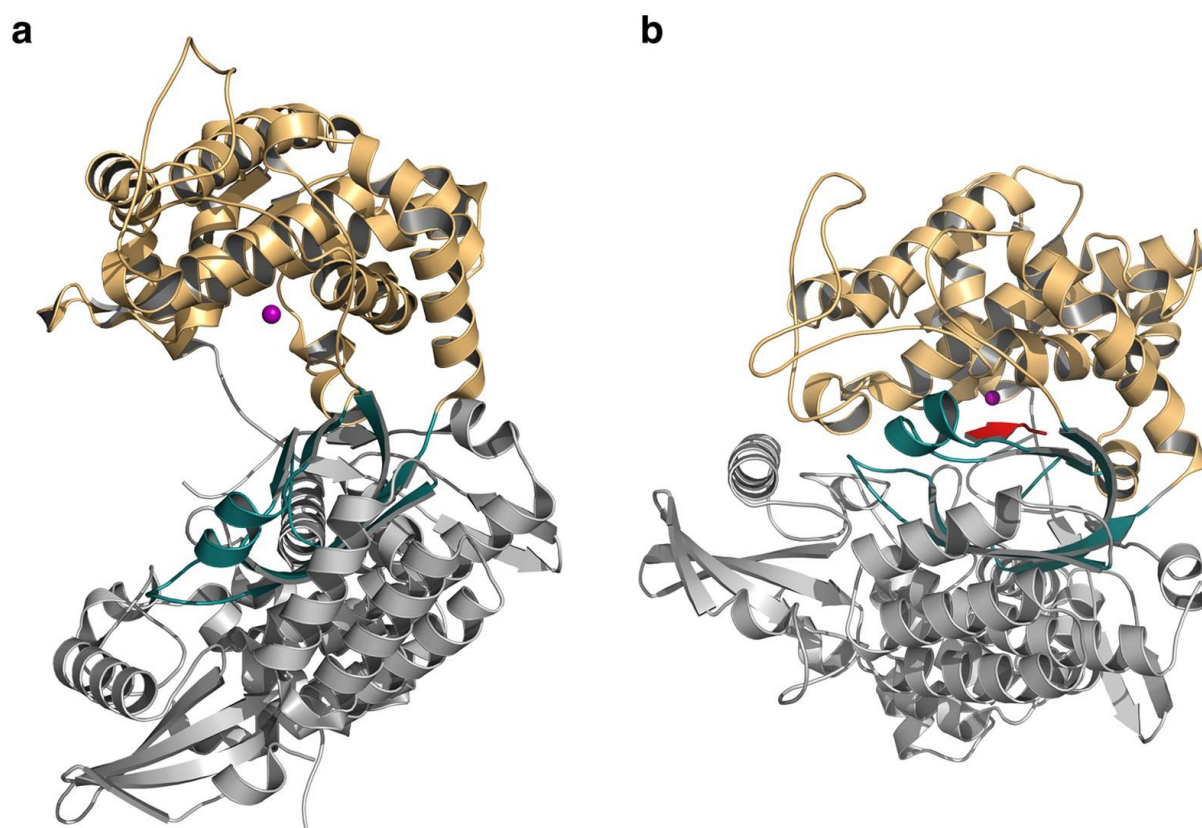


Slika 1. Mogući mehanizmi cijepanja peptida kataliziranog dipeptidil-peptidazom 3: hidrolitički (a) i anhidridni (b) mehanizam.²

DPP3 je protein građen od dvije domene, koji sadrži očuvane sekvence HEXXGH i EEXR(K)AE(D) temeljem kojih pripada M49 obitelji metalopeptidaza.^{1,4} Gornja domena je uglavnom helikalna, a donju čini kombinacija α - i β -sekundarnih struktura s jezgrom koju čini

β -bačva. Katalitički cink vezan je na gornjoj domeni te ga koordiniraju His450 i His455 iz očuvanog motiva HEXXGH, Glu508 iz motiva EE*XR(K)AE(D) te molekula vode. Glu451 iz HEXXGH djeluje kao katalitička baza, pozicioniran da može deprotonirati vodu koordiniranu na cinku.² Ovim mehanizmom cijepaju se „dobri“ supstrati. U slučaju „sporih“ supstrata, peptid se veže na četvrto koordinacijsko mjesto cinka umjesto vode (slika 1) te se razgrađuju putem energetski nepovoljnog anhidridnog mehanizma.^{2,4} Kad nastane kompleks enzim-peptid, domene se pomiču jedna prema drugoj i zatvaraju šupljinu pri čemu peptid ostaje „blokiran“ (slika 2).⁴

2,44



Slika 2. Struktura dipeptidil-peptidaze 3 u otvorenoj konformaciji (a) i zatvorenoj konformaciji (b) s vezanim opioidnim peptidom tinofinom (VVYPW). Gornja domena prikazano je zlatno, donja domena sivo, β -jezgra plavo, katalitički cink ljubičasto te tinorfin crveno.²

Iako fiziološke uloge DPP3 nisu u potpunosti razjašnjene,³ smatra se da je uključena u završne korake katabolizma proteina, regulaciju krvnog tlaka, oksidacijskog stresa, nocicepcije i imunomodulaciju. Angiotenzini, jedni od supstrata DPP3, pripadaju renin-angiotenzin sustavu koji utječe na krvni tlak i homeostazu elektrolita, a enkefalini su dio endogenog opioidnog

sustava koji je uključen u regulaciju i modulaciju boli.⁴ S obzirom da DPP3 hidrolizira enkefaline, smatra se da je uključena u nocicepciju.^{2,4,8}

DPP3 je također regulator puta odgovora na oksidacijski stres preko signalnog puta NRF2-KEAP1. DPP3 svojim ETGE motivom kompetira s NRF2 za vezanje na KEAP1. Vezanjem DPP3 na KEAP1, sprječava se degradacija NRF2, dolazi do njegove translokacije u jezgru te transkripcije niza antioksidacijskih gena.

DPP3 je citosolni enzim, međutim nađen je u niskim razinama u cirkulaciji kod zdravih ljudi. Ne zna se koji je mehanizam njegovog izlaska u vanstanični prostor, ali utvrđeno je da se količina DPP3 u cirkulaciji značajno povećava u slučajevima septičkog kardiogenog i vazodilacijskog šoka te se proučava njegova uloga kao biomarkera tih stanja.⁴

Primijećena je prekomjerna ekspresija i povećana aktivnost DPP3 u brojnim tumorima,^{2,4,5,8} no mehanizmi njene uključenosti u progresiju i razvoj tumora nisu razjašnjeni. U zloćudnim tumorima su također nađene mutacije u kodirajućoj regiji gena DPP3 koje mogu dovesti do promjene u katalitičkoj aktivnosti i biokemijskim svojstvima ili ometati interakciju s proteinom KEAP1. Prekomjerna ekspresija DPP3 direktno utječe na povećanje odgovora na oksidacijski stres istiskivanjem NRF2 iz kompleksa s KEAP1 i tako može sudjelovati u razvoju raka uslijed povećane zaštite tumorskih stanica od reaktivnih kisikovih vrsta (ROS, eng. *reactive oxygen species*).⁴ Osim interakcije s KEAP1, nedavno je nađena i interakcija s ciklin-ovisnom kinazom 1 (CDK1, eng. *cyclin-dependent kinase 1*), enzimom važnim za regulaciju staničnog ciklusa putem koje bi DPP3 mogao imati ulogu u razvoju kolorektalnog karcinoma.^{4,8}

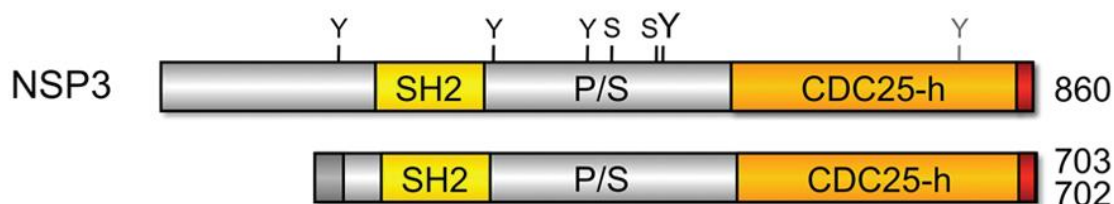
Prethodnim pretraživanjem baze cBioPortal za genomiku tumora pronađen je niz mutacija DPP3 u uzorcima raka. Istraživanjem G313W, R510W, G313A, R510K i R510Q pokazalo se da na aktivnost DPP3 značajno utječe fleksibilnost proteina.¹

Metodom označavanja aminokiselina stabilnim izotopom u staničnoj kulturi spregnutom sa spektrometrijom masa (SILAC-MS, eng. *stable isotope labeling by amino acids in cell culture coupled to mass spectrometry*) otkriven je SH2D3C kao novi, potencijalni interaktor DPP3.³ Njihova interakcija mogla bi biti poveznica između regulacije odgovora na oksidacijski stres i procesa u koje je uključen SH2D3C, poput staničnog rasta, adhezije i migracije.³

1.2. Protein 3C koji sadrži domenu SH2 (SH2D3C)

Obitelj novih proteina koji sadrže SH2 domenu (NSP, eng. *novel SH2-containing proteins*) čine: NSP1 (SH2D3A), NSP2 (BCAR3) i NSP3 (SH2D3C). NSP su adaptorski proteini

uključeni u regulaciju adhezije, migracije, organizacije tkiva, imunološkog odgovora³ i invazivnosti,⁹ a BCAR3 je uključen i u razvoj antiestrogenske rezistencije.^{10,11}



Slika 3. Izoforme NSP3 proteina s označenim domenama: SH2, prolin/serin-bogata domena (P/S) i Cdc25-homologna domenama te fosforilacijskim mjestima na tirozinu (Y) i serinu (S). Razlika kraćih izoformi označena je tamno sivom bojom na N-kraju.⁹

N-kraj proteina 3C koji sadrži SH2 domenu (SH2D3C, eng. *SH2 domain-containing protein 3C*) je promjenjive duljine (prikazano na slici 3) te se razlikuje nekoliko izoformi.

Dvije kraće izoforme SH2D3C eksprimirane su u raznim tkivima, dok se dulja izoforma uglavnom nalazi u hematopoetskim stanicama.⁹

Nakon N-kraja nalazi se SH2 domena (eng. *Src Homology 2*), koja veže aktivirane receptorske tirozin kinaze, uključujući članove ERBB i EPH obitelji.⁹ Potom slijedi središnja regija bogata prolinima/serinima, koja sadrži brojna potencijalna mjesta fosforilacije za kinaze usmjerene na proline (npr. mitogenom aktivirana protein kinaze, eng. *mitogen-activated protein kinases*)^{11,12} i vezna mjesta za proteine koji sadrže SH3 domenu. Razlikuje se među članovima NSP obitelji proteina što omogućuje da svaki član ima različite partnere za vezanje.^{9,10}

Na C-kraju nalazi se struktura slična Cdc25-homolognoj domeni,^{9,10} odnosno slična RasGEF domeni (eng. *RasGEF domain*; GEF, eng. *guanine nucleotide exchange factor*). Zatvorene je konformacije te je katalitički inaktivna i služi kao adaptorska domena.^{3,10,11} NSP proteini ovom domenom vežu proteine CAS obitelji (eng. *CRK-associated substrate*) te tvore mnoge signalne komplekse.^{10,11} CAS proteini su uključeni u prijenos signala, onkogene transformacije, invazivnost i rast stanica.⁹ NSP-CAS kompleksi djeluju kao medijatori u migraciji stanica, adheziji i invazivnosti, što upućuje na važnost u brojnim bolestima, a posebice u progresiji tumora i metastaza.¹⁰

1.3. Signalni put KEAP1-NRF2

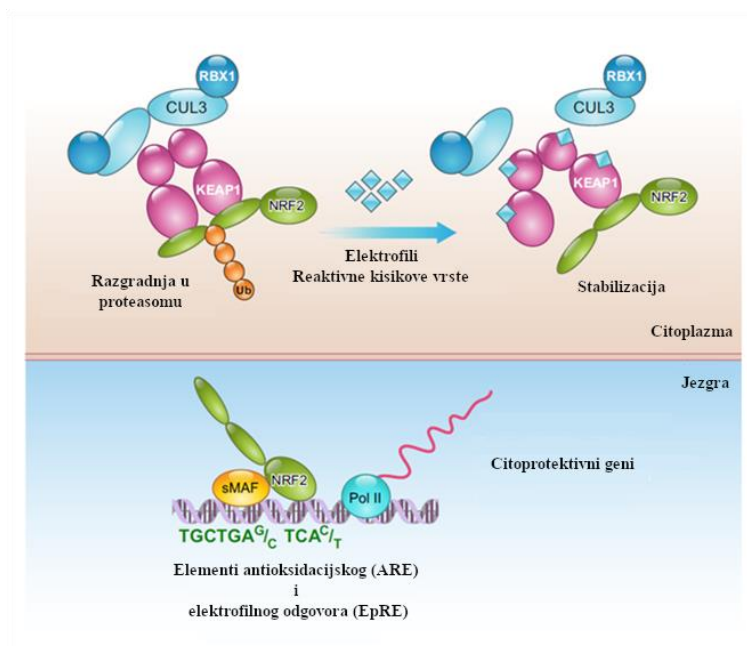
Faktor 2 povezan s nuklearnim faktorom E2 (NRF2, eng. *nuclear factor E2-related factor 2*) je član *cap'n'collar* obitelji proteina¹³ s ključnom ulogom u zaštiti stanica od elektrofilnog i

oksidacijskog stresa.^{6,13,14} U bazalnim uvjetima NRF2 je u stanici prisutan u malim količinama jer se ubikvitinira u kompleksu s KEAP1 i zatim razgrađuje u proteasomu.⁶

U uvjetima stresa dolazi do nakupljanja NRF2 te translokacije u jezgru gdje inducira transkripciju citoprotektivnih gena.^{6,13,14}

NRF2 je negativno reguliran s Kelchu sličnim proteinom 1 povezanim s ECH (KEAP1, eng. *Kelch-like ECH-associated protein 1*), koji je bogat tiolima (bočnim ograncima cisteina) koji služe kao biosenzori elektrofila i reaktivnih kisikovih vrsta (ROS, eng. *reactive oxygen species*).^{6,14,15} U normalnim uvjetima dvije molekule KEAP1 vežu se na NRF2, na ETGE (približno 200 puta veći afinitet) i DLG motive^{6,15} te olakšavaju nastanak kompleksa kulina 3 (CUL3, eng. *cullin 3*) i RING-box proteina 1 (RBX1, eng. *RING-box protein 1*) s ubikvitin E3 ligazom.¹⁵ U navedenom kompleksu dolazi do ubikvitinacije NRF2 i njegove razgradnje u proteasomu, a KEAP1 se otpušta za novi ciklus interakcija.^{13,15}

Kad su prisutni elektrofilni ili ROS-ovi, dolazi do oksidacije pojedinih tiola u KEAP1 što dovodi do promjene konformacije kompleksa NRF2-KEAP1 te blokade ubikvitinacije NRF2. Do aktivacije NRF2 također može doći uslijed vezanja kompetitorskih proteina na KEAP1 čime dolazi do otpuštanja NRF2 DLG mjesta s KEAP1, što također onemogućuje ubikvitinaciju i razgradnju NRF2.⁶ Uslijed toga dolazi do akumulacije NRF2 te translokacije u jezgru gdje formira heterodimere s malim muskulo-aponeurotičnim fibrosarkoma proteinima (sMAF, eng. *small musculo-aponeurotic fibrosarcoma*) i veže se na elemente antioksidacijskog odgovora (AREs, eng. *Antioxidant response elements*)^{6,13,14} ili elemente elektrofilnog odgovora (EpREs, eng. *Electrophile response elements*)^{13,14} gdje inducira transkripciju gena uključenih u eliminaciju ROS-ova, detoksifikaciju, intermedijarni metabolizam, antioksidacijske i protuupalne funkcije.⁶



Slika 4. NRF2 u normalnim staničnim uvjetima i u uvjetima staničnog stresa. U citoplazmi kompleks KEAP1-CUL3 ubikvitin E3 ligaza ubikvitinira NRF2 i označava ga za razgradnju u proteasomu. Pri izloženosti stanica elektrofilima ili ROS-ovima, dolazi do modifikacije KEAP1, smanjenja ubikvitinacije i stabilizacije NRF2 (gore). Novosintetizirani NRF2 translocira se u jezgru i inducira transkripciju nizvodnih citoprotektivnih gena (dolje).¹⁴ KEAP1-NRF2 je jedan od glavnih mehanizama koji pojačavaju otpornost na stanični stres što je evolucijski očuvana osobina dugovječnosti. Brojna istraživanja su pokazala doprinose KEAP1-NRF2 sustava na prevenciju i slabljenje fiziološkog starenja i bolesti povezanih sa starenjem.

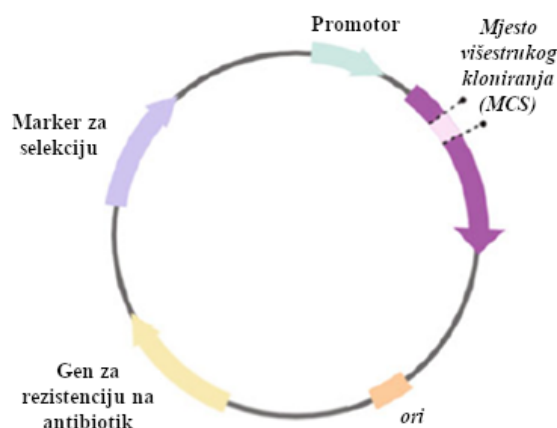
NRF2 sprječava kancerogenezu smanjujući oksidacijska oštećenja DNA i potičući detoksifikaciju karcinogena. Tranzijentna aktivacija NRF2 je korisna, dok je postojana aktivacija često štetna. Stanicama raka omogućuje proliferaciju i preživljenje zahvaljujući pojačanim antioksidacijskim kapacitetima, detoksifikaciji i promjenama u metabolizmu.¹³

Za proučavanje aktivacije transkripcije NRF2 obično se prate ekspresije nekih od nizvodnih gena poput: *HMOX1* koji kodira hem oksigenazu-1 (HO-1) ili *NQO1* koji kodira NADP(H) kinon oksidoreduktazu 1 (NQO1).¹⁵

1.4. Genetičko inženjerstvo

1.4.1. Tehnologija rekombinantne DNA

Tehnologija rekombinantne DNA revolucionalizirala je molekularnu biologiju i biokemiju, a njen razvoj započeo je otkrićem plazmidne DNA. Plazmidi su male kružne ekstrakromosomske DNA molekule, sposobne za samostalnu replikaciju, a bakterijama omogućuju dodatna svojstva poput rezistencije na antibiotike, virulencije ili degradativnih sposobnosti. U genetičkom inženjerstvu koriste se za unošenje stranog genetičkog materijala u stanice.



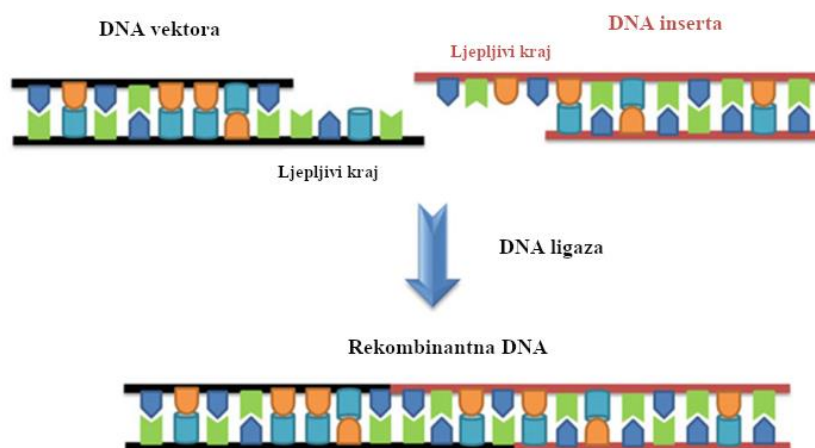
Slika 5. Općenita mapa plazmida. Osnovni dijelovi su ishodište replikacije *ori*, gen za rezistenciju na antibiotik, selektivni marker, promotor i višestruko mjesto kloniranja (MCS).¹⁶ Za prijenos strane DNA plazmidima važno je nekoliko elemenata. Ishodište replikacije *ori* je mjesto gdje započinje replikacija DNA. Marker za selekciju, često gen za rezistenciju na antibiotike poput ampicilina, omogućuje identifikaciju stanica koje sadrže vektor. Promotorska regija, koja se nalazi uzvodno od mjesta višestrukog kloniranja (MCS, eng. *multiple cloning site*), omogućuje transkripciju nizvodnih gena. MCS sadrži specifična mjesta prepoznavanja koja cijepaju restriksijske endonukleaze, omogućujući uvođenje gena od interesa.

Plazmidi koji kodiraju rekombinantne proteine često sadrže određene privjeske, poput heksahistidinskog privjeska (His6), glutation S-transfeaze (GST, eng. *glutathione S-transferase*) ili maltoza-vezujućeg proteina (MBP, eng. *maltose-binding protein*), na N- ili C-kraju, što olakšava pročišćavanje i proučavanje protein-protein interakcija.

Restriksijske endonukleaze prepoznaju specifične slijedove baza (mjesta prepoznavanja) u dvolančanoj DNA i cijepaju DNA na specifičnim mjestima. Dio su bakterijskog restriksijsko-modifikacijskog sustava koji štiti bakterije od infekcije bakteriofagima razgrađujući virusnu DNA na fragmente. Znanstvenici koriste restriksijske

endonukleaze za manipuliranje DNA fragmentima, čineći ih nezamjenjivim alatima u genetičkom inženjerstvu.

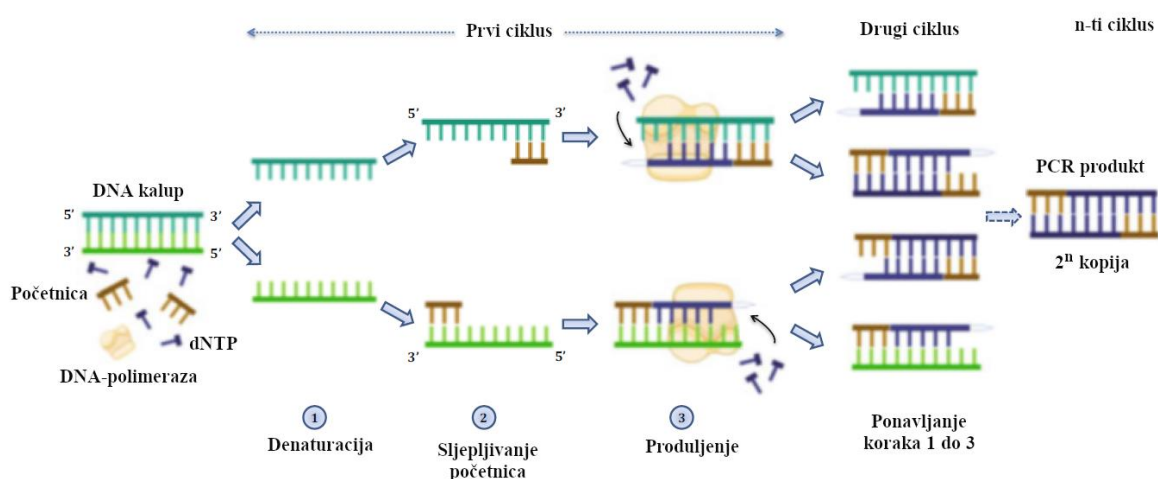
Kao što postoje enzimi koji cijepaju DNA, postoje i enzimi koji spajaju DNA, nazvani DNA ligazama. Oni su uključeni u replikaciju i popravak DNA, katalizirajući nastajanje fosfodiesterske veze između 3'-hidroksilne skupine na kraju jedne DNA i 5'-fosfatne skupine na kraju druge DNA uz utrošak ATP-a.¹⁶



Slika 6. Za ligaciju potrebni su vektor i insert razgrađeni istim restrikcijским enzimom. Ljepljivi krajevi pomažu DNA ligazi da ih uspješno poveže u pravoj orijentaciji.¹⁶

1.4.2. Lančana reakcija polimeraze (PCR)

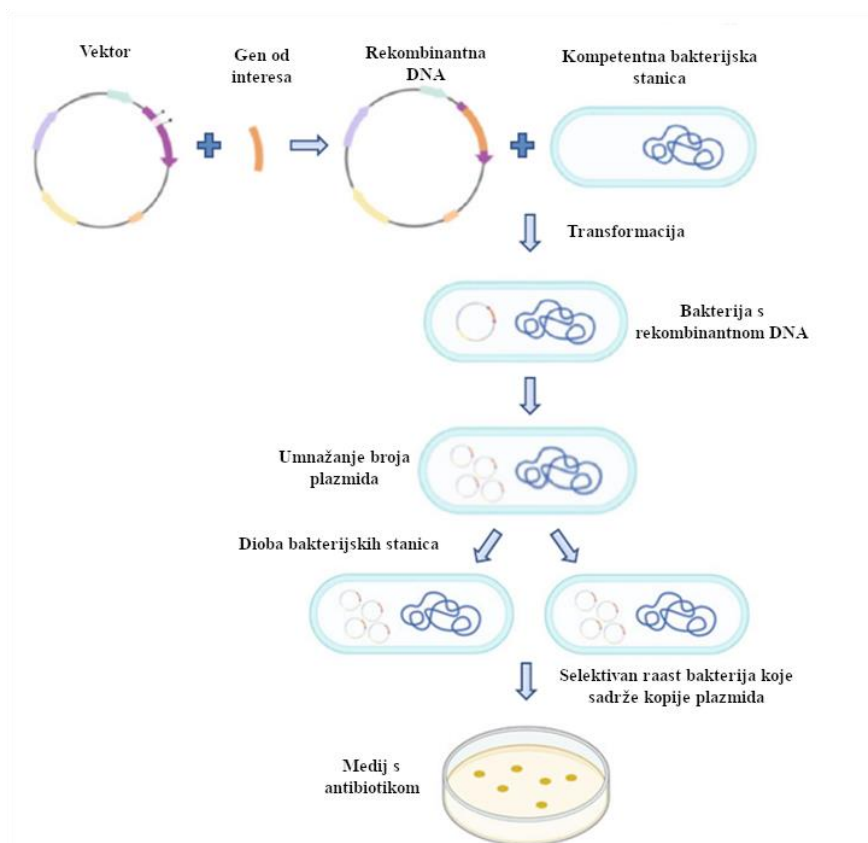
Lančana reakcija polimeraze (PCR, eng. *polymerase chain reaction*) je jednostavna metoda umnažanja specifičnih DNA fragmenata *in vitro*. U PCR-u denaturira se dvolančana DNA, početnice se sparuju s komplementarnim dijelom DNA, a DNA-polimeraza započinje sintezu novog DNA lanca. Ovaj proces se ponavlja u više ciklusa kako bi se dobio umnoženi PCR produkt.¹⁶



Slika 7. Općeniti koraci tijekom lančane reakcije polimeraze (PCR).¹⁶

1.4.3. Kloniranje

Kloniranje, proces repliciranja DNA iz jedne stanice pri čemu nastaje velik broj stanica s identičnom DNA, postalo je uobičajena praksa za stvaranje kopija (klonova) određenog gena ili DNA sekvence. Ova tehnika uključuje prijenos DNA fragmenta od interesa u prikladan vektor i umnažanje te rekombinantne molekule u stanicama domaćina. Kloniranje gena koristi se za sekvenciranje DNA, mutagenezu, genotipizaciju ili heterolognu ekspresiju proteina, čime se otkriva mnogo o strukturi i funkciji gena.¹⁶



Slika 8. Koraci u kloniranju gena.¹⁶

1.4.4. Mutageneza

Mutageneza je proces promjene DNA nekog organizma, koji dovodi do mutacije gena. Mutacija je trajna i nasljedna promjena u genetičkom materijalu, koja može dovesti do promjene funkcije proteina i fenotipskih promjena.

Mutageneza je pokretačka snaga evolucije. Promjene genotipa mogu nositi povoljna ili nepovoljna svojstva fenotipa koje utječu na prilagođenost organizma. Mutageneza DNA u prirodi se događa spontano ili kao rezultat djelovanja mutagena. Nadalje, tehnike molekularne genetike poput PCR-a revolucionizirale su način na kojih se dolazi do mutacija i kako ih se proučava.

Mutacije se dijele na: tihe (eng. *silent*), pogrešne (eng. *missense*), besmislene (eng. *nonsense*) i pomake okvira čitanja (eng. *frameshift*). Kod tih mutacija dolazi do zamjene nukleotida koji kodira istu aminokiselinu. Kod pogrešnih mutacija dolazi do promjene aminokiseline, a kod besmislenih mutacija promijenjeni nukleotid rezultira stop kodonom. Adicijom ili delecijom nukleotida nedijeljivih s 3 dolazi do pomaka okvira čitanja, a postoje i

drugi tipovi mutacija, koji uključuju mjesta prekrajanja (eng. *splice site*), promotor ili pojačivački slijed te mjesta terminacije transkripcije.

Uzroci mutageneze mogu biti endogeni ili egzogeni. Endogeni se dijele na: pogreške u replikaciji DNA, pogreške u mehanizmima popravka DNA, spontane deaminacije baza, oksidacijsko oštećenje DNA, metilaciju baza i nastajanje apurinskih i apirimidinskih mjesta. Egzogene uzroke čine: ionizirajuće zračenje, ultraljubičasto zračenje (UV, eng. *ultraviolet*), alkilirajući reagensi i aromatski amini, policiklički aromatski ugljikovodici, unakrsno povezivanje (eng. *crosslinking*), toksini i laboratorijske tehnike.

Mutageneza se koristi u molekularnoj biologiji za stvaranje mutiranih gena, proteina i organizama. Dvije osnove tehnike su mjesno-specifična mutageneza (SDM, eng. *site-directed mutagenesis*) i nasumična i ekstenzivna mutageneza (REM, eng. *random-and-extensive mutagenesis*).¹⁷

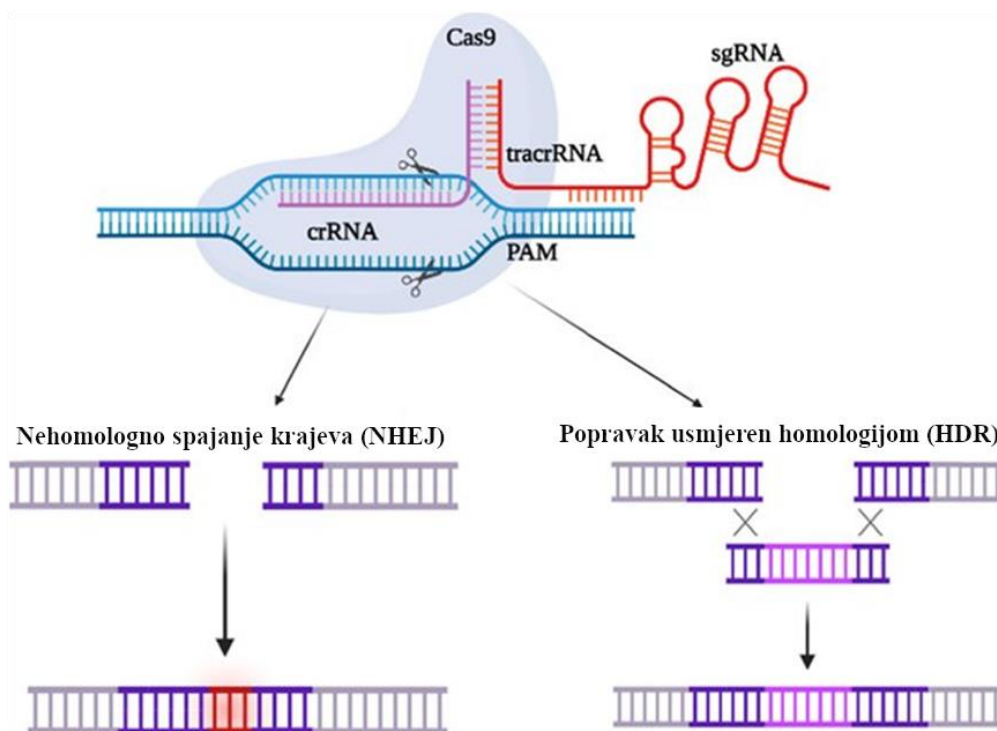
1.4.5. CRISPR/Cas sustav

Tehnologija uređivanja gena omogućuje precizno modificiranje sekvence genoma uvođenjem insercija, delecija ili zamjena baza. Razvijene su tri generacije tehnologija za uređivanje gena: nukleaze s cinkovim prstima (ZFNs, eng. *zinc-finger nucleases*), efektorske nukleaze nalik aktivatoru transkripcije (TALENs, eng. *transcription activator-like effector nucleases*) i sustav naizmjeničnih ponavljanja palindroma i razmaknica (CRISPR, eng. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) i CRISPR-povezanog proteina 9 (Cas 9, eng. *CRISPR-associated protein 9*).¹⁸

CRISPR/Cas sustav je obrambeni mehanizam bakterija i arhea protiv infekcije bakteriofagima i prijenosa plazmida, koji se temelji na prepoznavanju i razgradnji egzogenih genetičkih elemenata.^{18,19} Sastoji se od tri ključna koraka: adaptacije (stjecanja razmaknice), crRNA sinteze (ekspresije) i interferencije (cijepanja), a potrebni su samo vodička RNA (gRNA, eng. *guide RNA*) i Cas9.¹⁹

Prilikom prve infekcije, bakterija dio strane DNA, koji sadrži motiv obogaćen gvaninom (eng. *guanine-enriched sequence*) u susjedstvu proto-razmaknice (PAM, eng. *protospacer-adjacent motif*), ugradi u regiju CRISPR razmaknica. Ako dođe do ponovne infekcije istom DNA, započinje transkripcija CRISPR regije kojom nastaje pre-crRNA. Ona je komplementarna tracrRNA – ponavljajućoj regiji u CRISPR nizu. tracrRNA se veže na Cas9 te komplementarnim sparivanjem s pre-crRNA nastaje dvolančana RNA i pre-crRNA se veže

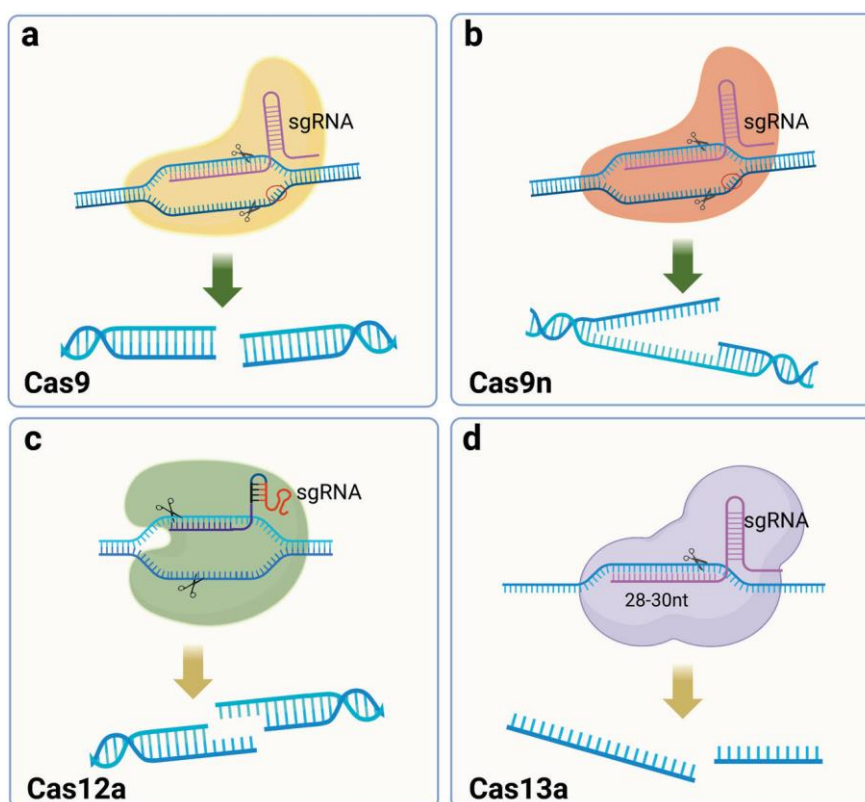
na Cas9. Pre-crRNA dozrijeva u crRNA, koja prepoznaje stranu DNA te ju Cas protein pocijepa.¹⁸ Cas se sastoji dvije regije: režnja za prepoznavanje (REC, eng. *recognition lobe*) i nukleaznog režnja (NUC, eng. *nuclease lobe*). REC se sastoji od REC1 i REC2, koje služe za vezanje vodičke RNA (gRNA, eng. *guide RNA*), dok se NUC sastoji od Ruv-C i HNH nukleazne domene te domena koje ostvaruju interakcije s PAM-ovima (eng. *PAM interacting domains*). RuvC i HNH svaka režu jedan lanac DNA, te je Cas9 poznat i kao „genetičke škare“.¹⁹



Slika 9. CRISPR/Cas9 sustav sastoji se od: endonukleaze Cas9, CRISPR RNA (crRNA) i transaktivirajuće crRNA (tracrRNA). Vodička RNA (gRNA) je dvolančana struktura sačinjena od crRNA i tracrRNA. sgRNA (oko 20 parova baza) je komplementarna ciljnom dijelu DNA i na svom kraju ima kratku PAM sekvencu potrebnu za vezanje Cas9. Cas9 radi dvolančani lom uzvodno od PAM. Stanica dvolančane lomove popravlja nehomolognim spajanjem krajeva ili popravkom usmjerenim homologijom.²⁰

Vodička RNA sastoji se od CRISPR RNA (crRNA) i trans-aktivirajuće CRISPR RNA (tracrRNA, eng. *trans-activating CRISPR RNA*). crRNA čini 18-20 parova baza, koji određuju ciljnu stranu DNA. tracrRNA čini niz petlji koji služe za vezanje Cas9. Cas9 potom cijepa dvolančanu DNA uzvodno od PAM. Dvolančani lom se popravlja nehomolognim spajanjem krajeva (NHEJ, eng. *non-homologous end joining*) ili popravkom usmjerenim homologijom (HDR, eng. *homology-directed repair*).¹⁹

Kod prokariota, vodička RNA prepoznaje virusnu DNA, ali sada je moguće dizajnirati fuzijski transkript (sgRNA, eng. *single guide RNA*) kojeg čine crRNA i tracrRNA, a koji prepoznaje sekvencu gotovo bilo kojeg gena.^{18,19} Osim toga, fuzioniranjem odgovarajućih deaminaza s katalitički inaktivnim Cas9 (d-Cas9) razvijeni su uređivači baza: uređivač citozinske baze (mijenja citozin u timin; CBE, eng. *cytosine base editor*) i uređivač adeninske baze (mijenja adenozin u gvanozin; ABE, eng. *adenine base editor*). Također, razvijen je prime editor (PE), u kojem je Cas9 nikaza fuzionirana s reverznom transkriptazom i multifunkcionalnom pegRNA (eng. *primer editing guide RNA*). PE može ispraviti svih 12 mogućih tranzicija i transverzija te male insercijske i delecije mutacije u genetičkim poremećajima.¹⁹



Slika 10. Shematski prikaz alata za cijepanje DNA/RNA. a) Cas9 cijepa dvolančanu DNA tako da nastaju tupi krajevi. b) Cas9 nikaza (Cas9n) cijepa samo jedan lanac DNA. c) Cas2a cijepa dvolančanu DNA tako da nastaju ljepljivi krajevi. d) Cas13a prepoznaje i cijepa RNA.¹⁸

Stoga je ova tehnologija našla svoju primjenu u brojnim područjima, poput medicine, agronomije i biotehnologije.¹⁹ CRISPR alati se mogu koristiti za cijepanje jednog ili oba lanca DNA, za uređivanje baza, regulaciju ekspresije gena, kao epigenetički modifikacijski alat i za prepoznavanje i cijepanje RNA.¹⁸ Neke od kliničkih primjena uključuju gensku terapiju (za

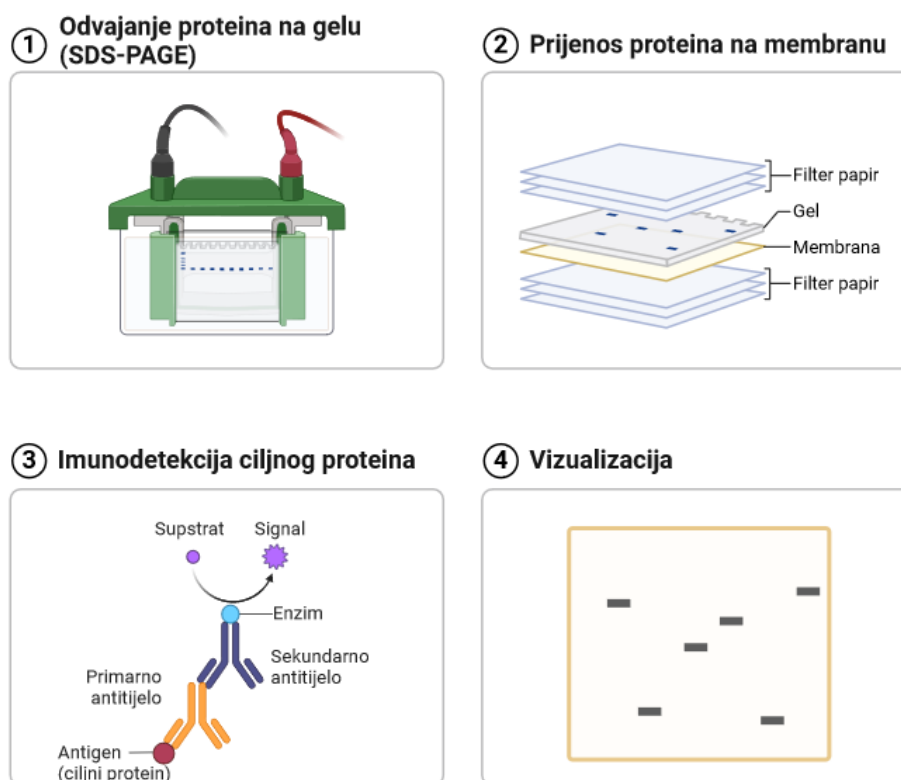
srpastu anemiju, β -talasemiju, cističnu fibrozu i mišićnu distrofiju),¹⁹ liječenje infektivnih bolesti poput HIV-a, detekciju SARS-CoV-2,¹⁸ bolesti jetre, kardiovaskularnih bolesti, neurodegenerativnih bolesti¹⁸ i raka.^{18,19,21}

No, javljaju se i određena ograničenja kod ove tehnologije. Može doći do pogrešnog sparivanja baza sgRNA i neželjenog mjesta, promjena u genomu na drugim mjestima osim željenog, kromosomskih translokacija, delecija velikih fragmenata i slično.¹⁸

Dodatne poteškoće prisutne su zbog imunogeničnosti, pronalaska odgovarajućeg sustava prijenosa i etičkih pitanja.¹⁹

1.5. *Western blot* analiza proteina

Western blot je imunokemijska metoda koja omogućuje specifično prepoznavanje željenih proteina te se često primjenjuje u staničnoj i molekularnoj biologiji. Temelji se na tri ključna koraka: odvajanje proteina prema veličini, prijenos na membranu te označavanje ciljnog proteina odgovarajućim primarnim i sekundarnim antitijelom.²² Prijenos proteina na membranu (*western blot*) je nastao po uzoru na prijenos DNA (*Southern blot*, osmislio Edwin Southern) i RNA (*northern blot*) na membranu, pri čemu je zadržan „geografski“ način imenovanja.²³



Created in BioRender.com bio

Slika 11. Ključni dijelovi metode *western blota*. Proteini se pomoću metode SDS-PAGE-a odvajaju prema masi, potom se prenose iz gela na membranu, ciljni proteini se detektiraju pomoću specifičnih primarnih i sekundarnih antitijela te vizualiziraju.

Izolirani proteini se prvo razdvajaju prema veličini elektroforezom na poliakrilamidnom gelu uz dodatak natrijevog dodecil-sulfata (SDS-PAGE, eng. *sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis*). Elektroforeza je separacijska tehnika u kojoj se čestice gibaju pod utjecajem električnog polja. U metodi SDS-PAGE koristi se anionski detergent, natrijev dodecil-sulfat koji se veže na peptidne lance i daje im veliki negativan naboj, koji je proporcionalan masi proteina. Na taj način, proteini se odvajaju isključivo prema svojoj masi, naboj nativnog proteina je zanemariv. Manji proteini lakše prolaze kroz pore gela, te brže putuju nego veliki proteini.²⁴

Nakon razdvajanja po masi, proteini se imobiliziraju, to jest prenose na membranu. Ovisno o potrebama eksperimenta, najčešće se koriste membrane od nitroceluloze ili od poliviniliden-fluorida (PVDF, eng. *polyvinylidene fluoride*). Prijenos na membranu moguć je na više načina: jednostavnom difuzijom, protokom otapala uz pomoć vakuuma („vakuumsko

blotanje“) ili elektroforetskom elucijom („elektroblotanje“ koje se još dijeli na mokri prijenos i „polu-suhi“ prijenos).

Nakon prijenosa proteina na membranu, potrebno je spriječiti da se primarna antitijela vežu nespecifično na membranu. Stoga se membrana blokira u 5% otopini goveđeg serumskog albumina (BSA, eng. *bovine serum albumin*) ili obranog mlijeka. Potom slijedi inkubacija s primarnim antitijelom koje je specifično za ciljni protein (antigen), ispiranje nevezanih primarnih antitijela s membrane te inkubacija sa sekundarnim antitijelom (specifično za primarno antitijelo), koje je često konjugirano s enzimom, poput peroksidaze iz hrena (HRP, eng. *horseradish peroxidase*), što dodatkom supstrata za HRP omogućuje vizualizaciju rezultata.²³

§ 2. CILJEVI

Cilj ovog rada je priprema plazmidnih vektora za tranzijentnu ekspresiju divljeg tipa proteina DPP3, SH2D3C izoforme 1 i SH2D3C izoforme 2 s HA epitopom na N-kraju u staničnim linijama sisavaca pomoću rekombinacijskog kloniranja. Ovi vektori će dalje služiti u istraživanju interakcija DPP3-SH2D3C i njihovih fizioloških značaja.

Drugi cilj je pomoću mjesno specifične mutageneze pripremiti plazmidne vektore za tranzijentnu ekspresiju mutiranih varijanti DPP3, G585A i G585E, s FLAG epitopom na N-kraju, u staničnim linijama sisavaca, kako bi se u daljnjem istraživanju ispitaio utjecaj mutacija u kodirajućoj regiji gena DPP3, koje su nađene u uzorcima zloćudnih tumora, na NRF2-KEAP1 signalni put.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Standardne kemikalije

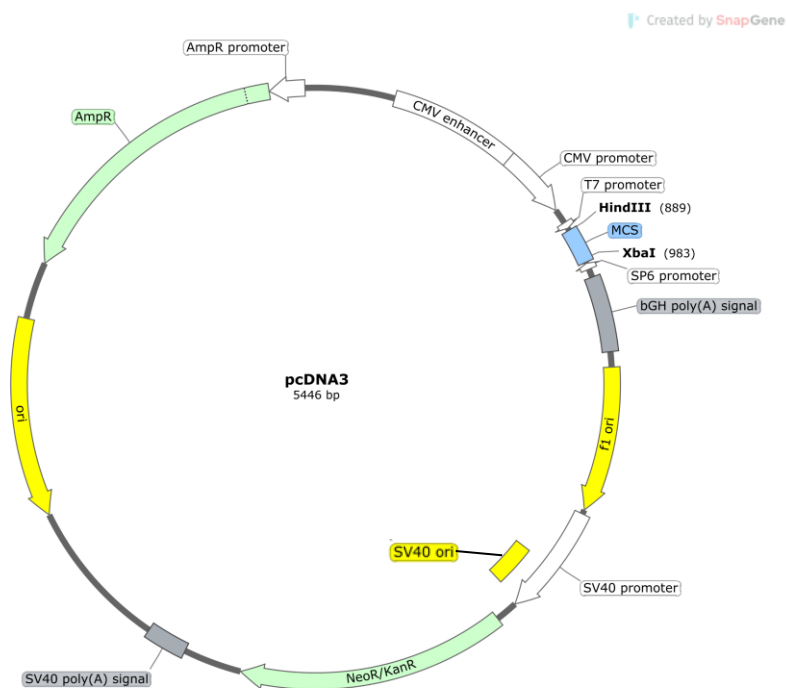
U izradi ovog rada korištene su sljedeće kemikalije: agar (*Carl Roth*), agarozna (*Carl Roth*), akrilamid/bisakrilamid (*Carl Roth*), amonijev peroksidisulfat (APS; *Sigma*), ampicilin (*Carl Roth*), glicerol (*Kemika*), Luria-Bertani agar (LB agar; *Carl Roth*), Triton X100 (*Carl Roth*), natrijev klorid (*GramMol*), natrijev dodecilsulfat (SDS; *Carl Roth*), N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (TEMED; *Serva*), tris(hidroksimetil)-aminometan (Tris; *Carl Roth*), glicin (*Carl Roth*), octena kiselina (*LabExpert*), etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA; *Sigma*), β-merkaptotanol (*Sigma*), Tween 20 (*Carl Roth*), etanol (*Kemika*), klorovodična kiselina (HCl; *Kemika*), metanol (*Kemika*), natrijev hidroksid (*Kemika*), tripsin (*Calbiochem*), fosfatno puferirana fiziološka otopina (eng. *Phosphate Buffered Saline*, PBS; *Invitrogen*), TRIzol™ Reagent (*Invitrogen*), izopropanol (*GramMol*), DMEM (eng. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*; *Thermo Fisher Sci.*), Opti-MEM (*Thermo Fisher Sci.*), Lipofectamine 2000 (*Thermo Fischer Sci.*), natrijev deoksikolat (*Sigma*), Coomassie Brilliant Blue R-250 (*Merck*), bromfenol plavo (*Sigma*), glukoza (*Sigma*), magnezijev klorid (MgCl₂, *Kemika*), albumin iz seruma goveda (BSA; *Sigma*), nemasno mlijeko u prahu (*Carl Roth*), Ponceau S (*Carl Roth*), etidij-bromid (*Sigma*), SOC medij (eng. *Super Optimal broth with Catabolite repression*; priredili sami u laboratoriju), triton (*Carl Roth*), kvašćev ekstrakt (*Carl Roth*).

Osim toga, korišteni su komercijalno dostupni kompleti za ciljanu *in vitro* mutagenezu *QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (*Agilent*), za pročišćavanje DNA iz gela *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (*Promega*), za rekombinacijsko kloniranje *In-Fusion HD Cloning Kit* (*Takara Bio USA*), za izolaciju i pročišćavanje plazmida iz bakterija *GeneJet Plasmid Miniprep Kit* (*Thermo Fisher Sci.*) i *ZymoPURE II Plasmid Midiprep Kit* (*Zymo Research*) te za kemiluminiscencijsku detekciju *western blot* analize *Amersham ECL Western Blotting Detection Kit* (*GE Healthcare*).

3.1.2. Plazmidi

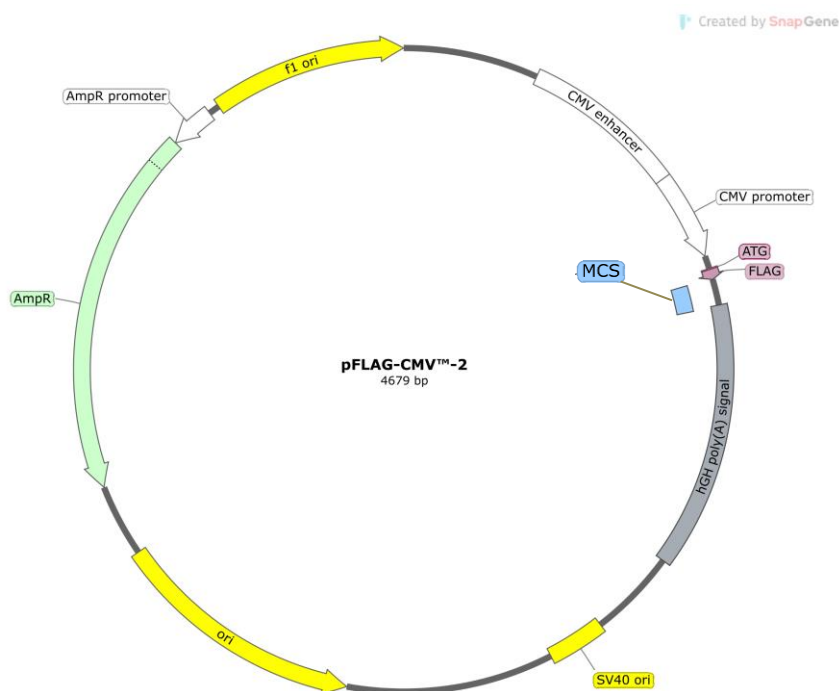
Korišteni su plazmidni vektori:

1. pcDNA3.0 za ekspresiju divljeg tipa DPP3, izoforme 1 SH2D3C i izoforme 2 SH2D3C – plazmid s humanim citomegalovirus promotorom (CMV) za ekspresiju proteina (slika 12).



Slika 12. Mapa plazmidnog vektora pcDNA3.0 izvezena iz programa Snapgene.

2. pFLAG-CMV-2 za ekspresiju mutanata DPP3 (G585A i G585E) – plazmid s humanim citomegalovirus promotorom (CMV) za ekspresiju proteina obilježenih FLAG epitopom (sekvenca: DYKDDDDK, veličine 1,0 kDa) epitopom na N-kraju u stanicama sisavaca (slika 13).



Slika 13. Mapa plazmidnog vektora pFLAG-CMV-2 izvezena iz programa Snapgene.

3. Prethodno pripravljan pcDNA4 TO s cDNA insertom koji kodira divlji tip DPP3, SH2D3C izoformu 1 i izoformu 2 s HA epitopom (sekvenca YPYDVPDYA, veličine 1,1 kDa) na N-kraju.

3.1.3. Markeri veličina DNA i proteina te boje za detekciju

Za poliakrilamidnu gel-elektroforezu korišten je marker veličina *Precision Plus Protein Standards Unstained* (BioRad) i *Page Ruler Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Sci.) te za agaroznu gel-elektroforezu marker veličina *MassRuler DNA ladder mix* (Thermo Fisher Sci.). Za nanošenje uzoraka u agaroznoj elektroforezi korišten je *6X MassRuler DNA Loading Dye* (Thermo Fisher Sci.) i za detekciju DNA korišten je etidij-bromid (Sigma) te Ponceau S (Carl Roth) za detekciju proteina.

3.1.4. Enzimi i antitijela

Za potrebe ovog rada korištene su HALT inhibitori proteaza (Thermo Fisher Sci.), proteinaza K (Sigma-Aldrich), restrikcijske endonukleaze: *DpnI* (Agilent), *HindIII*, *XbaI* (Thermo Fisher Sci.), DNA-polimeraze: *Pfu* Ultra High Fidelity DNA-polimeraza (Agilent), *Phusion* DNA-polimeraza (Thermo Fisher Sci.),

primarna antitijela: anti-HA antitijelo iz kunića (*Sigma*), anti-DPP3 antitijelo iz kunića (*Abcam*), anti-SH2D3C antitijelo iz kunića (*Abcam*), anti-FLAG antitijelo iz kunića (*Sigma*), sekundarna antitijela: anti-kuniće antitijelo iz kože na koje je vezana peroksidaza iz hrena (HRP, eng. *horse radish peroxidase*; *Sigma*).

3.1.5. Sojevi bakterija *Escherichia coli*

Tijekom izrade ovog rada korištene su DH5 α kompetentne stanice (*NEB*), XL10-Gold ultrakompetentne stanice (*Agilent*) i Stellar kompetentne stanice (*Takara Bio USA*) *E. coli*.

3.1.6. Stanična linija sisavaca HEK293FT

U svrhu ekspresiju proteina u stanicama sisavaca korištene su humane embrionalne stanice bubrega (HEK293FT), dizajnirane za potrebe lentiviralne produkcije. Stabilno ekspimiraju SV40 T-antigen, koji je pod kontrolom konstitutivnog citomegalovirusnog promotora (CMV). HEK293FT stanice su adherentne te na odgovarajućoj podlozi rastu kao monosloj formirajući manje agregate.

3.2. Metode rada s bakterijama

3.2.1. Rad u sterilnim uvjetima

Rad s bakterijama provodi se u sterilnim uvjetima kako bi se smanjile moguće kontaminacije. Prije početka rada radna površina i oprema dezinficiraju se 70%-tim etanolom. Svi postupci provode se uz otvoreni plamen te se koriste sterilne otopine autoklavirane pri 121°C.

3.2.2. Transformacija bakterijskih stanica

Transformacija je unos DNA u bakterijsku stanicu. Najčešće se koriste elektroporacija i transformacija toplinskim šokom.^{25,26} Elektroporacija je fizikalna metoda koja koristi kratke elektrošokove visokog napona što privremeno stvara pore na staničnoj membrani kroz koje makromolekule mogu ući ili izaći.²⁵ Ova metoda je korištena za transformaciju *E. coli* DH5 α s pcDNA3 vektorom. U 30 μ L elektrokompetentnih DH5 α stanica dodan je 1 μ L plazmida pcDNA3 ($\gamma = 66,3$ ng/mL). Smjesa je prebačena u ohlađenu kivetu za elektroporaciju (Carl Roth) te izložena elektrošoku napona 2,5 kV u trajanju 5 ms u elektroporatoru. Potom je dodan 1 mL LB medija temperature 37°C te je smjesa prebačena u 1,5 mL Ependorf epruvetu da se inkubira 1 h na 37°C. Smjesa je centrifugirana 2 min pri 4000 g, supernatant je uklonjen, a talog otopljen u 150 μ L LB medija. Na hranjivu podlogu s ampicilinom (LB+agar) u petrijevcu nanoseno je po 100 μ L suspenzije te su stanice inkubirane preko noći na 37°C.

Transformacija toplinskim šokom korištena je za unos plazmida pFLAG, pFLAG-DPP3, pFLAG-DPP3_ G585A, pFLAG-DPP3_ G585E, pcDNA3-HA, pcDNA3-HA-DPP3, pcDNA3-HA-SH2D3C-iso1 i pcDNA3-HA-SH2D3C-iso2 u *E. coli*. Nakon mjesno-specifične mutageneze i restrikcije s *DpnI*, u 20 µL XL 10 Gold kompetentnih stanica dodano je 0,9 µL β-merkaptioetanol, lagano promiješano te inkubirano 10 min na ledu. Zatim je dodano 0,9 µL iz PCR smjese, promiješano i inkubirano na ledu 30 min. Smjesa je prebačena u termoblok na 30 s na 42°C pa 2 min na led. Stanicama je dodano 500 µL LB medija (uz dodatak 10 µL 10% glukoze i 12,5 µL 0,25 mol/L MgCl₂) te su inkubirane 1h na 37°C pri 300 rpm. Potom je 250 µL smjese nasadeno na LB agar ploče s ampicilinom. Ploče su inkubirane preko noći na 37°C. Stellar kompetentne stanice *E. coli* transformirane su pcDNA3 plazmidima. Alikvotima od 30 µL stanica dodano je 1,5 µL In-Fusion reakcijske smjese i lagano promiješano. Smjese su inkubirane 30 min na ledu, pa prebačene u termoblok na 45 s na 42°C te 2 min na led. Dodano je 500 µL SOC medija temperature 37°C, smjesa je inkubirana 1 h na 37°C pri 300 rpm te je na LB agar ploče s ampicilinom nanoseno 100 µL transformacijske smjese dvaju razrjeđenja (razrjeđenje 1:2, a ostatak smjese je istaložen i resuspendiran u 100 µL SOC medija). Ploče se inkubiraju preko noći na 37°C.

3.2.3. Priprema bakterijskih kultura

Za uzgoj prekonocnih kultura sterilnom ezom postrugane su glicerolske kulture te nasadene u 10 mL LB medija s 10 μ L ampicilina. Tako pripremljena kultura inkubirana je preko noci na 37°C pri 220 rpm.

Za uzgoj glavnih kultura za izolaciju plazmida *ZymoPURE II Plasmid Midiprep Kit*-om, u 100 mL LB medija sa 100 μ L ampicilina dodano je 600 μ L prekonocne kulture te inkubirano preko noci na 37°C pri 220 rpm.

3.2.4. Priprema glicerolskih kultura za dugotrajnu pohranu bakterijskih stanica

Glicerolske bakterijske kulture koriste se za dugotrajnu pohranu bakterijskih kultura sa zeljenim plazmidom. Pripremi se prekonocna bakterijska kultura s odgovarajucim plazmidom nakon cega se 1 mL prekonocne kulture pomiješa sa 450 μ L glicerola volumnog udjela 50%. Glicerolske bakterijske kulture pohranjuju se na -80 °C.

3.3. Metode rada s nukleinskim kiselinama

3.3.1. Izolacija plazmidne DNA

Bakterijska kultura je uzgojena na 37°C uz ampicilin te je plazmidna DNA izolirana pomoću komercijalnog kompleta *GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Sci)* prema uputama proizvođača iz 6 mL kulture.²⁷ Talog stanica se resuspendira i podvrgne alkalnoj lizi. Razara se stanična membrana te denaturiraju proteini i DNA. Suspenziji se doda pufer za neutralizaciju pri čemu dolazi do taloženja kompleksa proteina, SDS-a i genomske DNA, a renaturacije plazmidne DNA. Supernatant s plazmidnom DNA se prenosi na kolonu, ispire te eluira puferom niske ionske jakosti. Koncentracija i čistoća izolirane plazmidne DNA provjerava se spektrofotometrijskim mjerenjem pri 260 nm.

3.3.2. Spektrometrijsko mjerenje koncentracije DNA

Za određivanje čistoće i koncentracije plazmidne DNA mjerena je apsorbancija pri 260 nm jer nukleinske kiseline snažno apsorbiraju pri toj valnoj duljini zahvaljujući rezonantnim strukturama pirimidinskih i purinskih baza.²⁸ Za spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije DNA na spektrometru *BioDrop (Biochrom)* korišteno je 2 μ L uzorka.

Prilikom mjerenja dobivaju se i omjeri A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230} pri čemu je poznato da za čistu DNA omjer A_{260}/A_{280} iznosi oko 1,8, a omjer A_{260}/A_{230} 2,0-2,2.

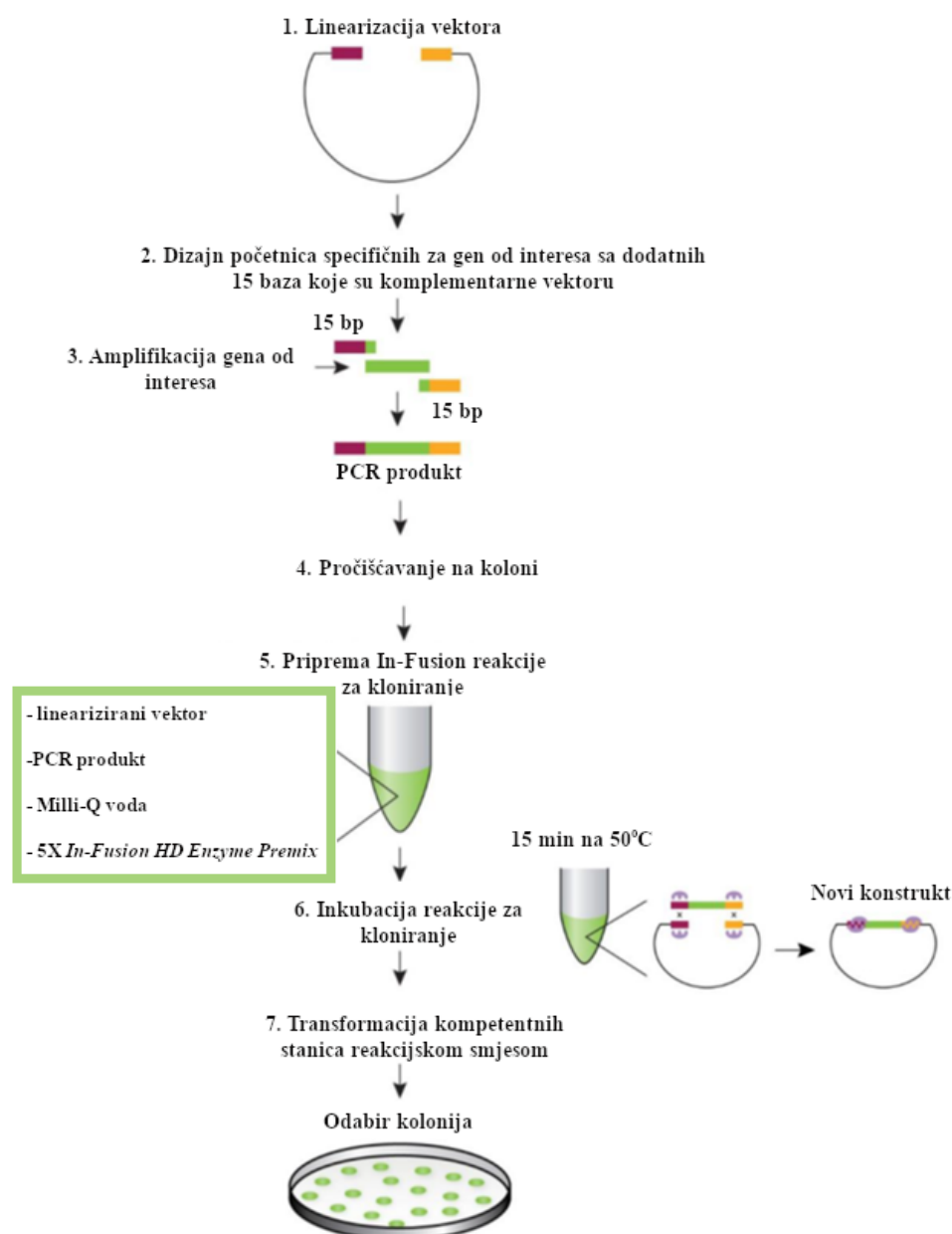
Pri 280 nm apsorbiraju bočni ogranci aromatskih aminokiselina posebice triptofana, dok pri 230 nm apsorbiraju ugljikohidrati, EDTA, gvanidinijev hidroklorid i fenoli.²⁹

3.3.3. Mjesno-specifična mutagenеза

Mjesno-specifična mutagenеза, još zvana ciljana, koristi mutagene početnice koje uvode mutacije na ciljanom mjestu DNA slijeda. Koristi se za proučavanje utjecaja na gene ili funkciju DNA te važnost pojedinih aminokiselina za strukturu i funkciju proteina.³⁰ Obično se koriste oligonukleotidi koji su komplementarni plazmidnoj DNA, ali sadrže mutaciju s pogrešno sparenim bazama (eng. *mismatch*).^{30,31} QuickChange sustav³² se temelji na lančanoj reakciji polimeraze (PCR): denaturaciji početne DNA, sljepljivanja i produljenja mutagenih početnica uz pomoć DNA-polimeraze. Roditeljska DNA se poslije razgrađuje uz pomoć DpnI endonukleaze, koja cijepa metiliranu i hemimetiliranu DNA. Novosintetizirana DNA s mutiranom sekvencom se pročisti i transformira u kompetentne stanice koje poprave urez nastao na 5' kraju početnica. Tijekom provođenja ciljane mutagenезе korišten je komercijalno dostupan komplet *QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent)*. Dizajnirane uzvodne i nizvodne mutagene početnice za DPP3 mutante prema uputama proizvođača prikazane su u tablici 1. U dizajnu je korišten online alat NEBaseChanger.³³

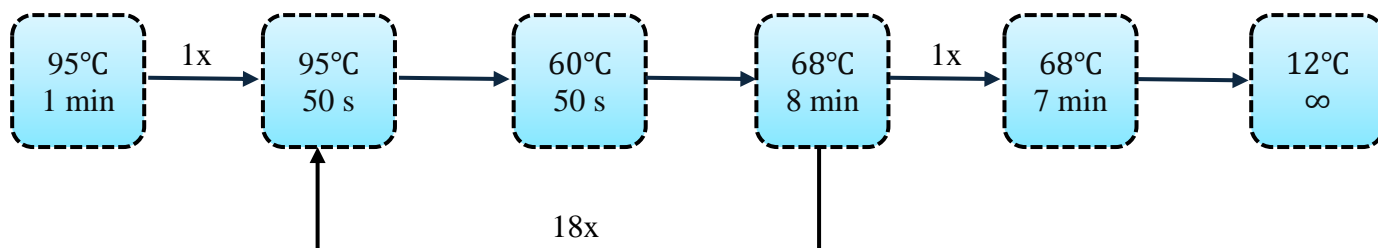
Tablica 1. Konstruirane početnice za mutagenезу s podebljanim i podvučenim mutiranim bazama.

Početnica	Udio GC	$T_m/^\circ\text{C}$	Nukleotidni sljed 5'→3'
DPP3_G585A.for	63	77	GAGGCTGGCGAGG C ACTCGTTACCATC
DPP3_G585A.rev	63	77	GATGGTAACGAGT G CCTCGCCAGCCTC
DPP3_G585E.for	60	78	GGAGGCTGGCGAGG A ACTCGTTACCATCAC
DPP3_G585E.rev	60	78	GTGATGGTAACGAGT I CCTCGCCAGCCTCC



Slika 14. Shema mjesno specifične mutageneze s mutagenim početnicama (mutacija je označena s „X“).³²

Za provedbu željenih mutacija DPP3 korišteno je: 0,7 μmol uzvodne početnice, 0,7 μmol nizvodne početnice, 25 ng vektora pFLAG-CMV2-DPP3, 1,5 μL pufera QuickSolution, 0,5 μL smjese deoksiribonukleozid trifosfata, 2,5 μL 10x reakcijskog pufera, 14,1 μL Milli-Q vode i 0,5 μL DNA-polimeraze visoke vjernosti PfuUltra (2,5 U/ μL). Mutagenaza je provedena u uređaju Thermal Cycler T100 (BioRad) prema temperaturnom programu prikazanom na slici 15.



Slika 15. Temperaturni program korišten u lančanoj reakciji polimeraze u sklopu ciljane mutageneze.

Potom je u reakcijske smjese dodano 0,5 μL DpnI (10 U/ μL). Reakcijske smjese su promiješane i centrifugirane 1 min pri 4000 g te inkubirane 1 h na 37°C. Uzorci su dalje korišteni za transformaciju XL 10 Gold ultrakompetentnih stanica.

3.3.4. Linearizacija vektora pcDNA3

Plazmid pcDNA3 lineariziran je cijepanjem restriktivskih endonukleaza HindIII i XbaI prema protokolu: 5 μg plazmida ($\gamma = 339 \text{ ng}/\mu\text{L}$), 5 μL HindIII, 5 μL XbaI, 10 μL 10x Fast Digest Buffer i Milli-Q vode do 100 μL . Reakcija je provedena 15 min na 37°C te su endonukleaze inaktivirane grijanjem na 80°C 10 min. Potom su nepocijepani i pocijepani uzorci (4 μL Milli-Q vode, 1 μL 6x MassRuler i 1 μL plazmida) nanoseni na 1% agarozni gel. Korišteno je 5 μL markera *MassRuler DNA ladder mix* (Thermo Scientific).

3.3.5. Agarozna gel-elektroforeza

Elektroforeza na agaroznom gelu je najučinkovitija metoda odvajanja nukleinskih kiselina prema masi i stupnju superzavijenosti. Tijekom polimerizacije agaroze, u gelu nastaju pore koje djeluju kao molekularno sito. Fosfatna okosnica DNA i RNA je negativno nabijena te se u električnom polju gibaju prema pozitivno nabijenoj anodi. Nakon odvajanja, DNA se može vizualizirati pod UV svjetlom nakon bojanja. Najčešće se koristi etidijev bromid, koji interkalira među lance DNA.³⁴

Tijekom ovog rada korišteni su 1% agarozni gelovi u TAE puferu (c (Tris) = 40 mmol/L, c (octena kiselina) = 20 mmol/L, c (EDTA) = 1 mmol/L) za restriktivsku analizu plazmida pcDNA3 s HindIII i XbaI te izrezivanja restriktivskog produkta iz gela (75 V, 70 min), provjere fragmenata DPP3, SH2D3C-iso1 i SH2D3C-iso2 umnoženih PCR-om te njihovog izrezivanja iz gela (85 V, 75 min), te provjere željenih gena (DPP3, SH2D3C-iso1, SH2D3C-iso2) iz bakterijskih kolonija (100 V; 45 min).

Prilikom nanošenja uzoraka na gel dodaje im se odgovarajuća količina *6x DNA Gel Loading Dye (Thermo Fisher Scientific)*, koja omogućuje lakše praćenje elektroforeze i ulazak uzoraka u jažicu, te je korišten marker molekulskih veličina *MassRuler DNA ladder mix (Thermo Scientific)*. Nakon provedene elektroforeze, gel je bojan 10 min u 0,5 µg/mL otopini etidijevog bromida. Za vizualizaciju korišten je uređaj za detekciju fluorescencije GeneSnap (Syngene).

3.3.6. Izolacija DNA iz agaroznog gela

Nakon provedene elektroforeze na agaroznom gelu, željeni fragmenti DNA mogu se izolirati iz gela. Ova metoda korištena je za izolaciju lineariziranog pcDNA3 vektora i PCR produkata DPP3, SH2D3C-iso1 i SH2D3C-iso2. Pod UV svjetlom transiluminatora određene su pozicije željenih fragmenata te su izrezani dijelovi gela. Gel sa željenom DNA pročišćen je kompletom za pročišćavanje *Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega)*. Gelu je dodano 350 µL pufera za vezanje na membranu. Uzorak je grijan 10 min na 65°C pa prenesen na kolonu i centrifugiran 1 min na 16 000 g. Eluat je odbačen, dodano je 700 µL pufera za ispiranje pa centrifugirano 1 min na 16 000 g. Eluat je bačen, dodano je još 500 µL pufera za ispiranje te centrifugirano 1 min na 16 000 g. Eluat je bačen i kolona je opet centrifugirana 1,5 min na 16 000 g pa prebačena u čistu tubicu. Dodano je 28 µL Dnase free water, centrifugirano 5 min na 16 000 g i potom je izmjerena koncentracija izolirane DNA.

3.3.7. PCR umnažanje konstrukata HA-DPP3, HA-SH2D3C-iso1 i HA-SH2D3C-iso2

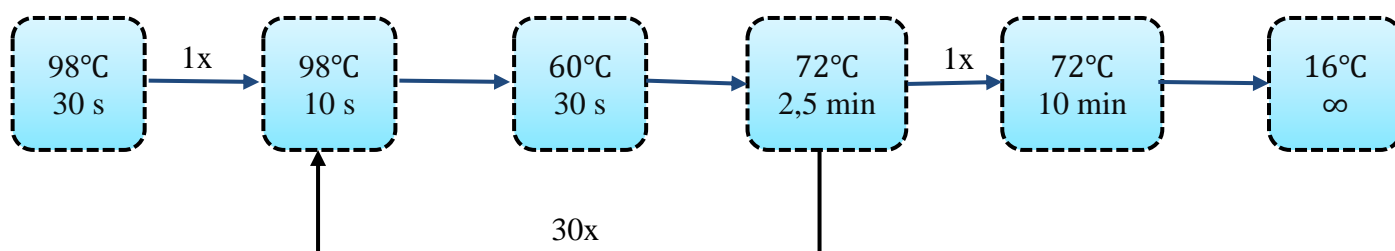
Postavljena je lančana reakcija polimeraze kako bi se umnožili željeni konstrukti za rekombinacijsko kloniranje: HA-DPP3, HA-SH2D3C-iso1 i HA-SH2D3C-iso2. Kao kalup korišteni su ~2 ng/µL pcDNA4-To-HA-DPP3, pcDNA4-To-HA-SH2D3C-iso1 i pcDNA4-To-HA-SH2D3C-iso2. Postavljene su reakcije s: 20 µL 5x HF pufera, 0,2 mmol/L dNTP, 0,2 µmol/L početnica, 40 pmol/L DNA kalupa, 1 µL Phusion DNA-polimeraze te dopunjene Milli-Q vodom do 100 µL. Uzvodna početnica pcDNA3-HA.for korištena je u sve 3 reakcije. Za umnažanje gena DPP3 korištena je nizvodna početnica pcDNA3-HA.rev, a za SH2D3C-iso1 i SH2D3C-iso2 nizvodna početnica pcDNA3-SH2D3C.rev (tablica 2).

Tablica 2. Početnice za umnažanje ciljnih gena (HA-DPP3, HA-SH2D3C-iso1 i HA-SH2D3C-iso2) prije rekombinacijskog kloniranja.

Početnica	Udio GC	T _m /°C	Nukleotidni sljed 5'→3'
pcDNA3-HA.for	43,5	62	AGGGAGACCCAAGCTTATGGGTTATCCGTATGATGTTCC
pcDNA3-DPP3.REV	52,6	60,2	AATAGGGCCCTCTAGAttaAGCTTGGCCAGATGGG
pcDNA3-SH2D3C.rev	73,3	60,9	AATAGGGCCCTCTAGAttaCaGCTCGCTGGAGCG

Amplifikacija željenih gena provedena je u uređaju Thermomixer comfort (*Eppendorf*).

Temperaturni program koji je korišten prikazan je na slici 16.



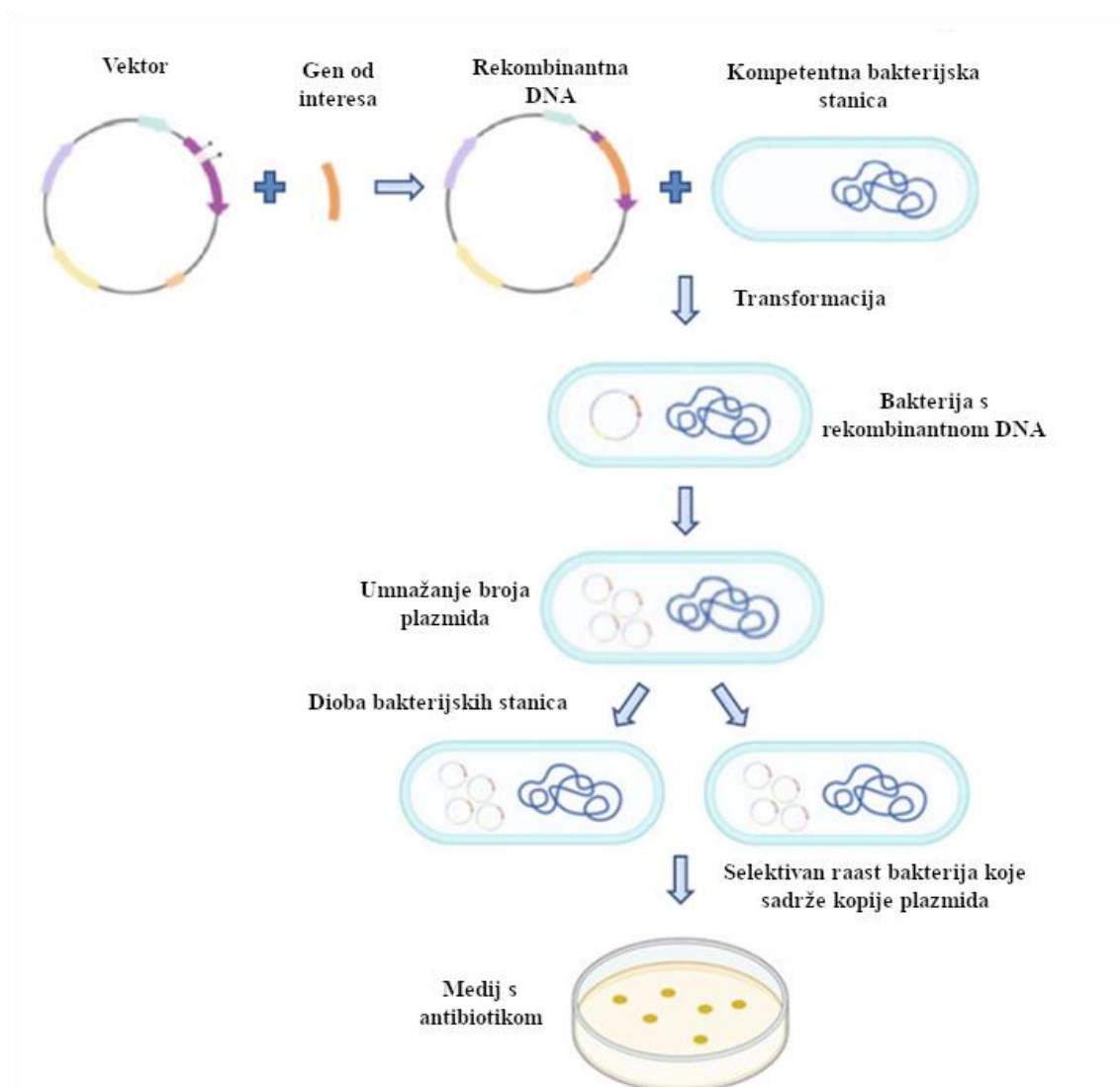
Slika 16. Temperaturni program korišten za amplifikaciju ciljnih gena (HA-DPP3, HA-SH2D3C-iso1 i HA-SH2D3C-iso2).

3.3.8. Rekombinacijsko kloniranje

Rekombinacijsko kloniranje je tehnika koja omogućuje brz i učinkovit prijenos željene DNA u više ekspresijskih sustava. To je metoda kloniranja u kojoj se homolognom rekombinacijom spajaju linearizirani vektor i PCR produkti s preklapajućim krajevima.³⁵



Slika 17. Prikaz vezanja početnica korištenih za amplifikaciju ciljnih gena na dijelove pcDNA3 vektora s označenim restriksijskim mjestima *HindIII* i *XbaI*. Nakon rekombinacijskog kloniranja između žuto označenih ljepljivih krajeva nalaze se geni od interesa.



Slika 18. Shema rekombinacijskog kloniranja iz uputa proizvođača.³⁶

Za rekombinacijsko kloniranje HA-DPP3, HA-SH2D3C-iso1 i HA-SH2D3C-iso2 konstrukata u pcDNA3 vektor korišten je *In-Fusion HD Cloning Kit* (Takara Bio USA). Online alat Promega korišten je u računu količina potrebnih konstrukata. Reakcije su postavljene s 40,82 ng pcDNA3 vektora u omjeru 1:2 sa željenih genima (tablica 3) i 1 μL 5X *In-Fusion HD Enzyme Premix*.

Tablica 3. Količine vektora i DNA korištenih u rekombinacijskom kloniranju.

Konstrukt	Veličina (bp)	γ / ng μL^{-1}	m / μg	n / pmol
pcDNA3	5446	12,37	40,82	11,36
HA-DPP3	2309	75,08	34,63	22,72
HA-SH2D3C-iso1	2663	57,92	39,94	22,72
HA-SH2D3C-iso2	2192	59,79	32,87	22,72

Nakon pripreme reakcija u PCR tubicama na sobnoj temperaturi, reakcijske smjese su inkubirane 15 min na 50°C te stavljene 2 min na led i korištene za transformaciju Stellar kompetentnih stanica.

3.3.9. PCR na kolonijama

Metoda PCR na kolonijama (eng. *colony PCR*) koristi se za provjeru sadrže li transformirane bakterije gen od interesa (DPP3, SH2D3C-iso1, SH2D3C-iso2). S LB agar ploča odabere se nekoliko pojedinačnih kolonija, mali dio kolonije resuspendira se u vodi te se 1 μL doda u 9 μL reakcijske smjese, koja sadrži 2x *GreenTaq mix*, uzvodnu CMV_for i nizvodnu BGH_rev početnicu te Milli-Q vodu (prema tablici 4).

Tablica 4. Sastav reakcijske smjese za PCR na kolonijama bakterija transformiranih genima od interesa (DPP3, SH2D3C-iso1, SH2D3C-iso2).

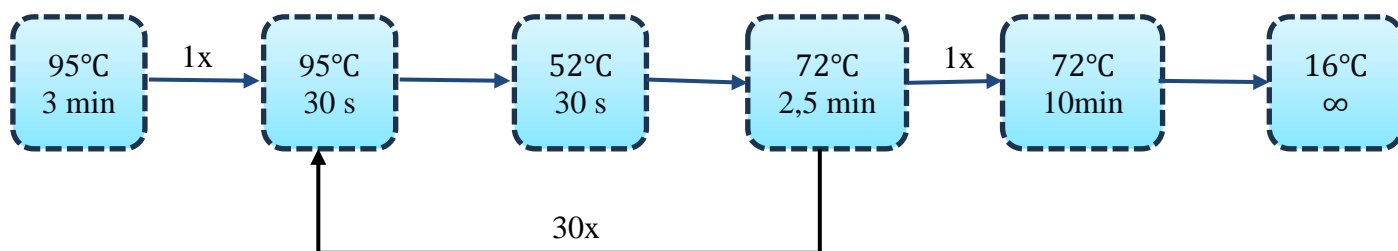
Reagens	Volumen / μL
Milli-Q	3,6
2X <i>GreenTaq mix</i>	5
10 μM CMV_FOR	0,2
10 μM BGH_REV	0,2

Korištene su PCR početnice:

CMV_for: 5' CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG 3'

BGH_rev: 5' TAGAAGGCACAGTCGAGG 3'

Reakcijske smjese smještene su u PCR uređaj (BioRad) te je pokrenut program prikazan na slici 19. Nakon završetka umnažanja DNA, uzorci su nanoseni na agarozni gel kako bi se provjerila veličina umnoženih fragmenata.



Slika 19. Temperaturni program korišten za PCR na kolonijama.

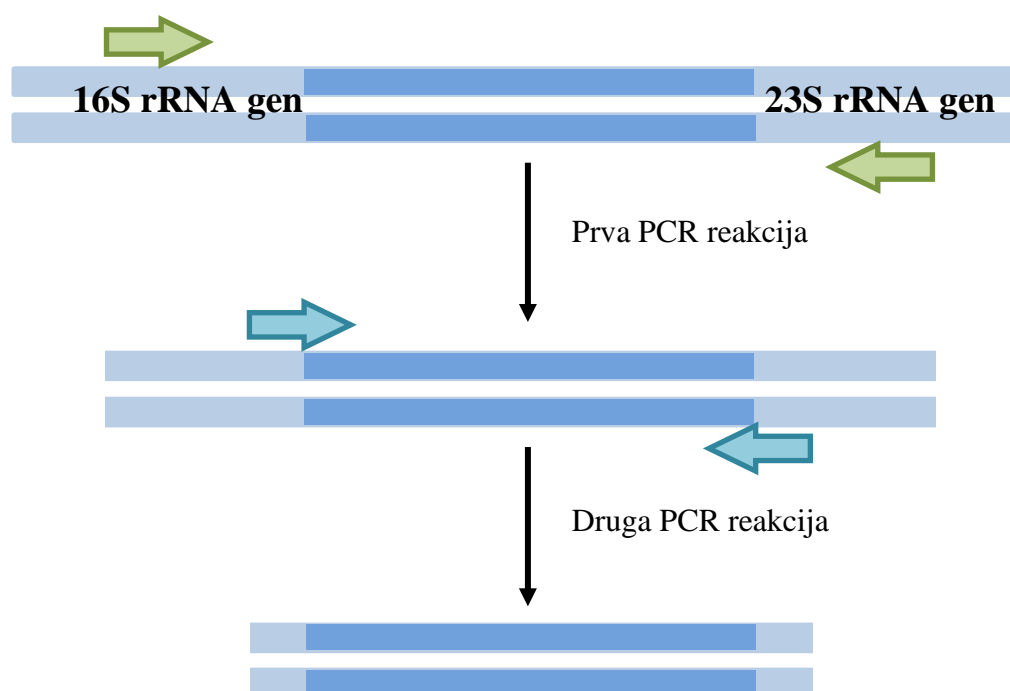
3.3.10. Izolacija DNA iz stanica u kulturi te detekcija mikoplazmi uz pomoć PCR-a

HEK293FT stanice rasle su do 70-80% konfluentnosti. Zatim su tripsinizirane i dodan im je DMEM medij za neutralizaciju. Sadržaj je centrifugiran 5 min na 1000 g u centrifugi 5415R (*Eppendorf*), supernatant je uklonjen, a talog resuspendiran u 600 μ L SDS pufera za digestiju. Dodano je 25 μ L proteinaze K (20 mg/mL štok otopina, *Sigma-Aldrich*), kratko vorteksirano na uređaju Electric vortex EV-100 (*Tehtnica*) i inkubirano na 56°C na uređaju Thermomixer comfort (*Eppendorf*) uz miješnje. Potom je dodano 200 μ L otopine NaCl ($c = 5$ mol/L), kratko vorteksirano, centrifugirano 5 min na 16 000 g te je supernatant prebačen u novu Ependorf epruvetu. Ponovno je centrifugiran 5 min na 16 000 g kako bi se što bolje istaložili proteini. Nakon odvajanja supernatanta od taloga, dodano je 200 μ L hladnog izopropanola te miješano, što je dovelo do taloženja DNA. Uzorak je centrifugiran na 16 000 g te je supernatant pažljivo uklonjen. Talog je ispran s 500 μ L hladnog etanola kako bi se uklonila preostala sol. Uzorak je centrifugiran 2 min na 16 000 g, supernatant uklonjen i talog osušen na termomikseru. Suhom talogu dodano je u 500 μ L TE pufera (c (Tris) = 10 mmol/L, c (EDTA) = 1 mmol/L, pH 8,0) i inkubiran na 37°C dok se talog nije otopio. Izmjerena je koncentracija te je provedena lančana reakcija polimeraze kako bi se utvrdilo prisustvo mikoplazmi.

Mikoplazme su prokarioti bez staničnog zida i peptidoglikanskog sloja. Često su prisutne kao onečišćenja staničnih kultura te mogu utjecati na njihovu fiziologiju i metabolizam.³⁷ Kako bi se utvrdila prisutnost mikoplazmi, korišten je “ugniježđeni PCR”. Ova metoda koristi 2 para početnica koje se vežu na 16S-23S rRNA intergenske razdvojne regije (eng. *intergenic spacer regions*). U prvoj reakciji koristi se par vanjskih početnica (F1 i R1), a u drugoj par unutarnjih početnica koje se vežu na fragment umnožen u prvoj reakciji (MGSO i GPO-3, tablica 5). Ova metoda odlikuje se visokom osjetljivošću i specifičnošću.³⁸

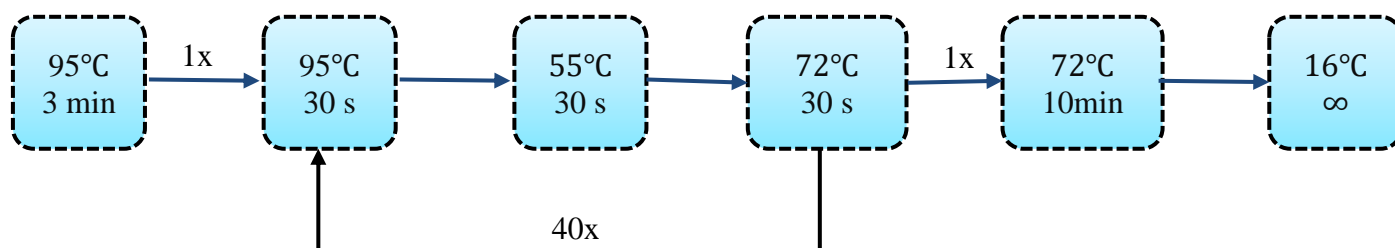
Tablica 5. Početnice za “ugniježđeni PCR” za detekciju mikoplazmi u staničnim kulturama.

Počelnica	Nukleotidni sljed 5'->3'
F1	ACACCATGGGAG(C/T)TGGTAAT
R1	CTTC(A/T)TCGACTT(C/T)CAGACCCAAGGCAT
MGSO	TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC
GPO-3	GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT



Slika 20. Shema “ugniježđenog PCR-a” za detekciju mikoplazmi u staničnim kulturama.

Reakcijska smjesa sastojala se od: 5 μL 2x *DreamTaq PCR Master Mix*, 0,5 μL uzvodne vanjske početnice (10 $\mu\text{mol/L}$), 0,5 μL nizvodne vanjske početnice (10 $\mu\text{mol/L}$), 1 μL uzorka DNA (50 ng/ μL) i 3 μL Milli-Q vode. Na isti je način pripravljena pozitivna kontrola, a u negativnu kontrolu umjesto DNA dodan je 1 μL Milli-Q vode. Reakcijske smjese postavljene su u PCR uređaj (BioRad) prema programu na slici 21. Inicijalna denaturacija služi da odvajanje lanaca DNA, a potom slijedi 40 ciklusa denaturacije, sljepljivanja početnica i sinteze DNA. Reakcija se na kraju drži 10 min na 72°C kako bi završila sinteza svih lanaca DNA.



Slika 21. Temperaturni program PCR-a za detekciju mikoplazmi u staničnim kulturama.

Prema istom protokolu, s 1 μL prvog PCR produkta izvršen je i drugi PCR s unutarnjim početnicama (“ugniježđeni” PCR).

3.4. Metode rada s proteinima

3.4.1. Izolacija proteina iz humanih stanica

Nakon 36-48 h od transfekcije, odlije se DMEM medij, stanice se isperu s 1 mL rashlađenog PBS-a (eng. *phosphate buffer saline*), doda se 400 μL RIPA pufera (eng. *radioimmunoprecipitation assay buffer*) sastava c (Tris) = 50 mmol/L, pH 7,4, c (NaCl) = 150 mmol/L, w (SDS) = 0,1%, c (Na-deoksikolat) = 12 mmol/L, φ (Triton X-100) = 1%, c (EDTA) = 1 mmol/L i svježe se doda HALT proteaza (1:100). Stanice se inkubiraju 10 min na ledu, suspenzija se prebace u 2 mL tubice te centrifugiraju 30 min na 16 000 g na 4°C. Supernatant se prebaci u 1,5 mL tubice. Uzme se alikvot za određivanje koncentracije po Bradfordu te 100 μL u koje se doda 25 μL 5x pufera za nanošenje na gel (TB, eng. *treatment buffer*; c (Tris-HCl) = 125 mmol/L, pH 6,8, c (SDS) = 0,14 mol/L, φ (glicerol) = 20%, φ (β -merkaptioetanol) = 2%, c (bromfenol plavo) = 30 mmol/L) za SDS-PAGE i *western blot*. Uzorci s 5xTB se griju 7 min na 98°C na termobloku Thermomixer comfort (Eppendorf), a zatim pohrane na -20°C do upotrebe.

3.4.2. Mjerenje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

Koncentracija proteina može se odrediti na nekoliko načina od kojih je jedna metoda po Bradfordu. Temelji se na vezanju boje Comassie Brilliant Blue G-250 na arginin, triptofan, tirozin, histidin i fenilalanin pri čemu dolazi do pomaka apsorpcijskog maksimuma s 470 nm na 595 nm. Iz standardnih otopina albumina iz seruma goveda (BSA) određuje se jednadžba pravca pomoću koje se određuje koncentracija željenog proteina.³⁹

Pripreme se uzorci slijepih proba (100 μL Milli-Q vode i 1 mL Bradfordovog reagensa) i uzorci ciljnih proteina (2 μL proteina, 98 μL Milli-Q vode i 1 mL Bradfordovog reagensa),

vorteksiraju te ostave na sobnoj temperaturi 40 minuta. *BioDrop* spektrofotometar (*Biochrom*) anulira se Milli-Q vodom (1 mL) te se izmjere apsorbancije uzoraka triju slijepih proba i uzoraka željenih proteina u staklenoj 13SOG kiveti pri 595 nm.

3.4.3. Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijeva dodecilsulfata (SDS-PAGE)

Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijeva dodecilsulfata (SDS-PAGE, eng. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) je metoda odvajanja smjese proteina visoke rezolucije. Proteini se toplinski denaturiraju te im se doda reducens i anionski detergent (SDS) koji se veže na njih i omogućuje da proteini imaju negativan naboj proporcionalan njihovoj masi. Potom slijedi elektroforeza na poliakrilamidnom gelu koji služi kao molekularno sito i razdvaja proteine temeljem njihove mase. Poliakrilamidni gel se sastoji od 2 sloja: gela za sabijanje i gela za razdvajanje. Gel za sabijanje je blago kiseo i ima manji udio akrilamida, s većim porama što omogućuje da se uzorci sabiju u ravnu liniju. Gel za razdvajanje je bazičan i ima manje pore, što omogućuje bolje razdvajanje proteina na temelju njihove veličine.^{40,41}

Uzorci 5x TB se griju 7 min na 98°C na termobloku Thermomixer comfort (*Eppendorf*), a zatim pohrane na -20°C do upotrebe. Kako bi se normalizirala količina uzoraka koji se nanose na gel, iz koncentracija određenih metodom po Bradfordu, izračunaju se volumeni potrebni za nanošenje 20 µg proteina na gel. Sastav gela za sabijanje (5%) nalazi se u tablici 6, a gela za razdvajanje (10%) u tablici 7. Gelovima se naposljetku dodaju N,N,N',N'-tetrametilendiamin (TEMED, eng. *tetramethylethylenediamine*), koji je zaslužan za polimerizaciju i amonijev persulfat (APS, eng. *amonium persulfate*), koji je katalizator.

Tablica 6. Poliakrilamidni gel za razdvajanje (10%).

Reagens	Volumen / mL
Milli-Q H ₂ O	4
1,5 mol/L Tris-HCl, pH = 8,8	2,5
30 % akrilamid/bisakrilamid (AA)	3,3
10 % SDS	0,1
10 % APS	0,1
TEMED	$8 \cdot 10^{-3}$

Tablica 7. Poliakrilamidni gel za sabijanje (5%).

Reagens	Volumen / mL
Milli-Q H ₂ O	4,05
0,5 mol/L Tris-HCl, pH = 6,8	0,75
30 % akrilamid/bisakrilamid (AA)	1,005
10 % SDS	$6 \cdot 10^{-2}$
10 % APS	$6 \cdot 10^{-2}$
TEMED	$1,2 \cdot 10^{-2}$

U jednu od jažica nanosi se 5 μ L markera proteina poznatih molekulskih masa *Precision Plus Protein Unstained (BioRad)* ili *PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Sci.c)*. Elektroforeza se provodi u aparaturi za elektroforezu Mini-Protean Tetra (*BioRad*) u elektroforetskom puferu (c (Tris) = 25 mmol/L, c (glicin) = 0,192 mol/L, w (SDS) = 1 %) 15 minuta na 120 V, zatim oko 35 min na 180 V dok fronta boje ne dođe do kraja gela.

3.4.4. Western blot analiza proteina

Nakon provedene SDS-PAGE, gel se prebaci u kadu za *western blot* gdje se namoči u puferu za prijenos (V (MeOH) = 100 mL, m (glicin) = 14,4 g, m (Tris) = 3,02 g, dopunjeno do 1 L Milli-Q vodom) i složi u kazetu za prijenos od spužve, filter papira, nitrocelulozne membrane, gela i ponovno filter papira i spužve. Filter papir se izreže veličine 10 x 6,6 cm i nitrocelulozna membranu *Amersham Protran Premium 0,45 μ m NC (GE Healthcare)* 5 x 9,5 cm. Pazeći da nema zaostalog zraka i pravilnu orijentaciju prijenosa, kazeta je stavljena u kadu s puferom za prijenos, magentićem i uloškom za hlađenje. Mokri prijenos proteina na membranu trajao je 1,5 h pri 250 mA. Membrana se boji 5 min otopinom Ponceau S boje (0,1% (w/v) Ponceau S u

5% octenoj kiselini), a zatim odbojava 2x10 min u Milli-Q vodi te fotografira. Membrana se potom blokira u puferu za blokiranje - 5% otopini nemasnog mlijeka u TBS-T-u (eng. *tris buffered saline and Tween20*; c (Tris) = 20 mmol/L, c (NaCl) = 150 mmol/L, pH 7,5, φ (Tween-20) = 0,1%) 1 sat na 37 °C u vodenoj kupelji. Mlijeko se odlije te se membrana inkubira u primarnom antitijelu razrijeđenom u puferu za blokiranje preko noći na 4°C. Primarna antitijela razrijeđena su u omjerima prikazanim u tablici 8.

Tablica 8. Primarna antitijela korištena u *western blot* analizi proteina i njihova razrjeđenja.

Antitijelo	Razrjeđenje
anti-HA antitijelo iz kunića (<i>Sigma</i>)	1 : 1 000
anti-DPP3 antitijelo iz kunića (<i>Abcam</i>)	1 : 1 000
anti-SH2D3C antitijelo iz kunića (<i>Abcam</i>)	1 : 1 000
anti-FLAG antitijelo iz kunića (<i>Sigma</i>)	1 : 1 000

Membrane su isprane tri puta po 10 minuta u puferu TBS-T te zatim inkubirane sa 1:10 000 razrjeđenjem sekundarnog anti-kunić antitijela iz kože na koje je vezana peroksidaza iz hrena 1 h na sobnoj temperaturi. Potom su membrane isprane dva puta po 10 minuta u puferu TBS-T, te dva puta po 10 minuta u puferu TBS. Proteini s vezanim antitijelima detektirani su kemiluminiscencijom pomoću reagenasa za detekciju *Amersham ECL Western Blotting Substrate* (*GE Healthcare*) na uređaju *Gel Imager Alliance Q9 Mini* (*Uvitec*).

3.5. Rad sa staničnim linijama sisavaca

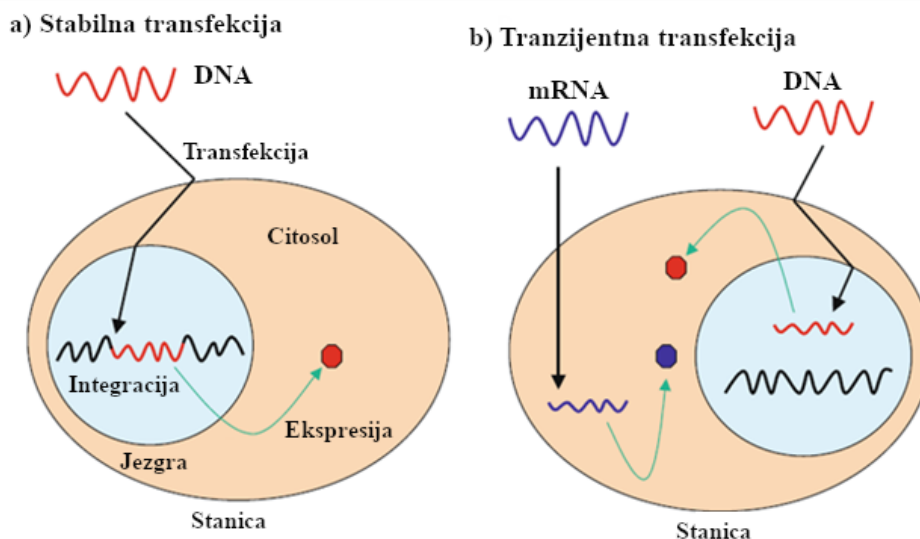
3.5.1. Uzgoj HEK293FT stanica

U svrhu ovog rada korištene su humane embrionalne stanice bubrega HEK293FT uzgajane kao adherentna stanična kultura u DMEM mediju (eng. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) uz dodatak 10 % fetalnog goveđeg seruma i 1 % nesencijalnih aminokiselina te 1% antibiotikom/antimikotikom gentamicinom u inkubatoru HERACELL VIOS 160i (*Thermo Fisher Sci.*) s kontroliranom atmosferom od 95 % zraka i 5 % CO₂ pri temperaturi od 37 °C u plastičnim T-bocama ravnih stijenci T25 (5 ml) i T75 (10 ml) u sterilnim uvjetima.

3.5.2. Transfekcija plazmidnim vektorima

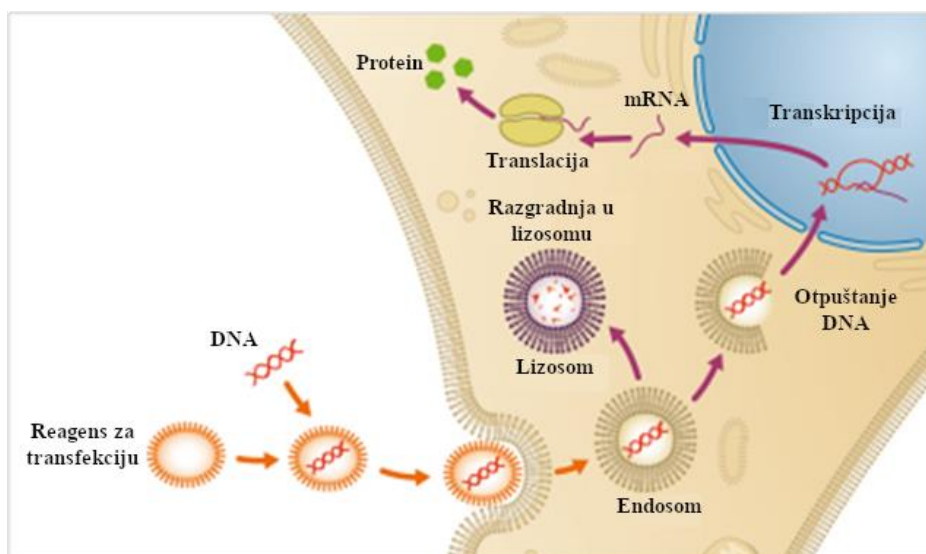
Transfekcija je unošenje stranih nukleinskih kiselina u eukariotske stanice kako bi se dobile modificirane stanice i time moglo proučavati funkciju gena te regulaciju i funkciju proteina. Ovisno o stanju genetičkog materijala, transfekcija može biti stabilna ili tranzijentna. U

stabilnoj transfekciji strani materijal se integrira u genom domaćina i ekspirira se kao transgen čak i nakon replikacije stanice domaćina. U tranzijentnoj transfekciji, strani geni prisutni su kao ekstrakromosomalni elementi te su ekspimirani samo ograničeno vrijeme.



Slika 22. Shematski prikaz stabilne (a) i tranzijentne (b) transfekcije. U stabilnoj transfekciji strana DNA (crvena vijugava linija) se integrira u genom (crna vijugava linija), dok u tranzijentnoj transfekciji strana DNA translocira u jezgro, ali ne integrira u genom, ili pak strana mRNA (plava vijugava linija) je unesena u citosol i translirana u protein (plavi šesterokut).⁴² Metode transfekcije dijele se na biološke, kemijske i fizikalne.⁴²

Tijekom izrade ovog rada primjenjene su kemijske metode – pozitivno nabijene tvari (Lipofecamine 2000) stvaraju komplekse s negativno nabijenim nukleinskim kiselinama. Potom ti pozitivni kompleksi (liposomi) ostvaruju interakciju s negativno nabijenom staničnom membranom te se smatra da su endocitoza i fagocitoza uključene u unos tih kompleksa u stanicu. Nije poznat mehanizam translokacije transfecirane DNA u jezgro.



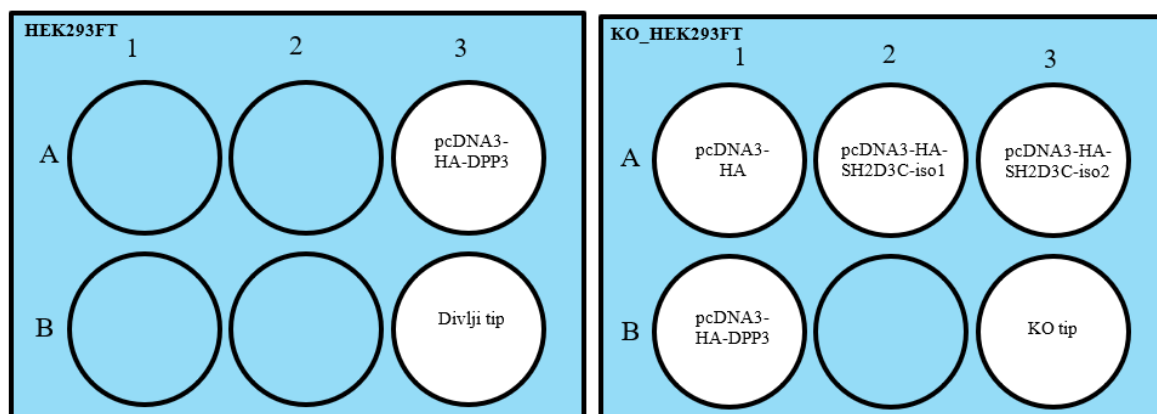
Slika 23. Mehanizam lipofekcije – kemijske transfekcije kationskim lipidom.⁴³

HEK293FT i HEK293FT stanice s deletiranim DPP3 genom (KO, eng. *knock out*) nacijepljene su 33 000 stanica po jažici te tranzijentno transfecirane s pcDNA3-HA, pcDNA3-HA-DPP3, pcDNA3-HA-SH2D3C-iso1 i pcDNA3-HA-SH2D3C-iso2 na 2 pločice sa 6 jažica (eng. *6-well*). Koncentracije korištenih vektora nalaze se u tablici 9.

Tablica 9. Koncentracije pcDNA3 plazmida korištenih u tranzijentnoj transfekciji.

Plazmid	γ (ng/ μ L)
pcDNA3-HA	542
pcDNA3-HA-DPP3	549
pcDNA3-HA-SH2D3C-iso1	545
pcDNA3-HA-SH2D3C-iso2	539

Za transfekciju korišten je omjer 2,5 μ g DNA : 7 μ L lipofektamina. Odvojeno su pripremljene otopine DNA i Lipofektamina 2000 (*Thermo Fischer Sci.*) svaka volumena 250 μ L s Opti-MEM medijem (*Thermo Fischer Sci.*), potom su spojene i inkubirane 10 min prije nanošenja na stanice. Stanice su inkubirane 48 h u CO₂ inkubatoru modela HERACELL VIOS 160i (*Thermo Fisher Sci*) na 37 °C. Zatim je uslijedila izolacija proteina za *western blot* analizu.



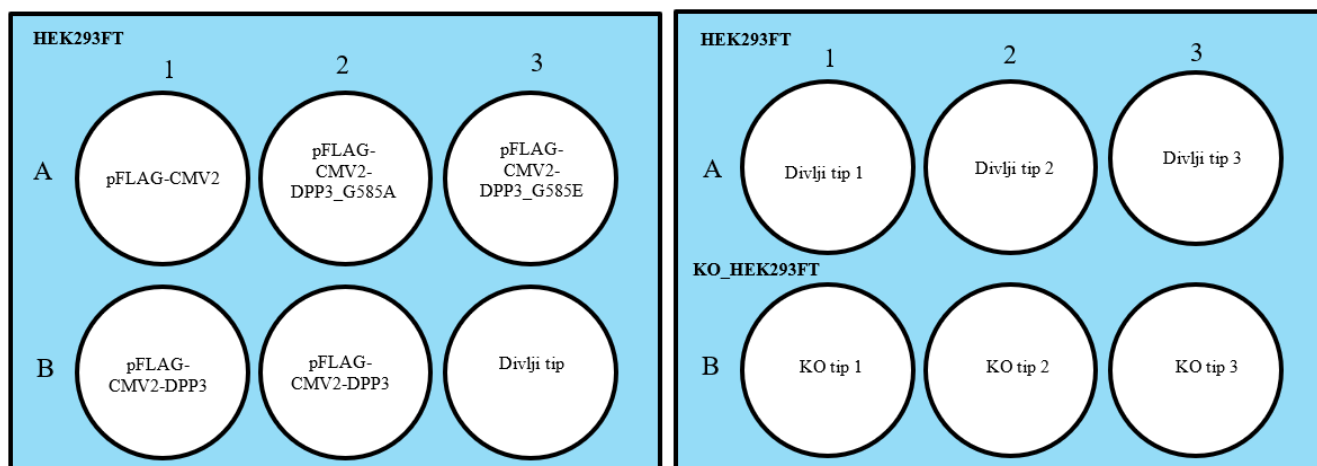
Slika 24. Raspored tranzijentno transfeciranih uzoraka po jažicama. Lijeva pločica sadrži HEK293FT stanice, a desna HEK293FT s deletiranim genom DPP3.

Za tranzijentnu transfekciju korištene su HEK293FT stanice naci jepljene 100 000 stanica po jažici te plazmidi pFLAG-CMV2, pFLAG-CMV2-DPP3, pFLAG-CMV2-DPP3_G585A i pFLAG-CMV2-DPP3_G585E. Koncentracije plazmida nalaze se u tablici 10.

Tablica 10. Koncentracije pFLAG-CMV2 plazmida korištenih u tranzijentnoj transfekciji.

Plazmid	γ (ng/ μ L)
pFLAG-CMV2	2122,6
pFLAG-CMV2-DPP3	619
pFLAG-CMV2-DPP3_G585A	317,5
pFLAG-CMV2-DPP3_G585E	786,3

Tijekom transfekcije korišten je omjer 1 μ g DNA: 2,5 μ L lipofektamina. Odvojeno su pripremljene otopine DNA i Lipofektamina 2000 (*Thermo Fischer Sci.*) svaka volumena 250 μ L s Opti-MEM medijem (*Thermo Fischer Scientific*), potom su spojene i inkubirane 10 min prije nanošenja na stanice. Stanice su inkubirane 36 h u CO₂ inkubatoru modela HERACELL VIOS 160i (*Thermo Fisher Sci.*) na 37 °C. Zatim je uslijedila izolacija proteina za *western blot* analizu.



Slika 25. Raspored tranzijentno transfeciranih HEK293FT stanica po jažicama (lijevo) i netretiranih HEK293FT i KO_HEK293FT stanica.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Priprema plazmidnog vektora za tranzijentnu ekspresiju divljeg tipa proteina DPP3, SH2D3C izoforme 1 i SH2D3C izoforme 2

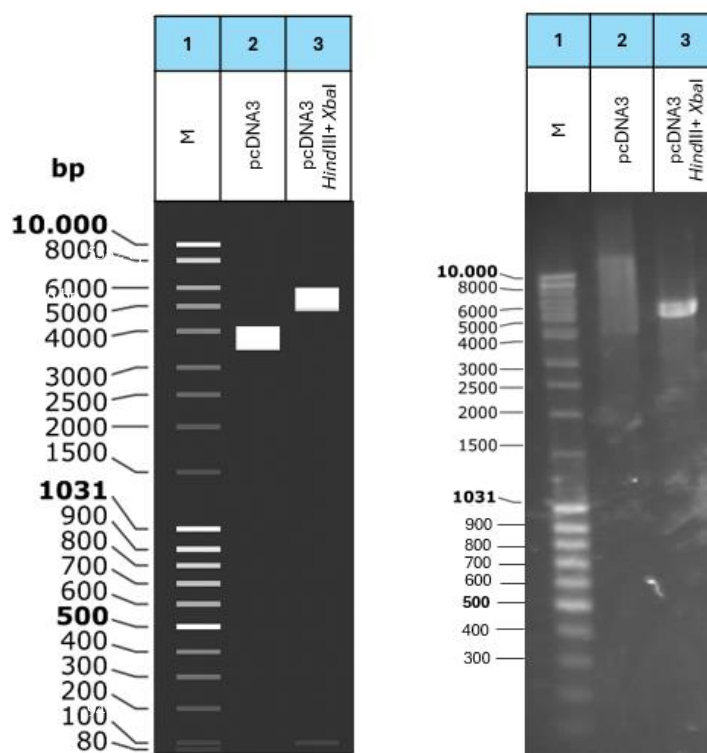
4.1.1. Priprema plazmidnog vektora pcDNA3 za rekombinacijsko kloniranje

Iz prekonoćne kulture bakterije *E. coli* DH5 α elektrotransformirane s pcDNA3 plazmidnim vektorom, provedena je izolacija plazmidne DNA uz pomoć *GeneJet Plasmid Miniprep Kit*-a te je koncentracija izmjerena na spektrometru *BioDrop* (tablica 11). Sekvenca plazmida potvrđena je sekvenciranjem u tvrtci MacroGene.

Tablica 11. Koncentracije plazmidnog vektora pcDNA3 te omjeri apsorbancije pri 260 nm i 230 nm te 260 nm i 280 nm.

Plazmid	γ / ng μ l ⁻¹	A_{260}/A_{230}	A_{260}/A_{280}
pcDNA3-1	236,9	3,767	1,960
pcDNA3-2	339,0	3,390	1,971

Provedena je linearizacija izoliranog plazmida pcDNA3 ($\gamma = 339$ ng/ μ L; 5446 bp) restrikcijским endonukleazama *Hind*III i *Xba*I koji navedeni plazmid cijepaju dva puta unutar mjesta višestrukih kloniranja (MCS, eng. *multiple cloning site*) te se dobivaju 2 fragmenta veličina 5352 bp i 94 bp (slika 26). Uspješnost linearizacije provjerena je elektroforezom na 1 %-tnom agaroznom gelu, bojanjem s etidij-bromidom te analizom na uređaju za detekciju fluorescencije GeneSnap (*SynGene*).



Slika 26. In silico provedena linearizacija pcDNA3 plazmidnog vektora u programu Snapgene na 1% agaroznom gelu te stvarni prikaz 1% agaroznog gela. U jažice su redom slijeva nanesen: marker veličina *MassRuler DNA ladder mix*, nepocijepani vektor te vektor pocijepan s *HindIII* i *XbaI*.

Kod pocijepanog plazmida vidi se oštra vrpca iznad 5000 bp, to jest željeni fragment lineariziranog pcDNA3. Manja vrpca (94 bp) se ne vidi na gelu, dok se kod nepocijepanog plazmida vidi spektar veličina („šmir“) zahvaljujući različitim stupnjevima superzavijenosti kružnog plazmida.

U simulaciji nepocijepani vektor je prikazan niže na gelu jer zbog svoje superzavijenosti putuje brže nego linearizirani vektor.

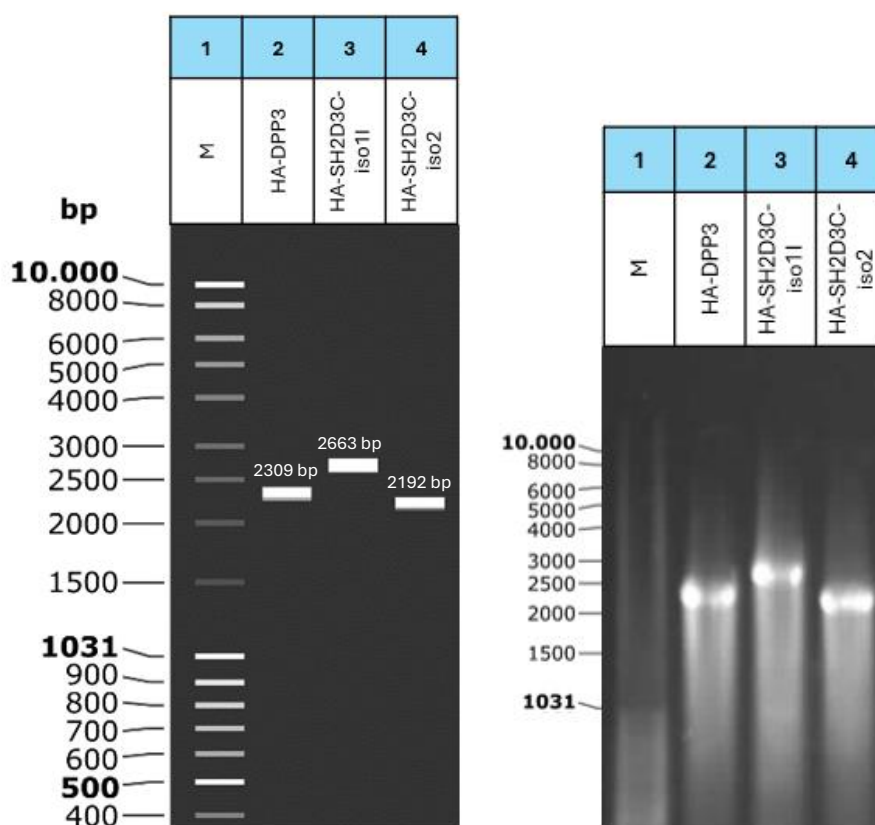
Linearizirani pcDNA3 vektor (5352 bp) izoliran je iz gela pomoću *Wizard Genomic DNA Purification Kit*-a te je izmjerena koncentracija na spektrometru *BioDrop* (tablica 12).

Tablica 12. Koncentracija lineariziranog pcDNA3 vektora izmjerena nakon izolacije iz 1% agaroznog gela te omjeri apsorbancije pri 260 nm i 230 nm te 260 nm i 280 nm.

Plazmid	γ (ng/ μ l)	A_{260}/A_{230}	A_{260}/A_{280}
pcDNA3.0 dig	12,37	0,861	1,941

4.1.2. Priprema gena HA-DPP3, HA-SH2D3C izoforme 1 i HA-SH2D3C izoforme 2 za rekombinacijsko kloniranje

Odabrani geni umnoženi su lančanom reakcijom polimeraze koristeći pcDNA4 vektore s umetnutim odgovarajućim genima. Ishod reakcije provjeren je na 1% agaroznom gelu (slika 27) te sekvenciranjem u tvrtci Macrogene.



Slika 27. Simulacija PCR amplikona u programu Snapgene na 1% agaroznom gelu te stvarni 1% agarozni gel s PCR uzorcima. U jažice su redom slijeva nanese: marker veličina *MassRuler DNA ladder mix*, amplikon HA-DPP3 (2309 bp), amplikon HA-SH2D3C-iso1 (2663 bp) i amplikon HA-SH2D3C-iso2 (2192 bp).

S obzirom na kvalitetu gela te vrpce markera, teško je procijeniti veličinu PCR produkata, ali njihovi odnosi su u skladu s provednom simulacijom. Točna veličina i sekvenca potvrđene su sekvenciranjem te su PCR produkti izolirani iz gela pomoću *Wizard Genomic DNA Purification Kit*-a. Koncentracija dobivenih PCR amplikona izmjerena je na spektrometru *BioDrop* (tablica 13).

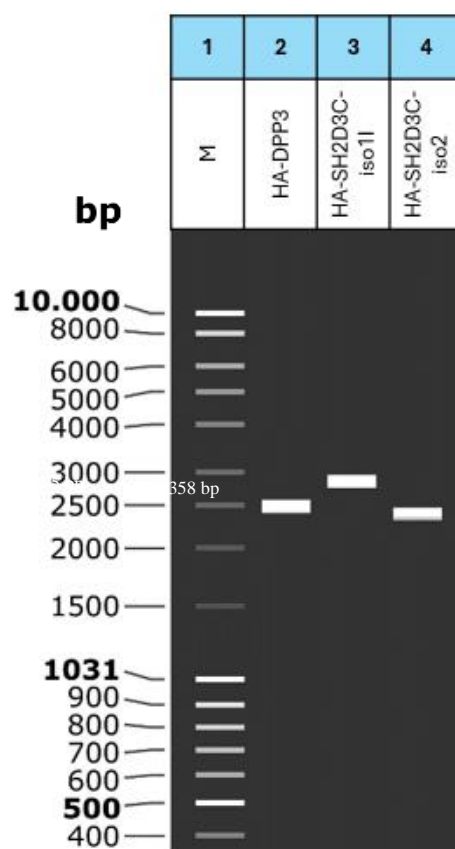
Tablica 13. Koncentracija PCR produkata izmjerena nakon izolacije iz 1% agaroznog gela te omjeri apsorbancije pri 260 nm i 230 nm te 260 nm i 280 nm.

PCR produkt	γ / ng μl^{-1}	A_{260}/A_{230}	A_{260}/A_{280}
HA-DPP3	75,08	1,200	1,856
HA- SH2D3C-iso1	57,92	1,936	1,873
HA- SH2D3C -iso2	59,79	1,942	1,942

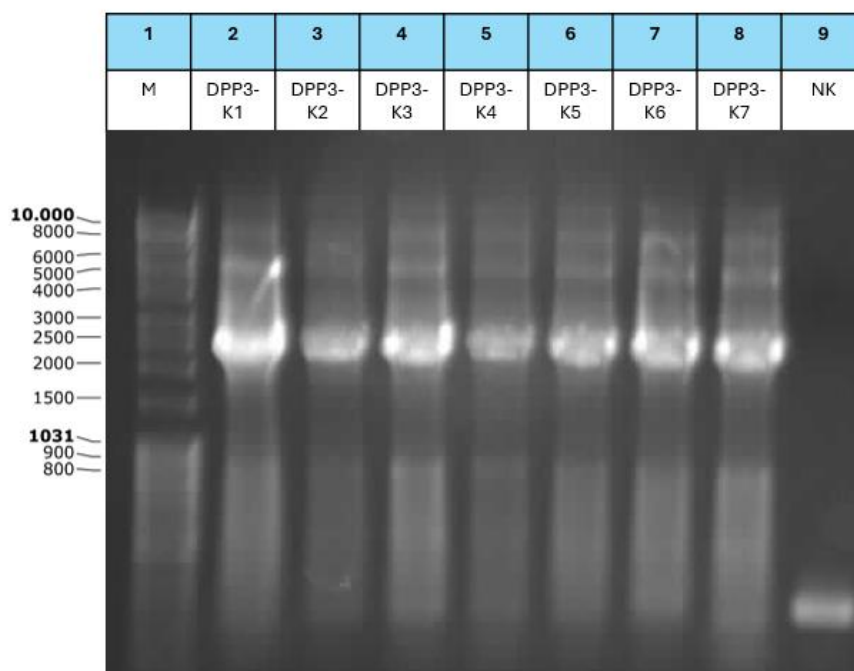
4.1.3. Rekombinacijsko kloniranje gena HA-DPP3, HA-SH2D3C izoforme 1 i HA- SH2D3C izoforme 2 u pcDNA3 plazmidni vektor

Provedeno je rekombinacijsko kloniranje DPP3, SH2D3C izoforme 1 i izoforme 2 sa slijedom za HA epitop na N-kraju u pcDNA3 plazmid prema postupku opisanom u 3.3.8. Reakcijska smjesa je netom nakon toga upotrebljena za transformaciju Stellar kompetentnih stanica koje su nasadene na LB agar ploče s ampicilinom.

Sutradan je proveden PCR na kolonijama kako bi se utvrdila uspješnost rekombinacijskog kloniranja i transformacije. Korištene su CMV_for i BgH_rev početnice te su očekivani produkti: za DPP3 2475 bp, za SH2D3C izoformu 1 2829 bp, za SH2D3C izoformu 2 2358 bp te za prazan vektor 286 bp (slika 28 i slika 29).

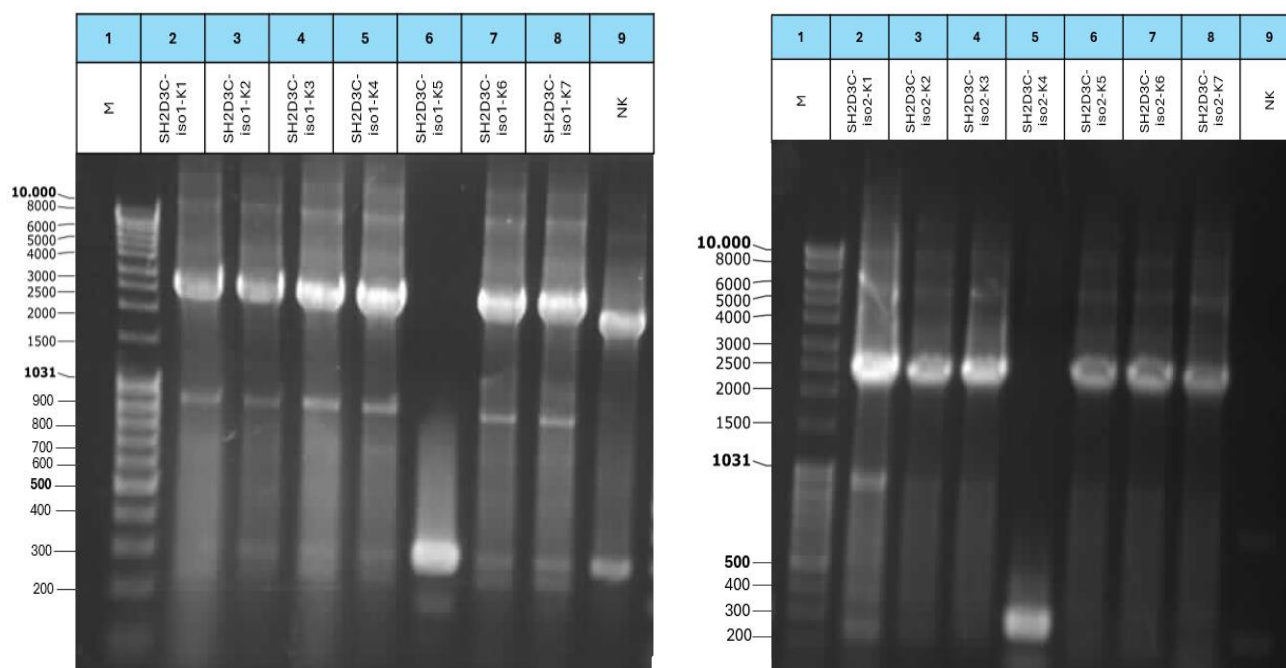


Slika 28. Simulacija PCR-a na kolonijama u programu Snapgene (redom: DPP3, SH2D3C izoforma 1, SH2D3C izoforma 2) na 1% agaroznom gelu.



Slika 29. 1% agarozni gel s amplikonima nakon PCR-a na kolonijama s DPP3. U jažice su redom slijeva nanesen: marker veličina *MassRuler DNA ladder mix*, kolonije DPP3 K1-K7 te negativna kontrola (bez uzorka kolonija, to jest DNA kalupa).

Na agaroznom gelu na slici 29. vidljivo je da su rekombinacijsko kloniranje HA-DPP3 i transformacija uspješno provedeni i te da je u svih 7 odabranih kolonija prisutan željeni fragment (2475 bp). U svim uzorcima vidljive su i manje izražene vrpce većih i manjih veličina („šmir“) što može biti rezultat manje specifičnog umnažanja i/ili kontaminacije. U negativnoj kontroli prisutan je PCR produkt što upućuje na kontaminaciju u reakciji.



Slika 30. 1% agarozni gelovi s amplikonima nakon PCR-a na kolonijama s SH2D3C izoformom 1 (lijevo) i izoformom 2 (desno). U jažice su redom slijeva nanese: marker veličina *MassRuler DNA ladder mix*, kolonije K1-K7 te negativna kontrola (umjesto DNA kalupa stavljena Milli-Q voda).

Na slici 30. na gelu lijevo s uzorcima SH2D3C izoforme 1 vidljivo je da su rekombinacijsko kloniranje i transformacija uspješno provedeni. Željeni SH2D3C-iso1 fragment prisutan u kolonijama K1-K4 te K6 i K7 (2829 bp), dok se u koloniji K5 nalazi prazan vektor (286 bp). Kao i na prošlom gelu prisutne su manje izražene vrpce većih i manjih veličina („šmir“), dok su u negativnoj kontroli vidljiva pak 2 PCR produkta manje veličine od željenog fragmenta.

Na desnom gelu s uzorcima SH2D3C izoforme 2 vidljivo je da su rekombinacijsko kloniranje i transformacija uspješno provedeni. Željeni SH2D3C-iso2 fragment prisutan u kolonijama K1-K3 te K5-K7 (2358 bp), dok se u koloniji K4 nalazi prazan vektor (286 bp). Ponovno su vidljive manje izražene vrpce većih i manjih veličina („šmir“) koje se nalaze na istim mjestima kao i na prethodna 2 gela. U negativnoj kontroli vidljive su 2 blijede vrpce male veličine.

S obzirom da je svaki od gelova pripreman zasebno, a uočeni su PCR produkti u negativnoj kontroli, poželjno bi bilo ponoviti PCR s novim setom početnica.

Iz pcDNA3-HA-DPP3 kolonija 6 i 7 pcDNA3-HA-SH2D3C-iso1 kolonija 3 i 4 te pcDNA3-HA-SH2D3C-iso2 kolonija 2 i 3 pripremljene su prekonoćne kulture. Sutradan je

GeneJet Plasmid Miniprep Kit-om izolirana plazmidna DNA te joj je izmjerena koncentracija na spektrometru *BioDrop* (tablica 14).

Tablica 14. Koncentracije plazmidne DNA izolirane iz prekonoćnih kultura nakon rekombinacijskog kloniranja te omjeri apsorbancije pri 260 nm i 230 nm te 260 nm i 280 nm.

Plazmid	$\gamma / \text{ng } \mu\text{l}^{-1}$	A_{260}/A_{230}	A_{260}/A_{280}
pcDNA3-HA-DPP3-K6	143,7	2,122	1,976
pcDNA3-HA-DPP3-K7	261,7	2,205	1,972
pcDNA3-HA-SH2D3C-iso1-K3	159,9	1,929	1,977
pcDNA3-HA- SH2D3C-iso1-K4	251,1	1,945	2,163
pcDNA3-HA- SH2D3C-iso2-K2	239,4	3,964	2,057
pcDNA3-HA- SH2D3C-iso2-K3	178,8	4,857	2,108

Sekvence plazmidne DNA potvrđene su sekvenciranjem u tvrtci Macrogene.

Iz glicerolskih kultura pcDNA3-HA, pcDNA3-HA-DPP3 kolonija 7, pcDNA3-HA-SH2D3C-iso1 kolonija 4 te pcDNA3-HA-SH2D3C-iso2 kolonija 3 pripremljene su prekonoćne kulture. Iz prekonoćnih kultura pripremljene su glavne kulture te je iz njih izolirana plazmidna DNA pomoću *Zymo PURE II Plasmid Midiprep Kit*-a (tablica 15).

Tablica 15. Koncentracije plazmidne DNA izolirane pomoću *Zymo PURE II Plasmid Midiprep Kit*-a te omjeri apsorbancije pri 260 nm i 230 nm te 260 nm i 280 nm.

Plazmid	$\gamma / \text{ng } \mu\text{l}^{-1}$	A_{260}/A_{230}	A_{260}/A_{280}
pcDNA3-HA	2169,2	2,141	1,893
pcDNA3-HA-DPP3-K7	1646,4	2,230	1,879
pcDNA3-HA-SH2D3C-iso1-K4	2724,8	2,121	1,819
pcDNA3-HA-SH2D3C-iso2-K3	3283,8	1,846	1,707

4.1.4. Tranzijentna transfekcija HEKFT stanica plazmidima dobivenima rekombinacijskim kloniranjem

Nakon što je potvrđeno da u HEK293FT i HEK293FT stanicama s deletiranim DPP3 genom nisu prisutne mikoplazme provedena je tranzijentna transfekcija pcDNA3 vektorima pripravljenima rekombinacijskim kloniranjem. Za transfekciju korišteno je 2,5 μg plazmidne

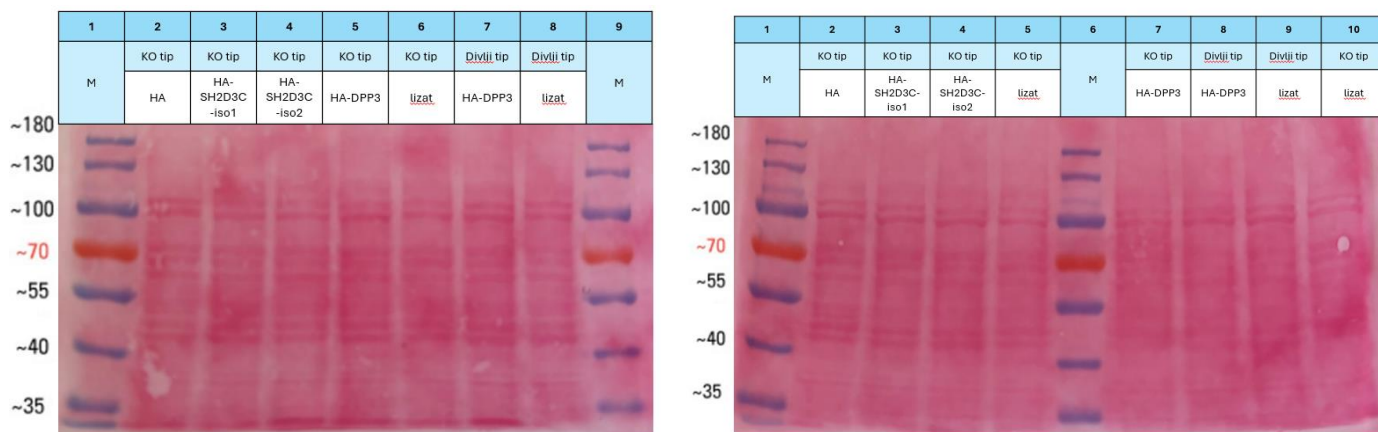
DNA (tablica 15.) na 7 μL lipofektamina. Nakon 48 sati proteini su izolirani, izmjerena im je koncentracija metodom po Bradfordu (tablica 16) te su pripremljeni uzorci za SDS-PAGE.

Tablica 16. Koncentracija proteina eksprimiranih u staničnim linijama sisavaca određena metodom po Bradfordu.

Uzorak	KO_HA-SH2D3C-iso1	KO_HA-SH2D3C-iso2	KO_HA-DPP3	KO_HA	KO tip	HA-DPP3	Divlji tip
$\gamma / \text{mg mL}^{-1}$	1,61	1,67	1,74	1,98	1,64	1,89	1,51

4.1.5. Western blot analiza proteina nakon tranzijentne ekspresije u staničnim linijama sisavaca

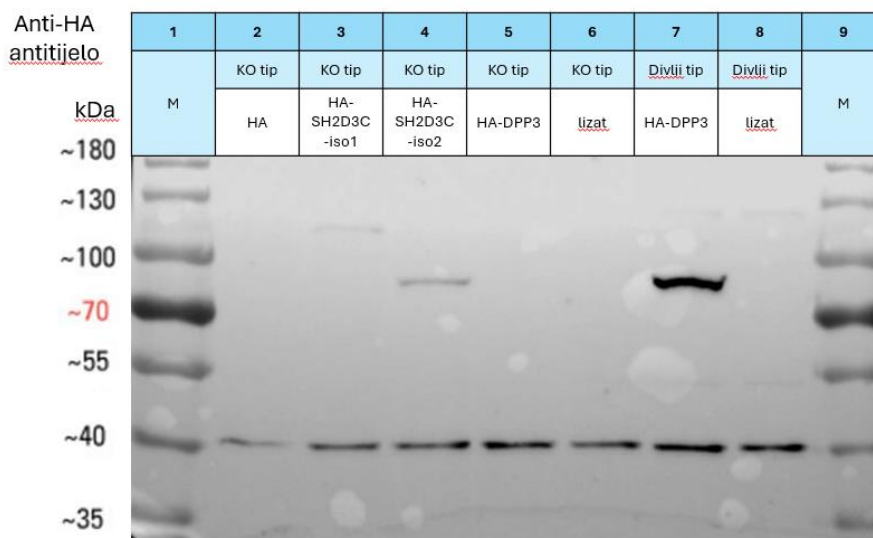
Nakon određivanja koncentracija proteina metodom prema Bradfordu nanese se 20 μg proteina na poliakrilamidni gel uz dodatak SDS-a. Provedena je elektroforeza te prijenos proteina s gela na membranu *western blot* metodom. Kako bi se provjerila uspješnost prijenosa, membrane su obojane Ponceau S bojom (slika 31).



Slika 31. Membrane obojane Ponceau S bojom s uzorcima proteina eksprimiranih u staničnim linijama sisavaca. Kao marker molekularnih veličina korišten je marker *Precision Plus Protein Unstained*.

Potom su membrane izrezane na odgovarajuće dijelove te inkubirane primarnim anti-HA antitijelom iz kunića (*Sigma*), anti-SH2D3C antitijelom iz kunića (*Abcam*) i anti-DPP3 antitijelom iz kunića (*Abcam*) te sekundarnim anti-kunić antitijelom iz koze na koje je vezana

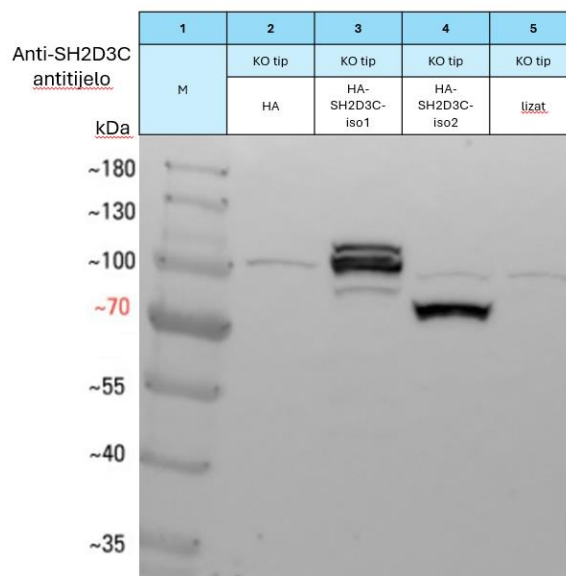
peroksidaza iz hrena (*Sigma*). Rezultati su vizualizirani na uređaju za detekciju kemiluminiscencije Alliance Q9 (Uvitec) uz pomoć kemiluminiscencijskih reagenasa *Amersham ECL Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare)* te prikazani na slikama 32, 33 i 34.



Slika 32. Membrana inkubirana anti-HA antitijelom s uzorcima proteina eksprimiranih u tranzijentno transfeciranim staničnim linijama sisavaca. Kao marker molekulskih veličina korišten je marker *Precision Plus Protein Unstained*.

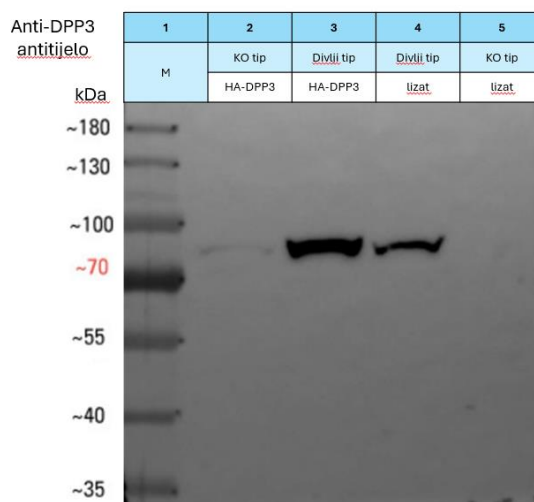
U svim uzorcima obilježenim anti-HA antitijelom prisutna je vrpca približne veličine 40 kDa koja se mogla pojaviti zbog nespecifične interakcije, unakrsne reaktivnosti antitijela (eng. *antibody cross-reactivity*) ili ekspresije endogenog proteina sa sekvencom koju prepoznaje anti-HA antitijelo.

U uzorcima proteina HA i lizata KO i divljeg tipa nema drugih vrpca, što je u skladu s očekivanim budući da je HA epitop relativno malen (1,1 kDa) i nije prirodno prisutan u staničnom lizatu. Vidljive su vrpce oko 100 kDa i 80 kDa, što odgovara veličini HA-SH2D3C izoformi 1 (95,5 kDa) i HA-SH2D3C izoformi 2 (78,2 kDa).⁴⁴ Vrpca koja odgovara HA-DPP3 (83,7 kDa)⁴⁵ vidljiva je u divljem tipu HEK293FT stanica, ali ne i u KO. Izostanak proteinskih vrpca u KO stanicama, može se objasniti potencijalnom aktivnošću Cas9 proteina koji prepoznaje sekvencu DPP3 te ju pocijepa.



Slika 33. Membrana inkubirana anti-SH2D3C antitijelom s uzorcima proteina eksprimiranih u tranzijentno transfeciranim staničnim linijama sisavaca. Kao marker molekulske veličine korišten je marker *Precision Plus Protein Unstained*.

Membrana na slici 33. inkubirana je primarnim anti-SH2D3C kuničjim antitijelom. U svim uzorcima prisutne su vrpce oko 100 kDa, što odgovara HA-SH2D3C izoformi 1 (95,5 kDa).⁴⁴ U uzorcima HA-SH2D3C izoformi 1 i HA-SH2D3C izoformi 2 (78,2 kDa) uočavaju se vrpce većeg intenziteta zbog povećane ekspresije navedenih proteina. U uzorku HA-SH2D3C izoforme 2 prisutne su još 2 vrpce, koje potencijalno odgovaraju posttranslacijski modificiranom te proteolitički degradiranom proteinu ili preuranjeno terminiranom translatiranom proteinom.



Slika 34. Membrana inkubirana anti-DPP3 antitijelom s uzorcima proteina eksprimiranih u tranzijentno transfeciranim staničnim linijama sisavaca. Kao marker molekulskih veličina korišten je marker *Precision Plus Protein Unstained*.

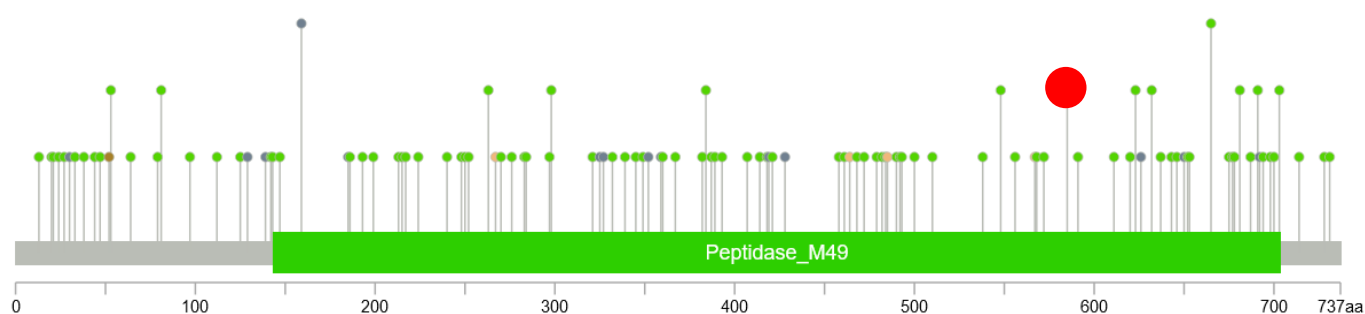
U uzorku staničnog lizata KO nema prisutnih vrpca, dok se u HA-DPP3 KO uzorku nazire blijeda vrpca koja odgovara veličini HA-DPP3 (83,6 kDa).

U uzorcima divljeg tipa HEK293FT stanica prisutne su jasne vrpce koje su u skladu s veličinom HA-DPP3. Može se uočiti da je vrpca HA-DPP3 izraženija nego u staničnom lizatu, što je očekivano zbog dodatne ekspresije HA-DPP3 uzrokovane transfekcijom plazmidom koji kodira taj gen.

4.2. Priprema plazmidnog vektora za tranzijentnu ekspresiju divljeg tipa proteina DPP3 te mutiranih inačica DPP3_G585A i DPP3_G585E

4.2.1. Konstrukcija mutiranih inačica DPP3_G585A i DPP3_G585E

Motivacija iza uvođenja mutacija G585A i G585E proizlazi iz pretraživanja cBioPortal baze podataka za genomiku zloćudnih tumora.⁴⁶ Pretragom je nađeno da je mutacija G585A prisutna u uzorku papilarnog raka štitnjače, a mutacija G585E u uzorku invazivnog dukalnog karcinoma dojke (najčešći tip raka dojke). Stoga su navedeni mutanti pripremljeni kako bi se ispitaio značaj G585A i G585E mutacija na signalni put KEAP1-NRF2.



Slika 35. Mutacije pronadene u genu DPP3 u uzorcima zloćudnih tumora. Visina kružića upućuje na zastupljenost određene mutacije u nekoj od onkoloških dijagnoza. Crvenim kružićem označene su mutacije na poziciji G585.⁴⁶

Ciljanom mutagenезom pFLAG vektora s cDNA insertom koji kodira divlji tip DPP3 pripravljene su mutirane inačice DPP3_G585A i DPP3_G585E. Željene mutacije unesene su pomoću mutagenih početnica koje sadrže izmijenjenu nukleotidnu bazu (eng. *mismatch*) koja je dio kodona za G585, a ostatak početnice komplementaran je kodirajućem slijedu divljeg tipa DPP3.



Slika 36. Dio gena hDPP3 i mutagene početnice koje sadrže mutacije G585A (plavo označena početnica) i G585E (crveno označena početnica). Izdignuta nukleotidna baza nije komplementarna divljem tipu hDPP3. Izrađeno u program Snapgene.

4.2.2. Ciljana mutageneza

Prema postupku opisanom u 3.3.3. provedena je ciljana mutageneza, transformirane su DH α kompetentne stanice i nasađene na LB agar ploče s ampicilinom. Pripremljene su prekonoćne

kulture s bakterijskim kolonijama. Iz njih su pripremljene glicerolske kulture te izolirana plazmidna DNA (tablica 17). Prisutnost mutacije potvrđena je sekvenciranjem u tvrtci MacroGene.

Tablica 17. Koncentracije plazmida s mutantima DPP3 dobivenih ciljanom mutagenezom.

Plazmid	γ / ng μl^{-1}	A_{260}/A_{230}	A_{260}/A_{280}
pFLAG-CMV2-DPP3-G585A-1	247	2,252	1,879
pFLAG-CMV2-DPP3-G585A-2	211	2,148	1,857
pFLAG-CMV2-DPP3-G585E-1	144	2,282	1,893
pFLAG-CMV2-DPP3-G585E-2	199	2,289	1,878

Iz glavne kulture izolirana je plazmidna DNA uz pomoć *ZymoPURE II Plasmid Midiprep Kit*-a te je izmjerena koncentracija prikazana u tablici 18.

Tablica 18. Koncentracija pFLAG plazmidne DNA za tranzijentnu transfekciju humanih stanica.

Plazmid	γ (ng/ μL)	A_{260}/A_{230}	A_{260}/A_{280}
pFLAG-CMV2	2122,6	2,226	1,869
pFLAG-CMV2-DPP3_G585A	317,5	2,276	1,895
pFLAG-CMV2-DPP3_G585E	786,3	2,317	1,889
pFLAG-CMV2-DPP3	619	-	-

4.2.3. Tranzijentna transfekcija HEK293FT stanica plazmidima dobivenima ciljanom mutagenezom

Nakon što je potvrđeno da u HEK293FT i HEK293FT stanicama s deletiranim DPP3 genom nisu prisutne mikoplazme provedena je tranzijentna transfekcija pFLAG vektorima. Za transfekciju korišteno je 1 μg plazmidne DNA na 2,5 μL lipofektamina. Nakon 36 sati proteini su izolirani, izmjerena im je koncentracija metodom po Bradfordu (tablica 19) te su pripremljeni uzorci za SDS-PAGE.

Tablica 19. Koncentracija proteina eksprimiranih u staničnim linijama sisavaca određena metodom po Bradfordu.

Uzorak	$\gamma / \text{mg mL}^{-1}$
pFLAG-CMV2	2,31
pFLAG-CMV2-DPP3_G585A	2,28
pFLAG-CMV2-DPP3_G585E	3,06
pFLAG-CMV2-DPP3	2,24
Divlji tip	2,21
Divlji tip 1	1,35
Divlji tip 2	1,40
Divlji tip 3	1,61
KO tip 1	1,39
KO tip 2	1,89
KO tip 3	1,55

4.2.4. Western blot analiza DPP3 proteina i njegovih mutiranih inačica nakon tranzijentne ekspresije u staničnim linijama sisavaca

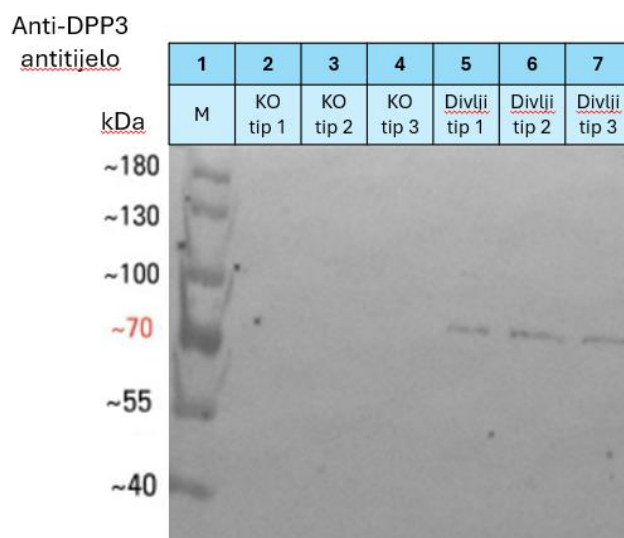
Na poliakrilamidne gelove s SDS-om naneseo je 20 μg uzoraka s pločice koja sadrži pFLAG plazmide te 15 μg uzoraka s druge pločice. Nakon provedene elektroforeze, proteini su preneseni s gelova na membrane. Membrane su inkubirane primarnim anti-DPP3 antitijelom iz kunića (*Abcam*), anti-FLAG antitijelom iz kunića (*Sigma*) te sekundarnim anti-kunić antitijelom iz koze na koje je vezana peroksidaza iz hrena (*Sigma*). Rezultati su vizualizirani na uređaju za detekciju kemiluminiscencije Alliance Q9 (*Uvitec*) uz pomoć kemiluminiscencijskih reagenasa *Amersham ECL Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare)* te prikazani na slici 37 i slici 38.



Slika 37. Membrana inkubirana s anti-DPP3 antitijelom (lijevo) i anti-FLAG antitijelom (desno) s uzorcima proteina eksprimiranih u staničnim linijama sisavaca. Kao marker molekulskih veličina korišten je marker *PageRuler Prestained Protein Ladder*.

Na membrani inkubiranoj anti-DPP3 antitijelom vidljive su vrpce između 70 i 100 kDa koje odgovaraju veličini FLAG-DPP3 proteina (83,7 kDa). Kod uzorka divljeg tipa koji nije transfeciran plazmidnim vektorom vrpca je manjeg intenziteta nego kod transfeciranih stanica. Kod njih su pak prisutne 2 vrpce, jedna koja odgovara očekivanoj vrijednosti te druga nešto niža. Kod uzorka s praznim pFLAG vektorom ne uočava se vrpca, iako je očekivana zbog endogenog DPP3.

Na membrani inkubiranoj anti-FLAG antitijelom prisutna su nespecifična vezanja u sva 3 uzorka, od kojih je jedno ispod 100 kDa gdje se očekuje položaj vrpce DPP3. No, mogu se razlučiti vrpce većeg intenziteta u oba mutanta DPP3 što upućuje da signal potječe od specifičnog vezanja.



Slika 38. Membrana inkubirana anti-DPP3 antitijelom s uzorcima proteina eksprimiranih u staničnim linijama sisavaca. Kao marker molekulskih veličina korišten je marker *PageRuler Prestained Protein Ladder*.

Vrpca koja odgovara DPP3 (82,6 kDa)⁴⁵ vidljiva je u divljem tipu HEK293FT stanica, ali ne i u KO stanicama, što je u skladu s ranijim rezultatom. Izostanak proteinskih vrpca u KO stanicama, može se objasniti potencijalnom aktivnošću Cas9 proteina koji prepoznaje sekvencu DPP3 te ju pocijepa.

§ 5. ZAKLJUČAK

U okviru ovog rada uspješno su pripremljeni plazmidi za ekspresiju u staničnim linijama sisavaca divljeg tipa proteina DPP3 i SH2D3C rekombinacijskim kloniranjem što će omogućiti daljnja istraživanja interakcije DPP3 i SH2D3C izoformi 1 i 2 te potencijalnu poveznicu signalnog puta KEAP1-NRF2 sa staničnim procesima u koje je uključen SH2D3C. Također moglo bi otvoriti nove mogućnosti detekcije biomarkera i pristupa liječenju raka.

Uspješno je provedena mjesno-specifična mutageneza te su pripremljeni plazmidi za ekspresiju mutanata DPP3 u staničnim linijama sisavaca.

U DPP3-KO staničnoj liniji HEK293FT nije vidljiva ekspresija DPP3, što je vjerojatno rezultat aktivnosti endonukleaze Cas9 korištene za deleciju gena DPP3 prirodno prisutnog u genomu. Kako bi se izbjeglo ovo neželjeno cijepanje te omogućilo daljnje istraživanje utjecaja DPP3 mutanata na signalni put KEAP1-NRF2, potrebno je dizajnirati sintetski slijed nukletida željenih mutanata DPP3 koristeći alternativne kodone pazeći na sekvence korištenih vodičkih RNA. Ovim pristupom vodičke RNA neće prepoznati slijed nukletida DPP3 mutanata te bi ekspresija mutiranih inačica DPP3 bila moguća u staničnoj liniji HEK293FT s deletiranim genom DPP3. Nastavak istraživanja mutanata DPP3 može omogućiti bolje razumijevanje mehanizama kojima DPP3 doprinosi razvoju raka i potencijalno otkriti nove mete antitumorskih lijekova.

§ 6. ZAHVALE

Hvala mojoj mentorici dr. sc. Mihaeli Matovina što me uvela u zanimljivu priču o dipeptidil-peptidazi 3. Hvala na ukazanom povjerenju i pruženoj prilici za izradu ovog rada, strpljenju i svojoj pomoći tijekom cijeloga procesa.

Hvala mojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Jasmini Rokov Plavec na prihvaćanju mentorstva te konstruktivnim savjetima.

Hvala dr. sc. Ani Tomašić Paić na iznimnom trudu, vremenu, podršci i pomoći sa svim izazovima na koje smo naišle te velikoj pozitivni.

Hvala obitelji i prijateljima na podršci pruženoj tijekom istraživanja i izrade ovog rada.

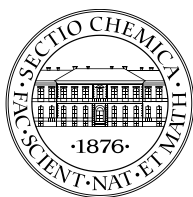
Hvala vam svima od srca!

§ 7. POPIS LITERATURE

1. M. Matovina, D. Agić, M. Abramić, et al. New findings about human dipeptidyl peptidase III based on mutations found in cancer. *RSC Adv* **2017**, 7 (58), 36326–36334.
2. P. Kumar, V. Reithofer, M. Reisinger, et al. Substrate complexes of human dipeptidyl peptidase III reveal the mechanism of enzyme inhibition. *Sci Rep* **2016**, 6.
3. M. Matovina, A. Tomašić Paić, S. Tomić, et al. Identification of SH2 Domain-Containing Protein 3C as a Novel, Putative Interactor of Dipeptidyl Peptidase 3. *Int J Mol Sci* **2023**, 24 (18).
4. G. Malovan, B. Hierzberger, S. Suraci, et al. The emerging role of dipeptidyl peptidase 3 in pathophysiology. *FEBS Journal*. John Wiley and Sons Inc May 1, 2023, pp 2246–2262.
5. M. Arora, S. Kumari, L. Kadian, et al. Involvement of DPP3 in modulating oncological features and oxidative stress response in esophageal squamous cell carcinoma. *Biosci Rep* **2023**, 43 (9).
6. K. Lu, A.L. Alcivar, J. Ma, et al. NRF2 induction supporting breast cancer cell survival is enabled by oxidative stress-induced DPP3-KEAP1 interaction. *Cancer Res* **2017**, 77 (11), 2881–2892.
7. P.K. Baral, N. Jajčanin-Jozić, S. Deller, et al. The first structure of dipeptidyl-peptidase III provides insight into the catalytic mechanism and mode of substrate binding. *Journal of Biological Chemistry* **2008**, 283 (32), 22316–22324.
8. Y. Tong, Y. Huang, Y. Zhang, et al. DPP3/CDK1 contributes to the progression of colorectal cancer through regulating cell proliferation, cell apoptosis, and cell migration. *Cell Death Dis* **2021**, 12 (6).
9. Y. Wallez, P.D. Mace, E.B. Pasquale, S.J. Riedl. NSP-CAS Protein Complexes: Emerging Signaling Modules in Cancer. *Genes Cancer* **2012**, 3 (5–6), 382–393.
10. P.D. MacE, Y. Wallez, M.K. Dobaczewska, et al. NSP-Cas protein structures reveal a promiscuous interaction module in cell signaling. *Nat Struct Mol Biol* **2011**, 18 (12), 1381–1387.
11. V.C. Dodelet, C. Pazzagli, A.H. Zisch, C.A. Hauser, E.B. Pasquale. A., in press. 2 The abbreviations used are: SH2, Src homology 2; SH3, Src homology 3; **1999**; Vol. 274.
12. A. Sakakibara, S. Hattori. Chat, a Cas/HEF1-associated Adaptor Protein That Integrates Multiple Signaling Pathways*; **2000**.
13. D. Matsumaru, H. Motohashi. The KEAP1-NRF2 system in healthy aging and longevity. *Antioxidants*. MDPI December 1, 2021.
14. X.M. Yamamoto, T.W. Kensler, H. Motohashi. THE KEAP1-NRF2 SYSTEM: A THIOL-BASED SENSOR-EFFECTOR APPARATUS FOR MAINTAINING REDOX HOMEOSTASIS. *Physiol Rev* **2018**, 98, 1169–1203.
15. A. Kopacz, A.I. Rojo, C. Patibandla, et al. Overlooked and valuable facts to know in the NRF2/KEAP1 field. *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier Inc. November 1, 2022, pp 37–49.
16. K. Bose. Textbook on Cloning, Expression and Purification of Recombinant Proteins; Springer Nature, **2022**.
17. J. Durland, H. Ahmadian-Moghadam. Genetics, Mutagenesis <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560519/> (accessed Aug 22, 2024).

18. T. Li, Y. Yang, H. Qi, et al. CRISPR/Cas9 therapeutics: progress and prospects. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. Springer Nature December 1, 2023.
19. M.A. Mengstie, B.Z. Wondimu. Mechanism and applications of crispr/ cas-9-mediated genome editing. *Biologics: Targets and Therapy*. Dove Medical Press Ltd 2021, pp 353–361.
20. S.C. Selvakumar, K.A. Preethi, K. Ross, et al. CRISPR/Cas9 and next generation sequencing in the personalized treatment of Cancer. *Molecular Cancer*. BioMed Central Ltd December 1, 2022.
21. M. Redman, A. King, C. Watson, D. King. What is CRISPR/Cas9? *Arch Dis Child Educ Pract Ed* **2016**, 101 (4), 213–215.
22. T. Mahood, P.-C. Yang. *N Am J Med Sci* **2012**, 4 (9), 429–434.
23. B.T. Kurien, R.H. Scofield. Western Blotting: An Introduction. *Methods Mol Biol.* **2020**.
24. J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer. BIOKEMIJA, 1st ed.; Bukan, G., Ed.; školska knjiga, Zagreb, **2013**.
25. H. Potter, R. Heller. Transfection by electroporation. *Current Protocols in Molecular Biology*. October 2010.
26. A. Froger, J.E. Hall. Transformation of Plasmid DNA into E. Coli using the heat shock method. *Journal of Visualized Experiments* **2007**, No. 6.
27. Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit www.thermoscientific.com/onebio.
28. N.D. Olson, J.B. Morrow. DNA extract characterization process for microbial detection methods development and validation. *BMC Res Notes* **2012**, 5.
29. G. Koetsier, E. Cantor, E. Biolabs. A Practical Guide to Analyzing Nucleic Acid Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometers.
30. P.E. Carrigan, P. Ballar, S. Tuzmen. Site-directed mutagenesis. *Methods in Molecular Biology* **2011**, 700, 107–124.
31. O. Edelheit, A. Hanukoglu, I. Hanukoglu. Simple and efficient site-directed mutagenesis using two single-primer reactions in parallel to generate mutants for protein structure-function studies. *BMC Biotechnol* **2009**, 9.
32. Agilent Technologies. QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit Instruction Manual.
33. NEBaseChanger <https://nebasechanger.neb.com/> (accessed Aug 24, 2024).
34. P.Y. Lee, J. Costumbrado, C.Y. Hsu, Y.H. Kim. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments* **2012**, No. 62.
35. J. Park, A.L. Throop, J. LaBaer. Site-specific recombinational cloning using gateway and in-fusion cloning schemes. *Curr Protoc Mol Biol* **2015**, 2015, 3.20.1-3.20.23.
36. T. Bio USA Inc. In-Fusion® HD EcoDry™ Cloning Kit User Manual.
37. L. Nikfarjam, P. Farzaneh. Prevention and Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Culture. *Cell J.* **2012**, 13 (4), 203–212.
38. R. Harasawa. PCR: APPLICATION OF NESTED PCR TO DETECTION OF MYCOPLASMAS; **1996**.
39. B.J.S.C. Olson. Assays for determination of protein concentration. *Curr Protoc Pharmacol* **2016**, 2016, A.3A.1-A.3A.32.
40. A.B. Nowakowski, W.J. Wobig, D.H. Petering. Native SDS-PAGE: High resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions. *Metallomics* **2014**, 6 (5), 1068–1078.
41. T. Mahmood, P.C. Yang. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci* **2012**, 4 (9), 429–434.

42. T.K. Kim, J.H. Eberwine. Mammalian cell transfection: The present and the future. *Anal Bioanal Chem* **2010**, 397 (8), 3173–3178.
43. Chemical Transfection Methods | ibidi <https://ibidi.com/content/263-chemical-transfection> (accessed Aug 24, 2024).
44. SH2D3C - SH2 domain-containing protein 3C - Homo sapiens (Human) | UniProtKB | UniProt <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q8N5H7/entry> (accessed Aug 24, 2024).
45. DPP3 - Dipeptidyl peptidase 3 - Homo sapiens (Human) | UniProtKB | UniProt <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9NY33/entry> (accessed Aug 24, 2024).
46. cBioPortal for Cancer Genomics <https://www.cbioportal.org/> (accessed Aug 24, 2024).



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Kemijski odsjek

SAŽETAK

Priprema plazmidnih vektora za ekspresiju proteina dipeptidil-peptidaze 3 (DPP3) i proteina 3C koji sadrži domenu SH2 (SH2D3C) u staničnim linijama sisavaca

Helena Križan

Dipeptidil-peptidaza 3 (DPP3) je aminopeptidaza ovisna o cinku, koja cijepa dipeptide s N-kraja kratkih peptida te je uključena u završne korake katabolizma proteina. DPP3 bi mogla imati ulogu u regulaciji krvnog tlaka, nocicepcije i imunomodulacije. Regulator je odgovora na oksidacijski stres preko signalnog puta NRF2-KEAP1 te je pronađena prekomjerno eksprimirana i/ili aktivana u nekoliko vrsta zloćudnih tumora.

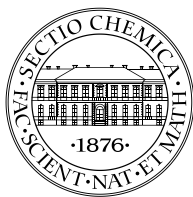
Protein 3C koji sadrži domenu SH2 (SH2D3C), adaptorski protein iz obitelji novih proteina koji sadrže SH2 domenu (NSP, eng. *novel SH2-containing proteins*), identificiran je kao novi, potencijalni interaktor DPP3. SH2D3C ostvaruje interakcije s CAS obitelji proteina (eng. *CRK-associated substrate*) pri čemu tvori mnoge signalne komplekse. NSP-CAS kompleksi djeluju kao medijatori u migraciji stanica, adheziji i invazivnosti, što upućuje na važnost u brojnim bolestima, a posebice u progresiji tumora i metastaza. Interakcija DPP3-SH2D3C bi mogla biti poveznica između regulacije odgovora na oksidacijski stres i procesa u koje je uključen SH2D3C, poput staničnog rasta, adhezije i migracije.

U okviru ovog rada su pomoću rekombinacijskog kloniranja pripremljeni plazmidni vektori za ekspresiju divljeg tipa proteina DPP3, SH2D3C izoforme 1 i SH2D3C izoforme 2, s HA epitopom na N-kraju, u staničnim linijama sisavaca. Ovi konstrukti omogućuju nastavak istraživanja DPP3-SH2D3C interakcije i njenog značaja za staničnu fiziologiju.

Također su pomoću mjesno specifične mutageneze pripremljeni plazmidni vektori za ekspresiju mutiranih inačica DPP3, G585A i G585E, s FLAG epitopom na N-kraju, u staničnim linijama sisavaca za daljnje istraživanje utjecaja mutacija u kodirajućoj regiji gena DPP3, koje su nađene u uzorcima zloćudnih tumora, na NRF2-KEAP1 signalni put.

Svi proteini kodirani pripremljenim plazmidnim vektorima uspješno su eksprimirani u HEK293FT stanicama, no divlji tip DPP3 i mutirane inačice nisu eksprimirane u HEK293FT stanicama s deletiranim DPP3 genom. Potencijalni uzrok tome je aktivnost Cas9 proteina u CRISPR/Cas9 modificiranim HEK293FT stanicama. Kako bi se tome doskočilo, potrebno je dizajnirati sekvencu DPP3 koju vodička RNA neće prepoznati te ponoviti postupak mjesno specifične mutageneze. Potom je moguć nastavak istraživanja utjecaja DPP3 mutanata na signalni put KEAP1-NRF2 u stanicama u kojima nije eksprimiran endogeni DPP3.

Ključne riječi: dipeptidil-peptidaza 3, protein 3C koji sadrži domenu SH2, genetičko inženjerstvo, plazmidni vektori, ekspresija u staničnim linijama sisavaca



University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Chemistry

SUMMARY

Preparation of Plasmid Vectors for the Expression of Dipeptidyl-Peptidase 3 (DPP3) and SH2 Domain-Containing Protein 3C (SH2D3C) in Mammalian Cell Lines

Helena Križan

Dipeptidyl-peptidase 3 (DPP3) is a zinc-dependent aminopeptidase that cleaves dipeptides from the N-terminus of short peptides and is involved in the final steps of protein catabolism. DPP3 may play a role in the regulation of blood pressure, nociception, and immunomodulation. It acts as a regulator of the oxidative stress response via the NRF2-KEAP1 signaling pathway and has been found to be overexpressed and/or activated in several types of malignant tumors.

The SH2 domain-containing protein 3C (SH2D3C), an adaptor protein from the novel SH2-containing protein (NSP) family, has been identified as a new, putative interactor of DPP3. SH2D3C interacts with the CAS protein family (CRK-associated substrate), forming numerous signaling complexes. NSP-CAS complexes act as mediators in cell migration, adhesion, and invasiveness, suggesting their importance in various diseases, particularly in tumor progression and metastasis. The DPP3-SH2D3C interaction could serve as a link between the regulation of oxidative stress responses and processes involving SH2D3C, such as cell growth, adhesion, and migration.

In this study, plasmid vectors were prepared using recombination cloning for the expression of wild-type DPP3 protein, SH2D3C isoform 1, and SH2D3C isoform 2, each with

an HA epitope at the N-terminus, in mammalian cell lines. These constructs enable further investigation of DPP3-SH2D3C interaction and their significance for cell physiology.

Additionally, site-specific mutagenesis was used to prepare plasmid vectors for the expression of mutated DPP3 variants, G585A and G585E, with a FLAG epitope at the N-terminus, in mammalian cell lines for further study of the impact of mutations in the DPP3 gene coding region, found in cancer samples, on the NRF2-KEAP1 signaling pathway.

All proteins encoded by the prepared plasmid vectors were successfully expressed in HEK293FT cells; however, the wild-type DPP3 and mutant variants were not expressed in HEK293FT cells with a deleted DPP3 gene. The potential cause of this could be the activity of the Cas9 protein in CRISPR/Cas9-modified HEK293FT cells. To address this issue, it is necessary to design a DPP3 sequence that will not be recognized by the guide RNA and to repeat the site-specific mutagenesis procedure. Subsequently, further research on the impact of DPP3 mutants on the KEAP1-NRF2 signaling pathway in cells lacking endogenous DPP3 expression can be pursued.

Keywords: dipeptidyl-peptidase 3, protein 3C containing the SH2 domain, genetic engineering, plasmid vectors, expression in mammalian cell lines

ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Helena Križan

Datum rođenja: 26.5.2000.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

- | | |
|-----------|--|
| 2024 | CEEPUS Free Mover mobilnost, Institute of Molecular Biosciences, University of Graz, Graz |
| 2024 | Rad u Laboratoriju za biokemiju proteina i molekularno modeliranje Zavoda za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković kod dr. sc. Mihaele Matovina |
| 2024 | Rad u Centru za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu kod dr. sc. Beate Halassy |
| 2022–2024 | Diplomski sveučilišni studij Kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, smjer: istraživački, grane: biokemija i organska kemija |
| 2019–2022 | Preddiplomski studij Kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb |
| 2015–2019 | V. gimnazija, Zagreb |
| 2007–2015 | Osnovna škola Antun Branka Šimića, Zagreb |

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

- | | |
|------|------------------|
| 2022 | Women in science |
|------|------------------|