Razvoj staničnih linija fibroblasta PS120 s mutiranim Na+/H+ izmjenjivačem NHE3

Jolić, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:633488

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

DIPLOMSKI RAD

Razvoj staničnih linija fibroblasta PS120 s mutiranim Na^+/H^+ izmjenjivačem NHE3

Martina Jolić

Zagreb, 2017.

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

Želim zahvaliti svom mentoru izv. prof. dr. sc. Mirzi Žišku na prilici za rad na ovom projektu, na ukazanom povjerenju, pomoći i strpljivosti. Također, veliko hvala sumentorici izv. prof. dr. sc. Nataši Bauer na savjetima, pomoći i razumijevanju.

Svim mojim prijateljima i prijateljicama na ovim nezaboravnim godinama studiranja, na odličnim uspomenama i novim iskustvima jedno ogromno hvala, uz vas je sve bilo lakše. Posebno hvala Dori, na društvu, bezbrojnim kavama i zasluženim pauzama.

Nika, hvala ti na prijateljstvu, bezuvjetnoj podršci, tuljanskom smijehu i gusarskom povezu. Tvojoj obitelji i tebi hvala na domu daleko od doma.

I naravno, beskrajno hvala mojoj obitelji koja mi je bila oslonac kroz sve godine školovanja i bez kojih ništa od ovog ne bi bilo moguće, moji „biseri rasuti po celom svetu“. Volim vas sve. Mama i tata ovo je za vas!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

RAZVOJ STANIČNIH LINIJA FIBROBLASTA PS120 S MUTIRANIM Na^+/H^+ IZMJENJIVAČEM NHE3

Martina Jolić
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Cilj istraživanja je razvijanje staničnih linija fibroblasta PS120, bez i s proteinom NHERF2, transfeciranih s mutiranim izmjenjivačima Na^+ i H^+ izooblika 3 (NHE3). Stanice će se u kasnijim funkcionalnim studijama koristiti za istraživanje mehanizama regulacije NHE3 pomoću Ca^{2+}/kalmodulin ovisne kinaze II (CaMK-II). Metodom usmjerene mutageneze mutirana su na sekvenci *HANHE3* potencijalna fosforilacijska mjesta za CaMK-II. Sedam mutacija je provedeno na nativnoj sekvenci *HANHE3* (pcDNA/TM7-HANHE3), dok se šest mutacija nalazi na krnjoj sekvenci *HANHE3* (pcDNA/TM6-d24HANHE3). Krnja sekvenca *HANHE3* (*d24HANHE3*) je mutanta iz koje je uklonjeno vezno mjesto za CaMK-II, segment dug 24 aminokiseline (Leu586-Arg609). Mutirana su slijedeća fosforilacijska mjesta: Ser554, Ser562, Ser607, Ser663, Ser693, Ser694 i Ser810. U ekspresijskom vektoru pcDNA/TM7-HANHE3 mutacije su provođene uzastopno, jedna nakon druge, pri čemu su korištene slijedeće metode: reakcija PCR, transformacija bakterija mutiranom *HANHE3*, umnožavanje bakterija u tekućem mediju, izolacija umnoženog plazmida iz bakterija i sekvenciranje. Ekspresijski vektor pcDNA/TM6-d24HANHE3 je konstruiran u dva koraka. U prvom je pomoću krnje sekvence *d24HANHE*3 konstruirana mutanta pcDNA/TM2-d24HANHE3 unutar koje su mutirani Ser554/Ser562 u Ala554/Ala562. U drugom koraku su najprije restrikcijskom endonukleazom *Pma*CI pocijepani pcDNA/TM7-HANHE3 i pcDNA/TM2-d24HANHE3 u po dva DNA isječka, duži vektorski dio i kraći umetak. Vektorski dio (f-pcDNA/TM4-HANHE3) izoliran iz pcDNA/TM7-HANHE3 sadržavao je četiri mutacije, dok umetak (fTM2-d24HANHE3) izoliran iz pcDNA/TM2-d24HANHE3 sadržavao dvije mutacije i deleciju veznog mjesta. Zatim je povezivanjem vektora i umetka pomoću ligacije konstruiran ekspresijski vektor pcDNA/TM6-d24HANHE3. Ekspresijski vektori su postupkom transfekcije unijeti u stanične linije fibroblasta PS120 bez i s proteinom NHERF2. Selekcijskim antibiotikom G418 selektirane su uspješno transfecirane stanice, a zakiseljavanjem transfeciranih staničnih linija selektirane su stanice s funkcionalnim mutiranim proteinom NHE3 na površini stanica.

(77 stranica, 31 slika, 10 tablica, 38 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: NHE3, CaMK-II, NHERF2

Voditelj: Dr.sc. Mirza Žižak, izv. prof.
Suvoditelj: Dr.sc. Nataša Bauer, izv. prof.

Ocjenitelji: Dr.sc. Nataša Bauer, izv. prof

Dr.sc. Mirta Tkalec, izv. prof.

Dr.sc. Jasna Lajtner, izv. prof.

Rad prihvaćen: 16.02.2017

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

DEVELOPMENT OF PS120 FIBROBLAST CELL LINES WITH MUTATED Na^+/H^+ EXCHANGER NHE3

Martina Jolić
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Goal of this research was development of PS120 fibroblast cell lines transfected with mutated Na^+/H^+ exchanger isoform 3 (NHE3), with or without NHERF2. Developed cell lines will be used in future studies to examine Ca^{2+}/calmodulin dependent kinase II (CaMK-II) regulation mechanisms of NHE3. Site directed mutagenesis was used on a gene sequence for HANHE3 to develop point mutations on potential phosphorylation sites for CaMK-II. Seven mutations were made on a native *HANHE3* sequence (pcDNA/TM7-HANHE3), while six mutations were made on *HANHE3* sequence that has 24 amino acids long (Leu586-Arg609) deletion of CaMK-II binding site (*d24HANHE3*). Mutations were made on following amino acids: Ser554, Ser562, Ser607, Ser663, Ser693, Ser694 and Ser810. Mutations on pcDNA/TM7-HANHE3 where made successively, one after the other, using: PCR reactions, bacterial transformation with mutated sequence, amplifying of bacteria in liquid medium, isolation of amplified product, and sequencing. Construction of pcDNA/TM6-d24HANHE3 was a two-step process. First, mutations Ser554Ala and Ser562Ala were made on d24HANHE3 as a template (pcDNA/TM2-d24HANHE3). Second, both pcDNA/TM7-HANHE3 and pcDNA/TM2-d24HANHE3 were cut using *PmaC*I restriction enzyme to acquire insert and vector needed for construction of pcDNA/TM6-d24HANHE3. Vector (f-pcDNA/TM4-HANHE3) was isolated from pcDNA/TM7-HANHE3, and it had four mutations, while insert (fTM2-d24HANHE3) was isolated from pcDNA/TM2-d24HANHE3 and had two mutations of CaMK-II potential phosphorylation sites and the deletion of CaMK-II binding site. Then using ligation, vector and insert were connected to form pcDNA/TM6-HANHE3. Mutated plasmids pcDNA/TM7-HANHE3 and pcDNA/TM6-HANHE3 were transfected into PS120 fibroblast cell lines with or without NHERF2. Cells were selected with antibiotic G418 to make sure that transfection was successful. Acid loading of transfected cells was performed to select cells with expression of functional mutated NHE3.

(77 pages,31 figures, 10 tables, 38 references,original in Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: NHE3, CaMK-II, NHERF2

Supervisor: Mirza Žižak, PhD, Assoc. Prof.
Cosupervisor: Nataša Bauer, PhD, Assoc. Prof.

Reviewers: Nataša Bauer, PhD, Assoc. Prof.,

Mirta Tkalec, PhD, Assoc. Prof.,

Jasna Lajtner, PhD, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 16.02.2017.

POPIS KRATICA

A	nukleotid adenin
Ala	aminokiselina alanin
ANG II	angiotenzin II
Arg	aminokiselina arginin
AT1R	angiotenzin II receptor tip 1
C	nukleotid citozin
CaMK-II	Ca2+/kalmodulin ovisna kinaza
cAMP	ciklički adenozin monofosfat
cGKII	ciklička GMP kinaza II
cGMP	ciklički gvanozin monofosfat
CHP	kalcineurin homologni protein
CK-II	kazein kinaza II
CPA	superporodica gena za kation-anion izmjenjivače
DDPIV	protein peptidaza IV
DMEM	medij za održavanje staničnih linija
dNTP	deoksiribonukleotid-3-fosfat
DRA	kloridni anionski izmjenjivač
E3KARP	regulator Na+/H+ proteinskog izmjenjivača 2
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
El	izvanstanična petlja
EZR	ezrin vezajuća domena proteina
FBS	fetalni goveđi serum
G	nukleotid gvanin
HA	peptid deriviran iz glikoproteina humanog virusa influence
HANHE3	sekvenca gena NHE3 s kloniranim trostrukim HA epitopom
HANHE3	protein NHE3 s trostrukim HA epitopom
d24HANHE3	sekvenca gena NHE3 s deletiranim CaMK-II veznim mjestom (Leu586-Arg609) s kloniranim trostrukimHA epitopom
d24HANHE3	protein NHE3 s deletiranim CaMK-II veznim mjestom (Leu586-Arg609) s trostrukim HA epitopom
HBSS	pufer za održavanje pH i osmotske ravnoteže

IBD	upalne bolesti crijeva
IFN-γ	interferon gama
IP3	inozitol trifosfat
IRBIT	receptor vezajući protein inozitol 1,4,5-trifosfat
LB	Luria-Bertani medij
Leu	aminokiselina leucin
M	transmembranska poddomena
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina
NHA	Na+/H+ antiporteri
NHE	Na+/H+ izmjenjivač
NHERF	regulator Na+/H+ proteinskog izmjenjivača
PAT-1	H+/aminokiseline transporter 1
pb	par baza
pcDNA	plazmidna deokisribonukleinska kiselina
PCR	lančana reakcija polimerazom
PDZ	strukturna proteinska domena
PepT1	di/tripeptidi
PKA	protein kinaza A
PKC	protein kinaza C
PLC	protein lipaza C
PP1	protein fosfataza 1
PP2A	protein peptidaza 2A
SDS	natrijev dodecil-sulfat
Ser	aminokiselina serin
SGK1	serum/glukokortikoid inducibilna kinaza 1
SLC9	porodica gena koja kodira za Na+/H+ izmjenjivače
SOC	super optimalni medij s glukozom
T	nukleotid timin
TAE	pufer: 40 mM Tris, 20 mM natrij acetat, 2 mM EDTA
TE	pufer: 10 mM Tris, 1 mM EDTA
TMA	pufer: 3 M tetrametilamonium klorid, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM EDTA, 1% SDS
TNF-γ	tumorski faktor nekroze gama

Sadržaj:

1. UVOD 1

1.1. Porodica proteina NHE 2

1.2. Protein NHE3 3

1.3. Uloga NHE3 u bolesti 3

1.4. Struktura proteina NHE3 4

1.4.1. Transmembranska domena NHE3 4

1.4.2. Regulatorna domena NHE3 5

1.5. Fiziološka uloga proteina NHE3 6

1.6. Regulacija proteina NHE3 8

1.6.1. Regulacija aktivnosti NHE3 fosforilacijom 9

1.6.2. Regulacija aktivnosti NHE3 posredovana protein – protein interakcijom 10

1.6.3. Regulacija aktivnosti NHE3 promjenom njegovog položaja u stanici 12

1.6.4. Regulacija aktivnosti NHE3 posredovana nadzorom nad transkripcijom i translacijom NHE3 14

1.6.5. Regulacija aktivnosti NHE3 pomoću CaMK-II 14

2. CILJ ISTRAŽIVANJA 16

3. MATERIJALI I METODE 18

3.1. Materijali 19

3.1.1. Kemikalije 19

3.1.1.1. Početnice 19

3.1.1.2. Enzimi 19

3.1.1.3. Puferi 20

3.1.1.4. Komercijalni kompleti 20

3.1.1.5. Reagensi 20

3.1.2. Plazmidni vektori 21

3.1.3. Programi 22

3.1.4. Stanice 22

3.1.5. Hranjive podloge 22

3.1.6. Oprema 22

3.2. Metode 24

3.2.1. Program GPS 3.0. 24

3.2.2. Izrada početnica 24

3.2.3. Reakcije PCR za izradu mutanti HANHE3 25

3.2.4. Strategija izrade ekspresijskog vektora pcDNA/TM6-d24HANHE3 29
3.2.5. Defosforilacija fragmenata DNA pomoću enzima SAP 29
3.2.6. Ugradnja DNA fragmenta (umetka) u vektorski plazmid ligacijom 31
3.2.7. Određivanje orijentacije umetka restrikcijskim enzimima 31
3.2.8. Utvrđivanje orijentacije umetka u ekspresijskom vektoru 31
3.2.9. Horizontalna gel elektroforeza u agaroznom gelu 32
3.2.10. Pročišćavanje i izolacija PCR produkata 33
3.2.11. Mjerenje koncentracije DNA u uzorcima 33
3.2.12. Uklanjanje plazmidnog predloška iz reakcijske smjese za transformaciju bakterijskih stanica 33
3.2.13. Transformacija bakterijskih stanica 34
3.2.14. Minipreparacija plazmidne DNA 35
3.2.15. Sekvenciranje 36
3.2.16. Održavanje kulture stanica PS120 36
3.2.17. Presađivanje kulture stanica PS120 37
3.2.18. Transfekcija stanica 37
3.2.19. Selekcija stanica postupkom zakiseljavanja 38
4. REZULTATI 39
4.1. Odabir potencijalnih CaMK-II fosforilacijskih mjesta 40
4.2. Konstrukcija ekspresijskog vektora pcDNA/TM7-HANHE3 40
4.2.1. Izrada pojedinih točkastih mutacija unutar HANHE3 41
4.2.2. Transformacija kompetentnih stanica mutiranom DNA 42
4.2.3. Analiza i potvrđivanje provedenih mutacija sekvenciranjem 43
4.3. Konstrukcija ekspresijskog vektora pcDNA/TM6-d24HANHE3 47
4.3.1. Izrada točkastih mutacija u pcDNA/d24HANHE3 47
4.3.2. Transformacija kompetentnih stanica mutiranom DNA 47
4.3.3. Analiza i potvrđivanje provedenih mutacija sekvenciranjem 48
4.3.4. Potpuna restrikcija vektora pcDNA/TM2-d24HANHE3 i pcDNA/TM7-HANHE3 i njihovo pripravljanje za konstruiranje ekspresijskog vektora pcDNA/TM6-d24HANHE3 50
4.3.5. Konstruiranje pcDNA/TM6-d24HANHE3 ugradnjom *umetka* fTM2-d24HANHE3 u *vektor* f-pcDNA/TM4-HANHE3 52
4.3.6. Analiza plazmida pcDNA/TM6-d24HANHE3 i provjera orijentacije umetka restrikcijskom digestijom 53
4.3.7. Analiza ekspresijskog vektora pcDNA/TM6-d24HANHE3 sekvenciranjem 55

4.4. Transfekcija ekspresijskih vektora pcDNA/TM7-HANHE3 i pcDNA/TM6-d24HANHE3 u stanične linije fibroblasta PS120 i fibroblasta PS120 stabilno transfeciranih s NHERF2 58
4.5. Zakiseljavanje transfeciranih staničnih linija fibroblasta PS120 i PS120/NHERF2 58
5. RASPRAVA 62
5.1. Konstrukcija mutanti 64
5.2. Konstrukcija ekspresijskog vektora pcDNA/TM7-HANHE3 64
5.3. Konstrukcija ekspresijskog vektora pcDNA/TM6-d24HANHE3 65
5.4. Transfekcija staničnih linija fibroblasta PS120 bez i sa NHERF2 i zakiseljavanje stanica 67
6. ZAKLJUČAK 69
7. LITERATURA 71
8. ŽIVOTOPIS 76

1. UVOD

Do danas je identificirano devet izoformi proteinskih izmjenjivača Na^+/H^+ (NHE1-9) koje nalazimo u staničnoj membrani stanica i/ili membranama unutarstaničnih organela. Kao integralni membranski proteini ovi izmjenjivači posreduju transmembransku elektroneutralnu izmjenu Na^+ i H^+ iona (Brett i sur., 2005). Porodica NHE je podijeljena u tri grupe izoformi: 1) *„housekeeping“*, široko rasprostranjene izoforme, koje su uključene u homeostazu unutarstaničnog pH i održavanje staničnog volumena; 2) epitelne, koje su uključene u apsorpciju Na^+ preko stanične membrane i 3) unutarstanične, čije funkcije još nisu dovoljno istražene (Donowitz i sur., 2013). U sisavaca disfunkcija proteina NHE povezana je s raznim patofiziološkim stanjima kao što su bolesti bubrega i probavnog sustava, proljevi, hipertenzija, epilepsija i postishemijska miokardiološka aritmija (Zachos i sur., 2005).

1.1. Porodica proteina NHE

Porodica izmjenjivača NHE kodirana je porodicom gena *SLC9* (*Solute Carrier calssification of transporters*, HUGO nomenklatura), koja je podgrupa superporodice *CPA* (*Cation Proton Antiporter*). Geni porodice *SLC9* su podijeljeni u tri podgrupe: podgrupa *SLC9A* koja kodira izmjenjivače Na^+/H^+ izoformi 1-9, podgrupa *SLC9B* koja kodira NHA1 i NHA2, te podgrupa *SLC9C* koja kodira NHE specifičan za spermu i NHE11 za kojeg još nema funkcionalnih podataka (Donowitz i sur., 2013).

Prema položaju kojeg zauzimaju u membranama stanica izoforme porodice NHE možemo podijeliti u dvije skupine. Prva skupina sastavljena je od izoformi NHE 1-5, smještena je primarno u staničnoj membrani u kojoj ostvaruju svoju funkciju. Druga skupina sastavljena je od izoformi NHE 6-9 koje su smještene u membranama unutarstaničnih organela. Iznimka su izoforme NHE3 i NHE5 za koje je pokazano da recirkuliraju između stanične membrane i unutarstaničnog prostora (Donowitz i Li, 2007).

NHE1 je prisutan u većini stanica sisavaca i jedini je član porodice koju se opisuje kao *„housekeeping“* izoforma. Uglavnom ga nalazimo u staničnoj membrani unutar koje se može nakupljati u određenim mikro-područjima što ovisi o stanju i vrsti stanice (Fuster i Alexander, 2014). Tako ga u polariziranim epitelnim stanicama pronalazimo u bazolateralnoj membrani, u miocitima na prijelaznim pločama i T-tubulima, a u fibroblastima na mjestima prianjanja (Orlowski i Grinstein, 2004). NHE2-4 se pretežno nalaze u epitelnim stanicama bubrega i gastrointestinalnog sustava iako se pojavljuju i u epitelnim stanicama mozga, pluća, srca i dr. Ekspresija NHE5 je najveća u mozgu ali je prisutan i u testisima, slezeni, te skeletnim mišićima (Fuster i Alexander, 2014).

Ostali članovi porodice NHE se nalaze u membranama unutarstaničnih organela gdje sudjeluju u održavanju različitih pH gradijenata unutar citoplazme i organela. Tako se NHE6 nalazi unutar reciklirajućih endosoma gdje održava razinu endosomalnog pH. NHE7 je lokaliziran uglavnom na *trans* dijelu Golgijevog tijela orijentiranom prema površini stanice, dok NHE8 možemo pronaći na apikalnoj membrani proksimalnog kanalića bubrega i crijeva, te u središnjem i *trans* dijelu Golgijevog tijela. NHE9 je primarno lokaliziran u sortirajućim i reciklirajućim endosomima (Fuster i Alexander, 2014).

1.2. Protein NHE3

NHE3 je glikoprotein sastavljen od 832 aminokiseline koji prenosi izvanstanični Na^+ u zamjenu za unutarstanični H^+ u omjeru 1:1 (Levine i sur., 1992). Svoju glavnu funkciju obavlja u četkastoj prevlaci crijeva i kanalića bubrega gdje je odgovoran za neutralnu apsorpciju NaCl i $NaHCO_3$, regulaciju unutarstaničnog pH i volumena epitelnih stanica, te regulaciju sistemskog pH. U stanici NHE3 cirkulira između stanične membrane i ranih endosoma (Zachos i sur., 2005).

U probavnom sustavu možemo ga pronaći u četkastoj prevlaci duodenuma, jejunuma, ileuma i kolona, te žučnom mjehuru. U bubrežnom sustavu se nalazi u proksimalnom kanaliću bubrega, proksimalnom dijelu dugog silaznog kraka i debelom uzlaznom kraku Henleove petlje. Također je pronađen i u nekoliko neurona malog mozga, respiratornih neurona ventrolateralne medule, perineuralnim stanicama laringealnog živca, te u timusu, testisima, ovarijima i hondrocitima (Donowitz i Li, 2007).

1.3. Uloga NHE3 u bolesti

Sudjelovanje proteina NHE3 u brojnim patofiziološkim stanjima predstavlja glavni razlog zbog kojeg se toliko pažnje posvećuje proučavanju njegove topologije, položaja i regulacije.

Sve više istraživanja podupire mišljenje kako je poremećaj transmembranske elektroneutralne apsorpcije NaCl uslijed promijenjene aktivnosti NHE3 jedan od glavnih mehanizama patofiziologije proljeva kod upalnih bolesti crijeva (IBD, engl. ***I**nflammatory **B**owel **D**isease*) (Priyamvada i sur., 2015). Jedan od glavnih simptoma ovih bolesti je kronični proljev, koji je posljedica poremećene homeostaze apsorpcije tekućina i elektrolita. Nedavna istraživanja su pokazala kako glavnu ulogu u razvitku i progresiji proljeva imaju smanjenje funkcije i ekspresije NHE3 i izmjenjivača Cl^-/HCO_3^- DRA (engl. ***D**own **R**egulated in **A**denoma*) (Priyamvada i sur., 2015). Stoga bi dobro razumijevanje mehanizama uključenih u regulaciju aktivnosti NHE3 pomoglo u razvijanju lijekova koji bi olakšali simptome ljudima oboljelim od ovih bolesti.

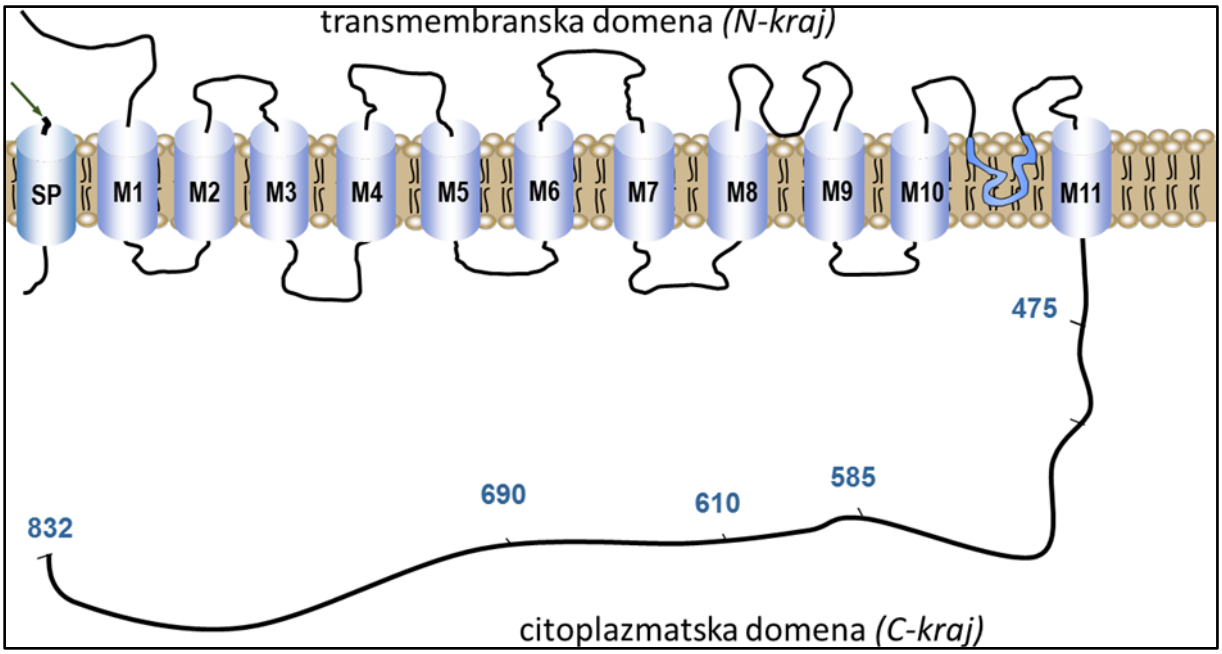
Uloga NHE3 u razvoju hipertenzije (visoki krvni tlak) predstavlja još jedan primjer uključenosti NHE3 u razvoju neke bolesti. Pretpostavlja se da u gotovo 60% osoba s povišenim krvnim tlakom postoji osjetljivost na prehranu bogatu NaCl, a kao jedan od mogućih razloga navodi se poremećena apsorpcija Na^+ u bubrezima (Dominguez Rieg i sur., 2016). Povećani prijenos iona u proksimalnim kanalićima bubrega može rezultirati povećanjem krvnog tlaka. U bubrezima protein NHE3 ima ulogu jednog od glavnih prijenosnika Na^+ te na taj način posreduje u homeostazi krvnog tlaka u organizmu. Povećana aktivnost NHE3 u hipertenziji je rezultat smanjene učinkovitosti inhibicijskih mehanizama i/ili povećane aktivacije NHE3 (Wang i sur., 2009).

Za istraživanje uloge NHE3 u raznim patološkim stanjima često se koriste životinjski modeli. U studiji koji su proveli Ledoussal i sur. (2001) pokazano je da je NHE3 nužan za homeostazu soli, volumena tekućina i pH organizma. Ova grupa je istraživanje provodila na soju *NHE3*$^{-/-}$ miša koji nema ekspresiju proteina NHE3. Uloga proteina NHE3 u održavanju normalne razine krvnog tlaka

potvrđena je i u studiji koju su proveli Li i sur. (2015). U ovoj studiji je potvrđeno da je apsorpcija Na^+ u proksimalnim kanalićima bubrega i tankog crijeva potrebna za regulaciju krvnog tlaka. NHE3 *„knock-out"* miševi (*NHE3*$^{-/-}$) pokazuju poremećaje kao što su hipovolemija (stanje smanjenog volumena plazme u krvi), hipotenzija (nizak krvni tlak), blago zakiseljenje organizma i proljev, što pokazuje važnost NHE3 u funkciji crijeva i bubrega (Dominguez Rieg i sur., 2016).

1.4. Struktura proteina NHE3

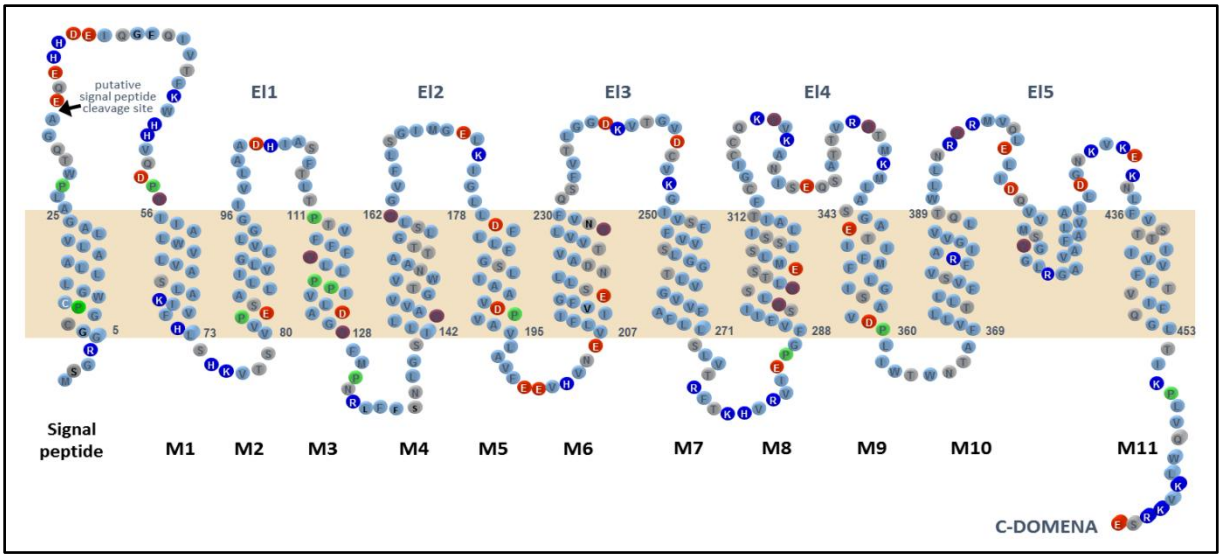
Porodica NHE je funkcionalna grupa proteina koja dijeli visoki stupanj strukturne homologije. Iako točna struktura nije poznata ni za jedan od izmjenjivača NHE, zna se da su svi oni sastavljeni od transmembranske domene (N-domena) na N-kraju i citoplazmatske domene (C-domena) na C-kraju proteina (Slika 1.).



Slika 1. *Shematski prikaz strukture NHE3. Proteini porodice NHE su organizirani u dvije domene: transmembransku (N-domena) na N-kraju proteina i citoplazmatsku (C-domena) na C-kraju proteina.*

1.4.1. Transmembranska domena NHE3

Transmembranska N-domena proteina NHE3 služi za izmjenu iona Na^+ i H^+ kroz staničnu membranu. Sastoji se od približno 455 aminokiselina koje su organizirane u 11 transmembranskih poddomena, signalni peptid i 5 izvanstaničnih petlji (Slika 2.) (Žižak i sur., 2000).



Slika 2. *Topološki model transmembranske domene proteina NHE3 sa signalnim peptidom koji se odcjepljuje na 30. aminokiselini i 11 transmembranskih poddomena. Svaka transmembranska poddomena je numerirana (M1-M11), a izvanstanične petlje su označene s „El 1-5" (engl.* ***E****xtracellular* ***l****oop)* (*preuzeto iz* Žižak i sur., 2000).

Žižak i sur. (2000) razvili su model topološke organizacije transmembranske domene NHE3 sastavljene od 11 transmembranskih poddomena i pet izvanstaničnih petlji. U predstavljenom modelu prva transmembranska domena predstavlja signalni peptid koji se djelovanjem peptidaze na 30. aminokiselinu odcjepljuje od ostatka transmembranskog dijela proteina. Odvajanjem signalnog peptida od ostatka proteina, N-kraj proteina NHE3 ostaje u izvanstaničnom prostoru. S vanjske strane stanične membrane, poddomene su međusobno povezane izvanstaničnim petljama: El1 povezuje poddomene M2-M3, El2 povezuje M4-M5, El3 povezuje M6-M7, El4 povezuje M8-M9, a El5 povezuje poddomene M10-M11. Za El5 petlju smatra se da sudjeluje u prijenosu Na^+ i H^+, te služi u određivanju specifičnosti transporta (P-petlja) (Žižak i sur., 2000). Autori sugeriraju kako je P-petlja izgrađena od izvanstaničnog i unutar membranskog dijela, pri čemu se dio petlje koji uranja u membranu razlikuje od transmembranskih poddomena.

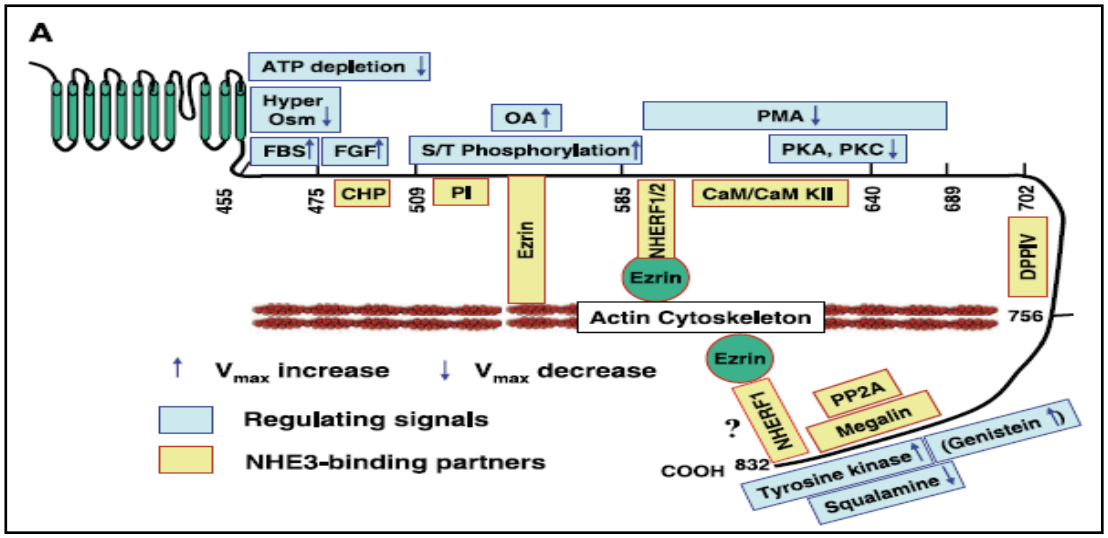
Ovakva organizacija funkcionalne domene proteina NHE3 razlikuje se od modela NHE1 kojeg su razvili Wakabayashi i sur. (2000). Prema njihovu modelu, NHE1 je organiziran u 12 transmembranskih poddomena s N- i C- krajem proteina smještenim unutar stanice. Oba modela, NHE3 i NHE1, se podudaraju u funkcionalnoj važnosti izvanstanične pete petlje, iako se ne podudaraju u njenoj lokaciji.

1.4.2. Regulatorna domena NHE3

Citoplazmatska domena proteina NHE3 je regulatorna domena posredstvom koje različiti agonisti reguliraju aktivnost proteina NHE. Za razliku od transmembranskih domena koje među izoformama porodice NHE dijele visoki stupanj homologije, C domene imaju mali stupanj homologije. Različitost C-domena unutar izoformi se pripisuje regulatornoj ulozi ove domene (Lee i sur., 2013).

Regulatorna domena proteina NHE3 se proteže od 455 do 832 aminokiseline (Donowitz i Li, 2007). Unutar ove domene duge 378 aminokiselina nalaze se stimulacijski i inhibicijski segmenti na koje se vežu ili preko koje djeluju različiti faktori poput NHERF1-4 (engl. *NHE regulatory factor*), Hsc70, DDPIV (engl. *dipeptidyl peptidase IV*), PP2A (engl. *protein phosphatase 2A)* megalin, ezrin, CaMK-II (Ca^{2+}/kalmodulin protein-ovisna kinaza II), fosfolipaza Cγ (PLCγ), Shank2, CHP (kalcineurin homologni protein) i IRBIT (engl. *inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) receptor binding protein released with IP3*) koji utječu na aktivnost NHE3, njegov položaj unutar stanice i razinu ekspresije na površini stanične membrane (Donowitz i sur., 2009) (Slika 3.).

Od osobite važnosti u ovoj domeni je područje između aminokiselina Leu586 i Arg605 za koje se veže više proteina koji aktiviraju i/ili inhibiraju protein NHE3 poput kazein kinaze II (engl. *casein kinase II,* CK II) (Sarker i sur., 2008), NHERF2 (Cha i sur., 2004), CaMK-II (Žižak i sur., 2012) i PLCγ (Zachos i sur., 2009). Uz pojedine regulatorne faktore i proteine, u regulaciji aktivnosti također sudjeluju i veliki više-proteinski kompleksi koji međusobno aktiviraju ili inhibiraju protein NHE3 (Donowitz i sur., 2009).



Slika 3. *Shematski prikaz citoplazmatske regiju NHE3 s proteinima koji se za nju vežu. Strelice indiciraju regulatorne signale koji stimuliraju ili inhibiraju aktivnost NHE3. U žutim pravokutnicima se nalaze regulatorni proteini koji se direktno vežu na citoplazmatsku regiju NHE3 (preuzeto iz* Donowitz i Li, 2007*).*

1.5. Fiziološka uloga proteina NHE3

Glavna uloga proteina NHE3 je elektroneutralna izmjena izvanstaničnog Na^+ za unutarstanični H^+ u stehiometrijskom omjeru 1:1 (Levine i sur., 1992).

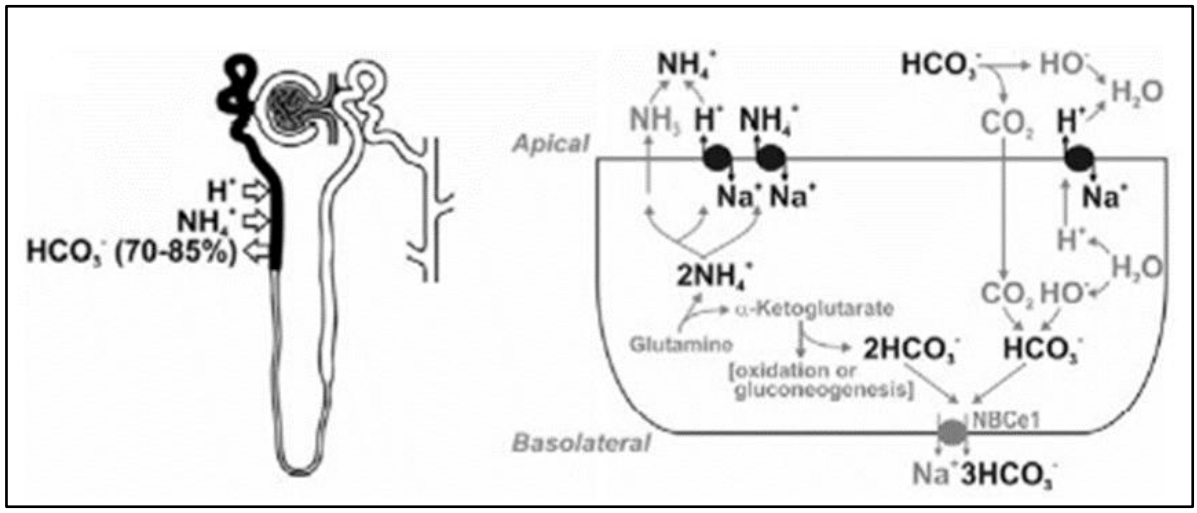
Svakodnevno kroz probavni sustav prođe oko devet litara vode i oko 800 mEq Na^+ od čega veliki dio luče sami organi gastrointestinalnog sustava kao dio probave, a samo je manja količina unijeta prehranom. Jedna od glavnih funkcija ovog sustava, uz bubrežni, je održavanje homeostaze vode i Na^+ u organizmu (Zachos i sur., 2005).

Protein NHE3 odgovoran je za većinu apsorpcije iona Na u proksimalnim dijelovima crijeva i bubrega u procesu neutralne apsorpcije NaCl, procesu visoke učinkovitosti ali niskog kapaciteta koji se odvija u oba sustava. U neutralnoj apsorpciji NaCl u crijevima protein NHE3 je funkcionalno povezan s izmjenjivačima Cl/HCO_3 DRA i PAT-1 (engl. ***p**utative **a**nion **t**ransporter **1***). Apsorpcija Na^+ povezana je s apsorpcijom Cl^- i mehanizam povezanosti NHE3 i izmjenjivača Cl/HCO_3 nije u potpunosti razjašnjen. Pretpostavlja se da do povezivanja dolazi zbog kisele pH mikroklime koja je regulirana pomoću NHE3. Djelovanje NHE3 ne ovisi o njegovom povezivanju s DRA i PAT-1 (Donowitz i sur., 2009).

Osim uloge u neutralnoj apsorpciji NaCl, NHE3 posreduje apsorpciju dipeptida i aminokiselina tako što stvara kiselu mikroklimu na površini četkaste prevlake. Kisela mikroklima koja nastaje na površini zbog izmjene H^+ i Na^+ osigurava potrebne uvjete za ulaz dipeptida. Funkcionalnim povezivanjem NHE3 s kotransporterom PepT1 (H^+/dipeptid kotransporter) unose se dipeptidi iz lumena crijeva u stanice četkaste prevlake (Donowitz i sur., 2009).

U proksimalnim kanalićima bubrega NHE3 posreduje izmjenu H^+ iz apikalnih stanica kanalića u zamjenu za Na^+ iz glomerularnog filtrata. Kao takav igra veliku ulogu u održavanju homeostaze volumena izvanstanične tekućine, kontrole krvnog tlaka i održavanju ravnoteže kiselosti organizma (Crajoinas i sur., 2016).

Osim što sudjeluje u neutralnoj apsorpciji NaCl, u bubrezima je protein NHE3 bitan i za apsorpciju bikarbonata (HCO_3^-) i sekreciju amonijaka (NH_4^+). U proksimalnom kanaliću bubrega NHE3 sudjeluje u sekreciji NH_4^+ na dva načina. Jedan način je da osigurava H^+ potreban za reagiranje s NH_3 koji pasivno difundira u lumen kanalića i stvaranje manje reaktivnog NH_4^+, a drugi način je da katalizira izmjenu NH_4^+, koji je nastao metabolizmom glutamina u mitohondrijima stanice, za Na^+ koji je u lumenu kanalića. Isto tako, u proksimalnom kanaliću bubrega NHE3 posreduje i u apsorpciji većine filtriranog $NaHCO_3$ tako što se, izmjenom Na^+ i H^+, u kanaliću nakuplja H^+ koji stupa u reakciju s HCO_3^- i pretvara ga u CO_2 i H_2O (Bobulescu i Moe, 2006) (Slika 4.).



Slika 4. *U proksimalnom kanaliću bubrega na apikalnoj membrani protein NHE3 posreduje izlučivanje NH_4^+ na dva načina: jedan način je da osigurava H^+ za reakciju s NH_3, koji pasivno difundira u kanalić, a drugi način je da katalizira izmjenu NH_4^+ koji je nastao metabolizmom glutamina u mitohondrijima, za Na^+ iz lumena kanalića. NHE3 posreduje i apsorpciju većine filtriranog bikarbonata u proksimalnom kanaliću tako što osigurava H^+ za reagiranje s bikarbonatom iz čega nastaje CO_2 i voda* (*preuzeto iz* Bobulescu i Moe, 2006).

Kao što je spomenuto u jednom od prethodnih poglavlja, NHE3 je jedan od proteina iz porodice NHE koji cirkulira između citoplazme i stanične membrane. U citoplazmi se nalazi unutar reciklirajućih odjeljaka gdje zakiseljuje rane endosome izmjenom Na^+ unutar endosoma za H^+ u citoplazmi što pripomaže u njihovoj funkciji (Zachos i sur., 2005). Rani endosomi sudjeluju u endocitozi metabolita, hormona i drugih proteina u reakciji posredovanoj receptorom. Tako je za NHE3 je pokazano da sudjeluje u endocitozi albumina u reakciji posredovanoj receptorom (Gekle i sur., 1999). Također, protein NHE3 pokazuje izrazitu osjetljivost na razinu pH unutar stanice. Kad se pH stanice spusti ispod određene razine, izmjenjivač se alosterički aktivira što rezultira pojačanim izbacivanjem H^+ iz stanice i posljedičnim podizanjem unutarstaničnog pH (Orlowski i Grinstein, 1997).

1.6. Regulacija proteina NHE3

NHE3 pripada skupini dobro reguliranih prijenosnih proteina što može objasniti činjenicu da je protein NHE3 čija je veličina oko 87 kDa, smješten unutar velikog više-proteinskog kompleksa veličine 1-2 MDa (Žižak i sur., 2012).

Zbog djelomične aktivnosti NHE3 u bazalnim uvjetima moguće je na njegovu aktivnost djelovati stimulacijom ili inhibicijom. Jedan od primjera kratkoročne regulacije proteina NHE3 je i inhibicija njegove aktivnosti u probavnom sustavu kao odgovor na krajnje produkte probave poput D-glukoze i kratkolančanih masnih kiselina, te promjene neurohormonalnog sastava unutar crijeva. Ova promjena aktivnosti je brza i odvija se tijekom nekoliko minuta. Kratkoročna regulacija aktivnosti NHE3 u bubrezima je sporija i odvija se kroz nekoliko sati, a uzrokovana je promjenama u prehrani, volumenu i tlaku krvi, te kao odgovor na lijekove (Donowitz i Li, 2007). Popis kratkoročnih regulatora NHE1, -2 i -3 vidljiv je u Tablici 1.

Tablica 1. Popis kratkotrajnih regulatornih spojeva za NHE1-3 (preuzeto iz Zachos i sur., 2005), S – označava stimulaciju aktivnosti NHE3, I – označava inhibiciju aktivnosti NHE3.

	NHE1	NHE2	NHE3
Adenosine	—	—	S,I[a,b]
ATP Depletion	I	I	I
Albumin	—	—	S
Angiotensin II	S	—	S
ANP	—	—	I
cAMP	S	S	I
cGMP	—	—	I
Dopamine	I	—	—
EGF	—	—	S
Elevated $[Ca^{2+}]_i$	S	—	I
Endothelin-1	—	—	S
Epinephrine	I	—	S
FBS	S	S	S
FGF	S	S	S
Glucocorticoids	S	—	S
Hyperosmolarity	S	S,I[c]	I
Insulin	—	—	S
LPA	—	—	S
Mineralocorticoids	—	S	—
Nitric oxide	—	—	I
Norepinephrine	—	—	S
PMA	S	S	I
PTH	—	—	I
Okadaic acid	—	S	S
Serotonin	S	—	I
Short chain fatty acid	—	—	S
Somatostatin	I	—	—
Thrombin	S	S	S

Pored gore navedenih kratkoročnih regulatora aktivnosti NHE3 u koje spadaju drugi glasnici, faktori rasta, kiseline, hormoni i dr., aktivnost proteina NHE3 regulirana je s nekoliko kratkoročnih i dugoročnih mehanizama, kao što su fosforilacija, regulacija transkripcije, protein-protein interakcija i kruženje proteina NHE3 između citoplazme i membrane epitelnih stanica.

1.6.1. Regulacija aktivnosti NHE3 fosforilacijom

Regulatorna citoplazmatska domena proteina NHE3 sadrži brojna fosforilacijska mjesta koja se mogu podvrgnuti fosforilaciji raznim protein kinazama i tako modulirati aktivnost izmjenjivača NHE3.

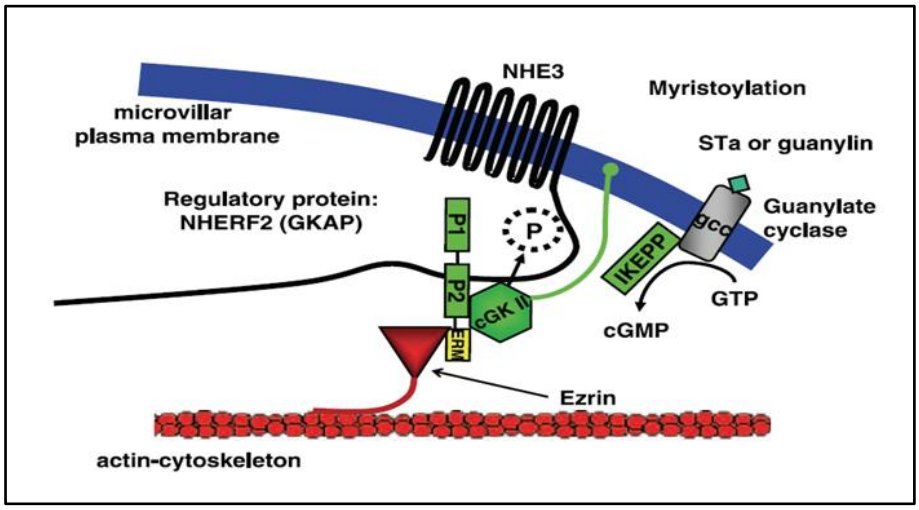
Protein kinaza A (PKA, poznata i kao 3'-5' ciklički adenozin monofosfat ovisna kinaza) je jedan od primjera regulacije NHE3 fosforilacijom. Ovisna je o staničnoj koncentraciji cAMP-a (3'-5' ciklički adenozin monofosfat) čiju koncentraciju reguliraju hormoni kao i pojedini bakterijski toksini (Kurashima i sur., 1997). Ranija istraživanja (Kurashima i sur., 1997) su pokazala kako PKA inhibira aktivnost NHE3 fosforilacijom aminokiseline Ser605. Mutacijom fosforilacijskog mjesta Ser605 u Ala605 dolazi do smanjenja inhibitornog učinka PKA na aktivnost NHE3 za 50 %. Potpuni nestanak inhibitornog učinka PKA na aktivnost NHE3 postignut je nakon mutacije Ser634. Kako se nije moglo potvrditi da PKA fosforilira Ser634 pretpostavljeno je da ova aminokiselina najvjerojatnije sudjeluje u povezivanju NHE3 i PKA što predstavlja preduvjet za djelovanje PKA (Kurashima i sur., 1997). Kasnije istraživanje (Zhao i sur., 1999) je pokazalo da u štakorskom modelu PKA fosforilira Ser552, dok je za značajno smanjenje inhibitornog učinka PKA potrebno deaktivirati oba fosforilacijska mjesta, Ser552 i Ser605.

PKA posredovana fosforilacija Ser552 i Ser605 potvrđena je i u studiji Kocinsky i sur. (2007) pomoću monoklonalnih fosfo-specifičnih protutijela za Ser552 i Ser605. Stimulacija aktivnosti PKA forskolinom povećala je fosforilaciju na Ser554 i Ser605, međutim nije uzrokovala trenutačnu inhibiciju aktivnosti NHE3. Do inhibicije aktivnosti NHE3 došlo je deset minuta nakon fosforilacije s PKA što upućuje na uključenost dodatnih mehanizama u regulaciji transporta Na^+ i H^+ pomoću NHE3 (Kocinsky i sur., 2007).

Bazalna aktivnost NHE3 je opisana u svim vrstama staničnih kultura u kojima je provedeno istraživanje proteina. U studiji koju su proveli Sarker i sur. (2008) pokazano je da kazein kinaza II (CK II) regulira aktivnost NHE3 pod bazalnim uvjetima tako što fosforilira NHE3 na aminokiselini Ser719. U studiji je fosforilacija povezana s povećanjem ekspresije NHE3 na površini stanice. Nadalje, pokazano je kako se CK II veže direktno na NHE3 čime se razlikuje od PKA i SGK1 (engl. *serum/glucocorticoid regulated kinase 1*) koji se na NHE3 vežu preko NHERF1 i/ili NHERF2. Autori sugeriraju da se CK II na NHE3 veže u području između aminokiselina Leu586 i Arg605. Mutacijom fosforilacijskog mjesta Ser719 u Ala719 pokazali su da se aktivnost izmjenjivača NHE3 smanjuje za 70%, dok se njegova ekspresija na staničnoj membrani smanjuje za 60%. Studijom je pokazano da CK II igra važnu ulogu u regulaciji i ekspresiji NHE3.

Cha i sur. (2005) su pokazali da ciklički guanozin monofosfat (cGMP) inhibira aktivnost izmjenjivača NHE3 u prisutnosti NHERF2 i cGKII (cGMP ovisna protein kinaza II). Povećanje koncentracije cGMP u stanicama četkaste prevlake crijeva smanjuje neutralnu NaCl apsorpciju što je

posljedica inhibicije aktivnosti proteina NHE3. Posrednik u ovoj inhibiciji je cGKII za koju je pokazano da fosforilira NHE3 i tako smanjuje njegovu aktivnost. Da bi cGKII mogla fosforilirati protein NHE3 potrebno je uspostavljanje njegove veze sa staničnom membranom i s domenom PDZ regulatornog proteina NHERF2 (Slika 5.) (Cha i sur., 2005).



Slika 5. *Shematski prikaz signalnog puta potrebnog za inhibiciju aktivnosti izmjenjivača NHE3 s cGMP-om. Proteini koji su uključeni u inhibiciju NHE3 su cGKII i NHERF2. Povećana koncentracija cGMP u stanici aktivira kinazu cGKII koja se s jedne strane veže na domenu PDZ NHERF2, a s druge za staničnu membranu, te fosforilira izmjenjivač NHE3 i smanjuje njegovu aktivnost* (*preuzeto iz* Donowitz i sur., 2009).

Ca^{2+}/kalmodulin protein-ovisna kinaza II γ (CaMK-IIγ) je još jedna kinaza za koju je pokazano da inhibira bazalnu aktivnost izmjenjivača, najvjerojatnije fosforilacijom NHE3 (Žižak i sur., 2012). Mehanizam ove regulacije će biti detaljnije opisan u posljednjem poglavlju Uvoda.

Dosadašnje studije usmjerene su na proučavanje načina kojim fosforilacija utječe na mobilnost NHE3 unutar stanice i njegovu interakciju s drugim regulatornim proteinima, no potpuni mehanizam kojim fosforilacija mijenja aktivnost NHE3 još uvijek nije otkriven (He i Yun, 2010).

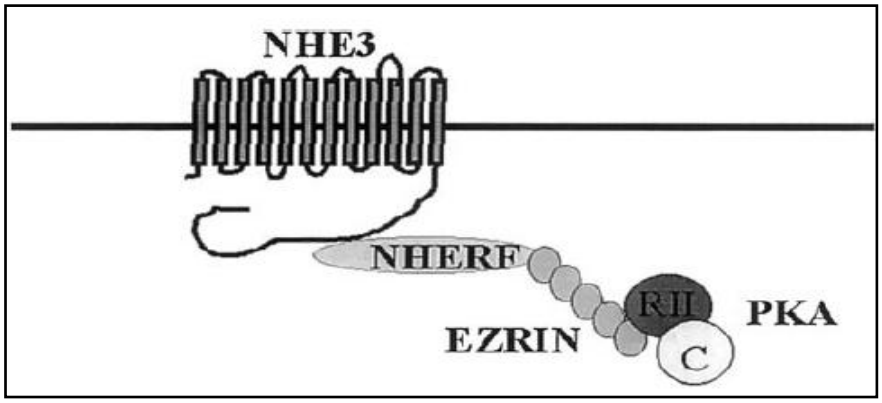
1.6.2. Regulacija aktivnosti NHE3 posredovana protein – protein interakcijom

Na citoplazmatsku regulatornu domenu NHE3 se vežu različiti agonisti i antagonisti koji reguliraju aktivnost proteina NHE3. Među tim čimbenicima se nalaze regulatorni proteini NHERF1 i NHERF2 (Weinman i sur., 1993) (Yun i sur., 1997) za koje je karakteristično da posjeduju domene PDZ (domena interakcije proteina, engl. ***PSD95/Disk large/ZO-1***). Proteini s domenom PDZ omogućavaju povezivanje specifičnih proteina u velike komplekse na točno određenim mjestima u stanici. Na taj način mogu „dostaviti" i/ili stabilizirati proteine stanične membrane. NHERF1 i NHERF2 se preko svojih domena PDZ vežu na regulatornu domenu NHE3 (Donowitz i sur., 2009).

Vezanjem nekoliko regulatornih proteina na citoplazmatsku domenu NHE3 nastaju veliki dinamički više-proteinski kompleksi koji mijenjaju sastav za potrebe regulacije aktivnosti NHE3 (Cha i sur., 2004).

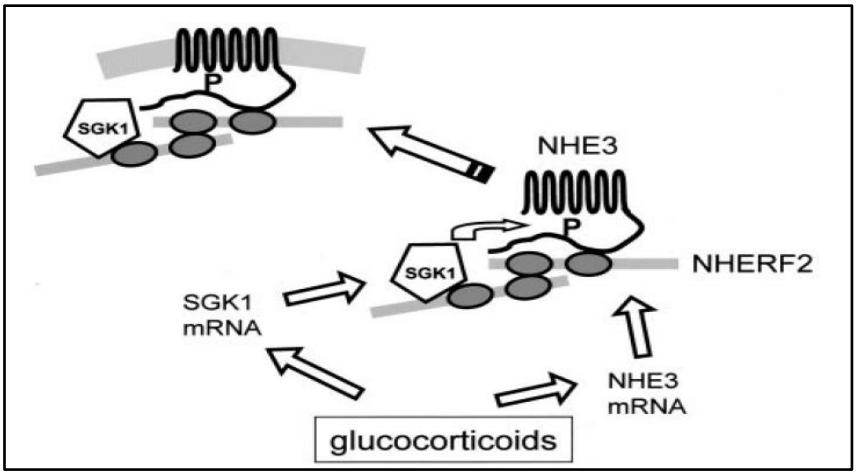
Studija koju su proveli Žižak i sur. (1999) pokazala je da je za inhibiciju NHE3 posredovanu s PKA potreban NHERF1. Stanice fibroblasta PS120 su stabilno transfecirali s NHERF1 i/ili proteinima NHE3 i zatim su uspoređivali utjecaj PKA na funkciju izmjenjivača NHE3. U stanicama PS120 koje su posjedovale NHERF1, PKA je djelovao inhibicijski na NHE3, dok se u stanicama bez NHERF1 nije mogla postići PKA-om posredovana inhibicija NHE3. Studijom je pokazano kako je NHERF1 neophodan za PKA posredovanu inhibiciju izmjenjivača NHE3.

Daljnja istraživanja su pokazala da je za PKA posredovanu inhibiciju NHE3, pored interakcije NHE3 i NHERF1, neophodno i da se NHERF1 poveže s ezrinom (Slika 6.). Naime, NHERF1 uz domenu PDZ posjeduje i domenu za vezanje ezrina (domena EZR) preko koje se povezuje s ezrinom. Stvaranjem serije delecijskih NHERF1 mutanti kojima su uklanjane pojedine domene pokazano je kako je prisutnost domene EZR preduvjet za PKA posredovanu regulaciju aktivnosti NHE3 (Weinman i sur., 2000).



Slika 6. *Shematski prikaz kompleksa signala koji su uključeni u inhibiciju aktivnosti NHE3 pomoću PKA i NHERF1. RII i C su regulatorna i katalitička podjedinica PKA* (*preuzeto iz* Weinman i sur., 2000).

NHERF2, pod imenom E3KARP, je prvi put opisan u radu Yun i sur. (1997) u kojem su pokazali da NHERF2 zajedno sa NHERF1 sudjeluje u inhibiciji aktivnosti NHE3, te da je ta inhibicija posredovana drugim glasnikom cAMP. Da se NHERF1 i NHERF2 u svom djelovanju razlikuju pokazano je u studiji kojom je istraživana aktivacija NHE3 pomoću SGK1 (Yun i sur., 2002). U toj je studiji pokazano da se aktivacija NHE3 posredovana sa SGK1 može dogoditi jedino u prisutnosti NHERF2. Ukoliko je bio prisutan samo NHERF1, SGK1 nije mogao aktivirati NHE3. Prema tome, glukokortikoidi koji potiču aktivnost kinaze SGK1 uzrokuju povećavanje aktivnosti NHE3, pri čemu povećana koncentracija glukokortikoida dovodi do povećanja aktivnosti izmjenjivača NHE3. Ovo povećanje aktivnosti je rezultat povećanja transkripcije NHE3 tj. povećanja količine NHE3 u stanici. S obzirom da je pokazano kako je za fosforilaciju NHE3 presudno povezivanje NHERF2 i SGK1, autori su pretpostavili da bi ova veza mogla pripomoći i u translokaciji NHE3 u staničnu membranu potencijalnim vezanjem NHERF2 s transportnim membranskim proteinima i receptorima tirozin kinaza, međutim točan mehanizam translokacije nije poznat (Slika 7.) (Yun i sur., 2002).



Slika 7. *Shematski prikaz aktivacije NHE3 pomoću glukokortikoidima ovisne kinaze SGK1* (*preuzeto iz* Yun i sur., 2002*)*.

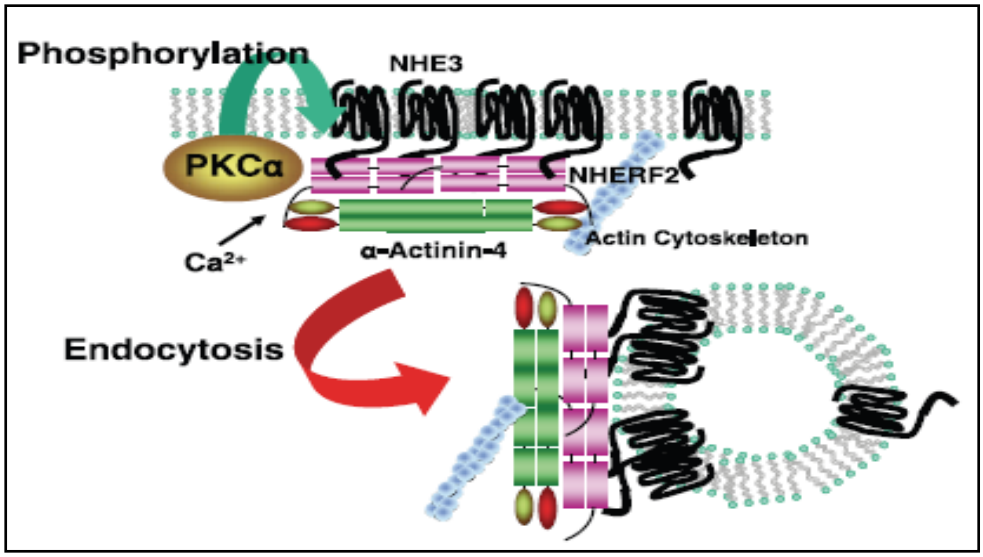
NHERF2 je široko rasprostranjen regulatorni protein koji sudjeluje u brojnim procesima regulacije NHE3 aktivnosti. Osim stimulacije NHE3 pomoću SGK1, za NHERF2 se pokazalo da ima ključnu ulogu u inhibiciji NHE3 posredovanoj cGKII (Cha i sur., 2005) i PKCα (Lee-Kwon i sur., 2003). Također, pokazano je kako NHERF2 sudjeluje u inhibiciji aktivnosti NHE3 potaknutoj s cAMP (Yun i sur., 1997), CK II (Sarker i sur., 2008) i CaMK-II (Žižak i sur., 2012).

1.6.3. Regulacija aktivnosti NHE3 promjenom njegovog položaja u stanici

Aktivnost proteina NHE3 se može regulirati i nadzorom nad njegovom ekspresijom na površini stanične membrane. Povećanjem ekspresije NHE3 na staničnoj membrani povećat će se izmjena Na^+ i H^+ kroz staničnu membranu. Važan mehanizam u povećanju ekspresije NHE3 na površini stanice je povećanje njegove mobilnosti između unutarstaničnih reciklirajućih endosoma i stanične membrane (Kurashima i sur., 1998).

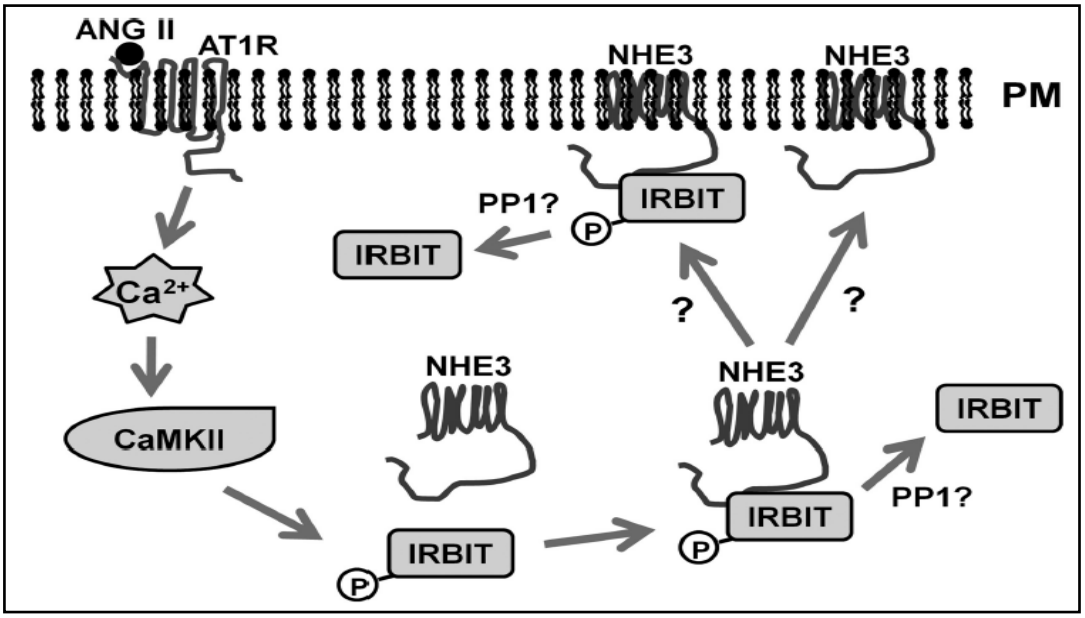
NHE3 se nalazi u četiri odjeljka unutar stanica bubrega i crijeva. Prva subpopulacija se trajno zadržava u apikalnoj membrani u interakciji s aktinskim citoskeletom, druga subpopulacija u membrani je dinamična i može endocitirati na odgovarajući poticaj, a treća i četvrta su unutarstanične subpopulacije koje mogu egzocitirati na podražaj (Alexander i sur., 2005).

U regulaciji položaja NHE3 u stanici, s ciljem regulacije izmjene Na^+ i H^+ kroz staničnu membranu, sudjeluju NHERF2, PKC-α i α-aktinin-4 koji zajedno s NHE3 stvaraju kompleks. U nastajanju ovog kompleksa važnu ulogu ima povećanje koncentracije Ca^{2+} koje posredstvom PKC dovodi do smanjenja količine proteina NHE3 u staničnoj membrani. PKC-α u ovim kompleksima ne fosforilira NHE3, no postoje pretpostavljena PKC-α fosforilacijska mjesta na α-aktininu-4 i NHERF2 te je moguće da dolazi do fosforilacije jednog od tih dijelova kompleksa. Stvaranje kompleksa je uvjetovano povećanjem koncentracije Ca^{2+}. Kompleks sudjeluje u inhibiciji aktivnosti NHE3 tako što regulira njegovu endocitozu (Lee-Kwon i sur., 2003) (Slika 8.).



Slika 8. *Shematskih prikaz endocitoze proteina NHE3 stvaranjem kompleksa s NHERF2, PKC-α i aktininom-4 u uvjetima povećane koncentracije* Ca^{2+} (*preuzeto iz* Donowitz i Li, 2007).

Površinska ekspresija NHE3 može se regulirati i preko proteina koji se veže za inozitol 1,4,5-trifosfatni (IP3) receptor i oslobađa u prisutnosti IP3 (IRBIT). Stvaranje mikro-kompleksa NHE3 i proteina IRBIT posredstvom CaMK-II uzrokuje translokaciju NHE3 na površinu stanice i povećava njegovu aktivnost (He i sur., 2010). Ovaj proces je potaknut vezanjem angiotenzina II (ANG II) na angiotenzin II receptor 1 (AT1R) smješten u staničnoj membrani što dovodi do unutarstaničnog povećanja koncentracije Ca^{2+}. CaMK-II, koja posreduje interakciju proteina IRBIT s NHE3, je stimulirana Ca^{2+} i fosforilira IRBIT na potencijalnim fosforilacijskim mjestima; Ser68, Ser71 i Ser74. Fosforilacija proteina IRBIT se pokazala nužnom za njegovo povezivanje s NHE3. Nije poznato u kojem trenutku IRBIT disocira od NHE3 i da li je ova disocijacija potrebna za regulaciju NHE3, no pretpostavljeno je da se odvija preko protein fosfataze 1 (PP1) (He i sur., 2010) (Slika 9.).



Slika 9. *Shematski prikaz regulacije aktivnosti NHE3 pojačanom ekspresijom NHE3 na površini stanične membrane. IRBIT stimulira aktivnost NHE3 u CaMK-II ovisnom procesu* (*preuzeto iz* He i sur., 2010*)*.

1.6.4. Regulacija aktivnosti NHE3 posredovana nadzorom nad transkripcijom i translacijom NHE3

Najčešće proučavani mehanizmi regulacije NHE3 pripadaju brzim, kratkoročnim regulacijama koje se događaju unutar nekoliko minuta do nekoliko sati od primljenog podražaja. U njih su uključene razne reakcije poput fosforilacije, interakcije izmjenjivača s drugim proteinima i promjene mjesta aktivnosti samog proteina (He i Yun, 2010).

Regulacija transkripcije i translacije NHE3 spada u grupu dugoročnih mehanizama regulacije aktivnosti izmjenjivača i posredovana je glukokortikoidima, aldosteronom, metaboličkom acidozom i kroničnom hiperosmolalnosti (He i Yun, 2010). Proupalni citokini poput IFN-γ i TNF-α i mnogi toksični produkti mikroba smanjuju ekspresiju mRNA NHE3 (He i Yun, 2010). Smanjena apsorpcija NaCl u probavnom sustavu povezuje se s upalnom bolesti crijeva. Pacijenti s upalnim bolestima crijeva imaju visoke razine citokina unutar svojih crijeva, uključujući IFN-γ i TNF-α. Za IFN-γ je pokazano da utječe na transkripciju *NHE3* tako što smanjuje količinu mRNA NHE3 u stanici i posljedično tome smanjuje ekspresiju i ukupnu aktivnost proteina NHE3 u stanici (Zachos i sur., 2005).

1.6.5. Regulacija aktivnosti NHE3 pomoću CaMK-II

CaMK-II je multifunkcionalna kinaza koja je uključena u različite Ca^{2+}-posredovane biološke procese uključujući prijenos sinaptičkih signala, transkripciju gena i regulaciju transportera (Hudmon i Schulman, 2002).

Studija koju su proveli Donowitz i sur. (1990) je pokazala da su Ca^{2+}/kalmodulin, CaMK-II i NHE3 uključeni u regulaciju neutralne apsorpcije NaCl kroz membrane četkaste prevlake tankog crijeva pri čemu je pokazano kako u prisutnosti Ca^{2+} dolazi do inhibicije aktivnosti NHE3. Ispitivanjem razine inhibicije aktivnosti NHE3 pomoću inhibitora koji sadrži promijenjenu CaMK-II autoregulatornu domenu pokazali su kako je inhibicija NHE3 najvjerojatnije posredovana djelovanjem CaMK-II.

Nedavna studija (Žižak i sur., 2012) je pokazala kako se CaMK-II pod bazalnim uvjetima veže na regulatornu domenu NHE3, fosforilira protein NHE3 i smanjuje njegovu aktivnost. Smanjenje aktivnosti NHE3 pomoću CaMK-II u ovom istraživanju uvjetovano je sintezom i degradacijom proteina (engl. *turnover*) bez utjecaja na razinu ekspresije izmjenjivača u staničnoj membrani.

CaMK-II se u citoplazmatskoj domeni NHE3 veže za segment koji obuhvaća aminokiseline od Leu586 do Arg605 (Žižak i sur., 2012). Druge studije su pokazale kako se na isti segment što neposredno što posredno veže više proteina poput: NHERF1-4 (Donowitz i sur., 2009), fosfolipaza Cγ (Zachos i sur., 2009), CK II (Sarker i sur., 2008), cGKII (Cha i sur., 2005). Smatra se kako je segment Leu586-Arg605 potreban za održavanje bazalne aktivnosti odnosno za inhibiciju NHE3 posredovanu s cAMP, cGMP i povećanom koncentracijom Ca^{2+}. S obzirom da je nedavno pokazano da CK II fosforilacijom Ser719 povećava aktivnost NHE3 moguće je da CK II i CaMK-II djeluju koordinirano aktivirajući odnosno inhibirajući aktivnost NHE3.

Za CaMK-II je pokazano da se za NHE3 veže za segment između Leu586-Arg605, međutim za inhibiciju bazalne aktivnosti izmjenjivača potrebna joj je i regija od 690. aminokiseline do kraja citoplazmatske domene. Unutar te regije je predviđeno postojanje nekoliko potencijalnih CaMK-II fosforilacijskih mjesta. Ispitivanjem triju takvih potencijalnih CaMK-II fosforilacijskih mjesta, aminokiseline Ser693, Ser694 i Ser810, pokazano je da njihova pojedinačna deaktivacija ne utječe na aktivnost NHE3 u odnosu na kontrolu. Međutim istodobnom deaktivacijom sva ta tri potencijalna fosforilacijska mjesta dovodi do smanjivanja inhibicije NHE3 (Žižak i sur., 2012). Još nema dokaza da CaMK-II fosforilira aminokiseline Ser693, Ser694 i Ser810 u bazalnim uvjetima.

U prethodnim poglavljima je opisano kako regulacije aktivnosti NHE3 posredovane fosforilacijom, protein-protein interakcijom i položajem NHE3 u stanici mogu ovisiti o regulatornim faktorima NHERF. U istraživanju koje su proveli Žižak i sur. (2012) pokazano je da je inhibicija bazalne aktivnosti NHE3 ovisna o NHERF2, iako razina fosforilacije kao i vezanje CaMK-II za NHE3 nisu pod utjecajem NHERF2.

Učinak CaMK-II na aktivnost NHE3 i njeno vezanje za citoplazmatsku domenu NHE3 sastavni su dio fiziološke regulacije NHE3 u kojoj CaMK-II djeluje kao dio velikog više-proteinskog, više-kinaznog signalnog kompleksa koji se formira na citoplazmatskoj domeni NHE3 (Žižak i sur., 2012).

Smatra se kako segment Leu586-Arg605 može imati važnu ulogu u održavanju bazalne aktivnosti NHE3 odnosno za inhibiciju NHE3 u bazalnim uvjetima posredovanu s cAMP, cGMP i povećanom koncentracijom Ca^{2+}. S druge strane, pokazano je kako fosforilacija NHE3 ima važnu ulogu u regulaciji aktivnosti proteina NHE3. Prema tome, ostaje istražiti je li segment između Leu586-Arg605, koji se pokazao kao vezno mjesto za brojne agoniste i antagoniste, neophodan u regulaciji aktivnosti NHE3.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Opći cilj ovog rada je razvoj trajnih kultura stanične linije fibroblasta PS120 koje eksprimiraju mutirani izmjenjivač NHE3. U tu svrhu ću mutirati potencijalna CaMK-II fosforilacijska mjesta u nativnoj *HANHE3* te u krnjoj *HANHE3* sekvenci iz koje je uklonjeno vezno mjesto za CaMK-II (*d24HANHE3*). Mutirane *HANHE3* i *d24HANHE3* sekvence, ugrađene u plazmid, ću transfecirati u stanične linije fibroblasta PS120 koje su prethodno stabilno transfecirane proteinom NHERF2 i u liniju PS120 bez proteina NHERF2.

Specifični ciljevi rada su:

1. Konstruirati ekspresijski vektor pcDNA/TM7-HANHE3 u kojem će se sedam potencijalnih CaMK-II fosforilacijskih mjesta proteina NHE3 mutacijom promijeniti tako da tripleti za serin budu promijenjeni u triplete za alanin.
2. Konstruirati vektor pcDNA/TM2-d24HANHE3, kao međukorak za stvaranje ekspresijskog vektora pcDNA/TM6-d24HANHE3, u kojem će se dva potencijalna CaMK-II fosforilacijska mjesta proteina NHE3 mutacijom promijeniti tako da tripleti za serin budu promijenjeni u triplete za alanin.
3. Konstruirati ekspresijski vektor pcDNA/TM6-d24HANHE3 u kojem je mutirano šest potencijalnih CaMKII fosforilacijskih mjesta proteina NHE3. Ekspresijski vektor će se izraditi od fragmenata dobivenih potpunom restrikcijom pcDNA/TM7-HANHE3 i pcDNA/TM2-d24HANHE3 pomoću restrikcijskog enzima *Pma*CI, tako što će se manji fragment dobiven iz pcDNA/TM2-d24HANHE3 (umetak) povezati s većim fragmentom dobivenim restrikcijom pcDNA/TM7-HANHE3 (vektor).
4. Transfecirati ekspresijski vektor pcDNA/HANHE3 s nativnim genom *HANHE3* i ekspresijske vektore pcDNA/TM7-HANHE3 i pcDNA/TM6-d24HANHE3 s mutiranim genima *HANHE3* u stanične linije fibroblasta PS120 bez i sa stabilno transfeciranim proteinom NHERF2 te uspostaviti kulture stanica PS120, sa i bez NHERF2, s nativnim odnosno mutiranim *HANHE3*.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

U izradi ovog rada korištene su početnice dizajnirane za točkaste mutacije i za potrebe sekvenciranja, standardne kemikalije, enzimi, puferi, komercijalni kompleti i reagensi.

3.1.1.1. Početnice

Početnice korištene za izradu točkastih mutacija:

- S554A (pozitivna) 5' GAGCGCCGAGGC**G**CCCTGGCCTTCATCC 3'
- S554A (negativna) 5' GGATGAAGGCCAGGG**C**GCCTCGGCGCTC 3'
- S562A (pozitivna) 5' CATCCGCTCCCCG**GC**CACTGACAACATG 3'
- S562A (negativna) 5' CATGTTGTCAGTG**GC**CGGGGAGCGGATG 3'
- S607A (pozitivna) 5' GCAGCGGCGGCGC**GC**CGTGCGCGAC 3'
- S607A (negativna) 5' GTCGCGCACG**GC**GCGCCGCCGCTGC 3'
- S663A (pozitivna) 5' CAAGCGGCTGGAG**GC**CTTCAAGTCG 3'
- S663A (negativna) 5' CGACTTGAAG**GC**CTCCAGCCGCTTG 3'
- S693A (pozitivna) 5' CGGAGAAAC**GC**CAGTGTCCCCAAC 3'
- S693A (negativna) 5' GTTGGGGACACTG**GC**GTTTCTCCG 3'
- S693-694A (pozitivna) 5' GAAGCGGAGAAAC**GC**C**GC**TGTCCCCAACG 3'
- S693-694A (negativna) 5' CGTTGGGGACA**GC**G**GC**GTTTCTCCGCTTC 3'
- S810A (pozitivna) 5' CCTTCCGGCCTC**GC**CAACAAGTCGGTG 3'
- S810A (negativna) 5' CACCGACTTGTTG**GC**GAGGCCGGAAGG 3'

Početnice korištene za sekvenciranje:

- T7 početnica 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'
- sp820_FW 5' GTGACGCGCTTCACC 3'
- sp1351_FW 5' GCCTGACCATCAAGCCGC 3'
- sp1598_FW 5' GTTCCACGAGCTG 3'
- sp1834_FW 5' GAGGACGTCATCACGCACCAC 3'

3.1.1.2. Enzimi

- Restrikcijska endonukleaza *BbrPI (PmaCI)* (Roche)
- Enzim *fosfataza (Shrimp Alkaline Phosphatase, SAP)* (Fermentas)
- Enzim *T4 ligaza* (Roche)
- Restrikcijska endonukleaza *Hind*III (Promega)
- Restrikcijska endonukleaza *Kpn*I (Promega)
- Restrikcijska endonukleaza *Dpn*I (NEB)

3.1.1.3. Puferi

- TE pufer (pH 8, 10 mM Tris, 1 mM EDTA*)*
- 50x TAE pufer (pH 8,5, 40 mM Tris, 20 mM natrij acetat, 1 mM EDTA*)*
- Pufer za nanošenje uzoraka na agarozni gel, Blue/Orange 6x Loading Dye (Promega)
- DNA marker, 1kb DNA Ladder (Promega)
- HBSS (***H****ank's* ***B****alanced* ***S****alt* ***S****olution)* bez kalcija i magnezija (Gibco – Invitrogen)
- TMA pufer (1.3 M TMA-Cl, 50 mM KCl, 20 mM $CaCl_2$, 10 mM $MgSO_4$, 200 mM HEPES, 80 mM TMA-OH)
- Pufer za *T4 ligazu* (Roche)
- Pufer B za *HindIII* i *KpnI* (Promega)

3.1.1.4. Komercijalni kompleti

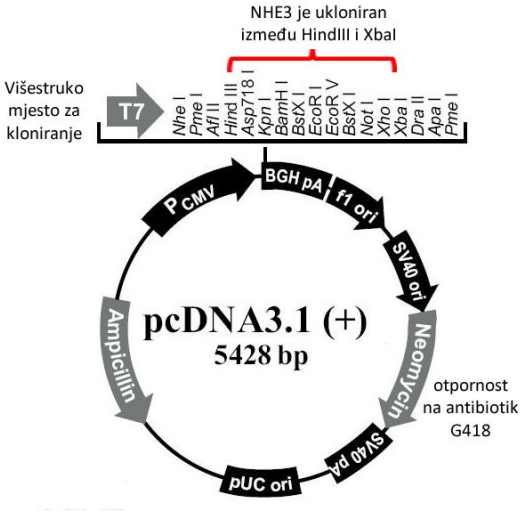
- In-Fusion® HD Cloning Kit (Clontech Laboratories, Inc.):
  - Za izolaciju odsječaka DNA iz agaroznog gela – NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up
  - Reakcije lančane reakcije polimerazom (PCR) - CloneAmp HiFi Premix™
- Za izolaciju plazmidne DNA - PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega)

3.1.1.5. Reagensi

- Agaroza, *UltraPureAgarose* (Invitrogen)
- Boja za prikaz nukleinskih kiselina u gelu (GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain, 10 000x in DMSO, Lonza)
- Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen)
- Antibiotik ampicilin (100 mg/ml *stock*)
- Antibiotik Geneticin (G418 sulfate) (Gibco – Invitrogen)
- Antibiotik Zeocin (Thermo FIsher Scientific)
- Deionizirana voda

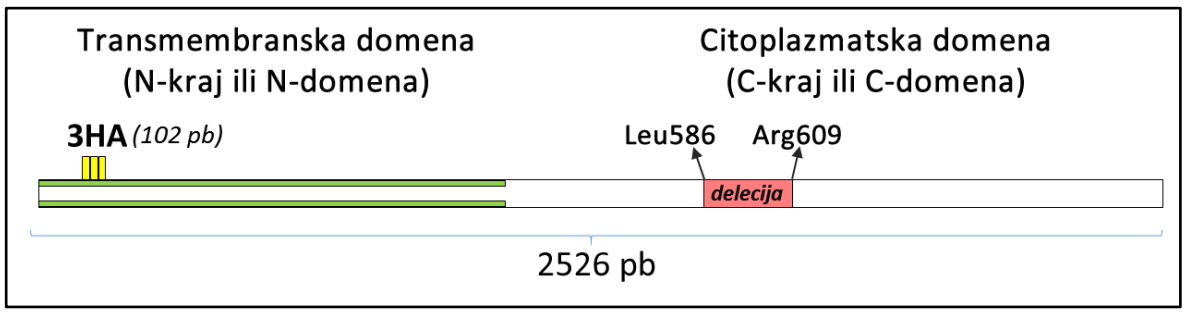
3.1.2. Plazmidni vektori

Za izradu mutiranih sekvenci *HANHE3* koristila sam plazmid pcDNA 3.1(+) u koji je prethodno umetnuta sekvenca *NHE3* izolirana iz zeca (Gene ID 100009430; *Oryctolagus cuniculus*, L.) rekombinirana s markerom u obliku tripleta *HA* epitopa (pcDNA/HANHE3). Marker HA je peptid deriviran iz glikoproteina *Human influenza hemagglutinin* i sastavljen je od 9 aminokiselina (YPYDVPDYA). Na sekvencu *NHE3* su vezane tri *HA* sekvence sa pripadajućim restrikcijskim mjestima koji su zajedno dugi 102 pb (*HANHE3*). Plazmid pcDNA 3.1(+), prikazan na Slici 10., je komercijalni plazmid veličine 5428 pb s višestrukim mjestom za kloniranje unutar kojeg je između restrikcijskih mjesta za enzime *Hind*III i *Xba*I uklonirana sekvenca za *HANHE3* veličine 2598 pb.



Slika 10. *Plazmid pcDNA 3.1(+) veličine 5428 pb s prikazanim višestrukim mjestom za kloniranje u koje je klonran HANHE3.*

Drugi predložak korišten u istraživanju je *HANHE3* sekvenca prikazana na Slici 11. iz koje je delecijom 24 aminokiseline (slijed aminokiselina između Leu586 i Arg609) uklonjeno vezno mjesto za CaMK-II. Sekvenca *HANHE3* bez veznog mjesta za CaMK-II (*d24HANHE3*) veličine 2526 pb je prethodno izrađena u laboratoriju Zavoda za fiziologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.



Slika 11. *Shematski prikaz NHE3 u kojem su u početnom dijelu između aminokiselina Glu37 i Ile38 ubačene tri HA sekvence s pripadajućim restrikcijskim mjestima ukupne dužine 102 pb (HANHE3), dok je iz C-domene delecijom uklonjen slijed od 24 aminokiseline koji obuhvaća aminokiselina između Leu586 i Arg609 (d24HANHE3). Mutirani d24HANHE3 je dug 2526 pb.*

3.1.3. Programi

- NEB Ligation Calculator (https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation)
- GPS 3.0 (Group-based Prediction System, http://gps.biocuckoo.org/)

3.1.4. Stanice

- Stanice fibroblasta linije PS120 (stanična linija je razvijena iz fibroblasta pluća CCL39 hrčka)
- Stanice fibroblasta linije PS120 sa stabilno transfeciranim proteinom NHERF2
- Bakterije - Stellar™ Competent Cells, dio In-Fusion® HD Cloning Kit (Clontech Laboratories, Inc.)

3.1.5. Hranjive podloge

Za uzgoj transformiranih bakterijskih stanica (Stellar™ Competent Cells) korišteni su kruti i tekući (bez agara) mediji:

- LB (**L**uria – **B**ertani) tekući hranjivi medij; 10 g/l NaCl, 5 g/l bakto-kvaščev ekstrakt i 10 g/l baktotripton (sve Difco Laboratories)
- Bogati medij SOC kao dio In-Fusion® HD Cloning Kita (Clontech Laboratories, Inc.)
- LB hranjivu krutu podlogu; 10 g/l NaCl, 5 g/l bakto-kvaščev ekstrakt, 10 g/l baktotripton i 15 g/l baktoagar (sve Difco Laboratories) + ampicilin do koncentracije 100 mg/l

Za kulturu stanica:

- DMEM (***D**ulbecco's **M**odified **E**agle **M**edium*) s dodatkom 25 mM $NaHCO_3$, 10 mM HEPES, 50 U/ml penicilina, 50 g/ml streptomicina (Gibco - Invitrogen)
    - +/- 10% FBS (fetalni goveđi serum, engl. ***F**etal **B**ovine **S**erum*), Gibco - Invitrogen
    - +/- G418 (400 µg/ml) (Neomycin)
    - +/- Zeocin (50 µg/ml)

Za transfekciju fibroblasta PS120:

- OptiMEM® medij (Life Technologies)

3.1.6. Oprema

- PCR uređaj (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems)
- Tube (Eppendorf; 0.2, 0.5, 1 i 1.5 ml, te Falcon; 14, 15 i 50 ml)
- Magnetska mješalica (Fisher Scientific)
- Mini-centrifuga (Fisher Scientific)
- Uređaj za elektroforezu s odgovarajućom kadicom, češljićem za izradu jažica i izvorom istosmjerne struje (PowerPac 200, BioRad)

- Blok za zagrijavanje (Digital heatblock, VWR)
- Inkubator (Isotemp Incubator, Fisher Scientific)
- Centrifuga (Centrifuge 5415D, Eppendorf)
- Vodena kupelj (Microprocessor Controlled 280 Series Water Bath, Precission)
- Automatski pipetori različitih volumena (Gilson)
- Nastavci za automatske pipetore različitih volumena (Thermo Scientific)
- Vakum sisaljka (Maxima dry, Fisher Scientific)
- Termostatirana rotacijska tresilica (Max^{Q}Mini 4000, Barnstead Lab-Line)
- pH metar (PerpHectT® LogR® Meter 320, Thermo Orion)
- Vaga (APX-402, Denver Instrument)
- UV - transiluminator
- Invertni mikroskop (Axiovert 25, Zeiss)
- Inkubator s kontroliranom atmosferom (Heracell 150, Heraeus)
- Laminarna komora (Heraeus)
- Autoklav (Kambič)
- NanoDrop 2000c (Thermo Scientific)

3.2. Metode

3.2.1. Program GPS 3.0.

GPS (***G**roup **P**rediction **S**ystem*) 3.0 je program otvorenog koda za predikciju fosforilacijskih mjesta u odabranom proteinu. Program sam besplatno preuzela sa internetske stranice: http://gps.biocuckoo.org/. Jedan je od mnogih dostupnih predikcijskih programa na tržištu, a odabran je zbog malog broja lažno pozitivnih rezultata. Program zahtijeva unos slijeda aminokiselina proteina u FASTA formatu, te odabir željene kinaze iz izbornika. Pomoću programiranog algoritama on predviđa potencijalna fosforilacijska mjesta na unesenoj sekvenci proteina. U ovom istraživanju koristila sam ga za određivanje potencijalnih CaMK-II fosforilacijskih mjesta na proteinu NHE3.

3.2.2. Izrada početnica

Za izradu točkastih mutacija potencijalnih CaMK-II fosforilacijskih mjesta unutar sekvence DNA nativnog (HANHE3) i krnjeg NHE3 (d24HANHE3) proteina dizajnirala sam sedam parova komplementarnih početnica (Tablica 2.). Odgovarajući parovi baza koji se podudaraju s potencijalnim CaMK-II fosforilacijskim mjestom nose promjenu aminokiseline serin u alanin (Ser → Ala). Pri izradi početnica pazila sam da su: a) početnice komplementarne jedna drugoj, b) duge između 25 i 45 nukleotida, c) mutirana mjesta u odnosu na predložak sadržana u obje početnice, d) mutacije smještene u sredini početnica i da postoji najmanje osam nukleotida s obje strane mutiranog mjesta, e) početnice posjedovale najmanje 40% GC sadržaja, f) početnice završavale s barem jednim G ili C nukleotidom i g) temperature denaturacije (Tm) početnica iznad 60 °C.

Dizajnirane početnice sam na izradu poslala u Invitrogen (Ujedinjeno Kraljevstvo) preko Biosistema. Po primitku liofilizirane početnice sam otopila prema uputama proizvođača u početnoj koncentraciji od 100 µM u TE puferu i razrijedila u sterilnoj vodi bez DNaza i RNaza do 10 µM.

Tablica 2. Sekvence početnica korištene za izradu potencijalnih CaMK-II fosforilacijskih mjesta, crvenom bojom podebljana i podvučena mjesta su baze koje su promijenjene kako bi se u originalnoj HANHE3 sekvenci aminokiselina Ser zamijenila aminokiselinom Ala.

	Mutacija	Pozitivna početnica	Negativna početnica
1.	S554A	5' GAGCGCCGAGGC**G**CCCTGGCCTTCATCC 3'	5' GGATGAAGGCCAGGG**C**GCCTCGGCGCTC 3'
2.	S562A	5' CATCCGCTCCCCG**GC**CACTGACAACATG 3'	5' CATGTTGTCAGTG**GC**CGGGGAGCGGATG 3'
3.	S607A	5' GCAGCGGCGGCGC**GC**CGTGCGCGAC 3'	5' GTCGCGCACG**GC**GCGCCGCCGCTGC 3'
4.	S663A	5' CAAGCGGCTGGAG**GC**CTTCAAGTCG 3'	5' CGACTTGAAG**GC**CTCCAGCCGCTTG 3'
5.	S693A	5' CGGAGAAAC**GC**CAGTGTCCCCAAC 3'	5' GTTGGGGACACTG**GC**GTTTCTCCG 3'
6.	S693-6944A	5' GAAGCGGAGAAAC**GC**C**GC**TGTCCCCAACG 3'	5' CGTTGGGGACA**GC**G**GC**GTTTCTCCGCTTC 3'
7.	S810A	5' CCTTCCGGCCTC**GC**CAACAAGTCGGTG 3'	5' CACCGACTTGTTG**GC**GAGGCCGGAAGG 3'

3.2.3. Reakcije PCR za izradu mutanti HANHE3

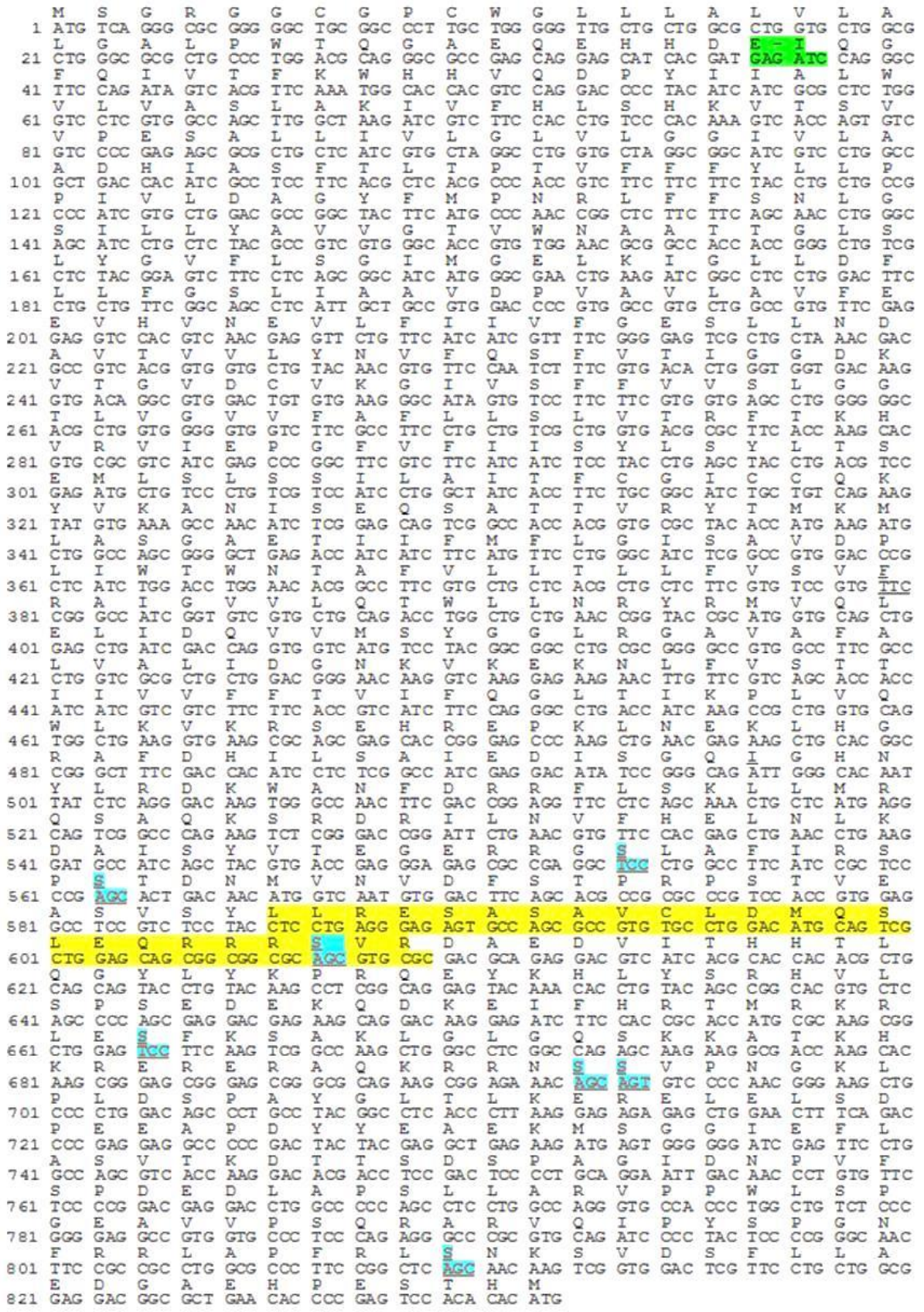
Uvođenje točkastih mutacija potencijalnih CaMK-II fosforilacijskih mjesta provela sam *in vitro,* metodom usmjerene mutageneze pomoću lančane reakcije polimerazom (engl. ***p****olymerase* ***c****hain* ***r****eaction*, PCR).

PCR je metoda kojom je moguće eksponencijalno umnožiti segment DNA ili cijelu DNA iz malih količina uzorka. Za uspješnu reakciju potrebne su kratke oligonukleotidne početnice, termostabilna DNA polimeraza, smjesa sva četiri nukleotida (dNTP), pufer, te DNA koja sadržava sekvencu koju želimo umnožiti ili mutirati. Za provođenje reakcije PCR potreban je uređaj koji može ciklički mijenjati temperaturu u kratkim vremenskim periodima.

Tri su glavna koraka PCR: denaturacija DNA, prianjanje početnica i elongacija DNA. Denaturacija zamjenjuje funkciju helikaze u *in vivo* replikaciji, odvija se na 95 °C i na ovoj temperaturi se razdvajaju lanci DNA predloška. Prianjanje početnica se odvija na temperaturama 40 – 60 °C, ovisno o Tm početnica, u ovom koraku se početnice vežu na komplementarnu sekvencu DNA. Posljednji korak je elongacija DNA u kojoj DNA polimeraza na 72 °C produžava lance DNA vežući nukleotide na 3' kraj početnica prema načelu komplementarnosti (A-T, C-G).

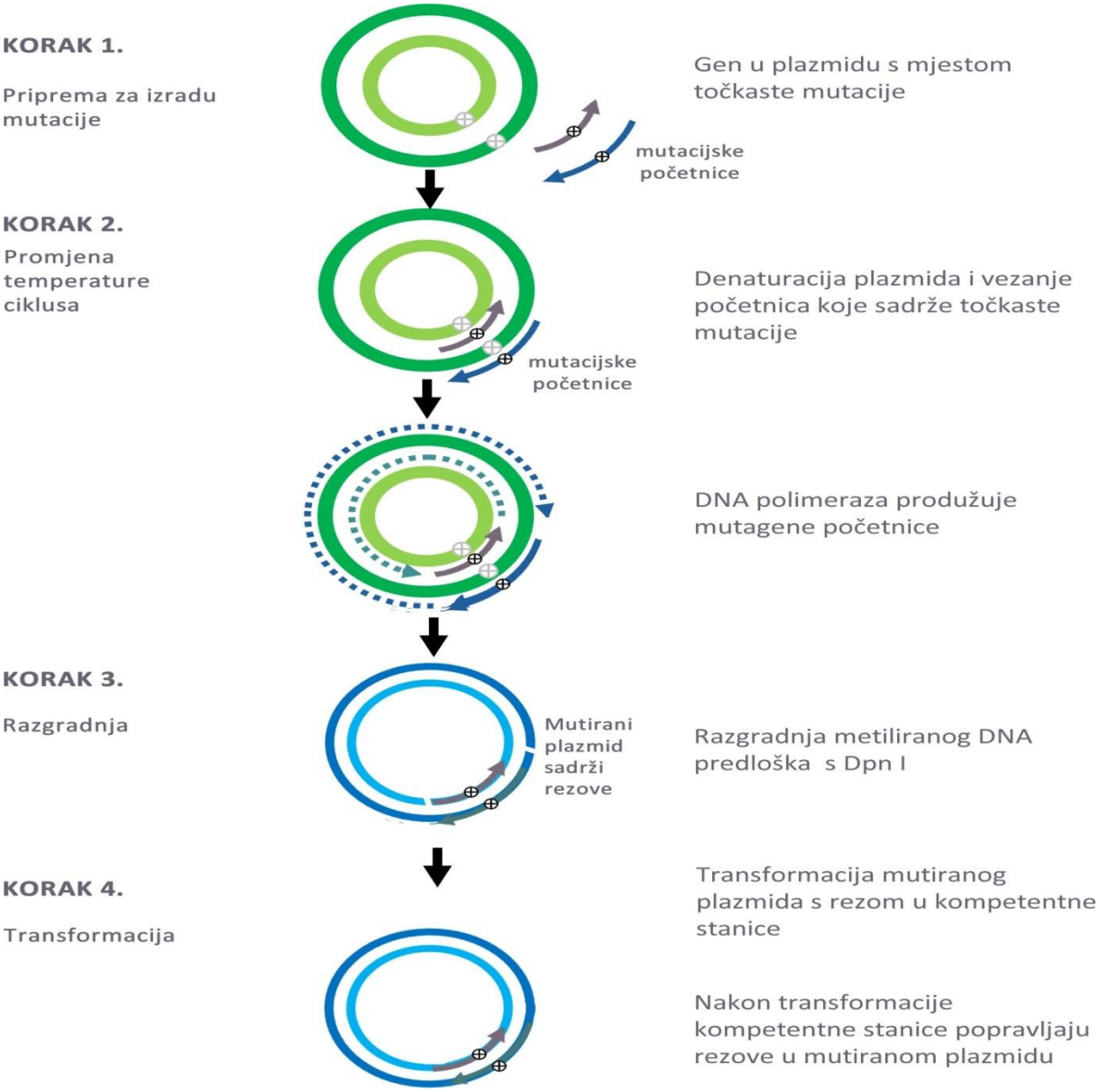
Sekvencu *NHE3* izoliranu iz zeca prikazanu na Slici 12., koristila sam kao predložak za reakcije PCR u ovom radu. Sekvenca *NHE3* je klonirana u vektor-plazmid pcDNA 3.1(+) (pcDNA/NHE3), a naknadno je u sekvencu *NHE3* kloniran triplet *HA* epitopa (pcDNA/HANHE3) koji služi kao marker proteina NHE3. Drugi predložak je *HANHE3* sekvenca u kojoj su delecijom uklonjene 24 aminokiseline smještene od aminokiseline Leu586. do Arg609., koje odgovaraju veznom mjestu za CaMK-II (pcDNA/d24HANHE3). Ovaj predložak je ranije konstruiran u istom laboratoriju (Laboratorij Zavoda za fiziologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu).

Usmjerenu mutagenezu pomoću metode PCR koristila sam kako bih na predlošku pcDNA/HANHE3 izradila točkaste mutacije na sedam potencijalnih CaMK-II fosforilacijskih mjesta (pcDNA/TM7-HANHE3) te na predlošku pcDNA/d24HANHE3 izradila točkaste mutacije na dva potencijalna CaMK-II fosforilacijska mjesta (pcDNA/TM2-d24HANHE3). Točkastim mutacijama sam triplet za aminokiselinu Ser zamjenjivala s tripletom za aminokiselinu Ala. Tako priređene konstruirane ekspresijske vektore sam kasnije umnožila pomoću In-Fusion® HD Cloning Kita.



Slika 12. *Sekvenca NHE3. Plavom bojom su označena potencijalna CaMK-II fosforilacijska mjesta. Žutom bojom je označen dio sekvence koji obuhvaća 24 aminokiseline, između aminokiselina Leu586 i Arg609, koje su za potrebe konstrukcije mutante d24HANHE3 delecijom uklonjene iz HANHE3. Zelenom bojom označene su aminokiseline Glu37 i Ile38 između kojih je kloniran triplet HA epitopa.*

Za izradu točkastih mutacija sedam potencijalnih CaMK-II fosforilacijskih mjesta u pcDNA/HANHE3, CloneAmp HiFi Premix™-u, u kojem se nalaze polimeraza, odgovarajući pufer i smjesa dNTP-a, dodavala sam početnice koje nose mutaciju, DNA predložak i sterilnu vodu bez DNaza. Strategija usmjerene mutageneze je prikazana na Slici 13.



Slika 13. *Shematski prikaz usmjerene mutageneze pomoću reakcije PCR.*

U konstruiranju točkastih mutacija u *HANHE3* sekvenci koristila sam dva pristupa. U prvom, standardnom, pristupu sam u reakcijsku smjesu pomiješala zajedno sve komponente PCR reakcije; odgovarajuću pozitivnu i negativnu početnicu s mutiranim mjestom, DNA predložak, CloneAmp HiFi Premix™ i vodu (Tablica 3.).

Tablica 3. PCR reakcijska smjesa u standardnom pristupu

Reakcijska smjesa	
plazmidna DNA (50 ng/µl)	0,2 µl
pozitivna početnica	1,5 µl
negativna početnica	1,5 µl
CloneAmp HiFi Premix™ (1x)	12,5 µl
voda (bez DNaza)	9,3 µl
Ukupni volumen	25 µl

Kad prvi pristup nije davao rezultate tada sam postupak izrade mutacija provodila na drugi način, u dva koraka. U prvom koraku bih pripremila dvije PCR smjese volumena po 25 µl pri čemu sam u svaku smjesu pomiješala po jednu, pozitivnu (Smjesa A) odnosno negativnu (Smjesa B) početnicu (Tablica 4.). Nakon početnih šest ciklusa umnožavanja provela bih drugi korak u kojem bi dvije smjese spojila u jednu zajedničku smjesu koju sam potom umnožavala sljedeća 24 ciklusa.

Tablica 4. PCR reakcijske smjese za reakciju PCR u dva koraka

Reakcijska smjesa A	
Pozitivna početnica	1,5 µl
Plazmidna DNA (50 ng/µl)	1 µl
CloneAmp HiFi Premix™ (1x)	12,5 µl
voda (bez DNaza)	10 µl
ukupni volumen	25 µl

Reakcijska smjesa B	
Negativna početnica	1,5 µl
Plazmidna DNA (50 ng/µl)	1 µl
CloneAmp HiFi Premix™ (1x)	12,5 µl
voda (bez DNaza)	10 µl
ukupni volumen	25 µl

Reakcija PCR se odvijala prema sljedećem protokolu: početna denaturacija DNA na 95°C 1 minutu na koju se nastavljala drugu faza čija su se tri koraka ponavljala kroz 30 ciklusa: denaturacija na 95°C 10 s, prianjanje početnica na 54-56°C 15 s i produljivanje lanca na 72°C 45 s. Trajanje sinteze ovisilo je o dužini PCR produkta, 5 sekundi za svakih 1000 pb. Na kraju su uzorci za potrebe završnog produljivanja inkubirani na 72°C u trajanju 2 minute (

Tablica 5.).

Tablica 5. Postavke programa PCR reakcije

Faza I	**Faza II (30 ciklusa)**			**Faza III**
95^{o}C	95^{o}C	54-56^{o}C	72^{o}C	72^{o}C
1'	10''	15''	45''	2'

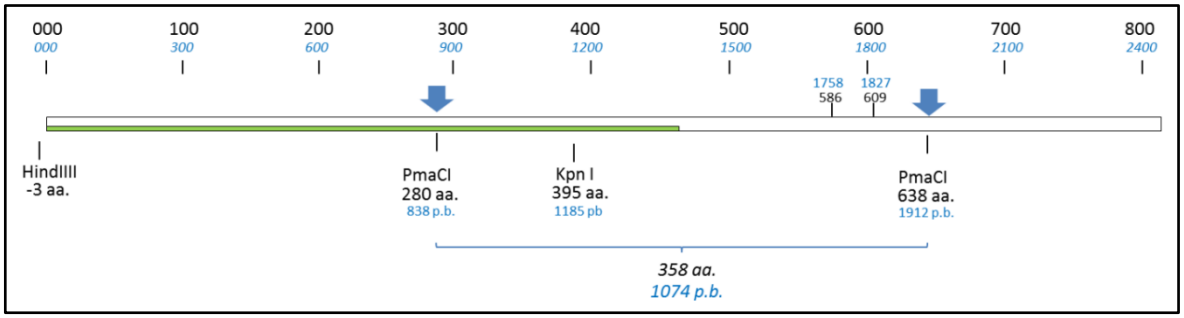
Mutiranu DNA dobivenu ovim postupkom koristila sam u transformaciji kompetentnih bakterijskih stanica. Nakon umnožavanja u bakterijskim stanicama plazmidnu DNA sam izolirala i sekvencu potvrđenu analizom rezultata dobivenih sekvenciranjem upotrijebila sam kao predložak u stvaranju

slijedeće točkaste mutacije potencijalnog CaMK-II fosforilacijskog mjesta. Postupak opisan u ovom poglavlju koristila sam i u konstrukciji dvije točkaste mutacije na pcDNA/d24HANHE3.

3.2.4. Strategija izrade ekspresijskog vektora pcDNA/TM6-d24HANHE3

Ekspresijski vektor pcDNA/TM6-d24HANHE3 sam konstruirala iz dva prethodno pripremljena vektora *HANHE3*. Prvi vektor činio je pcDNA/TM2-d24HANHE3 kojeg sam konstruirala iz pcDNA/d24HANHE3 tako što sam u njemu, postupcima točkaste mutacije, najprije mutirala dva potencijalna CaMK-II fosforilacijska mjesta proteina NHE3. Drugi vektor je činio pcDNA/TM7-HANHE3 u kojem sam, postupkom usmjerene mutageneze, mutirala sedam potencijalnih CaMK-II fosforilacijskih mjesta na sekvenci gena za protein HANHE3.

Za izradu ekspresijskog vektora pcDNA/TM6-d24HANHE3 najprije sam pcDNA/TM2-d24-HANHE3 i pcDNA/TM7-HANHE3 tretirala s restrikcijskim enzimom *PmaC*I. Prethodnom provjerom sam ustanovila da restrikcijski enzim *PmaC*I cijepa *HANHE3* ali ne i plazmid pcDNA 3.1(+). Unutar sekvence *HANHE3*, *PmaC*I prepoznaje specifični nukleotidni slijed 5'…CAC^GTG…3' i na tom slijedu reže oba lanca DNA. Unutar DNA sekvence *HANHE3* postoje dva takva slijeda (Slika 14.).



Slika 14. *Dva restrikcijska mjesta za enzim PmaCI unutar sekvence NHE3. Restrikcijska endonukleaza PmaCI reže sekvencu NHE3 između aminokiselina His280 i Val281 odnosno His638 i Val639.*

Restrikcijski enzimi djeluju tako da režu oba lanca molekule DNA te na 3' i 5' krajevima molekule mogu stvarati ljepljive ili tupe krajeve. Djelovanjem enzima *PmaC*I na pcDNA/HANHE3 nastaju dva DNA fragmenta s tupim krajevima: jedan duži (6952 pb) koji obuhvaća pcDNA vektor s početnim i završnim dijelovima sekvence *HANHE3* i drugi kraći (1074 odnosno 1002 pb) koji obuhvaća sekvencu *HANHE3* između mjesta rezanja s *PmaC*I.

3.2.5. Defosforilacija fragmenata DNA pomoću enzima SAP

Duže fragmente je potrebno defosforilirati kako bi se tijekom postupka ligacije spriječila njihova recirkulacija. Defosoforilaciju sam provela pomoću enzima *SAP* fosfataze (engl. ***S**hrimp **A**lkaline **P**hosphatase*) koja odcjepljuje fosfatne skupine na krajevima dužih fragmenata nastalih djelovanjem *PmaC*I i time sprječava povezivanje tupih krajeva.

Defosforilaciju fragmenata pocijepanog vektora pcDNA/TM7-HANHE3 sa *SAP* fosfatazom provela sam u odgovarajućem puferu na 37°C kroz 20 minuta. Nakon završene defosforilacije *SAP* fosfatazu sam inaktivirala na 65°C kroz 15 minuta.

Ekspresijski vektor pcDNA/TM6-d24HANHE3 koja sadrži deleciju 24 aminokiseline i mutacije šest potencijalnih CaMK-II fosforilacijskih mjesta proteina NHE3 konstruirala sam iz dva vektora, pcDNA/TM7-HANHE3 i pcDNA/TM2-d24HANHE3. U konačnici, pcDNA/TM6-d24HANHE3 je nastao povezivanjem dvaju segmenata; jednog kraćeg segmenta uzetog iz jednog i jednog dužeg fragmenta uzetog iz drugog ekspresijskog vektora. Iz pcDNA/TM7-HANHE3 sam uzela duži segment veličine 6952 pb *(vektor)*, koji sadrži četiri mutirana potencijalna CaMK-II fosforilacijska mjesta na sekvenci gena za protein HANHE3, dok sam iz ekspresijskog vektora pcDNA/TM2-d24-HANHE3 uzela kraći segment veličine 1002 pb *(umetak)*, koji sadrži dva mutirana potencijalna CaMK-II fosforilacijska mjesta i kojemu nedostaje vezno mjesto za CaMK-II. Dva izolirana fragmenta (vektor i umetak) međusobno sam povezala postupkom ligacije.

3.2.6. Ugradnja DNA fragmenta (umetka) u vektorski plazmid ligacijom

Ligacija je metoda kojom se fragment sekvence DNA (*umetak*) ugrađuje u *vektor* stvaranjem fosfodiesterskih veza između vektora i umetka. Odvija se u prisutnosti *T4* DNA ligaze i odgovarajućeg pufera za njeno djelovanje.

Za postupak ligacije pomiješala sam umetak i vektor u omjeru 4:1. U reakcijsku smjesu sam pored umetka i vektora dodala *T4* ligazu i njen pufer, te smjesu inkubirala preko noći na 16°C. Nakon završene inkubacije *T4* ligazu sam deaktivirala inkubacijom na 65°C kroz 10 min.

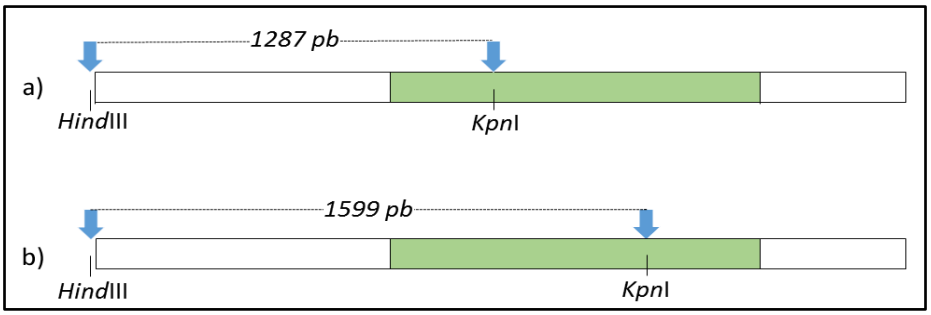
3.2.7. Određivanje orijentacije umetka restrikcijskim enzimima

S obzirom da se umetak i vektor povezuju preko tupih krajeva, umetak se može u vektor ugraditi u ispravnom i obrnutom smjeru. Stoga je nakon konstrukcije ekspresijskog vektora pcDNA/TM6-d24HANHE3 potrebno provjeriti kako je umetak orijentiran unutar plazmidnog vektora.

Novostvoreni ekspresijski vektor pcDNA/TM6-d24HANHE3 sam tretirala restrikcijskim enzimima *Hind*III *i Kpn*I kako bih utvrdila orijentaciju umetka u vektor. *Hind*III *i Kpn*I restrikcijski enzimi režu sljedove nukleinskih baza kako je navedeno:

*Hind*III 5'… A^AGCTT…3'
3' …TTCGA^A…5'

*Kpn*I 5'…GGTAC^C…3'
3'…C^CATGG…5'



Slika 15. *Shematski prikaz određivanja orijentacije umetka u vektoru pomoću restrikcijskih enzima. KpnI restrikcijsko mjesto nalazi se u početnom dijelu umetka, dok je HindIII restrikcijsko mjesto neposredno prije početne sekvence HANHE3. Potpunom restrikcijom mutante nastaju fragmenti različite veličine: a) fragment dug 1287 pb koji sugerira da je umetak ispravno orijentiran, b) fragment dug 1599 sugerira da je umetak obrnuto orijentiran u mutanti.*

3.2.8. Utvrđivanje orijentacije umetka u ekspresijskom vektoru

Utvrđivanje orijentacije umetka u izrađenom ekspresijskom vektoru pcDNA/TM6-d24HANHE3 provela sam reakcijom eskpresijskog vektora s restrikcijskim enzimima u 20 µl smjese koja je sadržavala:

- 100 ng pcDNA/TM6-d24HANHE3,
- 2 µl NEB pufera 2 (10x),
- 0,5 µl enzima *Hind*III,
- 0,5 µl enzima *Kpn*I
- sterilnu vodu bez DNaza.

Reakcijske smjese su inkubirane pri temperaturi od 37 °C kroz 60 min, nakon čega su restrikcijske endonukleaze inaktivirane na 65 °C kroz 15 min.

Produkti reakcija s restrikcijskim enzimima su analizirane metodom preparativne gel elektroforeze kako je opisano.

3.2.9. Horizontalna gel elektroforeza u agaroznom gelu

Horizontalna gel elektroforeza je metoda koja se koristi za razdvajanje i analizu molekula DNA. Provodi se u kadici za elektroforezu u kojoj se nalazi agarozni gel i pufer bogat ionima koji provodi istosmjernu struju i održava pH sustava konstantnim. Agarozni gel sastoji se od polisaharidnih polimera koji stvaraju mrežu pora kroz koje se kreću molekule DNA. Brzina kretanja molekula DNA ovisi o njihovoj molekularnoj masi, jakosti električnog polja te gustoći samog agaroznog gela. DNA molekule manje molekularne mase se brže kreću kroz gel. Za vizualizaciju DNA unutar gela dodaje mu se DNA boja koja se interkalira u dvolančanu DNA i čini je vidljivom pod UV svjetlom.

Uzorci za elektroforezu najprije se miješaju s bojom (engl. *loading dye*) koja olakšava nanošenje uzoraka u jažice smještene u početnom dijelu gela i pomaže u praćenju kretanja uzoraka kroz gel. Nakon nanošenja uzoraka, kroz kadicu se pušta istosmjerna struja uslijed čega se negativno nabijene molekule DNA kreću prema pozitivno nabijenoj anodi. Nakon završetka elektroforeze, DNA u gelu se vizualizira UV svjetlom i fotografira.

Za izoliranje fragmenata ili cijele DNA koristila sam 1%-tni agarozni gel koji sam pripremila otapanjem odgovarajuće mase agaroze u mikrovalnoj pećnici u odgovarajućem volumenu 1x TAE pufera (pH 8,5, 40 nM Tris, 20 mM natrij acetat, 1 mM EDTA). Za detekciju DNA fragmenata koristila sam interkalirajuću boju (Gel Star Nucleic Acid Gel Stain) u omjeru 1:10 000 koju sam dodavala u agaroznu smjesu prije njenog ulijevanja u odgovarajući kalup. U kadicu za elektroforezu sam ulila 1x TAE pufer. Uzorcima koje sam nanosila na ovako pripremljeni gel prethodno sam dodala boju za praćenje (6x *loading dye*) u omjeru 5:1 kako bih mogla pratiti tijek elektroforeze. Razdvajanje molekula DNA je provođeno u 100 V istosmjerne struje na sobnoj temperaturi. Za usporedbu i određivanje veličine molekula DNA koristila sam 1kb DNA Ladder. Trajanje elektroforeze je ovisilo u pretpostavljenoj veličini fragmenata DNA potrebnih za daljnji rad.

3.2.10. Pročišćavanje i izolacija PCR produkata

Izolacija i pročišćavanje DNA prema njihovoj veličini iz agaroznog gela se provodi izrezivanjem dijela gela koji sadrži željenu DNA. Izrezani komadići gela sa željenim PCR produktima sam podvrgla pročišćavanju uz pomoć komercijalnog kompleta NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up za izolaciju prema uputama proizvođača.

Izrezane komadiće gela sam vagala i prema težini gela dodavala odgovarajući volumen pufera NTI (200 µl NTI/ 100 mg gela) koji sadrži kaotropne soli koje pomažu u otapanju agaroznog gela. Uzorak sam uz povremeno miješanje inkubirala na 50°C dok se izrezani gel nije u potpunosti otopio. Zatim, sam otopljeni gel nanosila u kolonu sa silikatnom membranom koja veže DNA iz pufera NTI pri prolasku kroz membranu i centrifugirala 30 sekundi na 13 500 rpm. Potom sam na membranu nanosila 700 µl NT3 pufera s etanolom kako bi se iz uzorka uklonile nečistoće i soli te centrifugirala 30 sekundi na 13 500 rpm. Za uklanjanje etanola koji je mogao zaostati u koloni, silikatnu membranu sam dodatno „isušivala“ centrifugiranjem 1 minutu na 13 500 rpm. U posljednjem koraku sam molekule DNA eluirala (odvajala) iz membrane s 30 µl sterilne vode bez DNaza i RNaza.

3.2.11. Mjerenje koncentracije DNA u uzorcima

Koncentraciju DNA u otopini izolirane i pročišćene iz agaroznog gela odnosno dobivene minipreparacijom iz bakterijskih stanica mjerila sam spektrofotometrom NanoDrop2000c koji određuje koncentraciju i čistoću DNA u otopini. Spektrofotometar je opremljen s UV lampom koja izlaže uzorak DNA ultraljubičastom zračenju valne dužine 260 nm, a foto-detektor mjeri količinu svjetlosti koja prolazi kroz uzorak i pomoću ovih vrijednosti određuje se koncentracija DNA u uzorku. Izlaganje uzorka ultraljubičastom zračenju valne dužine 280 nm određuje prisutnu koncentraciju proteina. Omjer vrijednosti dobivenih apsorpcijom svijetlosti na valnim dužinama 260 i 280 nm ($A_{260/280}$) prikazuje čistoću uzorka. Idealan omjer ($A_{260/280}$) je 1,8 i on pokazuje da se radi o dobro pročišćenoj DNA bez primjesa proteina.

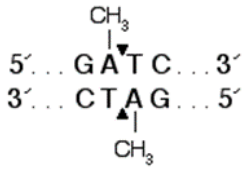
DNA iz uzoraka sam određivala tako što sam na detektor uređaja nanosila 1 µl odabranog uzorka. Za kalibraciju uređaja koristila sam istu otopinu kojom sam eluirala DNA sa silikatnih membrana. U uzorcima, u kojima sam određivala koncentracije DNA, omjer valnih duljina uglavnom je iznosio od 1,8 – 1,9 pokazujući da su moji uzorci dobro pročišćeni.

3.2.12. Uklanjanje plazmidnog predloška iz reakcijske smjese za transformaciju bakterijskih stanica

Prije postupka transformacije iz PCR smjese sam uklonila plazmidnu DNA koja je služila kao predložak za izradu mutacije budući da kompetente Stellar stanice nemaju sposobnost odstranjivanja metilirane DNA. Za uklanjanje predloška DNA koji za razliku od novosintetizirane i umnožene DNA u PCR reakciji, sadrži metilne skupine koristila sam restrikcijski enzim *Dpn*I. Za *Dpn*I je svojstveno da na

svom restrikcijskom mjestu lance DNA reže između nukleinskih baza adenina i timina samo ako je u adenin u okviru restrikcijskog mjesta metiliran (Slika 16.).

Nakon provedenog PCR-a, reakcijsku smjesu sam inkubirala s 0,5 µl *Dpn*I 60 minuta na 37°C. Nakon inkubacije, enzimatsku aktivnost *Dpn*I sam deaktivirala inkubiranjem uzoraka na 80 °C kroz 20 minuta. Tako pripremljenu PCR reakcijsku smjesu sam koristila za postupak transformacije.



Slika 16. *Restrikcijski enzim DpnI reže molekulu DNA na svom restrikcijskom mjestu samo ako je ono metilirano*.

3.2.13. Transformacija bakterijskih stanica

Transformacija bakterijskih stanica je postupak u kojem se u kompetentne bakterijske stanice unosi strana plazmidna DNA u svrhu umnožavanja DNA koja nosi sekvencu od interesa. Bakterijske stanice koje se koriste u transformaciji mogu se pripremiti na dva načina kako bi bile kompetentne u transformaciji. Najčešće korištene kompetentne bakterijske stanice su sojevi *E. coli*, a mogu se pripremiti na način da postanu elektro- ili kemijski kompetentne stanice. U ovom radu korištene su kemijski kompetentne bakterijske stanice koje su pripremljene u otopini $CaCl_2$ pri 0 °C. Pod ovim uvjetima ioni Ca^{2+} stvaraju pore u membrani bakterijskih stanica i pripomažu u vezanju DNA za stanicu „skrivajući“ njen negativan naboj. Ovako pripremljene kompetentne stanice olakšavaju ulaz DNA kroz hidrofobnu membranu. Korištenjem kratkotrajnog temperaturnog šoka na 42 °C stvara se temperaturni gradijent koji unosi DNA u bakterijsku stanicu.

Za umnažanje mutiranih sekvenci *HANHE3* koristila sam Stellar stanice (*Stellar™ Competent Cells)* koje su dio InFusion Kit-a za mutacije. Stellar stanice posjeduju visoku učinkovitost transformacije i sposobnost recirkulacije lineariziranog plazmida.

Kompetentne Stellar bakterije sam transformirala s mutiranim *HANHE3* sekvencama prema protokolu dobivenom od proizvođača. Cijelo vrijeme sam ih držala na ledu budući da na višoj temperaturi gube svoju kompetenciju. U tubice od 1,5 ml stavljala sam 30 µl Stellar stanica u koje sam dodavala 1,5 do 5 µl PCR reakcijske smjese prethodno obrađene s *Dpn*I. Smjesu sam inkubirala 30 minuta na ledu, zatim izložila temperaturnom šoku na 42°C točno 45 sekundi i vratila na led u kojem su inkubirane 1-2 minute. U smjesu sam zatim dodala 470 µl medija SOC prethodno zagrijanog na 37°C. Stanice sam na kraju inkubirala na tresilici pri 225 okretaja/min na 37°C kroz 60 min kako bi se obnovila narušena stabilnost staničnih membrana. Nakon završenog miješanja, nasadila sam ih na tvrdi LB agar kojemu je dodano 100 µg/ml ampicilina (podloga LB/Amp). Obično sam na krute podloge LB/Amp nasađivala 150 µl medija s bakterijskim stanicama i inkubirala ih preko noći na 37°C.

U slučaju uspješno provedene transformacije na podlozi bi nakon 18-20 sati narasle bakterijske kolonije. Podloge s naraslim kolonijama sam čuvala u frižideru na 4 °C.

3.2.14. Minipreparacija plazmidne DNA

Minipreparacija plazmidne DNA je metoda za izolaciju plazmidne DNA iz bakterijskih kolonija. Najčešće korištena metoda zasniva se na alkalnoj lizi bakterijskih stanica. Bakterije koje sadrže plazmid od interesa tretiraju se puferom za lizu koji sadrži deterdžent SDS (engl. ***S**odium **d**odecyl **s**ulfate)* i snažnu alkalnu bazu NaOH. Deterdžent otapa fosfolipidni dvosloj stanice i denaturira većinu proteina u stanici, a NaOH pomaže pri razgradnji stanične stijenke i denaturira bakterijski plazmid. Dodavanjem neutralizacijske otopine koja sadrži kalijev acetat podiže se pH smjese i omogućava ponovno spajanje lanaca plazmida. Nakon ovog koraka sva preostala jednolančana DNA, SDS i denaturirani stanični proteini stvaraju vidljivi precipitat koji od plazmidne DNA otopljene u otopini može lako odvojiti centrifugiranjem. Plazmidna DNA se u otopini nalazi zajedno s zaostalim onečišćenjima poput soli, zaostalih proteina i staničnog otpada zbog čega se mora pročistiti kako bi bila spremna za daljnju upotrebu.

Za potrebe minipreparacije bakterijske kolonije s podloga sam odabirala nasumično. Kolonije sam uzimala sterilnom ezom i prenosila ih u 4 ml tekućeg LB medija u koji je prethodno dodano 4 µl ampicilina (100 mg/ml). Uzorke sam zatim inkubirala u tresilici na 225 okretaja/min pri 37°C kroz 18 sati.

S obzirom da su bakterije rasle u 4 ml medija, nakon inkubacije sam uzorke morala u više navrata prenositi u tube od 1,5 ml. Pri svakom prijenosu, uzorke sam centrifugirala 30 sekundi na 13 500 rpm kako bih iz tekućeg medija LB/Amp istaložila bakterijske stanice. Ostali koraci su provedeni prema uputama proizvođača komercijalno dostupnog kompleta za izolaciju plazmidne DNA (PureYield™ Plasmid Miniprep System).

Istaložene bakterije sam resuspendirala u 400 µl sterilne vode bez DNaza. Potom sam dodavala otopinu CLC (engl. *Cell Lysis Buffer*) za lizu stanica koju sam promiješala s bakterijama laganim okretanjem tubice. U reakcijsku smjesu sam potom dodavala pufer za neutralizaciju NSC (engl. *Neutralization Solution*) i laganim okretanjem tubice izmiješala sadržaj. Nakon centrifugiranja sam supernatant u kojem se nalazila otopljena plazmidna DNA pažljivo prenosila u kolone s membranom za vezanje DNA. Nakon jednominutne inkubacije kolone sam centrifugirala 30 sekundi na 13 500 rpm kako bih plazmidnu DNA odvojila od ostatka otopine. Pri prolasku kroz membranu, plazmidna DNA iz supernatanta se vezala za membranu. Membranu u koloni sam ispirala najprije otopinom za uklanjanje endotoksina ERB (engl. *Endotoxin Removal Wash*) s dodatkom 70% etanola. Između svakog ispiranja kolone sam centrifugirala 60 sekundi na 13 500 rpm.

Nakon ispiranja kolone sam premjestila u sterilne tube od 1.5 ml i na membrane kolona sam pažljivo dodala 50 µl elucijskog pufera (sterilna voda bez DNAaza) kojeg sam ostavila da se inkubira 1 min na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, tube s kolonama sam centrifugirala 30 sekundi na 13 500 rpm. Prolaskom kroz membranu elucijski pufer je s nje odvajao plazmidnu DNA.

Koncentraciju plazmidne DNA sam određivala pomoću spektrofotometra na prethodno opisan način. Uzorke pročišćene plazmidne DNA pohranjivala sam na -20°C.

3.2.15. Sekvenciranje

Prisutnost željene mutacije i isključivanje mogućih grešaka na sekvenci HANHE3 ispitana je sekvenciranjem uzorka. Za tu uslugu korišten je Macrogen-ov servis za sekvenciranje (Amsterdam, Nizozemska, www.macrogen.com). Koristila sam njihovu *„Standard-seq single Regular"* uslugu, a za potrebe provjere uspješnosti točkastih mutacija dizajnirala sam početnice koje su služile za očitavanje mutirane sekvence *HANHE3* (Tablica 6.).

Uzorci za sekvenciranje koncentracije 100 ng/µl pripremljeni su u 20 µl sterilne vode bez DNaza i poslani na sekvenciranje.

Tablica 6. Početnice za ispitivanje točkastih mutacija na sekvenci *HANHE3* sekvenciranjem

T7	5' AATACGACTCACTATAG 3'
sp820_FW	5' CTGGTGACGCGCTTCACC 3'
sp1351_FW	5' GCCTGACCATCAAGCCGC 3'
sp1598_FW	5' GTTCCACGAGCTG 3'
sp1894_FW	5' GAGGACGTCATCAC 3'

3.2.16. Održavanje kulture stanica PS120

Za uspostavljanje kulture stanica koristila sam stanične linije fibroblasta PS120 koji prirodno ne posjeduju protein NHE3 u svojoj membrani. Fibroblaste PS120 sam transfecirala s plazmidima pcDNA 3.1(+) u koje su prethodno klonirane nativne i mutirane *HANHE3* sekvence. Za transfekcije sam koristila dvije stanične linije fibroblasta PS120: jednu sa stabilno transfeciranim proteinom NHERF2 i drugu bez proteina NHERF2.

Za uzgoj stanica PS120 koristila sam hranjivi medij DMEM obogaćen s 10% fetalnim goveđim serumom (FBS, engl. ***f**etal **b**ovine **s**erum*), dok sam transfecirane stanice održavala u hranjivom mediju DMEM s 10% FBS-om uz dodatak 400 µg/ml selekcijskog antibiotika G418 (selekcijski antibiotik za transfecirani NHE3) i 50 µg/ml selekcijskog antibiotika Zeocina (selekcijski antibiotik za transfecirani NHERF2).

Stanice sam uzgajala i održavala u bocama za kulturu stanica T25 u inkubatoru s kontroliranom atmosferom u prisutnosti 5% CO_2 pri 37 °C. Pri rukovanju sa stanicama osigurani su sterilni uvjeti kako ne bi došlo do neželjene infekcije stanične kulture. Stanični medij sam mijenjala svaka 2-3 dana.

3.2.17. Presađivanje kulture stanica PS120

Presađivanje kultura stanica PS120 s transfeciranim nativnim i mutiranim HANHE3 ovisilo je o dostizanju 100% konfluentnosti.

Za presađivanje stanica PS120 koristila sam 0,05% tripsin/EDTA koji razdvaja stanice i odvaja ih od podloge kako bi se mogle presaditi u novu T25. U postupku presađivanja najprije sam iz boca sa stanicama uklonila stanični medij i zatim dodala pufer HBSS koji služi za ispiranje stanica od preostalog seruma koji bi mogao interferirati s tripsinom i neutralizirati njegovo djelovanje. Nakon 5 min inkubacije uklonila sam pufer HBSS i na stanice nanijela 1 ml tripsin/EDTA. Tripsin sam ostavila da djeluje sve dok ne dođe do međusobnog razdvajanja stanica i njihova odvajanja od podloge (1-3 min).

Nakon inkubacije s tripsinom u boce sa stanicama sam dodala 5-8 ml staničnog medija PS120 s FBS serumom koji deaktivira djelovanje tripsina. U dodanom mediju sam resuspendirala stanice pažljivim provlačanjem kroz pipetu. Odgovarajući volumen stanica sam zatim prenosila u novu bocu u koju sam prethodno dodala 5 ml hranjivog medija.

Gustoća nasađivanja u svrhu održavanja i proširivanja stanične linije ovisila je o stupnju konfluentnosti i potrebama. Sve otopine korištene za presađivanje i održavanje stanica su prethodno ugrijane na 37 °C.

3.2.18. Transfekcija stanica

Transfekcija je postupak unošenja plazmidne DNA u stanice kako bi se eksprimirali specifični proteini unutar eukariotskih stanica. Fibroblasti PS120 su transfecirani uz pomoć ekspresijskih vektora pcDNA 3.1(+) s nativnim i mutiranim *HANHE3*: pcDNA/TM7-HANHE3 i pcDNA/TM6-d24HANHE3. Postupkom usmjerene mutageneze sam u sekvencama *HANHE3* mutirala odabrana potencijalna CaMK-II fosforilacijska mjesta na proteinu NHE3. Za razliku od prvog eskpresijskog vektora u kojem sam mutirala sedam potencijalnih CaMK-II fosforilacijskih mjesta, u drugom vektoru pcDNA/TM6-d24-HANHE3 mutirala sam ih šest budući da se sedmo mjesto nalazilo unutar segmenta koje je delecijom uklonjeno iz ove mutante.

Transfekciju sam izvela na sljedeći način: fibroblaste PS120 sam dan prije pokusa nasadila u ploču sa šest bunarića, tako da konfluentnost stanica u bunarićima na dan pokusa bude približno 80%. Na dan pokusa pripremila sam dvije otopine:

- u otopini A sam pomiješala 1 µg plazmidne DNA i 250 µl medija OptiMEM bez seruma,
- u otopini B sam pomiješala 6 µl Lipofektamina 2000 i 250 µl medija OptiMEM.

Otopine sam inkubirala 15 min nakon čega sam ih međusobno pomiješala (otopina A+B) i ostavila da se inkubiraju sljedećih 30 min. Tijekom inkubacije pripremila sam fibroblaste PS120 kultivirane na ploči s šest bunarića tako što sam ih dva puta isprala medijem OptiMEM. Nakon završene inkubacije,

otopinu A+B (transfekcijska smjesa) sam nanijela na stanice PS120 i inkubirala ih slijedećih 5 sati na 37 °C u 5 % CO_2.

Nakon petosatne inkubacije, iz bunarića sam uklonila transfekcijsku smjesu i dodala 2 ml standardnog hranjivog medija PS120 bez antibiotika i stanice ostavila u tom mediju tijekom slijedećih 24-48 sati nakon čega sam standardni hranjivi medij PS120 bez antibiotika zamijenila medijem sa selekcijskim antibiotikom G418 u koncentraciji od 400 μg/ml. Uspostavljanje trajnih staničnih kultura izvršeno je pomoću selekcijskog antibiotika G418. Naime, transfekcija stanica provedena je pomoću ekspresijskih vektora koji uz nativne odnosno mutirane gene *NHE3* na plazmidu nose gen *NeoR/KanR* za otpornost na antibiotik G418. Samo stanice s prisutnim genom za otpornost na antibiotik G418 mogu preživjeti trajnu selekciju antibiotikom. U pokusima u kojima su korištene stanice PS120 stabilno transfecirane sa *NHERF2* (PS120/NHERF2 stanice), standardni medij je sadržavao i selekcijski antibiotik Zeocin (50 μg/ml).

3.2.19. Selekcija stanica postupkom zakiseljavanja

Zakiseljavanje stanica (engl. *acid loading*) koristila sam za selekciju transfeciranih stanica PS120 koje u svojoj membrani imaju dobro eksprimirani protein HANHE3.

Transfecirane stanice PS120 izložila sam 40 mM NH_4Cl u TMA puferu (pH 7,35) što dovodi do brzog unutarstaničnog zakiseljavanja. Samo stanice koje u svojoj membrani imaju dobro eksprimirani protein NHE3 se mogu oporaviti od ovog postupka.

Prvo zakiseljavanje stanica sam provela nakon drugog presađivanja transfeciranih stanica PS120. Kad su transfecirane stanice PS120 dosegle konfluentnost od 70-80 % inkubirala sam ih s 40 mM NH_4Cl kroz 60 minuta. Nakon inkubacije, uklonila sam kiseli inkubacijski medij i stanice isprala dva puta s otopinom TMA (1x). Nakon ispiranja dodala sam 2 ml 2 mM NaCl u otopini 1xTMA i stanice inkubirala slijedećih 60 min. Nakon inkubacije uklonila sam otopinu NaCl i stanicama dodala medij DMEM s 10 % FBS-om i antibiotikom G418 u koncentraciji 400 μg/ml. Transfeciranim stanicama PS120/NHERF2 dodavan je hranjivi medij koji pored antibiotika G418 sadrži i antibiotik Zeocin (50 μg/mL).

4. REZULTATI

4.1. Odabir potencijalnih CaMK-II fosforilacijskih mjesta

Za odabir potencijalnih CaMK-II fosforilacijskih mjesta koristila sam predikcijski program otvorenog koda GPS 3.0 koji pripada skupini predikcijskih programa s najmanje lažno pozitivnih rezultata. GPS 3.0 program prepoznaje određeni aminokiselinski slijed unutar zadanog proteina i na osnovi vlastitih algoritama predviđa najvjerojatnije fosforilacijsko mjesto za odabranu kinazu. Program prikazuje vjerojatnost s kojom se očekuje da bi aminokiselina Ser ili Thr u peptidnoj sekvenci predstavljala stvarno fosforilacijsko mjesto za CaMK-II. U sekvenci *NHE3* (*NHE3*, UniProtKB/Swiss-Prot: P26432.1) program GPS 3.0 je pronašao sedam potencijalnih CaMK-II fosforilacijskih mjesta (Tablica 7.).

Tablica 7. Prikaz sedam potencijalnih CaMK-II fosforilacijskih mjesta na proteinu NHE3 dobivenih programom GPS 3.0. Mjesto – određuje redni broj aminokiseline u proteinu, Kod – predstavlja aminokiselinu koja se fosforilira, Kinaza – predstavlja kinazu koja fosforilira potencijalno fosforilacijsko mjesto, Peptid – aminokiselinski slijed od 15 aminokiselina predviđenim fosforilacijskim mjestom označenim crveno, Rezultat – teorijska vjerojatnost da se potencijalno fosforilacijsko mjesto stvarno i fosforilira (veći broj, veća vjerojatnost).

Mjesto	Kod	Kinaza	Peptid	Rezultat
554	S	CAMK/CAMK2	TEGERRG**S**LAFIRSP	4,366
562	S	CAMK/CAMK2	LAFIRSP**S**TDNMVNV	4,688
607	S	CAMK/CAMK2	SLEQRRR**S**VRDAEDV	4,551
663	S	CAMK/CAMK2	TMRKRLE**S**FKSAKLG	3,507
693	S	CAMK/CAMK2	RAQKRRN**S**SVPNGKL	3,893
694	S	CAMK/CAMK2	AQKRRNS**S**VPNGKLP	4,580
813	S	CAMK/CAMK2	PFRLSNK**S**VDSFLLA	2,863

Nije neobično da predikcijski programi ne predvide pojedina fosforilacijska mjesta. GPS 3.0 je predvidio sedam potencijalnih fosforilacijskih mjesta (Ser554, Ser562, Ser607, Ser663, Ser693, Ser694 Ser813), međutim vjerojatnost da se potencijalno fosforilacijsko mjesto Ser813 stvarno i fosforilira je bila znatno manja od ostalih i zbog toga to potencijalno fosforilacijsko mjesto nisam koristila u svom istraživanju. Nedavna studija koju su proveli Žižak i sur. (2012) sugerirala je da CaMK-II najvjerojatnije fosforilira i aminokiselinu Ser810. Stoga sam u ovo istraživanje uključila i aminokiselinu Ser810. Odabrana potencijalna CaMK-II fosforilacijska mjesta za potrebe ovog istraživanja su Ser554, Ser562, Ser607, Ser663, Ser693, Ser694 i Ser810.

4.2. Konstrukcija ekspresijskog vektora pcDNA/TM7-HANHE3

Za konstrukciju ekspresijskog vektora pcDNA/TM7-HANHE3, u kojem je sedam potencijalnih CaMK-II fosforilacijskih mjesta na sekvenci gena za protein HANHE3 mutirano na način da je triplet za aminokiselinu Ser promijenjen u triplet za Ala, koristila sam postupak usmjerene mutageneze pomoću reakcije PCR.

4.2.1. Izrada pojedinih točkastih mutacija unutar HANHE3

Kao plazmidni predložak za izradu mutacija potencijalnih fosforilacijskih mjesta koristila sam pcDNA/HANHE3. Radi se o *NHE3* molekuli, s tripletom *HA* epitopa (*HANHE3*), koja je klonirana u vektor pcDNA 3.1(+). Tri sekvence *HA* epitopa (triplet) su ranije klonirane u *NHE3*, a služe kao marker za kasniju analizu proteina NHE3. Točkaste mutacije provodila sam sukcesivno, jednu za drugom, na istom plazmidnom predlošku tako da je u svakoj slijedećoj mutaciji korišten mutirani plazmidni predložak u kojem je prethodnim postupkom uspješno provedena točkasta mutacija (Tablica 8.). Prema tome, pri svakoj slijedećoj mutaciji broj mutiranih potencijalnih fosforilacijskih mjesta se povećavao za jednu mutaciju. Izuzetak je izrada prve točkaste mutacije u kojoj je plazmidni predložak bila nativna sekvenca *HANHE3*. U svakom od sedam odabranih potencijalnih CaMK-II fosforilacijskih mjesta aminokiselina Ser je mutirana u Ala tako što je u tripletu nukleinskih baza koji kodira Ser učinjena promjena jedne ili dvije nukleinske baze kako bi se stvorio triplet nukleinskih baza koji kodira Ala.

Konstrukcija ekspresijskog vektora pcDNA/TM7-HANHE3 započeta je sa mutiranjem aminokiseline Ser693 jer se ona pokazala najuspješnijom od tri paralelno pokrenute mutacijske reakcije. Novostvoreni plazmid pcDNA/HANHE3_S693A je korišten kao predložak za konstruiranje slijedeće mutacije u procesu stvaranja ekspresijskog vektora pcDNA/TM7-HANHE3 (Tablica 8.).

Tablica 8. Redoslijed stvaranja ekspresijskih vektora pcDNA/HANHE3. U svakom slijedećem koraku (od 2. do 7.) mutante su povećavane za jednu novu točkastu mutaciju i bile predložak za slijedeću točkastu mutaciju. Posljednji stupac u tablici prikazuje redoslijed kojim su se mutirala potencijalna CaMK-II fosforilacijska mjesta.

	Plazmidni predložak	**Mutacija**
	pcDNA/HANHE3	S693A
1.	pcDNA/HANHE3_S693A	S554A
2.	pcDNA/HANHE3_S693A_S554A	S663A
3.	pcDNA/HANHE3_S693A_S554A_S663A	S810A
4.	pcDNA/HANHE3_S693A_S554A_S663A_S810A	S562A
5.	pcDNA/HANHE3_S693A_S554A_S663A_S810A_S562A	S607A
6.	pcDNA/HANHE3_S693A_S554A_S663A_S810A_S562A_S607A	S694A
7.	pcDNA/HANHE3_S693A_S554A_S663A_S810A_S562A_S607A_S694A	

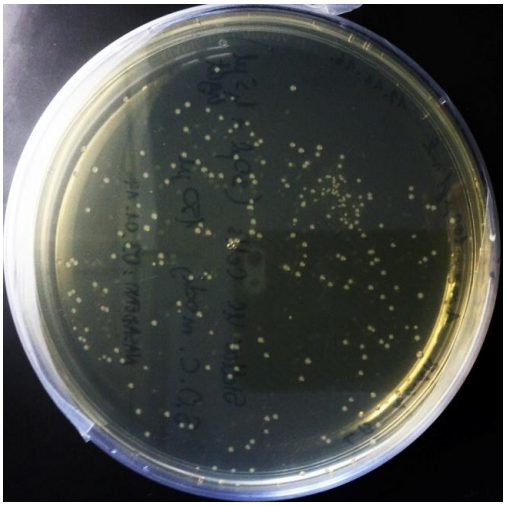
Za stvaranje točkastih mutacija korišten je CloneAmp HiFi Premix™, odgovarajući par pozitivne i negativne početnice i plazmidna DNA koja je služila kao predložak za konstrukciju mutirane *HANHE3*.

Nakon provedene PCR reakcije kojom je mutirana aminokiselina Ser potencijalnog CaMK-II fosforilacijskog mjesta na sekvenci *HANHE3*, reakcijska smjesa je tretirana s enzimom *Dpn*I kako bi se potpunom digestijom iz reakcijske smjese uklonila plazmidna DNA koja je služila kao predložak za stvaranje nove točkaste mutacije. *Dpn*I ima svojstvo da reže plazmidnu DNA na koju su vezane

metilne skupine koje DNA dobiva prilikom umnožavanja u bakterijama (Slika 17.). DNA stvorena i umnožena u PCR reakciji ne posjeduje vezane metilne skupine. Nakon tretmana s *Dpn*I u reakcijskoj smjesi je ostala samo novosintetizirana mutirana DNA.

4.2.2. Transformacija kompetentnih stanica mutiranom DNA

Na Slici 17. je prikazan primjer kolonija Stellar kompetentnih bakterijskih stanica koje su korištene za umnažanje mutiranih plazmida pcDNA/HANHE3. Alikvoti od 30 µl bakterijskih Stellar stanica transformirani su s 1,5 do 5 µl reakcijske smjese koja sadrži mutiranu sekvencu plazmida pcDNA/HANHE3. Transformirane stanice su nasađene na selektivne krute LB podloge s ampicilinom. Od 500 µl transformiranih bakterijskih stanica u SOC mediju, 150 µl medija sa stanicama je nasađeno na podlogu LB/Amp. Podloge s transformiranim bakterijskim stanicama su inkubirane preko noći na 37 °C. Ovisno o transformaciji na podlozi je znalo narasti između dvadesetak i stotinjak kolonija (Slika 17.).



Slika 17. *Kolonije bakterijskih Stellar kompetentnih stanica, koje su uspješno transformirane mutiranom sekvencom pcDNA/HANHE3, na krutoj podlozi LB/Amp.*

Nasumičnim odabirom sam uzimala 12 kolonija koje bih presadila na novu podlogu LB/Amp. Istodobno, od 12 odabranih kolonija njih 3-6 je korišteno i za nasađivanje u 4 ml tekućeg medija LB s ampicilinom. Nakon umnažanja na 37 °C kroz 18 sati iz bakterija je postupkom minipreparacije izolirana mutirana plazmidna DNA. Nakon određivanja koncentracije, uzorke sam priredila i poslala na sekvenciranje.

Plazmidna DNA u kojoj je mutacija potvrđena sekvenciranjem korištena je kao predložak za slijedeću mutaciju potencijalnog CaMK-II fosforilacijskog mjesta.

4.2.3. Analiza i potvrđivanje provedenih mutacija sekvenciranjem

Uzastopne mutacije pojedinačnih potencijalnih CaMK-II fosforilacijskih mjesta potvrđivane su sekvenciranjem DNA kojim se određuje nukleotidni slijed sekvence nizvodno od mjesta postavljanja komplementarne početnice. Dizajnirala sam četiri početnice za potrebe sekvenciranja s ciljem da se prema potrebi provede sekvenciranje cjelokupne sekvence *HANHE3*. Za rutinske analize sekvenci koje su se provodile na tjednoj osnovi koristila sam početnicu sp1351_FW jer je ona obuhvaćala segment *HANHE*3 unutar kojeg je provedeno svih sedam mutacija. U Tablici 9. je prikazan redoslijed potvrđenih mutiranih sekvenci nakon svakog ciklusa točkaste mutacije.

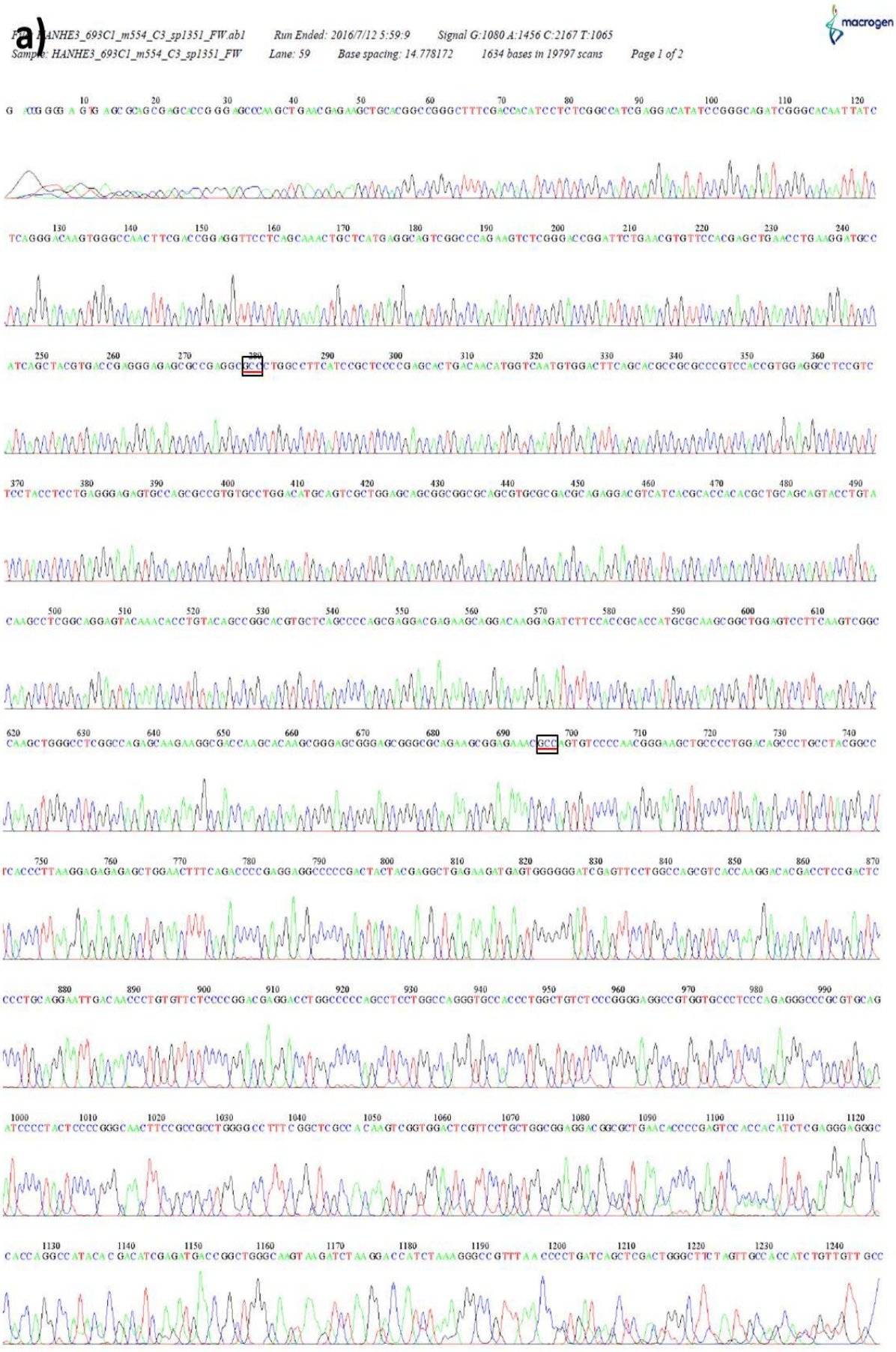
Tablica 9. *S*ekvence dobivene uzastopnim mutacijama potencijalnih CaMK-II fosforilacijskih mjesta. Plazmidni predložak – pcDNA korištena u tom ciklusu, Mutacija – izmjena potencijalnog fosforilacijskog mjesta, Prisutne mutacije nakon sekvenciranja – pcDNA sekvenca s *HANHE3* i označenom mutacijom potvrđenom sekvenciranjem. S- serin, A – alanin.

	Plazmidni predložak	**Mutacija**	**Prisutne mutacije nakon sekvenciranja**
1.	pcDNA/HANHE3	S693A	pcDNA/HANHE3_S693A
2.	pcDNA/HANHE3_S693A	S554A	pcDNA/HANHE3_S693A_S554A
3.	pcDNA/HANHE3_S693A_S554A	S663A	pcDNA/HANHE3_S693A_S554A_S663A
4.	pcDNA/HANHE3_S693A_S554A_S663A	S810A	pcDNA/HANHE3_S693A_S554A_S663A_S810A
5.	pcDNA/HANHE3_S693A_S554A_S663A_ S810A	S562A	pcDNA/HANHE3_S693A_S554A_S663A_S810A_ S562A
6.	pcDNA/HANHE3_S693A_S554A_S663A_ S810A_S562A	S607A	pcDNA/HANHE3_S693A_S554A_S663A_S810A_ S562A_S607A
7.	pcDNA/HANHE3_S693A_S554A_S663A_ S810A_S562A_S607A	S694A	pcDNA/HANHE3_S693A_S554A_S663A_S810A_ S562A_S607A_S694A

Produkti minipreparacije DNA su poslani na sekvenciranje u Macrogen. Upotrebom sekvencijske početnice sp1351_FW dobiva se nukleotidni slijed od oko 1100 do 1250 pb. Duljina dobivenih sljedova ovisila je o kvaliteti uzoraka poslanih na sekvenciranje.

Sekvence pcDNA/TM7-HANHE3, pcDNA/TM2-d24HANHE3 i pcDNA/TM6-d24HANHE3 su sekvencirane s četiri sekvencijske početnice kako bi se provela analiza cijele sekvence *HANHE3* i isključila prisutnost neželjenih slučajnih mutacija. Primjer jednog reprezentativnog kromatograma prikazan je na Slici 18.

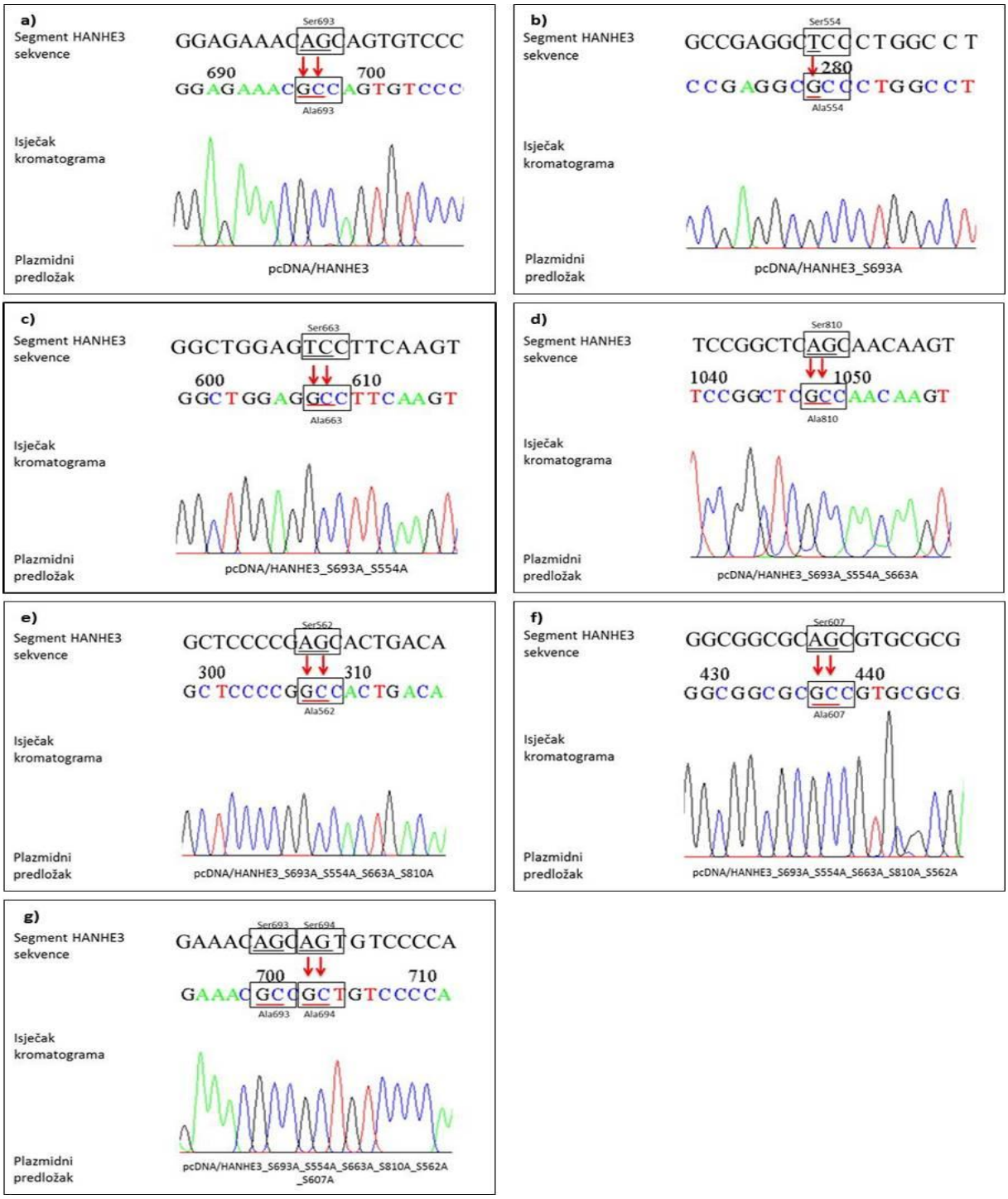
a)


File: HANHE3_693C1_m554_C3_sp1351_FW.ab1 Run Ended: 2016/7/12 5:59:9 Signal G:1080 A:1456 C:2167 T:1065
Sample: HANHE3_693C1_m554_C3_sp1351_FW Lane: 59 Base spacing: 14.778172 1634 bases in 19797 scans Page 1 of 2
macrogen



Slika 18. *Primjer kromatograma mutirane pcDNA/HANHE3_S693A_S554A. a) prikazan je kromatogram sekvence koji prikazuje slijed od 1250 pb nizvodno od sekvencijske početnice sp1351. Uspješno mutirani triplet za aminokiseline Ala554 i Ala693 podvučeni su crvenom linijom, b) prikazan je slijed nukleinskih baza očitan iz kromatograma. Redovi označeni s HANHE3 predstavljaju originalnu HANHE3 sekvencu, a redovi označeni sa S693A S554 predstavljaju sekvencu mutirane pcDNA/HANHE3_S693A_S554A. Žutom bojom su označene aminokiseline Ser693A i Ser554A promijenjene u aminokiseline Ala693 i Ala554. Nukleotidi označeni crvenom bojom su nosioci promjene aminokiseline (Ser →Ala). Zvjezdice ispod uspoređenih sekvenci označavaju da se nukleotidi dviju sekvenci podudaraju, dok njihov izostanak označava da na tim mjestima nema podudarnosti nukleotida dviju sekvenci.*

Na Slici 19. su prikazani isječci kromatograma različitih mutanti u kojima su potencijalna CaMK-II fosforilacijska mjesta mutirana u slijedu, jedno za drugim. Predikcijskim programom je predviđeno sedam potencijalnih CaMK-II fosforilacijskih mjesta koja su mutirana u sedam mutacijskih ciklusa pri čemu je u svakom slijedećem ciklusu kao plazmidni predložak korištena ona mutanta u kojoj je sekvenciranjem potvrđena prisutnost mutacije.



Slika 19. *Isječci kromatograma različitih mutanti u kojima je sekvenciranjem potvrđena mutacija. Prikazani su isječci dobivenih sljedova tijekom uzastopne mutageneze (a-g). Crvene strelice u svakom isječku prikazuju izmijenjene parove baza kojima je aminokiselina Ser u nativnoj sekvenci HANHE3 (podvučeno crno) zamijenjena aminokiselinom Ala u mutiranoj sekvenci HANHE3 (podvučeno crveno). Uspješno provedene mutacije su potvrđivane sekvenciranjem u svih sedam mutanti: a) pcDNA/HANHE3 s potvrđenom mutacijom S693A, b) mutanta pcDNA/HANHE3_S693A s potvrđenom mutacijom S554A, c) pcDNA/HANHE3_S693A_S554A s potvrđenom mutacijom S663A, d) pcDNA/HANHE3_S693A_S554A_S663A s potvrđenom mutacijom S810A, f) pcDNA/HANHE3_S693A_S554A_S663A_S810A s potvrđenom mutacijom S607A, g) pcDNA/HANHE3_S693A_S554A_S663A_S810A_S607A s potvrđenom mutacijom S694A. U sekvenci posljednje mutante može se vidjeti mutacija Ser693.*

4.3. Konstrukcija ekspresijskog vektora pcDNA/TM6-d24HANHE3

Za konstrukciju ekspresijskog vektora pcDNA/TM6-d24HANHE3 koji sadrži deleciju veznog mjesta za CaMK-II i mutaciju šest potencijalnih CaMK-II fosforilacijskih mjesta na sekvenci *d24HANHE3* koristila sam dva vektora: pcDNA/TM7-HANHE3 i pcDNA/TM2-d24HANHE3. Ekspresijski vektor pcDNA/TM7-HANHE3 je izrađen u prethodnom koraku i sadrži mutacije svih odabranih sedam potencijalnih CaMK-II fosforilacijskih mjesta. Drugi vektor, pcDNA/TM2-d24HANHE3, koji sadrži mutacije dvaju potencijalnih CaMK-II fosforilacijskih mjesta konstruirala sam na plazmidnom predlošku pcDNA/d24HANHE3. Vektor pcDNA/d24HANHE3 je ranije izrađen u istom laboratoriju, tako što je iz nativne sekvence *HANHE3* delecijom uklonjen slijed od 24 aminokiseline, od Leu586 do Arg609, za koji je pokazano da je vezno mjesto za CaMK-II na proteinu NHE3.

4.3.1. Izrada točkastih mutacija u pcDNA/d24HANHE3

Na plazmidnom predlošku pcDNA/d24HANHE3 izvršene su točkaste mutacije kojima su dva potencijalna CaMK-II fosforilacijska mjesta, Ser554 i Ser562, promijenjeni u Ala554 i Ala562.

Najprije sam usmjerenom mutagenezom uz pomoć PCR reakcije u pcDNA/d24HANHE3 mutirala aminokiselinu Ser554 u Ala554. Nakon potvrđivanja mutacije sekvenciranjem u novosintetiziranoj mutanti pcDNA/d24HANHE3_S554A, provela sam slijedeću mutaciju u kojoj sam točkastom mutacijom aminokiselinu Ser562 mutirala u aminokiselinu Ala562 (Tablica 10.).

Tablica 10. Mutante konstruirane uzastopnim točkastim mutacijama potencijalnih CaMK-II fosforilacijskih mjesta. Legenda: Plazmidni predložak – pcDNA korištena u ciklusu; Mutacija – izmjena potencijalnog fosforilacijskog mjesta iz Ser u Ala; Produkt točkaste mutacije – očekivane mutante koje treba potvrditi sekvenciranjem; S- serin, A – alanin.

	Plazmidni predložak	**Mutacija**	**Produkt točkaste mutacije**
1.	pcDNA/d24HANHE3	S554A	pcDNA/d24HANHE3_S554A
2.	pcDNA/d24HANHE3_S554A	S562A	pcDNA/d24HANHE3_S554A_S562A

4.3.2. Transformacija kompetentnih stanica mutiranom DNA

Produkti točkastih mutacija, mutirani plazmidi pcDNA/d24HANHE3_S554A i pcDNA/d24HANHE3_S554A_S562A, su korišteni za transformaciju kompetentnih bakterijskih stanica. Transformacija je provođena na način opisan u poglavlju 4.2.2. Ukratko, 30 µl kompetentnih bakterijskih stanica sam transformirala s 1,5 - 5 µl reakcijske smjese koja sadrži mutantu. Na krute podloge LB/Amp nasadila sam 150 µl transformiranih bakterijskih stanica. Nakon inkubacije na 37 °C, ovisno o transformaciji, na podlozi je znalo narasti između dvadesetak i stotinjak kolonija. Nasumičnim odabirom odabrala sam 3-6 bakterijskih kolonija koje sam nasadila u tekući medij LB/Amp i inkubirala preko noći na 37 °C. Nakon inkubacije bakterije sam taloženjem izolirala iz tekućeg medija LB/Amp. Minipreparacijom sam iz bakterija izolirala mutiranu plazmidnu DNA. Nakon

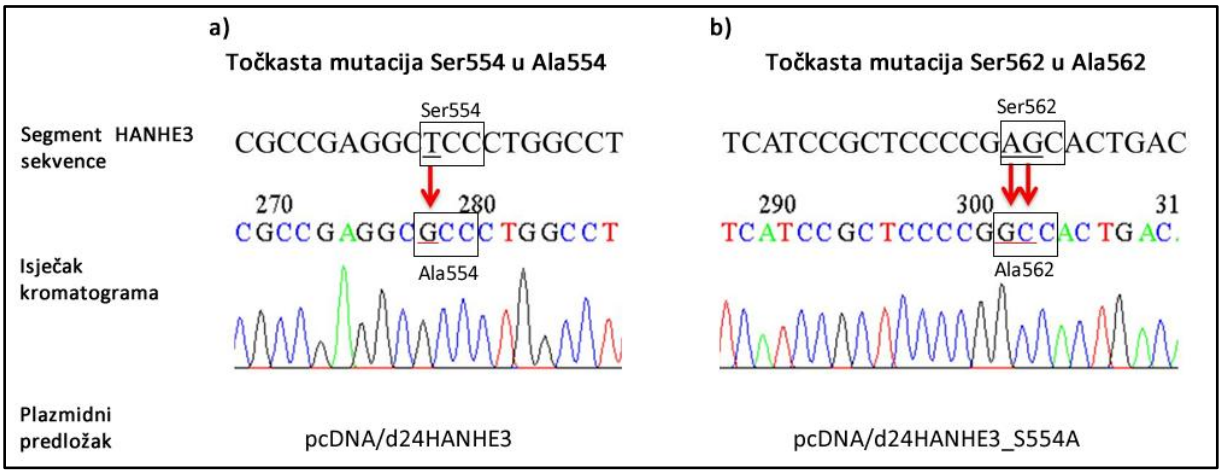
određivanja koncentracije izolirane plazmidne DNA uzorke sam pripremila za sekvenciranje prema uputama kompanije i zatim poslala na sekvenciranje.

Prvi mutirani plazmid, pcDNA/d24HANHE3_S554A, u kojem je mutacija potvrđena sekvenciranjem korišten je kao predložak za drugu mutaciju u kojoj je aminokiselina Ser562 mutirana u aminokiselinu Ala562.

4.3.3. Analiza i potvrđivanje provedenih mutacija sekvenciranjem

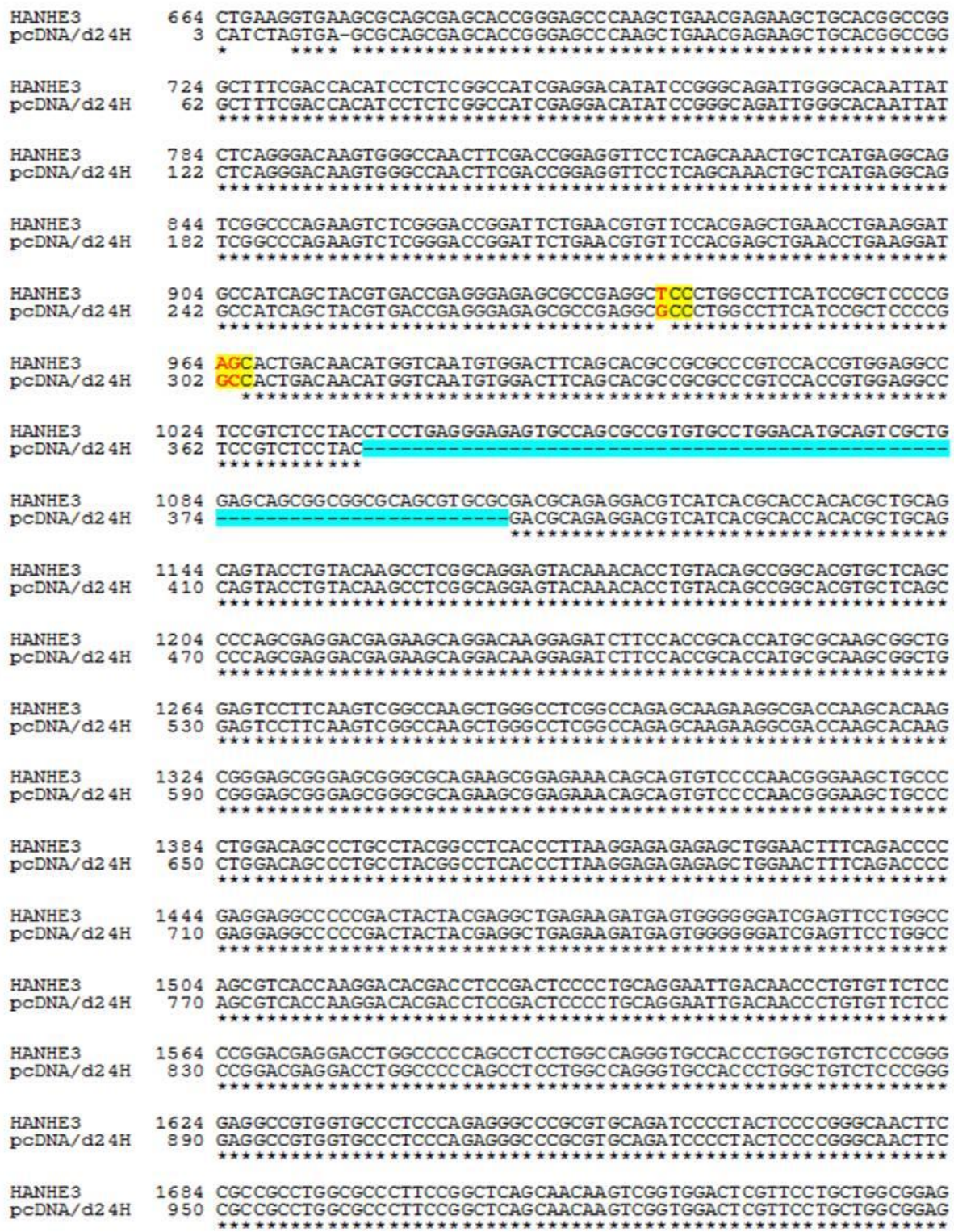
Na Slici 20. su prikazani isječci kromatograma koji potvrđuju da su provedene točkaste mutacije aminokiselina Ser554 i Ser562 bile uspješne. Mutacija na Slici 20.a. prikazuje kako je nukleinska baza timin uspješno zamijenjena bazom gvanin (označeno crvenom strelicom) čime je triplet nukleinskih baza (TCC) koji kodira aminokiselinu Ser554 zamijenjen tripletom baza (GCC) koji kodira aminokiselinu Ala554.

Mutacija na Slici 20.b. prikazuje kako su nukleinske baze adenin i gvanin uspješno zamijenjene bazama gvanin i citozin (označeno crvenim strelicama) čime je triplet nukleinskih baza (AGC) koji kodira aminokiselinu Ser562 zamijenjen tripletom baza (GCC) koji kodira aminokiselinu Ala562.



Slika 20. *Isječak iz kromatograma kojim se potvrđuje prisutnost mutacije S554A i mutacije S562A konstruiranim na plazmidnim predlošcima: a) pcDNA/d24HANHE3 i b) pcDNA/d24HANHE3_S554A. Crvene strelice u isječku prikazuju izmijenjene nukleinske kiseline u: a) kodonu (TCC) koji kodira Ser554 i b) kodonu (AGC) koji kodira Ser562. Nukleinske kiseline koje se mijenjaju podvučene su crnom crtom, dok su uspješno provedene njihove mutacije podvučene crvenom crtom. Mutacijom nastaje: a) kodon koji kodira Ala554 i b) kodon koji kodira Ala562.*

Novostvorena mutanta pcDNA/TM2-d24HANHE3 posjeduje mutacije dva potencijalna CaMK-II fosforilacijska mjesta i deleciju veznog mjesta za istu kinazu (Slika 21.).



Slika 21. *Usporedba isječaka nativne HANHE3 sekvence i mutante pcDNA/TM2-d24HANHE3. Originalna sekvenca se nalazi u redovima označenim s HANHE3, a sekvenca mutante je u redovima označenim pcDNA/d24H, zvjezdice označavaju podudaranje sekvenci. Plavom bojom je označen slijed od 72 baze koje su ranije uklonjene iz mutante. Uklonjeni slijed baza kodira 24 aminokiseline, od Leu586 do Arg609. Žutom bojom su označene aminokiseline Ser554 i Ser562. Baze označene crvenom bojom su nositelji mutacija. Promjena timina u gvanin u kodonu koji kodira Ser554 uzrokuje njegovu mutaciju u Ala554. Promjena adenina i gvanina u gvanin i citozin u kodonu koji kodira Ser562 uzrokuje njegovu mutaciju u Ala562.*

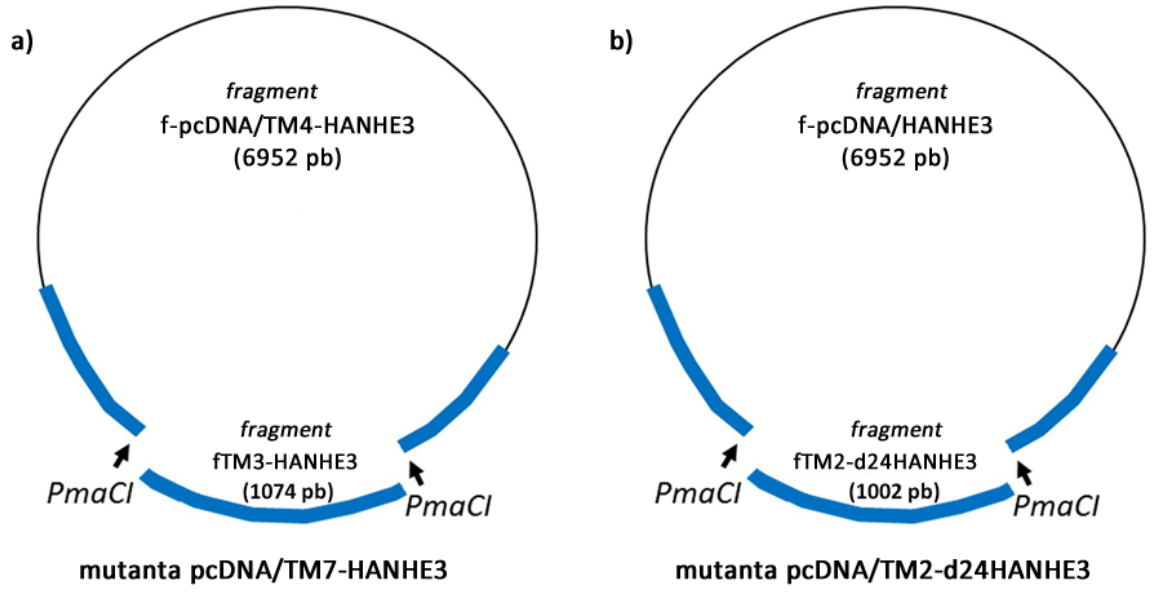
4.3.4. Potpuna restrikcija vektora pcDNA/TM2-d24HANHE3 i pcDNA/TM7-HANHE3 i njihovo pripravljanje za konstruiranje ekspresijskog vektora pcDNA/TM6-d24HANHE3

Restrikcijski enzim *PmaC*I ne djeluje na vektor pcDNA 3.1.(+), dok sekvencu *NHE3* reže na dva mjesta: na His280 i His638. Potpunom restrikcijom vektora pcDNA/TM7-HANHE3 i pcDNA/TM2-d24HANHE3 pomoću *PmaC*I, nastaju iz svakog vektora dva fragmenta jedan duži i drugi kraći. Povezivanjem dužeg fragmenta ekspresijskog vektora pcDNA/TM7-HANHE3 s kraćim fragmentom vektora pcDNA/TM2-d24HANHE3 konstruirala sam novi ekspresijski vektor pcDNA/TM6-d24HANHE3.

Potpunom digestijom mutiranog ekspresijskog vektora pcDNA/TM7-HANHE3 pomoću restrikcijskog enzima *PmaC*I nastaju dva fragmenta; jedan, dug 1074 parova baza (fragment fTM3-HANHE3) i drugi fragment dug 6952 parova baza (fragment f-pcDNA/TM4-HANHE3) koji odgovara veličini ostatka plazmida (Slika 22.a).

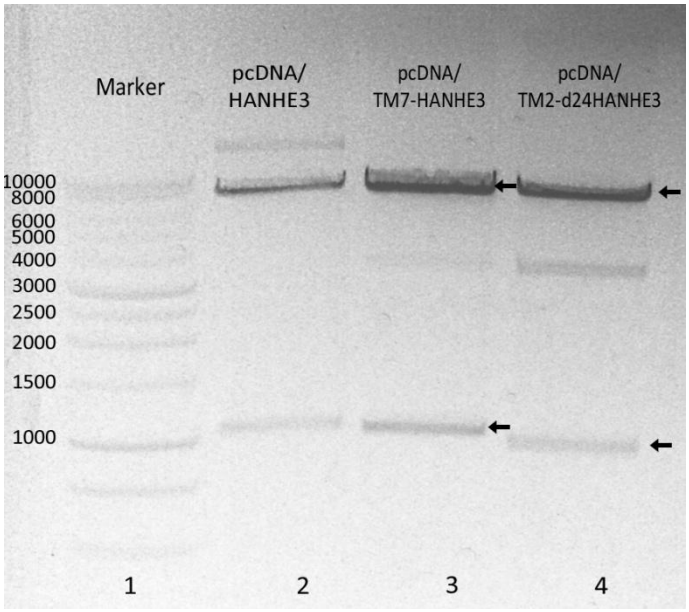
Djelovanjem *PmaC*I na mutirani vektor pcDNA/TM2-d24HANHE3 također nastaju dva fragmenta: jedan dug 1002 pb (fragment fTM2-d24HANHE3) i drugi fragment dug 6952 pb koji odgovara veličini preostalog dijela plazmida (fragment f-pcDNA/HANHE3) (Slika 22.b).

Postoji razlika u dužini kraćeg fragmenta između dvaju mutanti. Fragment fTM2-d24HANHE3 koji nastaje iz mutante pcDNA/TM2-d24HANHE3 je kraći za 72 pb što odgovara broju od 24 aminokiseline koje su ranije iz mutante uklonjene delecijom.



Slika 22. *Shematski prikaz digestije pcDNA/TM7-HANHE3 i pcDNA/TM2-d24HANHE3 restrikcijskim enzimom PmaCI. a) digestijom pcDNA/TM7-HANHE3 nastaju dva fragmenta: fTM3-HANHE3 dug 1074 pb i f-pcDNA/TM4-HANHE3 dug 6952 pb, b) digestijom pcDNA/TM2-d24HANHE3 također nastaju dva fragmenta: f-pcDNA/HANHE3 dug 6952 pb i drugi fTM2-d24HANHE3 dug 1074 pb*.

Nastali fragmenti su od ostatka mutiranog plazmida razdvojeni elektroforezom u 1% agaroznom gelu. Na gelu su detektirani kraći fragmenti veličine približno 1.0 kb koji odgovara fragmentu fTM2-d24HANHE3 (linija 4) i približno 1.1 kb koji odgovara veličini fragmenta fTM2-HANHE3 (linija 3). U svim linijama nalaze se duži fragmenti veličine oko 7 kb koji odgovaraju veličini ostatka mutiranih plazmida. U drugoj liniji kao kontrola je korišten pcDNA/HANHE3. Očekivano, fragmenti dobiveni potpunom restrikcijom pcDNA/HANHE3 iste su veličine kao i fragmenti nastali potpunom digestijom ekspresijskog vektora pcDNA/TM7-HANHE3 (Slika 23.).



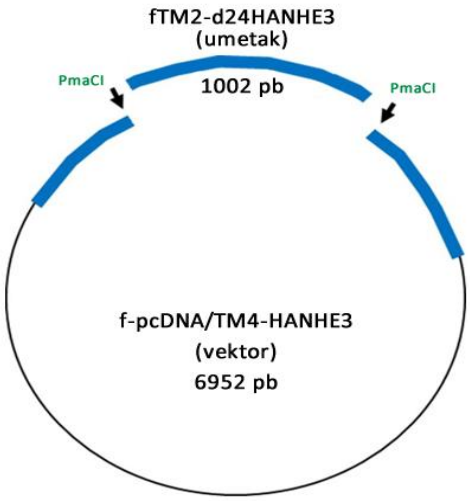
Slika 23. *Detekcija fragmenata nastalih potpunom restrikcijom vektora pcDNA/TM7-HANHE3 i pcDNA/TM2-d24HANHE3 pomoću restrikcijskog enzima PmaCI. Svi su uzorci tretirani enzimom PmaCI. U svim uzorcima mogu se vidjeti dva fragmenta: jedan kraći, dug oko 1 kb (označen donjom strelicom) koji odgovara izrezanom fragmentu i drugi duži, dug približno 7 kb (označen gornjom strelicom) koji odgovara ostatku plazmida. U prvoj se liniji nalazi marker (1 kb DNA ladder). Kao kontrola korišten je plazmid pcDNA/HANHE3 (2. linija). U preostale dvije linije vide se fragmenti nastali iz pcDNA/TM7-HANHE3 (linija 3) i fragmenti nastali iz pcDNA/TM2-d24HANHE3 (linija 4).*

Razdvojeni fragmenti su iz agaroznog gela izolirani pomoću NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kompleta koji je dio In-Fusion® kompleta za mutacije. Iz ekspresijskog vektora pcDNA/TM7-HANHE3 su izolirani fragment f-pcDNA/TM4-HANHE3 i fragment fTM3-HANHE3, dok su iz vektora pcDNA/TM2-d24HANHE3 izolirani fragment fTM2-d24HANHE3 i fragment f-pcDNA/HANHE3. Izolirani fTM2-d24HANHE3 sam nazvala umetak, a f-pcDNA/TM4-HANHE3 sam nazvala vektor. Umetak i vektor su dalje korišteni za konstruiranje mutante pcDNA/TM6-d24HANHE3.

Koncentracija umetka fTM2-d24HANHE3 je iznosila 25 ng/µl, a vektora f-pcDNA/TM4-HANHE3 iznosila je 130 ng/ µl.

4.3.5. Konstruiranje pcDNA/TM6-d24HANHE3 ugradnjom *umetka* fTM2-d24HANHE3 u *vektor* f-pcDNA/TM4-HANHE3

Za konstruiranje pcDNA/TM6-d24HANHE3 korišteni su vektor f-pcDNA/TM4-HANHE3 i umetak fTM2-d24HANHE3. Postupkom ligacije se umetak, izoliran iz pcDNA/TM2-d24HANHE3, ugrađuje u vektor, izoliran iz ekspresijskog vektora pcDNA/TM7-HANHE3 (Slika 24.).

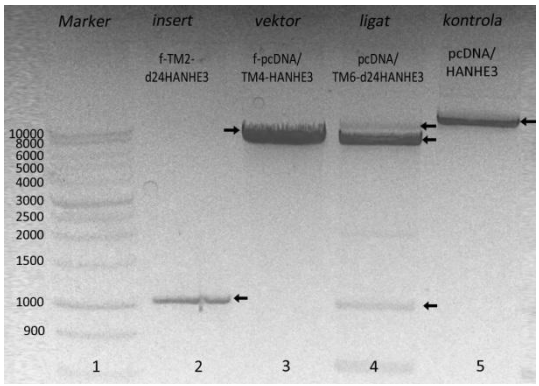


Slika 24. *Shematski prikaz konstrukcije ekspresijskog vektora pcDNA/TM6-d24HANHE3 ugradnjom umetka fTM2-d24HANHE3 u vektor f-pcDNA/TM4-HANHE3.*

Budući da digestija restrikcijskim enzimom *PmaC*I ostavlja tupe krajeve unutar vektora i umetka, izolirani vektor f-pcDNA/TM4-HANHE3 sam podvrgnula reakciji s enzimom *SAP* koji uklanja fosfatne skupine na krajevima vektora i tako sprječava samostalnu recirkulaciju vektora. Ugradnju umetka fTM2-d24HANHE3 u vektor f-pcDNA/TM4-HANHE3 provela sam pomoću ligacijske reakcije u omjeru 4:1 prema formuli:

$$\text{masa umetka (g)} = \text{željeni molarni omjer } \left(\frac{\text{umetak}}{\text{vektor}}\right) \times \text{masa vektora(g)} \times \text{omjer dužina pb } \left(\frac{\text{umetak}}{\text{vektor}}\right)$$

Rezultati ligacijske reakcije kojom se stvara ekspresijski vektor pcDNA/TM6-d24HANHE3 su detektirani elektroforezom u 1%-tnom agaroznom gelu. Na gelu su vidljivi fragmenti približne veličine oko 8 kb koji odgovaraju veličini ekspresijskog vektora pcDNA/TM6-d24HANHE3 (Slika 25.).



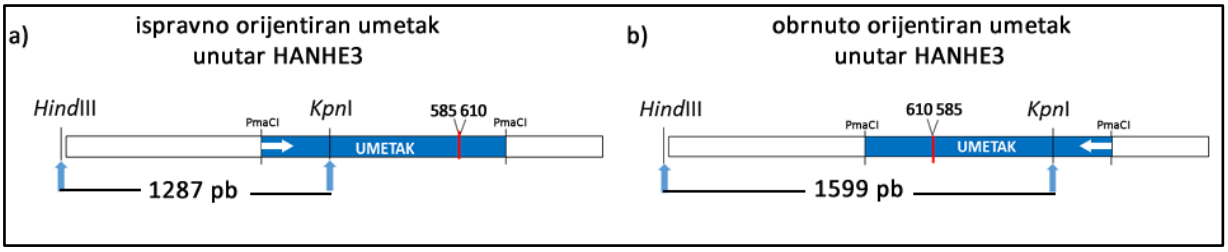
Slika 25. *Detekcija ligata pcDNA/TM6-d24HANHE3 konstruiranog ugradnjom umetka fTM2-d24HANHE3 (strelica u liniji 2) u vektor f-pcDNA/TM4-HANHE3 (strelica u liniji 3). Gornjom strelicom u liniji 4 je označen uspješno konstruiran ligat pcDNA/TM6-d24HANHE3, strelica ispod označava vektor preostao u ligacijskoj smjesi, a najdonja strelica prikazuje umetak zaostao u ligacijskoj smjesi. Kontrola pcDNA/HANHE3 se nalazi u liniji 5. Marker (1 kb DNA ladder) se nalazi u liniji 1.*

Ligacijska smjesa je korištena za transformaciju kompetentnih Stellar bakterijskih stanica. Transformirane stanice su nasađene na krutu podlogu LB/Amp i inkubirane preko noći na 37 °C. Velik broj naraslih kolonija na podlozi je pokazao da je transformacija kompetentnih stanica bila uspješna.

4.3.6. Analiza plazmida pcDNA/TM6-d24HANHE3 i provjera orijentacije umetka restrikcijskom digestijom

Za umnožavanje i izolaciju ekspresijskog vektora pcDNA/TM6-d24HANHE3 nasumično sam odabrala osam kolonija koje su preko noći na 37°C umnožene u tekućem mediju LB/Amp. Iz bakterija je minipreparacijom izoliran mutirani ekspresijski vektor pcDNA/TM6-d24HANHE3.

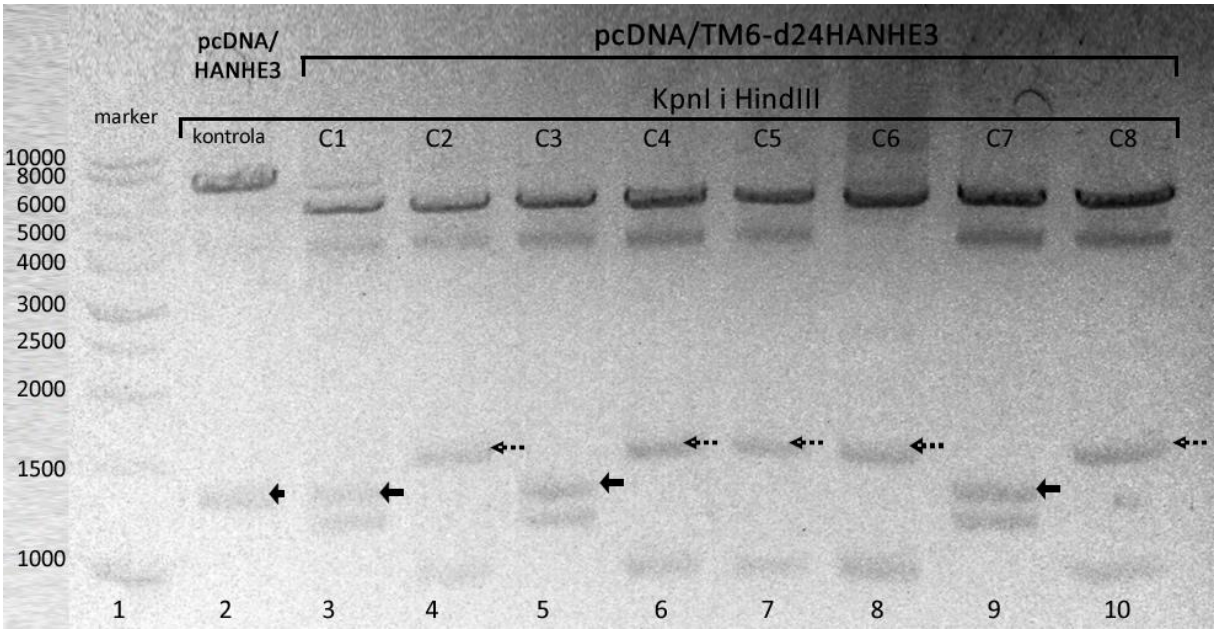
Zbog tupih krajeva umetak fTM2-d24HANHE3 se mogao u vektor f-pcDNA/TM4-HANHE3 ugraditi na dva načina: ispravno ili obrnuto orijentiran (Slika 26.).



Slika 26. *Shematski prikaz dvaju mogućih orijentacija ugradnje umetka u vektor. a) ispravna orijentacija ugrađenog umetka u vektor i b) obrnuta orijentacija ugrađenog umetka u vektor. Na vektoru i umetku su pokazana restrikcijska mjesta koja režu restrikcijski enzimi HindIII i KpnI. Djelovanjem restrikcijskih enzima nastaju fragmenti različitih veličina. Kod ispravno orijentiranog umetka fragment je dug 1287 pb, a kod obrnuto orijentiranog umetka fragment je dug 1599 pb.*

Kako bih provjerila da prilikom ugradnje nije došlo do pogrešne orijentacije umetka fTM2-d24HANHE3 u vektoru f-pcDNA/TM4-HANHE3, testirala sam orijentaciju umetka restrikcijskim enzimima *Hind*III i *Kpn*I koji mutirani ekspresijski vektor pcDNA/TM6-d24HANHE3 režu samo na jednom restrikcijskom mjestu. Restrikcijsko mjesto za *Hind*III nalazi se u vektoru, dok se restrikcijsko mjesto za *Kpn*I nalazi u početnom dijelu umetka. Ovisno o orijentaciji umetka djelovanjem ovih restrikcijskih enzima nastaju fragmenti različitih veličina. Ukoliko je umetak u vektoru ispravno orijentiran tada će restrikcijski enzimi *Hind*III i *Kpn*I izrezati fragment dug 1287 pb, dok će u mutiranih plazmida sa obrnuto orijentiranim umetkom izrezati fragment dug 1599 pb.

Orijentacija umetka je ispitivana na ekspresijskim vektorima pcDNA/TM6-d24HANHE3 izoliranih iz osam nasumično odabranih kolonija. Plazmide sam rezala pomoću restrikcijskih enzima *Hind*III i *Kpn*I (Slika 27.). Elektroforezom u 1%-tnom agaroznom gelu razdvojeni su izrezani fragmenti od preostalog dijela ekspresijskog vektora. Na gelu su detektirani fragmenti iz svih osam kolonija. Fragmenti veličine od oko 1287 pb (označeni strelicama), koji nastaju ukoliko je umetak ispravno orijentiran u plazmidu, detektirani su u linijama 3, 5 i 9. U ostalih pet linija fragmenti su veliki približno 1599 pb (označeni isprekidanim strelicama) što ukazuje da je u tim plazmidima umetak obrnuto orijentiran. Kao kontrolu koristila sam pcDNA/HANHE3. Djelovanjem restrikcijskih enzima *Hind*III i *Kpn*I nastaje fragment dug oko 1287 pb.



Slika 27. *Restrikcijska analiza orijentacije ugrađenog umetka u ekspresijskom vektoru pcDNA/TM6-d24-HANHE3. Svi su uzorci tretirani restrikcijskim enzimima HindIII i KpnI čijim djelovanjem nastaju fragmenti različitih veličina što ovisi o orijentaciji umetka u plazmidu. Kod ispravno orijentiranog umetka fragment je dug 1287 pb, a kod obrnuto orijentiranog umetka fragment je dug 1599 pb. U linijama 3 (kolonija C1), 5 (kolonija C3) i 9 (kolonija C7) vidljivi su isječci DNA veličine oko 1287 pb (označeni strelicama). U liniji 2, koja sadrži kontrolni vektor s nemutiranim HANHE3, detektiran je isječak DNA velik približno 1266 pb (označen crnom strelicom). U ostalim linijama isječci DNA su veliki približno 1599 pb (označeni su isprekidanim stralicama). U prvoj liniji nalazi se marker (1 kb DNA ladder).*

4.3.7. Analiza ekspresijskog vektora pcDNA/TM6-d24HANHE3 sekvenciranjem

Ekspresijski vektor pcDNA/TM6-d24HANHE3 izoliran iz bakterijske kolonije C1 poslala sam na sekvenciranje cjelokupne sekvence kako bi se potvrdila prisutnost šest potencijalnih CaMK-II fosforilacijskih mjesta, delecija 72 para baza koje kodiraju 24 aminokiseline (vezno mjesto za CaMK-II kinazu), pravilna orijentacija umetka fTM2-d24HANHE3 i isključile slučajne nespecifične mutacije. Za sekvenciranje sam odabrala četiri početnice: početnicu T7 čije se vezno mjesto nalazi neposredno prije početka sekvence NHE3; početnicu sp820_FW, sp1351_FW i početnicu sp1834_FW.

Sekvenciranje je potvrdilo da u konstruiranom vektoru pcDNA/TM6-d24HANHE3 nema slučajnih mutacija, da posjeduje mutacije svih šest potencijalnih CaMK-II fosforilacijskih mjesta, da je umetak pravilno orijentiran i da u njemu nema 72 pb koje odgovaraju segmentu uklonjenom delecijom 24 aminokiseline (Slika 28.).

```
HANHE3          1 ATGTCAGGGCGCGGGGGCTGCGGCCCTTGCTGGGGGTTGCTGCTGGCGCTGGTGCTGGCG
TM6-d24HAN     28 ATGTCAGGGCGCGGGGGCTGCGGCCCTTGCTGGGGGTTGCTGCTGGCGCTGGTGCTGGCG
                  ************************************************************

HANHE3         61 CTGGGCGCGCTGCCCTGGACGCAGGGCGCCGAGCAGGAGCATCACGATGAGGGTTACCCC
TM6-d24HAN     88 CTGGGCGCGCTGCCCTGGACGCAGGGCGCCGAGCAGGAGCATCACGATGAGGGTTACCCC
                  ************************************************************

HANHE3        121 TACGACGTCCCCGACTACGCTGGTTACCCCTACGACGTCCCCGACTACGCTGGATCCTAC
TM6-d24HAN    148 TACGACGTCCCCGACTACGCTGGTTACCCCTACGACGTCCCCGACTACGCTGGATCCTAC
                  ************************************************************

HANHE3        181 CCCTACGACGTCCCCGACTACGCTGGACGCGTGATCCAGGGCTTCCAGATAGTCACGTTC
TM6-d24HAN    208 CCCTACGACGTCCCCGACTACGCTGGACGCGTGATCCAGGGCTTCCAGATAGTCACGTTC
                  ***********************************************************

HANHE3        241 AAATGGCACCACGTCCAGGACCCCTACATCATCGCGCTCTGGGTCCTCGTGGCCAGCTTG
TM6-d24HAN    268 AAATGGCACCACGTCCAGGACCCCTACATCATCGCGCTCTGGGTCCTCGTGGCCAGCTTG
                  ************************************************************

HANHE3        301 GCTAAGATCGTCTTCCACCTGTCCCACAAAGTCACCAGTGTCGTCCCCGAGAGCGCGCTG
TM6-d24HAN    328 GCTAAGATCGTCTTCCACCTGTCCCACAAAGTCACCAGTGTCGTCCCCGAGAGCGCGCTG
                  ************************************************************

HANHE3        361 CTCATCGTGCTAGGCCTGGTGCTAGGCGGCATCGTCCTGGCCGCTGACCACATCGCCTCC
TM6-d24HAN    388 CTCATCGTGCTAGGCCTGGTGCTAGGCGGCATCGTCCTGGCCGCTGACCACATCGCCTCC
                  ************************************************************

HANHE3        421 TTCACGCTCACGCCCACCGTCTTCTTCTTCTACCTGCTGCCGCCCATCGTGCTGGACGCC
TM6-d24HAN    448 TTCACGCTCACGCCCACCGTCTTCTTCTTCTACCTGCTGCCGCCCATCGTGCTGGACGCC
                  ************************************************************

HANHE3        481 GGCTACTTCATGCCCAACCGGCTCTTCTTCAGCAACCTGGGCAGCATCCTGCTCTACGCC
TM6-d24HAN    508 GGCTACTTCATGCCCAACCGGCTCTTCTTCAGCAACCTGGGCAGCATCCTGCTCTACGCC
                  ************************************************************

HANHE3        541 GTCGTGGGCACCGTGTGGAACGCGGCCACCACCGGGCTGTCGCTCTACGGAGTCTTCCTC
TM6-d24HAN    568 GTCGTGGGCACCGTGTGGAACGCGGCCACCACCGGGCTGTCGCTCTACGGAGTCTTCCTC
                  ************************************************************

HANHE3        601 AGCGGCATCATGGGCGAACTGAAGATCGGCCTCCTGGACTTCCTGCTGTTCGGCAGCCTC
TM6-d24HAN    628 AGCGGCATCATGGGCGAACTGAAGATCGGCCTCCTGGACTTCCTGCTGTTCGGCAGCCTC
                  ************************************************************
```

```
HANHE3       558 ATTGCTGCCGTGGACCCCGTGGCCGTGCTGGCCGTGTTCGAGGAGGTCCACGTCAACGAG
TM6-d24HAN   688 ATTGCTGCCGTGGACCCCGTGGCCGTGCTGGCCGTGTTCGAGGAGGTCCACGTCAACGAG
                 ************************************************************

HANHE3       618 GTTCTGTTCATCATCGTTTTCGGGGAGTCGCTGCTAAACGACGCCGTCACGGTGGTGCTG
TM6-d24HAN   748 GTTCTGTTCATCATCGTTTTCGGGGAGTCGCTGCTAAACGACGCCGTCACGGTGGTGCTG
                 ************************************************************

HANHE3       678 TACAACGTGTTCCAATCTTTCGTGACACTGGGTGGTGACAAGGTGACAGGCGTGGACTGT
TM6-d24HAN   808 TACAACGTGTTCCAATCTTTCGTGACACTGGGTGGTGACAAGGTGACAGGCGTGGACTGT
                 ************************************************************

HANHE3       738 GTGAAGGGCATAGTGTCCTTCTTCGTGGTGAGCCTGGGGGGCACGCTGGGTGGGGGGTGG
TM6-d24HAN   868 GTGAAGGGCATAGTGTCCTTCTTCGTGGTGAGCCTGGGGGGCACGCTGGGTGGGGGGTGG
                 ************************************************************

HANHE3       796 TCTTCGCCTTCCTGCTGTCGCTGGTGACGCGCTTCACCAAGCAC
TM6-d24HAN   928 TCTTCGCCTTCCTGCTGTCGCTGGTGACGCGCTTCACCAAGCAC
                 *********************************************

HANHE3       841 GTGCGCGTCATCGAGCCCGGCTTCGTCTTCATCATCTCCTACCTGAGCTACCTGACGTCCG
TM6-d24HAN   972 GTGCGCGTCATCGAGCCCGGCTTCGTCTTCATCATCTCCTACCTGAGCTACCTGACGTCCG
                 ************************************************************

HANHE3       902 AGATGCTGTCCCTGTCGTCCATCCTGGCTATCACCTTCTGCGGCATCTGCTGTCAGAAGT
TM6-d24HAN    59 AGATGCTGTCCCTGTCGTCCATCCTGGCTATCACCTTCTGCGGCATCTGCTGTCAGAAGT
                 ************************************************************

HANHE3       962 ATGTGAAAGCCAACATCTCGGAGCAGTCGGCCACCACGGTGCGCTACACCATGAAGATGC
TM6-d24HAN   119 ATGTGAAAGCCAACATCTCGGAGCAGTCGGCCACCACGGTGCGCTACACCATGAAGATGC
                 ************************************************************

HANHE3      1022 TGGCCAGCGGGGCTGAGACCATCATCTTCATGTTCCTGGGCATCTCGGCCGTGGACCCGC
TM6-d24HAN   179 TGGCCAGCGGGGCTGAGACCATCATCTTCATGTTCCTGGGCATCTCGGCCGTGGACCCGC
                 ************************************************************

HANHE3      1082 TCATCTGGACCTGGAACACGGCCTTCGTGCTGCTCACGCTGCTCTTCGTGTCCGTGTTCC
TM6-d24HAN   239 TCATCTGGACCTGGAACACGGCCTTCGTGCTGCTCACGCTGCTCTTCGTGTCCGTGTTCC
                 ************************************************************

HANHE3      1142 GGGCCATCGGTGTCGTGCTGCAGACCTGGCTGCTGAACCGGTACCGCATGGTGCAGCTGG
TM6-d24HAN   299 GGGCCATCGGTGTCGTGCTGCAGACCTGGCTGCTGAACCGGTACCGCATGGTGCAGCTGG
                 ************************************************************

HANHE3      1202 AGCTGATCGACCAGGTGGTCATGTCCTACGGCGGCCTGCGCGGGGCCGTGGCCTTCGCCC
TM6-d24HAN   359 AGCTGATCGACCAGGTGGTCATGTCCTACGGCGGCCTGCGCGGGGCCGTGGCCTTCGCCC
                 ************************************************************

HANHE3      1262 TGGTCGCGCTGCTGGACGGGAACAAGGTCAAGGAGAAGAACTTGTTCGTCAGCACCACCA
TM6-d24HAN   419 TGGTCGCGCTGCTGGACGGGAACAAGGTCAAGGAGAAGAACTTGTTCGTCAGCACCACCA
                 ************************************************************

HANHE3      1322 TCATCGTCGTCTTCTTCACCGTCATCTTCCAGGGCCTGACCATCAAGCCGCTGGTGCAGT
TM6-d24HAN   479 TCATCGTCGTCTTCTTCACCGTCATCTTCCAGGGCCTGACCATCAAGCCGCTGGTGCAGT
                 ************************************************************

HANHE3      1382 GGCTGAAGGTGAAGCGCAGCGAGCACCGGGAGCCCAAGCTGAACGAGAAGCTGCACGGCC
TM6-d24HAN   539 GGCTGAAGGTGAAGCGCAGCGAGCACCGGGAGCCCAAGCTGAACGAGAAGCTGCACGGCC
                 ************************************************************

HANHE3      1442 GGGCTTTCGACCACATCCTCTCGGCCATCGAGGACATATCCGGGCAGATTGGGCACAATT
TM6-d24HAN   599 GGGCTTTCGACCACATCCTCTCGGCCATCGAGGACATATCCGGGCAGATTGGGCACAATT
                 ************************************************************

HANHE3      1502 ATCTCAGGGACAAGTGGGCCAACTTCGACCGGAGGTTCCTCAGCAAACTG
TM6-d24HAN   120 ATCTCAGGGACAAGTGGGCCAACTTCGACCGGAGGTTCCTCAGCAAACTG
                 ***************************************************
```



Slika 28. *Usporedba sekvenci HANHE3 i mutante pcDNA/TM6-d24HANHE3.Originalna sekvenca označena je s HANHE3 na početku reda, a sekvenca mutante pcDNA/TM6-d24HANHE3 označena je s TM6-d24HAN u odgovarajućim redovima. Zelenom bojom je označen marker sastavljen od trostruke sekvence HA epitopa koji je u NHE3 kloniran između Glu37 i Ile38. Plavom bojom je označeno CaMK-II vezno mjesto koje obuhvaća 72 para baza koje su ranije uklonjene iz mutante. Žutom bojom su označeni kodoni sastavljeni od tri nukleotida koji u nativnoj sekvenci kodiraju aminokiselinu Ser, a u mutanti kodiraju aminokiselinu Ala. Crvenom bojom su označeni nukleotidi koji su u mutanti mutirani tako da mijenjaju Ser u Ala. Prikazana je cjelokupna sekvenca pcDNA/TM6-d24HANHE3 dobivena sekvenciranjem s četiri sekvencijske početnice.*

4.4. Transfekcija ekspresijskih vektora pcDNA/TM7-HANHE3 i pcDNA/TM6-d24HANHE3 u stanične linije fibroblasta PS120 i fibroblasta PS120 stabilno transfeciranih s NHERF2

Cilj ovog istraživanja bio je razviti nove stanične linije fibroblasta PS120 i fibroblasta PS120 stabilno transfeciranih s NHERF2 koje eksprimiraju mutirani protein NHE3 kako bi se one koristile u funkcionalnim studijama za ispitivanje kinetičke aktivnosti NHE3 posredovane djelovanjem CaMK-II. To sam postigla transfekcijama stanica fibroblasta PS120 i fibroblasta PS120/NHERF2 s ekspresijskim vektorima pcDNA/TM7-HANHE3 i pcDNA/TM6-d24HANHE3. Ispravnost ekspresijskih vektora korištenih u transfekciji potvrđena je analizom njihovih cjelokupnih sekvenci. Stanice PS120 bez i s proteinom NHERF2 transfecirane s pcDNA/HANHE3 su korištene kako bi se u budućim studijama mogla usporediti funkcija proteina HANHE3 između stanica koje su stabilno transfecirane s nemutiranim i mutiranim vektorima.

Plazmid pcDNA 3.1(+) u sebi ima gen *NeoR/KanR* koji nosi otpornost na antibiotik G418. Primjenom antibiotika G418 (400 μg/ml) selektiraju se stanice koje posjeduju uspješno transfecirane mutirane ekspresijske vektore pcDNA/TM7-HANHE3 i pcDNA/TM6-d24HANHE3 te nemutirani ekspresijski vektor pcDNA/HANHE3.

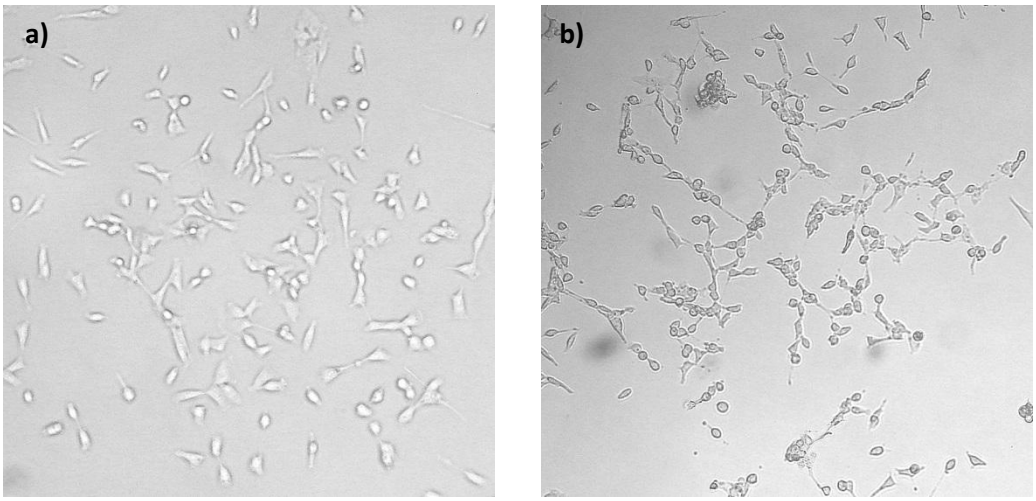
Transfecirani fibroblasti PS120 održavani su u selekcijskom mediju dva tjedna i prema potrebi presađivani kako bi se dobila kultura stanica koje imaju stabilnu ekspresiju mutiranog odnosno nemutiranog proteina HANHE3. Na taj način uspostavljene su stanične kulture. Većina stanica je preživjela selekciju antibiotikom G418 što je potvrdilo uspješnost provedenih transfekcija.

4.5. Zakiseljavanje transfeciranih staničnih linija fibroblasta PS120 i PS120/NHERF2

Nakon drugog presađivanja, kada su postigle konfluentnost od 70-80%, stanice sam zakiseljavala s ciljem selekcije stanica koje su posjedovale dobru ekspresiju funkcionalnog proteina HANHE3 na površini stanica.

Postupkom zakiseljavanja izlagala sam stanice visokoj koncentraciji H^+ što uzrokuje smanjenje unutarstaničnog pH. Samo stanice u kojima je došlo do ekspresije funkcionalnog proteina NHE3 na staničnoj membrani se mogu oporaviti. Kao kontrolu za uspješan postupak zakiseljavanja koristila sam PS120 fibroblaste koji nisu transfecirani s ekspresijskim vektorom pcDNA/HANHE3.

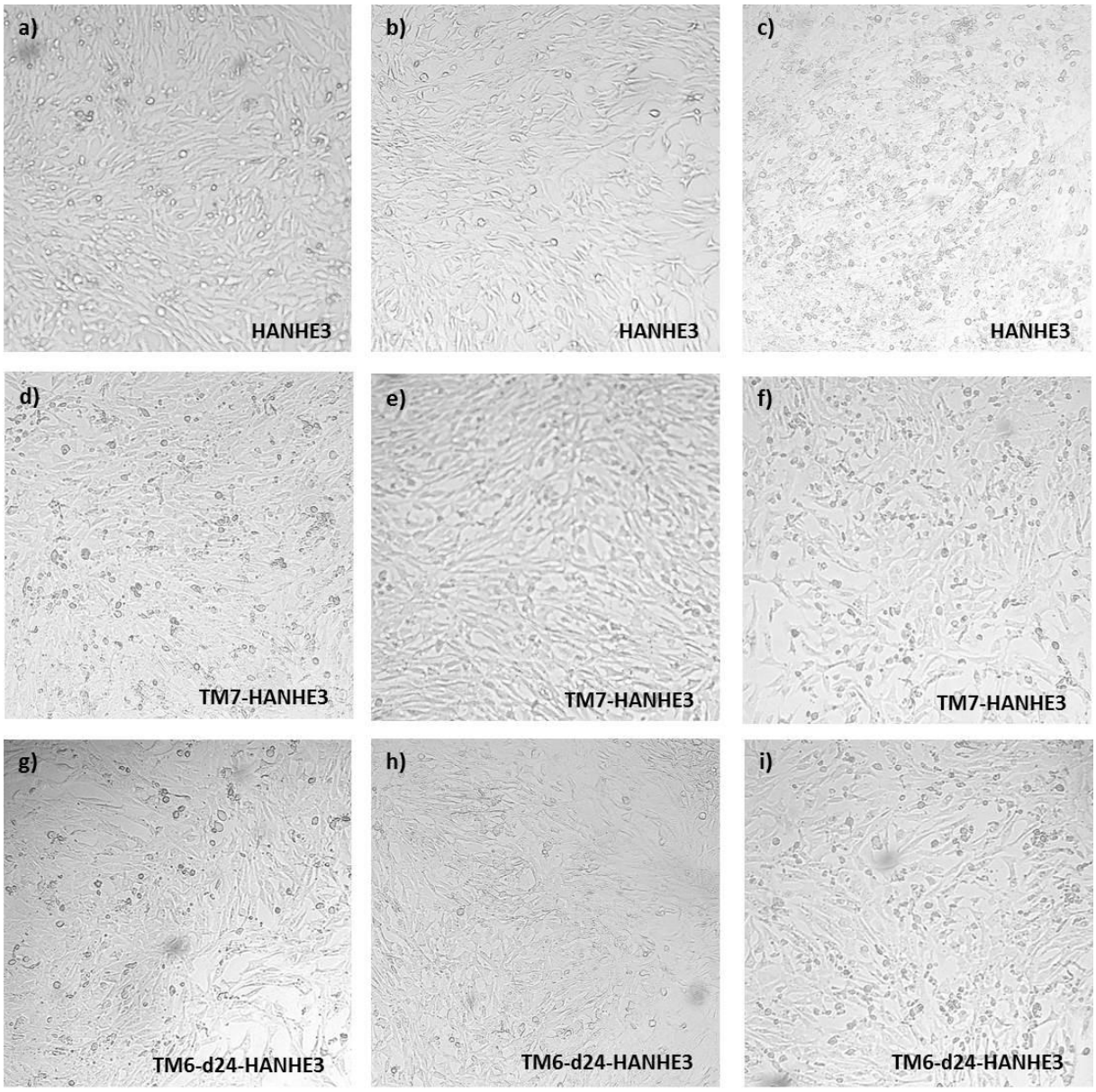
Stanice sam inkubirala sat vremena u otopini 40 mM NH_4Cl, te potom još sat vremena u otopini 2mM NaCl koju sam zatim zamijenila s hranjivim medijem PS120 uz dodatak 10 % FBS-a. Kontrolne stanice nisu preživjele postupak zakiseljavanja, što potvrđuje da u svojoj membrani nemaju proteinske izmjenjivače koji bi omogućili oporavak od visoke koncentracije H^+ kojoj su bile izložene (Slika 29.a i b).



Slika 29. *Stanice PS120 fibroblasta provedene kroz postupak zakiseljavanja. Stanice PS120: a) prije zakiseljavanja i b) nakon zakiseljavanja. Vidljiva je promjena izgleda stanica prije i nakon zakiseljavanja (povećanje 100x).*

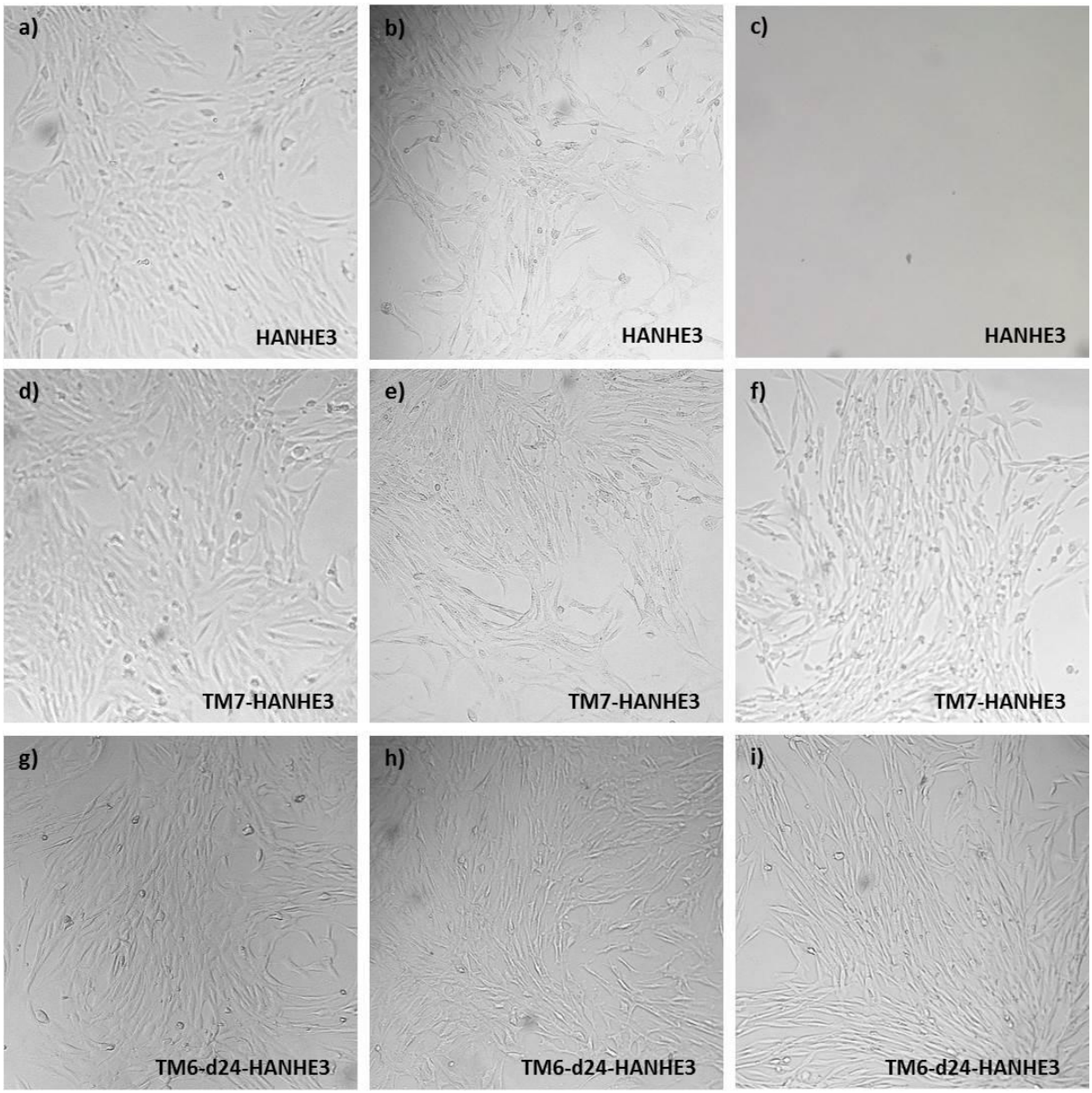
Fibroblaste PS120 i PS120/NHER2 transfecirane s pcDNA/TM7-HANHE3, pcDNA/TM6-d24HANHE3 i pcDNA/HANHE3 također sam izložila zakiseljavanju na način opisan u prethodnom odlomku. Razlika je u mediju koji se dodavao nakon postupka zakiseljavanja. Dok je kontrolnim stanicama dodavan samo hranjivi medij sa 10% FBS, stanicama PS120 transfeciranim s mutiranim HANHE3 u medij je dodavan i selekcijski antibiotik G418, dok su stanicama PS120/NHERF2 dodavani selekcijski antibiotici G418 i Zeocin.

Provela sam tri uzastopna zakiseljavanja triju staničnih linija fibroblasta PS120: transfeciranih s pcDNA/TM7-HANHE3, pcDNA/TM6-d24HANHE3 i pcDNA/HANHE3 kroz tjedan dana, svaka dva dana. Nakon prva dva zakiseljavanja opazila sam kako transfecirane stanice dobro preživljavaju tretman. Uočila sam neznatne razlike kod stanica s transfeciranim nativnim HANHE3 koje su imale slabije preživljavanje u usporedbi sa stanicama s mutiranim HANHE3. Nakon trećeg zakiseljavanja opazila sam da dolazi do nešto većeg odumiranja transfeciranih stanica (Slika 30. a-i). U konačnici nakon tri zakisljevanja približno polovica stanica je odumrla, međutim preživjele stanice su se uspješno oporavile i nastavile normalan rast.



Slika 30. *Stanice fibroblasta PS120 transfecirane s pcDNA/HANHE3 (a-c), pcDNA/TM7-HANHE3 (d-f), pcDNA/TM6-d24-HANHE3 (g-i) i provedene kroz postupak zakiseljavanja. a) fibroblasti s nemutiranim proteinom NHE3 prije zakiseljavanja, b) fibroblasti s nemutiranim proteinom HANHE3 neposredno nakon zakiseljavanja, c) fibroblasti s nemutiranim proteinom HANHE3 dan nakon trećeg zakiseljavanja, d) fibroblasti s proteinom HANHE3 koji na sebi ima mutacije sedam potencijalnih CaMK-II fosforilacijskih mjesta (TM7-HANHE3) prije zakiseljavanja, e) fibroblasti s proteinom TM7-HANHE3 neposredno nakon zakiseljavanja, f) fibroblasti s proteinom TM7-HANHE3 dan nakon zakiseljavanja, g) fibroblasti s proteinom HANHE3 koji na sebi ima mutacije šest potencijalnih CaMK-II fosforilacijskih mjesta i deleciju veznog mjesta za istu kinazu (TM6-d24-NHE3) prije zakiseljavanja, h) fibroblasti s proteinom TM6-d24-HANHE3 neposredno nakon zakiseljavanja, i) fibroblasti s proteinom TM6-d24-HANHE3 dan nakon zakiseljavanja (povećanje 100x).*

Provela sam i jedno zakiseljavanje stanica fibroblasta PS120/NHERF2 transfeciranih s pcDNA/TM7-HANHE3, pcDNA/TM6-d24-HANHE3 i pcDNA/HANHE3. Postupak zakiseljavanja uzrokovao je veliko odumiranje stanica, dok su se stanice transfecirane s pcDNA/HANHE3 u potpunosti odlijepile od podloge nakon postupka zakiseljavanja (Slika 31.c). Stanične linije transfecirane s mutiranim sekvencama *HANHE3* su se oporavile bez razlike u preživljavanju između staničnih linija (Slika 31. d-i).



Slika 31. *Stanice fibroblasta PS120 s regulatornim proteinom NHERF2 transfecirane s pcDNA/HANHE3 (a-c), pcDNA/TM7-HANHE3 (d-f), pcDNA/TM6-d24-HANHE3 (g-i) i provedene kroz postupak zakiseljavanja. a) fibroblasti s nemutiranim proteinom NHE3 prije zakiseljavanja, b) fibroblasti s nemutiranim proteinom HANHE3 neposredno nakon zakiseljavanja, c) fibroblasti s nemutiranim proteinom HANHE3 tjedan dana nakon zakiseljavanja, sve stanice su se odlijepile nakon zakiseljavanja, d) fibroblasti s proteinom HANHE3 koji na sebi ima mutacije sedam potencijalnih CaMK-II fosforilacijskih mjesta (TM7-HANHE3) prije zakiseljavanja, e) fibroblasti s proteinom TM7-HANHE3 neposredno nakon zakiseljavanja, f) fibroblasti s proteinom TM7-HANHE3 tjedan dana nakon zakiseljavanja, g) fibroblasti s proteinom HANHE3 koji na sebi ima mutacije šest potencijalnih CaMK-II fosforilacijskih mjesta i deleciju veznog mjesta za istu kinazu (TM6-d24-HANHE3) prije zakiseljavanja, h) fibroblasti s proteinom TM6-d24-HANHE3 neposredno nakon zakiseljavanja, i) fibroblasti s proteinom TM6-d24-HANHE3 tjedan dana nakon zakiseljavanja (povećanje 100x). Stanice transfecirane s nativnim proteinom HANHE3 (a,b,c)) se nisu oporavile od postupka zakiseljavanja, što je prikazano izostankom stanica na slici c).*

5. RASPRAVA

Ovaj diplomski rad je nastavak studije u kojoj je jasno pokazano kako CaMK-II sudjeluje u inhibiciji bazalne aktivnosti proteina NHE3 (Žižak i sur., 2012). Regulacijski učinak CaMK-II ostvaruje fosforilacijom NHE3, slično ostalim kinazama poput; PKA (Kocinsky i sur., 2007), cGKII (Cha i sur., 2005) i CK II (Sarker i sur., 2008) za koje je pokazano da reguliraju aktivnost NHE3. Dok jedne kinaze fosforilacijom stimuliraju aktivnost NHE3 pod bazalnim uvjetima, druge tu aktivnost inhibiraju te se na taj način postiže precizna regulacija aktivnosti NHE3. U studiji koju su proveli Žižak i sur. (2012) autori su nastojali pronaći mehanizam kojim CaMK-II regulira aktivnost NHE3. Primjenom inhibitora CaMK-II (KN62) opazili su kako dolazi do smanjenja razine fosforilacije NHE3 te povećanja njegove aktivnosti iz čega su zaključili da CaMK-II u bazalnim uvjetima fosforilira NHE3 i tako smanjuje njegovu aktivnost. U mnogim radovima pokazano je kako kinaze na NHE3 mogu djelovati neposredno ili posredno. Tako su Kocinsky i sur. (2007) pokazali kako PKA inhibira aktivnost NHE3 fosforilacijom aminokiselina Ser554 i Ser605, dok su Sarker i sur. (2008) pokazali kako CK II posredstvom fosforilacije Ser719 potiče aktivnost NHE3. S druge strane, pokazano je kako pojedine kinaze, poput cGKII, reguliraju NHE3 posredno preko pomoćnićkog proteina NHERF2 (Cha i sur., 2005).

Dvije su stvari zajedničke većini kinaza koje reguliraju aktivnost NHE3. Prva je fosforilacija kao osnovni mehanizam regulacije NHE3 uz koju mogu biti uključeni i neki drugi mehanizmi, poput promjene razine ekspresije NHE3 na površini stanica. Druga je stvaranje posredne ili neposredne veze između NHE3 i kinaza pod bazalnim uvjetima. Različite studije su pokazale kako u citoplazmatskoj domeni NHE3 postoji zajedničko vezno mjesto za većinu kinaza kao i nekih drugih proteina. Provođenjem delecijskih studija otkriveno je kako se u citoplazmatskoj domeni proteina NHE3 više različitih proteina veže na segment koji obuhvaća 21 aminokiselinu od Leu589 do Arg605. Isto je pokazano i za CaMK-II što otvara pitanje važnosti navedenog segmenta u regulaciji NHE3 te mogu li kinaze regulirati aktivnost NHE3 bez vezanja na navedeni segment.

Prema tome, nedavne studije regulacije aktivnosti NHE3 potaknule su traženje odgovora na nekoliko pitanja: 1.) je li vezno mjesto u citoplazmatskoj domeni preduvjet za djelovanje CaMK-II i drugih poznatih kinaza koje reguliraju NHE3, 2.) ovisi li bazalna aktivnost NHE3 o prisutnosti veznog segmenta, 3.) nalazi li se unutar potencijalnih CaMK-II fosforilacijskih mjesta i mjesto koje je uključeno u regulaciju NHE3, 4.) je li prisutnost veznog mjesta nužna za sudjelovanje regulacijskog proteina NHERF2 u inhibiciji aktivnosti NHE3 posredovanoj CaMK-II?

Kako bi se dobili odgovori na postavljena pitanja preduvjet je konstruiranje mutanti proteina NHE3 s mutacijama potencijalnih CaMK-II fosforilacijskih mjesta, kao i mutanti s mutacijama potencijalnih CaMK-II fosforilacijskih mjesta na proteinu NHE3 kojem je prethodno deletirano vezno mjesto za istu kinazu. Također, navedene mutante potrebno je ispitati u staničnom okruženje zbog čega se moraju razviti stanične linije fibroblasta PS120 stabilno transfecirane s mutiranim proteinom NHE3. Kako bi se ispitala uloga NHERF2 u CaMK-II posredovanoj regulaciji NHE3 potrebno je razviti i stanične linije bez i s proteinom NHERF2 u koje će se transfecirati konstruirane mutante.

5.1. Konstrukcija mutanti

Pri odabiru potencijalnih CaMK-II fosforilacijskih mjesta na proteinu NHE3 testirala sam nekoliko predikcijskih programa za određivanje fosforilacijskih mjesta koji su davali slične rezultate. U konačnici sam se odlučila za program otvorenog koda GPS 3.0 za koji se smatra da ima bolje razvijene algoritme koji daju manje lažno pozitivnih rezultata. Program je predvidio postojanje sedam potencijalnih fosforilacijskih mjesta u rasponu vjerojatnosti fosforilacije od 2,8 do 4,6, gdje veći broj predstavlja veću vjerojatnost da se potencijalno fosforilacijsko mjesto zaista i fosforilira. S tim u vidu, izuzela sam fosforilacijsko mjesto na aminokiselini Ser813 čija je teorijska vjerojatnost fosforilacije iznosila 2,8 što je neznatno više od programom dobivenog praga prihvatljive vjerojatnosti od 2,7. S druge strane, u ispitivanje sam uključila aminokiselinu Ser810 koja je u nekim predikcijskim programima predviđena kao potencijalno CaMK-II fosforilacijsko mjesto, a u ranijoj studiji su Žižak i sur. (2012) pokazali kako postoji vjerojatnost da je Ser810 uključen u regulaciju NHE3 posredovanu CaMK-II. Na osnovi programom dobivenih predikcija i studije Žižak i sur. (2012) u konstrukciji mutanti NHE3 mutirala sam aminokiseline Ser554, Ser562, Ser607, Ser663, Ser693, Ser694 i Ser810.

Mutirane sekvence gena *HANHE3* koje će se koristiti za transfekciju fibroblasta PS120 s i bez regulatornog proteina NHERF2 konstruirane su unošenjem točkastih mutacija potencijalnih CaMK-II fosforilacijskih mjesta metodom usmjerene mutageneze *in vitro* pomoću reakcija PCR. Ova metoda omogućava stvaranje specifičnih, točno određenih promjena u dvolančanoj plazmidnoj DNA (Laible i Boonrod, 2009). S obzirom da mi je cilj bio mutirati fosforilacijska mjesta na nativnoj i krnjoj sekvenci *HANHE3*, iz koje je prethodno uklonjeno vezno mjesto za CaMK-II, kao plazmidne predloške za stvaranje mutacija koristila sam pcDNA/HANHE3 i pcDNA/d24HANHE3. Mutacije sam unosila promjenom aminokiseline serin, potencijalnog fosforilacijskog mjesta, u alanin koji se ne može fosforilirati. Alanin je odabran i zbog malog utjecaja na sekundarnu strukturu proteina, a korišten je i u ranijim studijama koje su se bavile istraživanjem utjecaja fosforilacijskih mjesta na aktivnost proteina NHE3.

U pripremi za izradu mutacija dizajnirala sam odgovarajuće početnice tako da su njihove sekvence komplementarne predlošku osim u nukleotidima odabranog potencijalnog CaMK-II fosforilacijskog mjesta. Promjenom aminokiseline serin u alanin onemogućila sam vezanje fosfatnih skupina na potencijalno fosforilacijsko mjesto u procesu fosforilacije i time osigurala „deaktivaciju“ fosforilacijskog mjesta. Pri dizajniranju početnica pazila sam da budu dovoljno duge (~33 pb) kako bih izbjegla nespecifična vezanja na druga mjesta unutar sekvence, kao i da se ostvari bolje povezivanje početnica sa predloškom s obzirom da početnice sadrže izmjenu jednog ili dva nukleotida koji nose mutaciju serin u alanin. Izmijenjene nukleotide sam postavljala u središnji dio početnica kako bi se ostvarila što bolja povezanost početnica i predloška.

5.2. Konstrukcija ekspresijskog vektora pcDNA/TM7-HANHE3

Konstrukciju ekspresijskog vektora pcDNA/TM7-HANHE3, koji ima mutacije svih sedam potencijalnih CaMK-II fosforilacijskih mjesta, započela sam stvaranjem uzastopnih mutacija na nativnoj sekvenci gena za protein NHE3 s trostrukim epitopom HA. Mutacije sam uvodila postupno

jednu za drugom. Nakon potvrđivanja prisutnosti pojedine mutacije sekvenciranjem, dobivenu mutantu sam koristila kao predložak u izradi slijedeće mutacije potencijalnog CaMK-II fosforilacijskog mjesta. Pri izradi točkastih mutacija do prvih problema je došlo već nakon druge mutacije. Nisam uspijevala provesti željenu mutaciju. Mijenjanje omjera početnica i predloška u reakcijskoj smjesi kao i promjena temperature vezanja početnica nisu pomogli u izradi mutacije. Mogući razlozi su mogli biti stvaranje dimera početnica zbog njihove komplementarnosti na 3' kraju, kao i stvaranje ukosnica (engl. *hairpins*) čime bi se onemogućilo vezanje početnica za predložak u reakciji PCR. Stoga sam u potrazi za rješenjem pretraživala znanstvene forume (ResearchGate, BioForum i sl.) koji su korisni u pronalaženju savjeta za rješavanje sličnih problema. Na osnovi pronađenih rasprava i prijedloga prilagodila sam PCR protokol za usmjerenu mutagenezu tako da sam izradu točkaste mutacije, umjesto u jednom, provela u dva koraka. U prvom sam pripremila dvije reakcijske smjese od kojih je svaka pored standardnih komponenti, koju čine plazmidna DNA kao predložak, CloneAmp HiFi™ Premix i voda bez DNaza, sadržavala samo jednu umjesto uobičajenih dvije početnice. Umnažanje DNA je provedeno kroz 6 ciklusa PCR. U drugom koraku sam dvije smjese međusobno pomiješala i zatim dovršila umnažanje DNA kroz slijedeća 24 ciklusa.

Ovim pristupom rješila sam nastale probleme, a većinu mutacija sam uspješno provela već u prvom pokušaju što se očitovalo kroz rast kompetentnih bakterijskih stanica na podlozi LB/Amp. Naime, uspješno provedene mutacije su gotovo redovito popraćene uspješnim transformacijama kompetentnih Stellar stanica mutiranom plazmidnom DNA.

Kako bih potvrdila uspješnost mutacije potencijalnog CaMK-II fosforilacijskog mjesta rutinski sam provodila sekvenciranje nakon svakog mutacijskog ciklusa. Za sekvenciranje sam koristila sekvencijsku početnicu sp1351_FW koja omogućava sekvenciranje dijela *HANHE3* sekvence u kojoj sam provela sve točkaste mutacije. Na sekvenciranje sam redovito slala 3-5 uzoraka. Ovisno od mutacije do mutacije varirali su i rezultati sekvenciranja, u pojedinim slučajevima sekvenciranje je pokazalo prisutnost mutacije u svim uzorcima, dok je u drugim slučajevima mutacija potvrđena samo u jednom uzorku. Kako sam za dobivanje točkastih mutacija koristila CloneAmp HiFi™ Premix, koji u sebi sadrži pouzdanu polimerazu s niskom stopom pogrešaka, nespecifične točkaste mutacije duž sekvence su bile iznimno rijetke. Znalo se dogoditi da sekvenca ispisana iz kromatograma ne odgovara signalu koji je grafički prikaz na kromatogramu. Stoga sam redovito sve takve slučajeve provjeravala dodatnom analizom kromatograma, a u pojedinim slučajevima i ponovnim sekvenciranjem mutante u kojoj bi se pojavila greška kako bih bila sigurna da li je došlo do pogreške u očitanju signala ili do stvarne točkaste mutacije. Nakon što sam u ekspresijskom vektoru pcDNA/TM7-HANHE3 mutirala svih sedam potencijalnih CaMK-II fosforilacijskih mjesta: Ser554, Ser562, Ser607, Ser663, Ser693, Ser694 i Ser810 u Ala, provjerila sam sekvenciranjem s četiri sekvencijske početnice cijelu sekvencu *HANHE3* kako bih bila sigurna da se u njoj nalazi svih sedam mutacija i kako duž cijele sekvence nema niti jedne nespecifične mutacije.

5.3. Konstrukcija ekspresijskog vektora pcDNA/TM6-d24HANHE3

U svojoj studiji Žižak i sur. (2012) sugeriraju kako je u bazalnim uvjetima CaMK-II neposredno vezana za NHE3 i s te pozicije djeluje inhibirajuće na njegovu aktivnost. Pokazali su i kako je u

bazalnim uvjetima protein NHE3 fosforiliran te da se blokadom aktivnosti CaMK-II fosforilacija smanjuje. Na osnovu tih nalaza autori su pretpostavili da je fosforilacija proteina NHE3 vjerojatni mehanizam kojim CaMK-II inhibira bazalnu aktivnost NHE3.

Kako bi se mogle ispitati navedene pretpostavke izradila sam ekspresijski vektor pcDNA/TM6-d24HANHE3 kojem nedostaje vezno mjesto za CaMK-II i u kojem je mutirano šest potencijalnih CaMK-II fosforilacijskih mjesta na sekvenci gena za protein NHE3 s trostrukim epitopom HA. Ekspresijski vektor sam konstruirala na drugačiji, brži način od konstrukcije pcDNA/TM7-HANHE3 opisane u prethodnom poglavlju. Pri konstruiranju ekspresijskog vektora pcDNA/TM6-d24HANHE3 kombinirala sam dvije metode; metodu usmjerene mutageneze pomoću reakcija PCR za izradu dvije točkaste mutacije na predlošku pcDNA/d24HANHE3 i metodu potpune razgradnje restrikcijskim endonukleazama kojima sam cijepala konstruirane vektore pcDNA/TM2-d24HANHE3 i pcDNA/TM7-HANHE3 i međusobnim kombiniranjem i povezivanjem izoliranih fragmenata konstruirala novi ekspresijski vektor.

Krnji vektor pcDNA/d24HANHE3 ranije je izrađen u istom laboratoriju metodom PCR preklapanja dvaju fragmenata DNA sekvence gena *NHE3* s trostrukim epitopom *HA*, i u sebi ima deleciju 72 para baza koji kodiraju za 24 aminokiseline (Leu 586 – Arg609) koje su sugerirano vezno mjesto za CaMK-II. Za navedeni segment su Žižak i sur. (2012) pokazali da se veže CaMK-II u bazalnim uvjetima. I nekoliko drugih studija je pokazalo vezanje različitih regulacijskih proteina na isti segment NHE3 poput: NHERF1 i 2 (Cha i sur., 2004), CK II (Sarker i sur., 2008) i PLCγ (Zachos i sur., 2009).

Na pcDNA/d24HANHE3 sukcesivnim mutacijama sam mutirala potencijalna CaMK-II fosforilacijska mjesta Ser554 i Ser562 u Ala554 i Ala562. Za izradu točkastih mutacija u pcDNA/TM2-d24HANHE3 koristila sam reakcije PCR s dvije početne reakcijske smjese. Da bih bila sigurna u ispravnost dobivene mutante provela sam sekvenciranje cjelokupne skevence pcDNA/TM2-d24HANHE3 pomoću četiri sekvencijske početnice. Konstruirani vektor pcDNA/TM2-d24HANHE3 ne sadrži vezno mjesto za CaMKII i ima mutirana dva potencijalna CaMK-II fosforilacijska mjesta, Ser554Ala i Ser562Ala.

Kako bih konstruirala ekspresijski vektor pcDNA/TM6-d24HANHE3 podvrgla sam pcDNA/TM7-HANHE3 i pcDNA/TM2-d24HANHE3 potpunom cijepanju pomoću restrikcijske endonukleaze *Pma*CI. Ovu restrikcijsku endonukleazu sam odabrala jer cijepa *HANHE3* na aminokiselinama His280 i His638, koje se nalaze prije i poslije veznog mjesta za CaMK-II, bez da reže vektor pcDNA 3.1 (+). Restrikcijskom endonukleazom *Pma*CI tretirala sam oba vektora, pcDNA/TM7-HANHE3 i pcDNA/TM2-d24HANHE3, iz kojih su nastala po dva fragmenta, po jedan vektor i jedan umetak.

Pomoću horizontalne elektroforeze izolirala sam iz pcDNA/TM7-HANHE3 duži vektorski dio (f-pcDNA/TM4-HANHE3) koji je sadržavao četiri mutacije, a iz pcDNA/TM2-d24HANHE3 sam izolirala kraći dio, umetak (fTM2-d24HANHE3) koji je sadržavao dvije mutacije i područje delecije veznog mjesta. Dva problema koja se javljaju pri restrikciji endonukleazom *Pma*CI uslijed stvaranja tzv. tupih krajeva su povećana vjerojatnost spontane recirkulacije dugog lineariziranog vektora, kao i mogućnost da se umetak poveže s vektorom u obrnutom smjeru. Stoga sam u cilju prevencije spontane recirkulacije, vektor f-pcDNA/TM4-HANHE3 defosforilirala pomoću *SAP* fosfataze. U slijedećem koraku sam postupkom ligacije povezala izolirani vektor f-pcDNA/TM4-HANHE3 i umetak fTM2-d24HANHE3 čime je sintetiziran ekspresijski vektor pcDNA/TM6-d24HANHE3 kojem nedostaje

vezno mjesto za CaMK-II, a posjeduje šest mutacija potencijalnih CaMK-II fosforilacijskih mjesta: Ser554, Ser562, Ser663, Ser693, Ser694, Ser810**.**

Prilikom povezivanja umetka i vektora testiranjem sam pronašla da se najbolji rezultati postižu kad sam umetak:vektor pomiješala u omjeru 4:1. Ostale korake sam provela rutinski izuzev odabira bakterijskih kolonija u kojima je umetak ispravno orijentriran u vektoru. U tu svrhu odabrala sam osam ligatom transformiranih kolonija i njihove izolirane plazmidne sekvence testirala pomoću restrikcijskih endonukleaza *Kpn*I i *Hind*III. Dvije restrikcijske endonukleaze *Hind*III i *Kpn*I su se pokazale najboljim izborom budući da cijepaju plazmid unutar vektorskog dijela i unutar umetka i imaju jedinstvena restrikcijska mjesta unutar ekspresijskog vektora. Ukoliko je umetak orijentiran u pravom smjeru tada endonukleaze cijepanjem stvaraju manji DNA isječak dug 1287 pb, dok kod orijentacije umetka u obrnutom smjeru stvaraju DNA isječak dug 1599 pb.

Od testiranih plazmida izoliranih iz osam kolonija samo su u tri: C1, C3 i C7, pronađeni isječci dugi približno 1287 pb, dok su u ostalim kolonijama isječci bili dugi oko 1599 pb. Zanimljivo je da su se na gel elektroforezi pojavili i nespecifični bendovi koji se nisu pojavili u reakciji endonukleaza s kontrolnim plazmidom pcDNA/HANHE3. Kako nisam bila sigurna u uzrok ovih nespecifičnih bendova, odlučila sam napraviti dodatnu provjeru i sve tri kolonije poslati na sekvenciranje. Rezultati sekvenciranja pokazali su ispravnu orijentaciju umetka u sve tri kolonije bez nespecifičnih mutacija. Ekspresijski vektor koji sam kasnije koristila za transfekciju fibroblasta PS120 s i bez NHERF2 provjerila sam sekvenciranjem cjelokupne sekvence s četiri sekvencijske početnice. Provjera je pokazala kako pcDNA/TM6-d24HANHE3 sadrži svih šest potencijalnih CaMK-II fosforilacijskih mjesta: Ser554, Ser562, Ser663, Ser693, Ser694, Ser810, pravilnu orijentaciju umetka i deleciju CaMK-II veznog mjesta.

5.4. Transfekcija staničnih linija fibroblasta PS120 bez i sa NHERF2 i zakiseljavanje stanica

Opći cilj ovog rada bio je razvoj kultura staničnih linija fibroblasta PS120 koje na svojoj površini eksprimiraju mutirani HANHE3 kako bi se mogli istraživati mehanizmi kojima CaMK-II regulira protein NHE3. Krajnji cilj je pripremiti stanične linije fibroblasta PS120 s dobro eksprimiranim mutiranim proteinima NHE3 koje će se u budućim funkcionalnim studijama koristiti za ispitivanje kinetičke aktivnosti NHE3 pod djelovanjem CaMK-II. Tim studijama se planira ispitati djeluje li CaMK-II inhibitorno preko neposredne fosforilacije proteina i da li je segment u NHE3 za koji se veže CaMK-II važan u toj regulaciji, odnosno, je li vezni segment uopće važan za inhibitorno djelovanje CaMK-II na NHE3. S obzirom na ranije pokazanu ulogu NHERF2 u regulaciji aktivnosti proteina NHE3 preko cGKII (Cha i sur. 2005) i CaMK-II (Žižak i sur., 2012) važno je u studiji ispitati i koju ulogu ima NHERF2 u CaMK-II posredovanoj regulaciji NHE3. Stoga sam ekspresijske vektore transfecirala u dvije stanične linije fibroblasta PS120, jednu bez regulatornog proteina NHERF2 i drugu sa stabilno transfeciranim NHERF2.

Kako bi se moglo provesti istraživanje koji će dati odgovore na postavljena pitanja uspostavila sam šest kultura PS120 staničnih linija transfeciranih nativnim i mutiranim sekvencama za protein HANHE3, TM7-HANHE3 i TM6-d24HANHE3. Stanična linija PS120 fibroblasta bez NHERF2 je

transfecirana ekspresijskim vektorom pcDNA/HANHE3, i u daljnjim ispitivanjima bi trebala služiti kao kontrola, te ekspresijskim vektorima pcDNA/TM7-HANHE3 i pcDNA/TM6-d24HANHE3. Na isti način su transfecirane stanične linije PS120 fibroblasta stabilno transfecirane s NHERF2. U konačnici sam pored stanica s nativnim proteinima HANHE3 uspostavila i četiri stanične linije stabilno transfecirane mutantama: 1) fibroblasti PS120 bez NHERF2 transfecirani s pcDNA/TM7-HANHE3; 2) fibroblasti PS120 sa stabilno transfeciranim NHERF2 i transfecirani s pcDNA/TM7-HANHE3; 3) fibroblasti PS120 bez NHERF2 transfecirani s pcDNA/TM6-d24HANHE3 i 4) fibroblasti PS120 sa stabilno transfeciranim NHERF2 i transfecirani s pcDNA/TM6-d24HANHE3.

Uspostavljanjem staničnih linija fibroblasta PS120 s eksprimiranim mutantama proteina HANHE3 na površini stanica željela sam provjeriti da li transfekcija mutantama, za koje očekujem da bi mogle utjecati na funkcionalnost NHE3, utječe na reaktivnost stanica na zakiseljavanje staničnog medija. Nakon postupka transfekcije, transfecirane stanice sam izložila mediju sa selektivnim antibiotikom G418 kako bih testirala prisutnost mutiranog, odnosno nemutiranog plazmida. Samo stanice s plazmidom posjeduju gen za otpornost na selektivni antibiotik. Preživljavanje stanica u sve četiri novo-uspostavljene stanične linije kao i u njihovih kontrola bilo je podjednako. Stanice nakon inicijalne selekcije antibiotikom G418 nastavile su normalan rast i diobu bez razlika među stanicama transfeciranim s mutiranim tj. nemutiranim HANHE3. Nakon inicijalne selekcije, korištenjem selekcijskog antibiotika G418 u staničnom mediju kroz dva tjedna razvila sam stanične kulture fibroblasta PS120, bez i sa proteinom NHERF2, koje eksprimiraju na svojoj površini nativni odnosno mutirani protein HANHE3.

U slijedećem koraku sam stanice zakiseljavala visokim koncentracijama H^+ kako bih dodatno selektirala stanice s dobrom ekspresijom HANHE3 u staničnoj membrani. Podizanjem koncentracije H^+ u staničnom mediju opada unutarstanični pH, a samo one stanice koje u svojoj membrani imaju dobru ekspresiju funkcionalnog proteina HANHE3 mogu se oporaviti. Stanice fibroblasta PS120 bez proteina NHERF2 transfecirane ekspresijskim vektorima pcDNA/TM7-HANHE3, pcDNA/TM6-d24HANHE3 i pcDNA/HANHE3 izložila sam zakiseljavanju tri puta, svaki put stanice su se oporavile bez razlika među linijama. Stanice PS120 s proteinom NHERF2 sam isto tako izložila zakiseljavanju nakon kojeg se moglo vidjeti nešto veće odumiranje stanica, međutim nakon nekoliko dana došlo je do oporavka stanica koje su transfecirane ekspresijskim vektorima s mutiranim sekvencama *HANHE3*, dok stanice transfecirane nativnom sekvencom *HANHE3* nisu preživjele postupak zakiseljavanja. Prilikom prvih pokušaja transfekcije fibroblasta PS120 sam se već susretala s pojavom da su stanice preživljavale selekcijski antibiotik ali ne i zakiseljavanje zbog preranog izlaganja postupku, prije nego se na staničnoj membrani eksprimiralo dovoljno proteina NHE3 koji bi omogućili preživljavanje stanice. U pojedinih transfeciranih stanica potrebno je duže vrijeme za dovoljnu ekspresiju proteina na membrani što može biti uzrokovano manje uspješnom transfekcijom, slabijom ekspresivnom sposobnosti vektora i sl., pa kod preranog zakiseljavanja obično uslijedi smrt takvih stanica. Kako sam kroz preliminarne postupke već ranije uspostavila kulturu stanica PS120 s NHERF2 koje eksprimiraju nativni protein HANHE3 te će se stanice koristiti kao kontrola u budućim funkcionalnim studijama.

6. ZAKLJUČAK

- Predikcijskim programom GPS 3.0 predviđeno je postojanje sedam potencijalnih CaMK-II fosforilacijskih mjesta od kojih za šest (Ser554, Ser562, Ser607, Ser663, Ser693 i Ser694) postoji velika vjerojatnost da se u stanici stvarno fosforiliraju. U studiju je uključeno i potencijalno fosforilacijsko mjesto Ser810, za koje su ranije istraživanja pokazala kako bi mogao biti uključen u CaMK-II posredovanu regulaciju NHE3.
- Na nativnoj sekvenci *HANHE3* uspješno je metodom usmjerene mutageneze mutirano sedam potencijalnih CaMK-II fosforilacijskih mjesta (pcDNA/TM7-HANHE3), dok su na krnjoj sekvenci *d24HANHE3*, iz koje je u ranijoj studiji uklonjeno 24 aminokiseline (Leu586-Arg609) koje čine vezno mjesto za CaMK-II, prvo mutirana dva potencijalna CaMK-II fosforilacijska mjesta, Ser554 i Ser562, a zatim se novostvorena mutanta (TM2-d24HANHE3) koristila za izradu ekspresijskog vektora pcDNA/TM6-d24HANHE3.
- Ekspresijski vektor pcDNA/TM6-d24HANHE3 je konstruiran iz pcDNA/TM2-d24HANHE3 i pcDNA/TM7-HANHE3, koji su pocijepani restrikcijskom endonukleazom *Pma*CI. Povezivanjem vektorskog dijela f-pcDNA/TM4-HANHE3 izoliranog iz pcDNA/TM7-HANHE3 i umetka fTM2-d24HANHE3 izoliranog iz pcDNA/TM2-d24HANHE3 konstruiran je ekspresijski vektor pcDNA/TM6-d24HANHE3.
- Ekspresijski vektor s nativnom sekvencom *HANHE3*; pcDNA/HANHE3 i s mutiranom *HANHE3;* pcDNA/TM6-d24HANHE3 i pcDNA/TM7-HANHE3 su postupkom transfekcije uspješno unijeti u stanične linije fibroblasta PS120 sa i bez proteina NHERF2. Antibiotikom G418 prisutnom u staničnom mediju selektirane su uspješno transfecirane stanice, nakon čega je zakiseljavanjem učinjena dodatna selekcija stanica s dobrom ekspresijom proteina NHE3 na površini stanica.
- Uspješno je razvijeno šest staničnih linija fibroblasta PS120 transfecirane s nativnim, mutiranim i krnjim mutiranim genom HANHE3 sa ili bez regulatornog proteina NHERF2. Ustaljene su stanične linije: PS120/HANHE3, PS120/TM7-HANHE3, PS120/TM6-d24HANHE3, PS120/NHERF2/HANHE3, PS120/NHERF2/TM7-HANHE3 i PS120/NHERF2/TM6-d24HANHE3.

7. LITERATURA

1. Alexander, R.T., Furuya, W., Szaszi, K., Orlowski, J., Grinstein, S. 2005. Rho GTPases dictate the mobility of the Na/H exchanger NHE3 in epithelia: Role in apical retention and targeting. *Procedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 12253-12258.

2. Bobulescu, I. i Moe, O. 2006. Na+/H+ Exchangers in Renal Regulation Acid-Base Balance. *Seminars in Nephrology* 26(**5**), 334-344.

3. Brett, C. L., Donowitz, M., Rao, R. 2005. Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **288**, C233-C239.

4. Cha, B., Kenworthy, A., Murtazina, R., Donowitz, M. 2004. The lateral mobility of NHE3 on the apical membrane of renal epithelial OK cells is limited by the PDZ domain proteins NHERF1/2, but is dependent on an intact actin cytoskeleton as determined by FRAP. *Journal of Cell Science* **117**, 3353-3365.

5. Cha, B., Kim, J.H., Hut, H., Hogema, B.M., Nadarja, J., Žižak, M., Cavet, M., Lee-Kwon, W., Lohmann, S.M., Smolenski, A., Tse, C.M., Yun, C., de Jonge, H.R., Donowitz, M. 2005. cGMP Inhibition of Na+/H+ Antiporter 3 (NHE3) Requires PDZ Domain Adapter NHERF2, a Broad Specificity Protein Kinase G-anchoring Protein. *Journal of Biological Chemistry* 280(**17**), 16642-16650.

6. Crajoinas, R.O., Polidoro, J.Z., Carneiro de Morais, C.P.A., Castelo-Branco, R.C., Girardi, A.C.C. 2016. Angiotensin II counteracts the effects of cAMP/PKA on NHE3 activity and phosphorylation in proximal tubule cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiol* 5(**311**), 768-776.

7. Dominguez Rieg, J., Chavez, S. M. i Rieg, T. 2016. Novel developments in differentiating the role of renal and intestinal sodium. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 311(**6**), 1186-1191.

8. Donowitz, M. i. Li, X. 2007. Regulatory Binding Partners and Complexes of NHE3. *Physiological Reviews* **87,** 825-872.

9. Donowitz, M., Mohan, S., Zhu, C.X., Chen, T-E., Lin, R., Cha, B., Zachos, N.C., Murtazina, R., Sarker, R., Li, X. 2009. NHE3 regulatory complexes. *Journal of Experimental Biology* **212**, 1638-1646.

10. Donowitz, M., Tse, C. i Fuster, D. 2013. SLC9/NHE gene family, a plasma membrane and organellar family of Na+/H+ exchangers. *Molecular Aspects of Medicine* **34**, 236-251.

11. Fuster, D.G. i Alexander, R.T. 2014. Traditional and emerging roles for the SLC9 Na+/H+ exchangers. *European Journal of Physiology* **466**, 61-76.

12. Gekle, M., Drumm, K., Mildenberger, S., Freudinger, R., Gaßner, B., Silbernagl, S. 1999. Inhibition of Na+-H+ exchange impairs receptor mediated albumin endocytosis in renal proximal tubule derived epithelial cells from opossum. *Journal of Physiology* 520(**3**), 709-721.

13. He, P., Klein J., Yun, C.C. 2010. Activation of Na+/H+ Exchanger NHE3 by Angiotensin II is Mediated by Inositol 1,4,5-Triphosphate (IP3) Receptor-binding Protein Released with IP3 (IRBIT) and Ca2+/Calmodulin-dependent Protein Kinase II. *Journal of Biological Chemistry* 285(**36**), 27869-27878.

14. He, P. i Yun, C.C. 2010. Mechanisms of the regulation of the intestinal Na+/H+ Exchanger NHE3. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2010**, 1-10.

15. He, P., Zhang, H. i Yun, C.C. 2008. IRBIT, IP3 receptor binding protein released with IP3, binds Na+/H+ exchanger NHE3 and activates NHE3 activity in response to calcium. *Journal of Biological Chemistry,* 1-26.

16. Hudmon, A. i Schulman, H. 2002.. Structure–function of the multifunctional Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochemical Journal* **364**, 593-611.

17. Kocinsky, H.S., Dynia, D.W., Wang, T., Aronson, P.S. 2007. NHE3 phosphorylation at serines 552 and 605 does not directly affect NHE3 activity. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* **293**, 212–218.

18. Kurashima, K., Szabo, E.Z., Lukacs, G., Orlowski, J., Grinstein, S. 1998. Endosomal recycling of the Na+/H+ exchanger NHE3 isofrom is regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 20828-20836.

19. Kurashima, K., Yu, F.H., Cabado, A.G., Szabo, E.d.Z., Grinstein, S., Orlowski, J. 1997. Identification of Sites Required for Down-regulation of Na+/H+ Exchanger NHE3 Activity by cAMP-dependent Protein Kinase. Phosphorylation -dependent and -independent Mechanisms. *Journal of Biological Chemistry,* 272(**45**), 28672–28679.

20. Laible, M. i Boonrod, K. 2009. Homemade Site Directed Mutagenesis of Whole Plasmids. *Journal of Visualized Experiments: JoVE* **27**, 1135.

21. Lee, B., Sykes, B. i Fliegel, L., 2013. Structural and functional insights into the cardiac Na+/H+ exchanger. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **61,** 60-67.

22. Lee-Kwon, W., Johns, D.C., Cha, B., Cavet, M., Park, J., Tsichlis, P., Donowitz, M. 2003. Ca2+ -dependent inhibition of NHE3 requires PKC alpha which binds to E3KARP to decrease surface NHE3 containing plasma membrane complexs. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **285**, 1527-1536.

23. Levine, S., Montrose, M., Tse, C., Donowitz, M. 1992. Kinetics and regulation of three cloned mammalian Na+/H+ exchangers stably expressed in a fibroblast cell line. *Journal of Biological Chemistry* **268,** 25527-25353.

24. Orlowski, J. i Grinstein, S. 1997. Na+/H+ exchangers of mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry* 272(**36**), 22373–22376.

25. Orlowski, J. i Grinstein, S. 2004. Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. *European Journal of Physiology* **447**, 549-565.

26. Priyamvada, S., Gomes, R., Gill, R.K., Saksena, S., Alrefai, W., Dudeja, P.K. 2015. Mechanisms underlaying dysregulation of electrolyte absorption in IBD associated diarrhea. *Inflammatory Bowel Diseases* 21(**12**), 2926-2935.

27. Sarker, R., Gronborg, M., Cha, B., Mohan, S., Chen, Y., Pandey, A., Litchfield, D., Donowitz, M., Li, X. 2008. Casein Kinase 2 binds to the C terminus of Na+/H+ exchanger 3 (NHE3) and stimulates NHE3 basal activity by phosphorylating a separate site in NHE3. *Molecular Biology of the Cell* **19**, 3859-3870.

28. Wakabayashi, S., Pang, T., Su, X. i Shigekawa, M. 2000. A novel topology model of the human Na+/H+ exchanger isoform I. *Journal of Biological Chemistry* 275(**11**), 7942-7949.

29. Wang, X., Armando, I., Upadhyay, K., Pascua, A., Jose, P.A. 2009. The regulation of proximal tubular salt transport in hypertension: an update. *Current Opinions in Nephrology and Hypertension* 18(**5**), 412–420.

30. Weinman, E., Steplock, D., Donowitz, M., Shenolikar, S., 2000. NHERF associations with sodium-hydrogen exchanger isoform 3 (NHE3) and ezrin are essential for cAMP-mediated phosphorylation and inhibition of NHE3. *Biochemistry* **23**, 6123-6129.

31. Weinman, E., Steplock, D. i Shenolikar, S. 1993. CAMP mediated inhibition of the renal BBM Na+ -H+ exchanger requires a dissociable phosphoprotein co-factor. *Journal of Clinical Investigation* **92**, 1781-1786.

32. Yun, C.C., Chen, Y. i Lang, F. 2002. Glucocorticoid Activation of Na+/H+ Exchanger Isoform 3 Revisited The roles of SGK1 and NHERF2. *Journal of Biological Chemistry* 277(**10**), 7676-7683.

33. Yun, C.C., Oh, S., Žižak, M., Steplock, D., Tsao, S., Tse, C.M., Weinman, E.J., Donowitz, M. 1997. cAMP-mediated inhibition of the epithelial brush border Na+/H+ exchanger, NHE3, requires an associated regulatory protein. *Procedings of National Academy of Sciences USA* **94**, 3010-3015.

34. Zachos, N., Ming, T. i Donowitz, M. 2005. Molecular physiology of intestinal Na+/H+ exchange. *Annual Review of Physiology* **67**, 411-443.

35. Zachos, N.C., van Rossum, D.B., Li, X., Caraveo, G., Sarker, R., Cha, B., Mohan, S., Desiderio, S., Patterson, R.L., Donowitz, M. 2009. Phospholipase C-gamma binds directly to the Na+/H+ exchanger 3 and is required for calcium regulation of exchange activity. *Journal of Biological Chemistry* 284(**29**), 19437-19444.

36. Zhao, H., Wiederkher, M.R., Fan, L., Collazo, R.L., Crowder, L.A., Moe, O.W. 1999. Acute inhibition of Na/H exchanger NHE-3 by cAMP: role of protein kinase A and NHE-3 phosphoserines 552 and 605. *Journal of Biological Chemistry* 274(**7**), 3978-3987.

37. Žižak, M., Cavet, M.E., Bayle, D., Tse, C.M., Hallen, S., Sachs, G., Donowitz, M. 2000. Na(+)/H(+) exchanger NHE3 has 11 membrane spanning domains and a cleaved signal peptide: topology analysis using in vitro transcription/translation. *Biochemistry* 39(**27**), 8102-8112.

38. Žižak, M., Chen, T., Bartoniček, D., Sarker, R., Zachos, N.C., Cha, B., Kovabsnjuk, O., Korac, J., Mohan, S., Cole, R., Chen, Y., Tse, C.M., Donowitz, M. 2012. Calmodulin Kinase II constitutively binds, phosphorylates, and inhibits brush border Na+/H+ exchanger 3 (NHE3) by a NHERF2 protein-dependent process. *Journal of Biological Chemistry* 287(**16**), 13442-13456.

8. ŽIVOTOPIS

Ime mi je Martina Jolić. Rođena sam 25. veljače 1992. godine u Novoj Gradiški, gdje sam pohađala Osnovnu školu Ljudevita Gaja, a 2006. godine sam upisala Opću gimnaziju Nova Gradiška u Novoj Gradiški.

Godine 2010. upisala sam preddiplomski studij biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu te sam 2014. godine stekla zvanje prvostupnice biologije. Iste godine sam upisala diplomski studij eksperimentalne biologije, modul fiziologija i imunobiologija.

Tijekom ljetnog semestra akademske godine 2014./2015. sam sudjelovala u Erasmus razmjeni studenata na Sveučilištu Chalmers u Gothenburgu, Kraljevina Švedska. Tijekom razmjene sudjelovala sam u projektima tkivnog inžinjerstva gdje sam imala priliku raditi u razvijanju tehnika bio-printanja. Pri radu na projektima susretala sam se s raznim staničnim kulturama i željela sam razviti svoje znanje u ovom području. Odlučila sam se za diplomski rad na Medicinskom fakultetu u Zavodu za fiziologiju kako bih usvojila dodatne tehnike molekularne biologije.