

# Uloga konzerviranih domena MATH, BTB, i SPOP proteina BPM1 u interakciji s proteinima DMS3, RDM1 i HB6

---

Miškec, Karlo

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:307008>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-27**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET**  
**BIOLOŠKI ODSJEK**

Karlo Miškec

Uloga konzerviranih domena MATH, BTB i SPOP proteina BPM1 u  
interakciji s proteinima DMS3, RDM1 i HB6

**DIPLOMSKI RAD**

Zagreb, 2019.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za kulturu biljnog tkiva na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Dunje Leljak-Levanić i neposrednim vodstvom dr. sc. Lucije Markulin te je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Rad je financiran sredstvima Hrvatske zaklade za znanost u sklopu projekta „MATH-BTB proteini kao regulatori transkripcije i RNA posredovane metilacije DNA u biljnom razvitku“ IP 2016-06-6229.

## ZAHVALE

Zahvaljujem svim članovima laboratorija za kulturu biljnog tkiva na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na svim savjetima i laboratorijskom iskustvu koje sam stekao tokom ove 2 godine suradnje.

Najviše hvala mojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Dunji Leļjak-Levanić koja je imala dovoljno povjerenja u mene da mi dodijeli ovako opsežan i kompleksan diplomski koji me naučio kako se nositi s neuspjehom, ali i kako premostiti sve probleme koji se javljaju tokom izrade znanstvenog rada.

Zahvaljujem i izv. prof. dr. sc. Nataši Bauer na svim savjetima, susretljivosti, pomoći i podršci u situacijama koje su se činile nerješivima.

Posebno i jedno ogromno hvala mag. biol. mol. Mateji Jagić koja me naučila kako treba raditi u laboratoriju tokom laboratorijske stručne prakse. Također hvala što mi je bila podrška tokom izrade diplomskog rada i uvijek me bodrila da nastavim dalje usprkos neuspjesima.

Hvala mag. biol. mol. Andreji Škiljaici na ugodnoj atmosferi koja mi je olakšala održati demonstrature usprkos intenzivnom tempu termina održavanja praktikuma, bilo mi je drago biti dio ovogodišnjih vježba.

Hvala mojoj sestri i roditeljima koji su me podupirali tokom studija i omogućili mi da uspješno privedem studij kraju.

Zahvaljujem svim prijateljima koji su bili uz mene, a posebno hvala Ingrid na savjetima i mentalnoj podršci.

I za kraj, hvala osobi koja je cijelo vrijeme bila uz mene i koja je sve neuspjehe i uspjehe prolazila zajedno sa mnom. Hvala dr. sc. Luciji Markulin što je bila uz mene tokom izrade ovog diplomskog rada i imala dovoljno strpljenja i volje podučiti me kako biti dobar znanstvenik, bez nje ovo ne bi bilo moguće.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Uloga konzerviranih domena MATH, BTB i SPOP proteina BPM1 u interakciji s proteinima DMS3, RDM1 i HB6

Karlo Miškec

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

### Sažetak

Članovi proteinske porodice MATH-BTB sudjeluju u ubikvitinskom putu degradacije proteina kao adaptori E3 ligaze ovisne o kulinu 3 i odgovorni su za specifičnost prema ciljanom supstratu. U uročnjaku (*Arabidopsis thaliana* L.) postoji šest gena ove obitelji (*BPM 1-6*). Protein BPM1 uz domene MATH i BTB sadrži i konzerviranu domenu SPOP koja zajedno s domenom BTB sudjeluje u stvaranju proteinskih interakcija s kulinom 3. Domena MATH sudjeluje u selektivnim interakcijama s proteinima ciljanim za proteasomsku razgradnju. Takve interakcije utvrđene su između proteina BPM1 i nekih transkripcijskih faktora poput HB6 koji ima ulogu u odgovorima reguliranim apscizinskom kiselinom u biljnim stanicama. Preliminarna istraživanja su pokazala interakciju proteina BPM1 s proteinima DMS3 i RDM1 koji sudjeluju u metilaciji DNA posredovanom molekulama RNA. U ovom radu interakcije proteinskih domena BPM1 s transkripcijskim faktorom HB6 i proteinima DMS3 odnosno RDM1 su analizirane metodom kopurifikacije „jedan na jedan“. Konstruirani su odgovarajući ekspresijski plazmidi, optimizirani su postupci poticanja ekspresije i pročišćavanja za svaki pojedini protein ili varijantu proteina te su eksprimirani i pročišćeni rekombinantni proteini iz kemijski transformiranih bakterijskih stanica. Interakcija proteina je provjerena hibridizacijom po Westernu i metodom SDS-PAGE. Potvrđena je interakcija proteina BPM1 i DMS3 posredovana domenom MATH te interakcija BPM1 s RDM1 koja nije specifično posredovana niti jednom pojedinom domenom. Interakcija proteina BPM1 i HB6 nije dokazana uslijed degradacije proteina HB6 .

(118 stranica, 35 slika, 10 tablica, 7 slika u prilogu, 150 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: put RdDM, kopurifikacija, inkluzijska tjelešca, optimizacija topivosti, delecija domena proteina

Voditelj: izv. prof. dr. sc. Dunja Leļjak-Levanić

Neposredni voditelj: dr. sc. Lucija Markulin

Ocjenitelji: izv. prof. dr. sc. Dunja Leļjak-Levanić

izv. prof. dr. sc. Sandra Radić Brkanac

prof. dr. sc. Dijana Škorić

Zamjena: izv. prof. dr. sc. Nataša Bauer

Rad prihvaćen: 19. 6. 2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Division of Biology

Graduation thesis

The role of conserved BPM1 protein domains MATH, BTB and SPOP in interaction with DMS3,  
RDM1 and HB6 proteins

Karlo Miškec

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Members of MATH-BTB protein family partake as adaptors of cullin 3 dependant E3 ligase in the ubiquitin proteasome pathway and are responsible for specificity towards a substrate. In *Arabidopsis thaliana* there are 6 genes from this family (*BPM 1-6*). BPM1 protein along MATH and BTB domains, contains conserved SPOP domain which together with BTB domain partakes in forming of protein interactions with cullin 3. MATH domain has a role in selective interactions with proteins which are targeted for proteasomal degradation. This kind of interactions are established between BPM1 protein and some transcriptional factors like HB6 which has an important role in abscisic acid dependant response in plant cells. Preliminary research have shown an interaction between BPM1 protein and DMS3 and RDM1 proteins which partake in a DNA methylation directed by RNA molecules. Here interactions between BPM1 protein, HB6 transcription factor and proteins DMS3 and RDM1 were analyzed with „one to one“ pull down method. Adequate plasmid constructs were made, conditions for induced expression and purification for each protein and protein variant were optimised and recombinant proteins were expressed and purified from chemically transformed bacterial strains. Protein-protein interactions were proven by Western blot and SDS-PAGE. Interaction between BPM1 and DMS3 was confirmed and it is primarily mediated by MATH domain. Positive interaction between BPM1 and RDM1 didn't show preference towards any BPM1 domain. BPM1 and HB6 interaction wasn't confirmed due to HB6 degradation.

(118 pages, 35 figures, 10 tables, 7 supplemental figures, 150 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: RdDM pathway, copurification, inclusion bodies, solubility optimization, protein domain deletion

Supervisor: Dr. Dunja Leljak-Levanić, Assoc. Prof.

Assistant Supervisor: Dr. Lucija Markulin, Asst. Prof.

Reviewers: Dr. Dunja Leljak-Levanić, Assoc. Prof.

Dr. Sandra Radić Brkanac, Assoc. Prof.

Dr. Prof. Dijana Škorić, Prof.

Replacement reviewer: Dr. Nataša Bauer, Assoc. Prof.

Thesis accepted: June 19<sup>th</sup>, 2019

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Degradacija proteina ovisna o ubikvitinu .....	1
1.2. Proteini MATH-BTB .....	4
1.2.1. Domena MATH.....	5
1.2.2. Domena BTB/POZ.....	5
1.2.3. Domena SPOP.....	6
1.3. Interakcijski partneri proteina BPM1 .....	8
1.3.1. Transkripcijski faktor HB6.....	10
1.4. DNA metilacija usmjerena pomoću RNA.....	11
1.4.1. RNA polimeraza IV i V .....	13
1.4.2. Kompleks DDR .....	14
1.5. Cilj rada .....	16
<b>2. MATERIJALI I METODE</b> .....	17
2.1. MATERIJALI .....	17
2.1.1. Bakterijski sojevi.....	17
2.1.2. Bakterijski mediji za rast.....	17
2.1.2.1. Mediji LB, 2 × YT, 4 × YT i TB.....	17
2.1.2.2. Medij SOC.....	18
2.1.3. Nukleotidne sekvence gena.....	18
2.1.4. Plazmidi.....	18
2.1.5. Početnice .....	18
2.1.6. Aminokiselinske sekvence proteina .....	19
2.1.7. Pufferi .....	20
2.1.7.1. PBS.....	20
2.1.7.2. TAE .....	20
2.1.7.3. 5 × SLB .....	21
2.1.7.4. Pufferi za pročišćavanje His označenih proteina .....	21
2.1.7.5. Pufferi za pročišćavanje GST označenih proteina .....	21
2.1.8. Proteinski i DNA molekularni standardi.....	22

2.2. METODE .....	22
2.2.1. Priprema prekonocne bakterijske kulture.....	22
2.2.2. Priprema kemijski kompetentnih bakterijskih stanica .....	23
2.2.3. Transformacija bakterijskih stanica toplinskim šokom .....	23
2.2.4. Provjera uspješnosti transformacije bakterija .....	23
2.2.5. Elektroforeza u agaroznom gelu .....	24
2.2.6. Izolacija plazmidne DNA.....	25
2.2.7. Restriksijska digestija molekule DNA.....	25
2.2.8. Konstrukcija delecijjskih varijanti gena <i>BPM1</i> .....	26
2.2.8.1. Konstrukcija delecijjskih varijanti gena <i>BPM1</i> obilježenih His-privjeskom .....	26
2.2.8.2. Konstrukcija delecijjskih varijanti gena <i>BPM1</i> obilježenih GST-privjeskom .....	27
2.2.8.2.1. Linearizacija kalupa pGEX-4T-1-BPM1 .....	27
2.2.8.2.2. Defosforilacija linearizirane plazmidne DNA .....	28
2.2.8.2.3. Umnožavanje ciljnih sekvenci iz plazmidnih vektora reakcijom PCR .....	28
2.2.8.2.4. Pročišćavanje umnoženih ciljnih sekvenci i defosforiliranog plazmida iz gela.....	28
2.2.8.2.5. Restriksijsko cijepanje produkta PCR-a .....	28
2.2.8.2.6. Reakcija ligacije .....	29
2.2.8.2.7. Provjera orijentacije ciljnih slijedova u plazmidnom vektoru .....	29
2.2.9. Provjera sinteze proteina u ekspresijskim bakterijskim sojevima .....	29
2.2.10. Ekstrakcija bakterijskih proteina.....	30
2.2.11. Pročišćavanje proteina obilježenih His-privjeskom.....	31
2.2.11.1. Promjena pufera pročišćenih proteina obilježenih His-privjeskom.....	31
2.2.11.2. Optimizacija topivosti proteina His-BPM1 $\Delta$ MATH .....	32
2.2.12. Pročišćavanje proteina obilježenih GST-privjeskom.....	33
2.2.13. Elektroforeza SDS-PAGE .....	33
2.2.14. Hibridizacija po Westernu.....	34
2.2.14.1. Prijenos proteina na membranu.....	34
2.2.14.2. Imunodetekcija proteina na PVDF membrani .....	34



2.2.14.3. Vizualizacija proteina na poliakrilamidnom gelu i PVDF membrani bojom Coomassie Brilliant Blue .....	35
2.2.15. Kopurifikacija proteina .....	35
<b>3. REZULTATI</b> .....	<b>37</b>
3.1. Konstrukcija delecijских varijanti gena <i>BPM1</i> .....	37
3.1.1. Konstrukcija delecijских varijanti gena <i>BPM1</i> obilježenih His-privjeskom .....	37
3.1.2. Konstrukcija delecijских varijanti gena <i>BPM1</i> obilježenih GST-privjeskom .....	39
3.2. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje delecijских varijanta proteina His-BPM1 .....	41
3.2.1. Optimizacija prekomjerne ekspresije proteina His-BPM1 $\Delta$ BTB .....	43
3.2.2. Prekomjerna ekspresija i optimizacija pročišćavanja proteina His-BPM1 $\Delta$ MATH .....	44
3.2.2.1. Indukcija His-BPM1 $\Delta$ MATH .....	44
3.2.2.2. Pročišćavanje His-BPM1 $\Delta$ MATH .....	45
3.2.2.3. Optimizacija topivosti His-BPM1 $\Delta$ MATH .....	46
3.2.3. Optimizacija prekomjerne ekspresije proteina His-BPM1 $\Delta$ SPOP .....	47
3.2.4. Optimizacija indukcije delecijских varijanta proteina His-BPM1 dodatkom MgCl <sub>2</sub> .....	49
3.3. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje proteina GST-BPM1 i njegovih delecijских varijanta .....	50
3.3.1. Optimizacija indukcije i pročišćavanja proteina GST-BPM1, GST-BPM1 $\Delta$ MATH i GST-BPM1 $\Delta$ SPOP .....	51
3.3.2. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanja proteina GST-BPM1 $\Delta$ BTB .....	56
3.3.3. Pročišćavanje proteina GST .....	60
3.4. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje interakcijskih partnera proteina BPM1 .....	60
3.4.1. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanja proteina His-DMS3 .....	61
3.4.2. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanja proteina His-RDM1 .....	62
3.4.3. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanja proteina His-HB6 .....	63
3.5. Kopurifikacija proteina GST-BPM1 i njegovih delecijских varijanta s His-DMS3, His-RDM1 i His-HB6 .....	65

3.5.1. Kopurifikacija proteina GST-BPM1 i njegovih delecijских varijanta s proteinom His-DMS3 .....	65
3.5.2. Kopurifikacija proteina GST-BPM1 i njegovih delecijских varijanta s proteinom His-RDM1.....	67
3.5.3. Kopurifikacija proteina GST-BPM1 i njegovih delecijских varijanta s proteinom His-HB6 .....	69
<b>4. RASPRAVA .....</b>	<b>71</b>
4.1. Ekspresija proteina i uspješnost pročišćavanja .....	71
4.1.1. Ekspresija i pročišćavanje proteina BPM1, BPM1 $\Delta$ MATH, BPM1 $\Delta$ BTB i BPM1 $\Delta$ SPOP obilježenih privjeskom GST .....	71
4.1.2. Ekspresija i pročišćavanje proteina DMS3, RDM1 i HB6 obilježenih privjeskom His .....	78
4.1.3. Niska ekspresija proteina BPM1 $\Delta$ BTB i BPM1 $\Delta$ SPOP obilježenih privjeskom His .....	80
4.1.4. Formiranje inkluzijskih tjelešaca proteina BPM1 $\Delta$ MATH označenog privjeskom His .....	83
4.2. Kopurifikacija proteina GST-BPM1 i njegovih delecijских varijanta s interakcijskim partnerima DMS3, RDM1 i HB6 .....	85
4.2.1. Kopurifikacija proteina GST-BPM1 i njegovih delecijских varijanta s proteinom His-HB6 .....	85
4.2.2. Kopurifikacija proteina GST-BPM1 i njegovih delecijских varijanta s proteinom His-DMS3 i His-RDM1 .....	86
<b>5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>88</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>89</b>
<b>PRILOG .....</b>	<b>102</b>

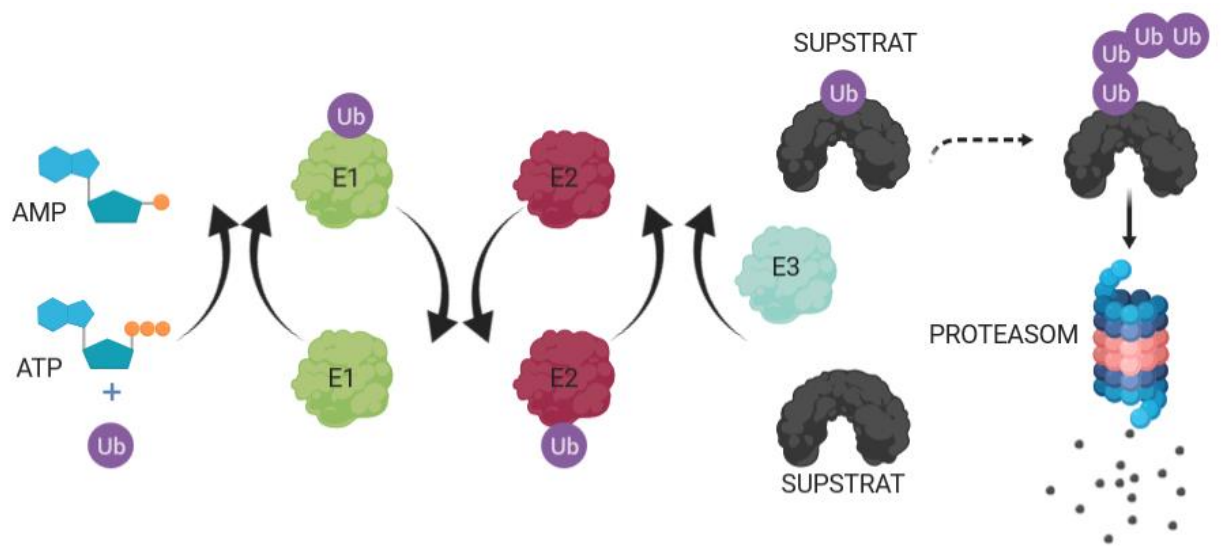
# 1. UVOD

Uročnjak (*Arabidopsis thaliana* L.) je biljka dvosupnica iz porodice krstašica te je jedan od najčešćih modelnih organizama molekularne biologije koji se koristi u svrhu istraživanja biljnog rasta i razvoja (Meinke i sur., 1998). Jedan od najvažnijih mehanizama regulacije biljnog rasta te adaptacije na okolišni stres poput suše, saliniteta, radijacije, prisustva teških metala i nedostatka nutrijenata je vezan uz ravnotežnu koncentraciju određenih proteina koja se regulira degradacijom proteina ovisnom ili neovisnom o ubikvitinu (Sharma i sur., 2016).

## 1.1. Degradacija proteina ovisna o ubikvitinu

Proteinska degradacija je jedan od najvažnijih regulatornih procesa aktivnosti stanice. Ukoliko se proteini pogrešno smotaju ili se oštete, moraju se ukloniti iz stanice kako ne bi potaknuli apoptozu ili promjenu aktivnosti stanice ometanjem određenih signalnih putova. Osim zaštitne uloge, proteinska degradacija ima veliku važnost u regulaciji ravnotežne koncentracije regulatornih proteina i formaciji peptidnih fragmenata koji kontroliraju odgovor adaptivne imunosti. Kako bi se razlikovao protein koji ima nativnu konformaciju od krivo smotanog proteina, krivo smotani protein se označava signalnim molekulama nazvanim degronima koje ga usmjeravaju prema proteolizi. Degron se sastoji od dva dijela, a to su mjesto početka degradacije proteina i signalna molekula koju prepoznaje proteasom 26S koji pripada proteazama ovisnim o adenzin trifosfatu (engl. *Adenosine Triphosphate*, ATP) (Schrader i sur., 2009). Najčešće signalna molekula koja usmjerava protein prema proteasomu 26S sastoji se od nekoliko kopija proteina ubikvitina (Thrower i sur., 2000). Ubikvitin je mali protein koji se sastoji od 76 aminokiselina te se veže za supstrat pomoću aktivnosti tri enzima: aktivirajućeg enzima E1, ubikvitin konjugirajućeg enzima E2 i ubikvitin protein ligaze E3 (Smalle i Vierstra, 2004). Osnovna uloga ovog puta aktivacije je da konjugira ubikvitin preko izopeptidne veze između  $\alpha$ -kabrksilne grupe ubikvitinske okosnice i  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> skupine lizina proteina supstrata (Schrader i sur., 2009). Pojedinačne molekule ubikvitina se aktiviraju enzimom E1 koji formira tioestersku vezu sa C-terminalnim krajem ubikvitina uz utrošak ATP-a te ga prebacuje na enzim E2. Enzim E2 ima ulogu u prebacivanju aktiviranog ubikvitina na protein supstrat pomoću enzima E3 koji prepoznaje supstrat ili direktno prebacuje ubikvitin na supstrat bez pomoći enzima E3 (Smalle i Vierstra, 2004; Weissman, 2001). Ovaj ciklus se ponavlja nekoliko puta sve dok protein supstrat nije označen s minimalno četiri molekule ubikvitina (Thrower i sur., 2000) nakon čega se preusmjerava u proteasom 26S. Ukoliko se protein monoubikvitinira može

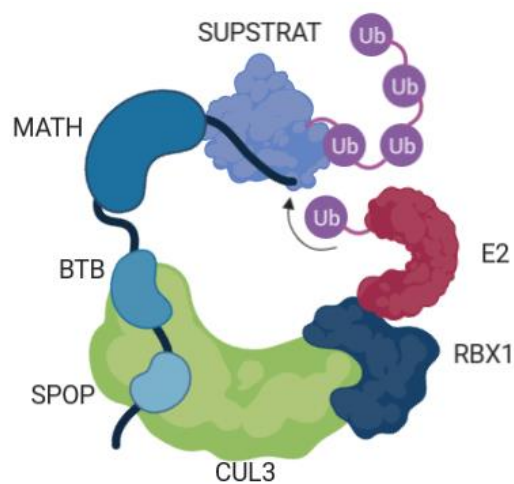
djelovati kao signal za popravak DNA i transport vezikula dok će samo poliubikvitinirani signal slati proteine prema proteasomu 26S (Johnson, 2002). Proteasom 26S je proteolitički kompleks veličine 2,5 MDa koji se sastoji od srži 20S i regulatornih jedinica 19S. Srž se sastoji od četiri heptamerna prstena (vanjski prsteni 2 $\alpha$  i unutarnji prsteni 2 $\beta$ ) koji čine cilindar sa središnjom šupljinom koja čini aktivno mjesto dok se regulatorne jedinice vežu na krajeve srži te im je svrha da prepoznaju poliubikvitinirani protein supstrat. Prilikom ulaska označenog proteina u šupljinu srži, protein se mora linearizirati nakon čega slijedi proteoliza (Smalle i Vierstra, 2004; Lowe i sur., 1995). Pojednostavljen mehanizam označavanja proteina supstrata ubiktivinskim lancem je prikazan na **Slici 1**.



**Slika 1.** Degradacija proteina ovisna o ubikvitinu. Ubikvitin se veže za enzim E1 uz utrošak ATP-a. Enzim E1 prebacuje ubikvitin na enzim E2. Enzim E2 u interakciji s enzimom E3 prebacuje ubikvitin na proteinski supstrat ili se direktno veže za supstrat bez pomoći enzima E3. Ciklus se ponavlja minimalno četiri puta nakon čega se poliubikvitinirani protein šalje u proteasom 26S na proteolizu (Izvor: Slika je izrađena u programu Biorender, <https://biorender.com/>).

Specifičnost ovog mehanizma u biljkama je predodređena jednom od 1500 vrsta ligaza E3 koja prepoznaje supstrat (Hua i Vierstra, 2011). Glavna komponenta E3 ligaza je domena RING (engl. *Really Interesting New Gene*) koja ima specifičnost prema enzimu E2 ili domena HECT (engl. *Homologous to E6-AP-C-Terminus*) (Huibregtse i sur., 1995). Ligaze E3 koje posjeduju domenu RING se dijele na pojedinačne domene kao što su COP1 (engl. *Constitutive Photomorphogenesis 1*), SINAT5 (engl. *Seven in Absentia in Arabidopsis Thaliana 5*), ARC1 (engl. *Arm Repeat-Containing 1*) koje se vežu direktno na supstrat kako bi ga ubikvitinirale te ligaze koje funkcioniraju u kompleksu sa ligazom E2 poput SCF (engl. *SKP1-CULLIN-F-box*), CUL3-BTB (engl. *Cullin 3 Bric a Brac, Tramtrack and Broad Complex/Pox Virus and Zinc*

*Finger*), CUL4-DDB1 (engl. *Cullin 4 UV-Damaged DNA Binding Protein 1*) i APC (engl. *Anaphase Promoting Complex*) (Moon i sur., 2004; Sharma i sur., 2016). Multimerne RING-ligaze, izuzev APC, sastoje se od središnjeg proteina kulina (1-4) koji je jednim krajem vezan za C-terminalnu regiju proteina skele i drugim krajem za adaptorsku molekulu koja prepoznaje supstrat i veže ga direktno. Proteini skele također vežu za svoj N-terminalni kraj enzime koji modificiraju supstrat, poput enzima E2 (Chen i sur., 2013). Jedan od takvih proteina skele je RBX1 (engl. *RING Box Protein 1*). RBX1 djeluje kao poveznica između CUL3 i enzima E2 koji ubikvitinira supstrat. U ovim tipovima ligaza, supstrat je direktno pozicioniran na adaptorski protein koji mora sadržavati domenu BTB/POZ. Domena BTB/POZ se veže N-terminalnim krajem za CUL3 dok sekundarne domene ovog proteina poput domene MATH (engl. *Meprin and TRAF [Tumor necrosis factor receptor-associated factor]*) imaju ulogu u vezanju ciljanog supstrata kako bi ga pozicionirali za prepoznavanje od strane enzima E2 (Gingerich i sur., 2005.; Chen i sur., 2013). Jedan od takvih adaptora ovisnom o kulinu u vrsti *A. thaliana* je protein AtBPM1. U sklopu ovog rada u proteinu AtBPM1 po prvi puta je izdvojena i domena SPOP (engl. *Speckle Type POZ*) koja je izvorno opisana kao subdomena domene BTB/POZ. Uloga domene SPOP je da zajedno sa domenom BTB veže kulin 3 (**Slika 2**). Radi lakšeg raspoznavanja u daljnjem radu domena BTB/POZ će označavati domenu BTB i SPOP, dok domena BTB samo domenu BTB odvojenu od domene SPOP.



**Slika 2.** Ligaza E3 koja posjeduje kompleks CUL3-BTB. Kulin 3 se veže za protein skele RBX1 koji pozicionira enzim E2 kako bi mogao ubikvitinirati supstrat. Supstrat je pozicioniran domenom MATH proteina BPM1, dok domene BTB i SPOP vežu kulin 3 (Izvor: Slika je izrađena u programu Biorender, <https://biorender.com/>).

## 1.2. Proteini MATH-BTB

Proteinska porodica MATH-BTB je velika skupina proteina koja se sastoji od N-terminalne domene MATH i C-terminalne domene BTB/POZ s motivom cinkovih prstiju (Weber i sur., 2005; Koonin i sur., 1992) iako postoje slučajevi gdje su pozicije ovih dviju domena zamijenjene ili se pojavljuju kao višestruke kopije (Zapata i sur., 2007). Ova skupina proteina je široko rasprostranjena među eukariotima uključujući i niže eukariote *Trypanosomatidae* (Euglenozoa) i *Coccidia* (Alveolata) te među višim eukariotima kao što su biljne skupine monokotiledona (*Liliopsidae*) i dikotiledona. Također se javljaju i u skupini metazoa (Zapata i sur., 2007). Genom uročnjaka sadrži 80 gena koji kodiraju proteine porodice BTB/POZ, a samo 6 gena koji kodiraju za proteine porodice MATH-BTB/POZ (Gingerich i sur., 2007). Ti proteini nazvani su AtBPM od (od **B**TB/**P**OZ-**M**A**T**H) i numerirani brojevima od jedan do šest. Svi članovi imaju konzervirane domene, a veličine im se kreću od 44 do 50 kDa sa 410 do 421 aminokiselinom. U *in vitro* uvjetima mogu formirati homo i heterodimere pomoću domena MATH i BTB/POZ, a protein AtBPM1 može uspostaviti interakciju s kulinima AtCUL3A i AtCUL3b domenom BTB/POZ dok domena MATH veže supstrate koji se ubikvitiniraju i šalje ih u proteolizu (Weber i sur., 2005). Osim što BPM1 može sudjelovati u degradaciji proteina ovisnom o ubikvitinu, potencijalno može vezati različite proteine te mijenjati njihovu aktivnost i položaj u stanici neovisno o njihovoj degradaciji. BPM1 se nalazi u citoplazmi gdje ima ulogu u usmjeravanju proteina u proteolizu pomoću proteasoma 26S, ali je lokaliziran i u jezgri gdje je vjerojatno uključen u procese koji se odvijaju u jezgri (Leljak Levanić i sur., 2012). Osim lokalizacije u citoplazmi i jezgri, proteini BPM se mogu nalaziti samo u citoplazmi (BPM4) ili samo u jezgri (BPM2) (Weber i Hellmann, 2009). Većina gena *BPM* je eksprimirana u svim organima, a najviša ekspresija javlja se u pupoljcima i cvijetovima dok je niža ekspresija u komušcima. Ekspresija gena *BPM1-3* je također uočena u peludnim zrcima (Lechner i sur., 2011). U genomu kukuruza (*Zea mays*) je dokazano postojanje 31 gena koji kodiraju proteine MATH-BTB/POZ. Jedan od njih, MAB1, eksprimiran u zigoti ima ulogu u regulaciji duljine diobenog vretena u mejozi i u identitetu jezgre tokom asimetrične diobe polenovog zrna (Juranić i sur., 2012). Riža kodira 67 proteina MATH-BTB/POZ te posjeduje 41 genomski lokus za koji se pretpostavlja da su pseudogeni MATH-BTB/POZ (Juranić i sur., 2012). Filogenetska analiza rižnih proteina MATH-BTB/POZ pokazala je grananje klada što je dokaz da se ovi proteini dijele u 2 grupe, manju koja je zajednička riži i uročnjaku te veću proširenu skupinu specifičnu za rižu (Gingerich i sur., 2005) te ostale vrste iz porodice trava (Juranić i Dresselhaus, 2014). Što se tiče životinjskih proteina MATH-BTB/POZ, otkriveno je da se

nalaze u jajnim stanicama i embrijima kod velikog broja organizama uključujući i čovjeka, a najviše su zastupljeni u genomu vrste *Caenorhabditis elegans* sa 50 gena (Thomas, 2006). U vrsti *Mus musculus* također se javlja barem 8 homologa proteina TDPOZ1 koji ima homologe u čovjeku, *C. elegans* i *Drosophila melanogaster*. Kod miša se proteini TDPOZ1 prepisuju za vrijeme razvoja embrija što ukazuje na važnost u diobi stanica i embrionalnom razvoju, dok se neki prepisuju nakon razvoja organa i tkiva (Huang i sur., 2009; Huang i sur., 2004).

### **1.2.1. Domena MATH**

Domena MATH je konzervirana domena pozicionirana bliže N-terminalnom kraju proteina BPM. Sastoji se od otprilike 180 aminokiselina koje čine 8  $\beta$ -naboranih ploča (Sunnerhagen i sur., 2002). Naziv MATH dolazi od homologije s C-terminalnim krajem proteina meprina A i B odnosno domene TRAF-C (engl. *Tumor Necrosis Factor-Receptor Associated Factor*, TNF-RAF; TRAF). Meprini pripadaju ekstracelularnim metaloproteazama koje sadrže visoku homologiju C-terminalnog kraja sa domenom TRAF-C dok su proteini TRAF regulatori i interaktivni partneri koji se vežu na receptore TNF. Proteini TRAF sastoje se od visokog udjela  $\beta$ -naboranih ploča koje se označavaju kao domena TRAF-C pa se ona često naziva MATH uslijed sličnog sastava (Marín, 2015). Osim što se domena MATH javlja u metaloproteinazama, česta je i kod proteina uključenih u citoplazmatski put prijenosa signala. Također kao dio proteina BPM, domena MATH sudjeluje u prepoznavanju i pozicioniranju supstrata kako bi se mogao ubikvitinirati enzimom E2 (Pintard i sur., 2003). Uz MATH-BTB/POZ, funkciju ubikvitin ligaza E3 posjeduju i protein TRAF te MATH-TRAF. Domena MATH najčešću interakciju uspostavlja sa domenom BTB/POZ, ali su zabilježene i interakcije s peptidazama, filaminom i domenom RluA. Osim što je ova domena prisutna u biljkama, javlja se i u proteinima protozoa te jednostaničnih gljivica kao i kod iridovirusa, ali nije otkrivena ni u jednom prokariotu (Zapata i sur., 2007).

### **1.2.2. Domena BTB/POZ**

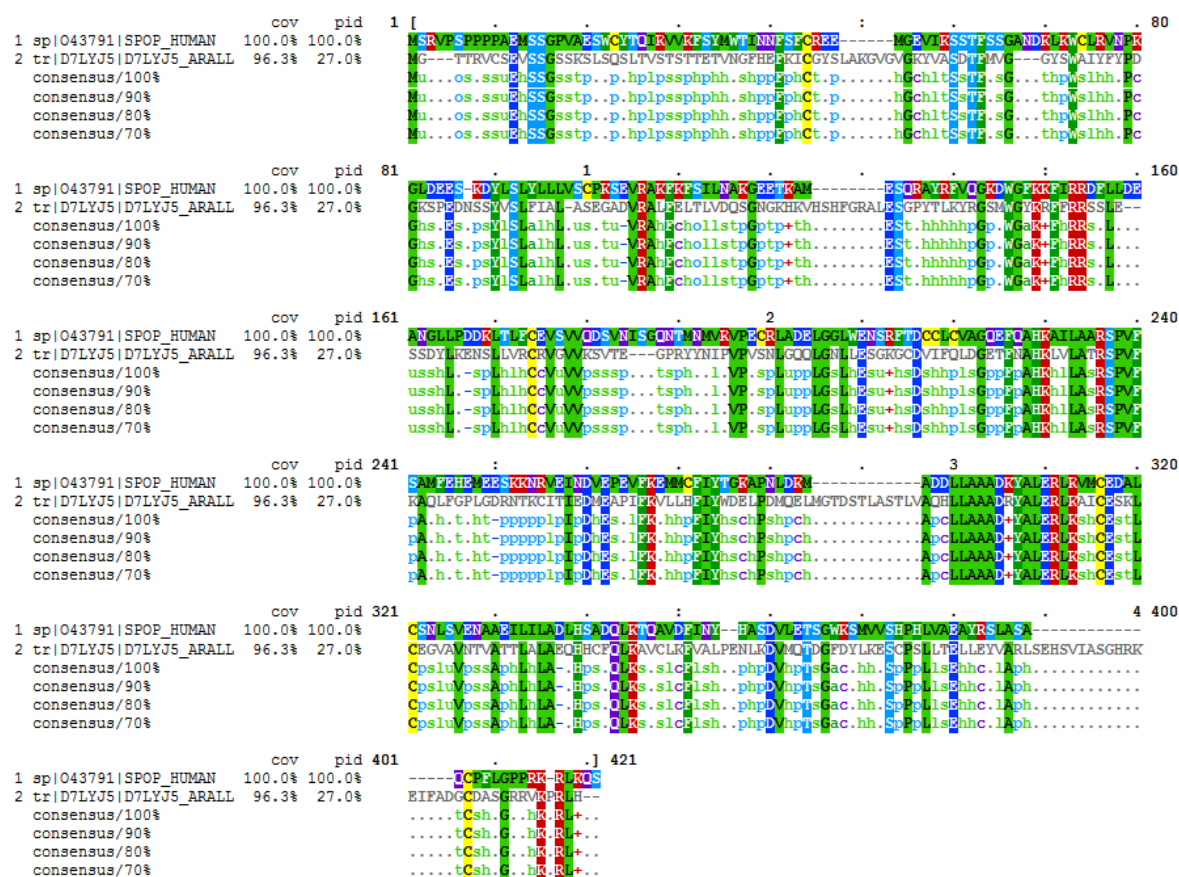
Domena BTB/POZ je konzervirana domena locirana bliže C-terminalnom kraju proteina BPM. Po prvi puta je identificirana u *D. melanogaster* kao motiv „bric a brac, tramtrack and broad“ kompleks transkripcijskih faktora kao i kod brojnih proteina poxvirusa koji posjeduju cinkove prste poput ZID, GAGA i ZF5 zbog čega dobiva naziv POZ (engl. *Pox virus and Zinc finger*) (Zollman i sur., 1994). Proteini koji imaju domenu BTB/POZ dijele se u više porodica, a dvije najvažnije su porodice BTB/POZ i MATH-BTB/POZ. Porodica BTB/POZ ima ulogu

kao supstrat-specifični adaptor CUL3 kompleksa E3 (Pintard i sur., 2003). Porodica MATH-BTB/POZ je jedna od nekoliko porodica u kojoj domena BTB stupa u interakciju s nekim drugim motivom kao što su npr. BTB/POZ-ZF (engl. *Zinc Finger*), BTB/POZ-BACK-Kelch (BBK), BTB/POZNPH3, BTB/POZ-BACK-PHR (BBP), BTB/POZ-ANK (engl. *Ankyrin*) i Rho-BTB/POZ (Stogios i sur., 2005). Domena BTB/POZ osim što ima ulogu u putu degradacije proteina ovisnom o ubikvitinu, djeluje i na transkripcijsku represiju (Ziegelbauer i sur., 2001), regulaciju citoskeleta (Ziegelbauer i sur., 2001), tetramerizaciju te zatvaranje ionskih kanala (Minor i sur., 2000). Proteini BTB/POZ se općenito mogu klasificirati u dvije grupe, a to su oni koji sudjeluju u protein-protein interakcijama i oni koji reguliraju transkripciju vezanjem za molekulu DNA. Domena BTB/POZ sačinjena je od otprilike 100 aminokiselina od kojih je konzervirano 10 hidrofobnih aminokiselina u unutrašnjosti dok su vanjske varijabilne. Javlja se u jednoj ili dvije kopije u kombinaciji s prethodno navedenim domenama, a većinom je pozicionirana na N-terminalnoj domeni porodice BTB/POZ. Osnovna struktura sastoji se od 5  $\alpha$ -zavojnica iza kojih slijedi trolančana  $\beta$ -naborana ploča. Također može formirati homo i heterodimere, ali i homotetramerne interakcije s drugim proteinima (Stogios i sur., 2005). Iako se javlja u brojnim skupinama proteina, BTB/POZ je izrazito konzervirana domena. U istraživanju struktura domena BTB/POZ X-kristalografijom pokazano je da ima visokosrodnu sekvencu proteinima BTB-ZF, Skp1, elonginu C i kalijevom kanalu T1 (T1-Kv) iako nemaju istu sekundarnu strukturu niti ulogu (Stogios i sur., 2005). Što se tiče porodice MATH-BTB/POZ, BTB/POZ domena je uglavnom pozicionirana na C-terminalnom kraju proteina uz dodatak od 75 do 100 aminokiselina koje čine  $\alpha$ -zavojnice. Evolucijski domena BTB/POZ se ne javlja u arheobakterijama ni u bakterijama osim u vrsti *Candidatus protochlamidya* za koju se smatra da je ishodište ove domene koja je nastala nakon odvajanja eukariota (Horn i sur., 2004).

### 1.2.3. Domena SPOP

Protein BPM1 se sastoji od domena MATH koja se sastoji od 135 aminokiselina i BTB/POZ sa 183 aminokiselina. Na temelju komplementarnosti s ljudskim proteinom SPOP, domena BTB/POZ se po prvi put odvojila na dvije domene, domenu BTB duljine od 118 aminokiselina i domenu SPOP koju sačinjava 64 aminokiselina (Leljak-Levanić, nepublicirano). Domene BTB i SPOP odvojene su jednim glicinom na položaju 311. Prema poravananju sekvenca ljudskog proteina SPOP i AtBPM1, sličnost sekvenca je samo 27%, ali su ključne aminokiseline očuvane unutar slijeda domene SPOP i proteina SPOP pa je po njemu dobila naziv (**Slika 3**).

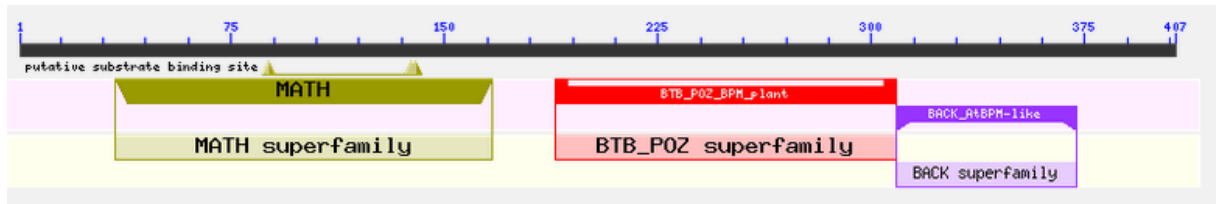




**Slika 3.** Poravnanje sekvence AtBPM1 sa sekvencom ljudskog proteina SPOP. Ukupna sličnost sekvence je 27%, a konzervirane aminokiseline su označene istim bojama. Poravnanje je rađeno u programu: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>.

Ljudski protein SPOP je supstrat-specifični adaptor CUL3 kao i BPM1 kod biljaka. Veličine je 42 kDa te ima očuvane konzensusne sekvence koje čine domene N-terminalnu MATH, BTB/POZ te domenu 3-box iza čega slijedi nuklearna lokalizacijska sekvenca. Protein SPOP veže kulin 3 preko domene BTB na području  $\alpha$ 3- $\beta$ 4 omče, a dodatan par  $\alpha$ -zavojnica iza domene BTB, 3-box, ima ulogu u pojačavanju interakcije proteina SPOP i CUL3 te u oligomerizaciji (Zhuang i sur., 2010). U literaturnim podacima, domena SPOP proteina BPM1 se označava kao C-terminalna „BACK“ domena (**Slika 4**) te se opečnito gleda kao dio BTB/POZ domene (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Uloga domene SPOP je da zajedno s domenom BTB stupa u interakciju s kulinom 3 te da sudjeluje u homooligomerizaciji, a konzensusno i prema položaju odgovara domeni 3-box proteina SPOP što bi potencijalno značilo da domena SPOP pojačava interakciju proteina BPM1 i CUL3 kao što to omogućava 3-box proteinu SPOP. Bioinformatička istraživanja predlažu da svi proteini MATH-BTB/POZ i BTB/POZ-Kelch koji nemaju domenu 3-box potencijalno nisu adaptori CUL3 kao što je protein BTB/POZ12 što

dodatno potvrđuje teoriju da protein BPM1 ima domenu 3-box, odnosno domenu SPOP s obzirom da pripada skupini adaptora CUL3 (Zhuang i sur., 2010).



**Slika 4.** Prikaz konzerviranih domena proteina BPM1. Zelenom bojom je prikazana domena MATH, crvenom domena BTB, a ljubičastom domena BTB-BACK koja je u ovom radu nazvana domenom SPOP. Domena BTB-BACK se u svim literaturnim podacima zajedno sa domenom BTB/POZ naziva samo BTB/POZ. Izvor: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

### 1.3. Interakcijski partneri proteina BPM1

BPM1 ima nekoliko dokazanih interakcijskih partnera uz CUL3 koji pripadaju u skupinu transkripcijskih faktora kao što su DREB2A (engl. *Dehydration-Responsive Element Binding 2A*) (Morimoto i sur., 2017), HB6 (engl. *Homeobox Protein 6*) (Lechner i sur., 2011), WR11 (engl. *Wrinkled 1*) (Weber i Hellman, 2009), MYB56 (engl. *MYB Domain Protein 56*), ERF1 (engl. *Ethylene-Responsive Transcription Factor 1*) (Chen i sur., 2013), ERF4 (engl. *Ethylene-Responsive Transcription Factor 4*) (Chen i sur., 2013) i RAV1 (engl. *AP2/ERF and B3 Domain-Containing Transcription Factor*) (Chen i sur., 2013). RAV1, ERF1 i ERF4 su transkripcijski faktori iz skupine AP2/ERF koji su vezani uz odgovor na razinu etilena u stanici. BPM1 interagira sa članovima AP2/ERF preko svoje domene MATH, a kontrolira njihovu razinu tako da interferira s njihovim afinitetom prema DNA te se predlaže mehanizam da ih u konačnici šalje na degradaciju ovisnu o ubikvitinu (Weber i Hellman, 2009). S obzirom da ERF1 sudjeluje i u signalnom putu aktiviranim jasmonatom, njegova regulacija utječe na obrambeni mehanizam od patogena i biljojeda. U većim razinama ERF1 je dokazan da povećava otpornost uročnjaka na patogene poput *Botrytis cinerea* i *Plectosphaerella cucumerina* tako da njegovim smanjenjem ekspresije u prisustvu proteina BPM1 pada i obrambeni mehanizam biljke (Lorenzo i sur., 2003).

Jedan od snažnih BPM1 interaktora koji pripada skupini AP2/ERF je protein DREB2A (Morimoto i sur., 2017). DREB2A ili CBF (engl. *Crepeat Binding Factor*) je glavni faktor koji regulira gensku transkripciju u sušnim stresnim uvjetima neovisnima o prisustvu abscizinske kiseline (engl. *Abscissic Acid*, ABA) te u stresnim uvjetima visokog saliniteta i topline (Sakuma i sur., 2006). Kako bi DREB2A bio transkripcijski aktivan, regulira se na posttranslacijskoj

razini kako bi se stabilizirao, a unutar njegove strukture se nalazi i negativna regulatorna domena (NRD) bogata aminokiselinama prolinom, glutamatom, serinom i treoninom. Uklanjanje ove domene potiče konstitutivnu stabilnost DREB2A te je takva forma poznata kao DREB2A CA koja potiče prekomjernu ekspresiju ciljnih gena i povećava otpornost na stres no utječe i usporavanje rasta te formacije patuljastih biljaka uslijed čega se njegova ekspresija strogo mora kontrolirati (Sakuma i sur., 2006). DREB2A interagira s proteinom BPM1 u jezgri pomoću domene NRD kojom se veže za domenu MATH proteina BPM1 (Sakuma i sur., 2006; Morimoto i sur., 2017). Kada se javlja temperaturni ili sušni stres, DREB2A se stabilizira pri čemu djeluje kao transkripcijski faktor nakon čega se degradira pomoću proteina BPM1 kako se ne bi inhibirao rast biljke (Morimoto i sur., 2017).

WRI1 je član transkripcijskih faktora AP2/EREBP (engl. *Apetala 2/Ethylene-Responsive Element Binding Protein*) koji pozitivno regulira biosintezu ulja u biljkama. Naziv je dobio prema formaciji smežuranih biljnih mutanata koji nastaju uslijed njegove mutacije (Maeo i sur., 2009). Triacilgliceridi koje regulira WRI1 se nakupljaju u sjemenci tokom ranog embrionalnog stadija u fazi maturacije. Formira dvije varijante nastale alternativnim prekrajanjem, a to su RcWRI1-A i RcWRI1-B koje imaju razliku u okviru čitanja od 9 pb. RCWRI1-A ekspresija javlja se u cvijetovima, listovima, perikarpu i razvijajućim sjemenkama, a RCWRI1-B samo u sjemenkama (Ji i sur., 2018; Maeo i sur., 2009). Osim uloge u sintezi triacilglicerida, sudjeluje u glikolizi gdje potiče transkripciju gena vezanih uz ovaj metabolički put, a također veže i gene vezane uz fotosintezu i razgradnju škroba čime ih utišava (Maeo i sur., 2009; Grimberg i sur., 2015). Istraživanja temeljena na imunoprecipitaciji i kopurifikaciji dokazuju da je WRI1 interakcijski partner proteina BPM1 u uvjetima *in vitro* i *in planta*. Njihova interakcija potiče destabilizaciju supstrata, pa je BPM1 negativni regulator proteina WRI1 tako da ga usmjerava u degradaciju putem proteasoma 26S. WRI1 ima mehanizam regulacije degradacije koji ga sakriva od interakcije s proteinom BPM1 kada je to potrebno. Mehanizam se bazira na vezanju 14-3-3 fosfopeptid-vezajućih proteina koji interferiraju s proteinom BPM1 vežući se na aktivno vezajuće mjesto WRI1 (Zhai i sur., 2017).

Osim što BPM1 veže proteine vezane uz biljni odgovor na razinu etilena, dokazano je da veže i transkripcijski faktor MYB56 vezan uz regulaciju cvjetanja. MYB56 je negativni regulator proteina FT (engl. *Flowering Locus T*) koji je jedan od glavnih aktivatora cvjetanja (Chen i sur., 2015). Osim što utječe na cvjetanje, kontrolira i veličinu sjemenke uročnjaka što je dokazano mutantima koji su formirali manje sjemenke u odnosu na divlji tip, dok prekomjerna ekspresija potiče stvaranje većih sjemenka. Mutacijom *myb56* smanjuje se broj stanica vanjskog omotača sjemena dok se taj broj povećava pojačanom ekspresijom gena

(Zhang i sur., 2013). MYB56 pripada obitelji transkripcijskih faktora R2R3-MYB te interagira sa svih 6 proteina BPM (Chen i sur., 2015). BPM1 usmjerava MYB56 u degradaciju putem proteasoma 26S što znači da je BPM1 pozitivan regulator cvjetanja jer uklanja negativan regulator proteina FT (Chen i sur., 2015).

Osim interakcije s transkripcijskim faktorima koje usmjerava prema proteasomu 26S, BPM1 može imati i druge funkcije ovisno o mjestu lokalizacije. U citoplazmi usmjerava proteine prema degradaciji dok u jezgri potencijalno regulira procese neovisne o degradaciji (Leljak-Levanić i sur., 2012). Obzirom da proteini kao što su DMS3 (engl. *Defective in Meristem Silencing 3*) i RDM1 (engl. *RNA-Directed DNA Methylation 1*) koji sudjeluju u putu DNA metilacije usmjerene pomoću RNA (engl. *RNA-Dependant DNA Methylation*, RdDM) kolokaliziraju u prostoru jezgre (Gao i sur., 2010), a njihova interakcija s proteinom BPM1 je dokazana (Bauer i sur., 2014; Rendulić, 2018; Tokić, 2019) postoji mogućnost da protein BPM1 u putu RdDM ima ulogu neovisnu o interakciji s CUL3.

### 1.3.1. Transkripcijski faktor HB6

Protein HB6 pripada skupini I transkripcijskih faktora HD-ZIP (engl. *Homeodomain Leucine Zipper*) koji su uključeni u regulaciju biljnog odgovora na ABA-u. ABA ima ulogu u prilagodbi biljaka na vodeni, solni i temperaturni stres (Leung i Giraudat, 1998). Neke od biljnih prilagodba u ovim situacijama uključuju zatvaranje puči kako bi se spriječio nepotreban gubitak vode, inhibicija rasta i prilagodba ekspresije gena. Regulacije ABA-e važna je i tijekom razvoja sjemenke i niskog vodenog potencijala te maturacije sjemenke (Busk i Pagès, 1998). Razina ABA-e je negativno regulirana fosfatazom PPC2CA kodiranom genima *ABI1* i *ABI2* što je dokazano mutantima *abi1* i *abi2* koji imaju smanjenu reakciju na razinu ABA-e. *ABI1* i *ABI2* vjerojatno djeluju putem negativnog mehanizma povratne sprege u signalnom putu regulacije ABA-e (Merlot i sur., 2001). Ukoliko je razina ABA-e niska, fosfataza PP2C će defosforilirati protein kinaze koje dalje fosforiliraju transkripcijske faktore za transkripciju gena ovisnih o ABA-i. U prisustvu ABA-e, ona će blokirati aktivnost fosfataze PP2C te će početi transkripcija gena ovisnih o ABA-i (Miyazono i sur., 2009). Transkripcijski regulator HB6 je ciljna molekula fosfataze *ABI1* te se razina HB6 povećava količinom ABA-e u sušnom stresu (Söderman i sur., 1999). HB6 djeluje negativno na ekspresiju ABA-e u stanicima. Dok ABA stabilizira i povećava razinu njegovu ekspresiju, HB6 djeluje u mehanizmu povratne sprege te regulira količinu ABA-e kako se ne bi eksprimirala prevelika količina čime bi biljka trajno zaustavila rast (Lechner i sur., 2011). Interakcija proteina HB6 i BPM1 je dokazana u sustavu dvaju kvašćevih hibrida (engl. *Yeast Two Hybrid*) te kopurifikacijom (Lechner i sur., 2011). BPM1 interagira sa

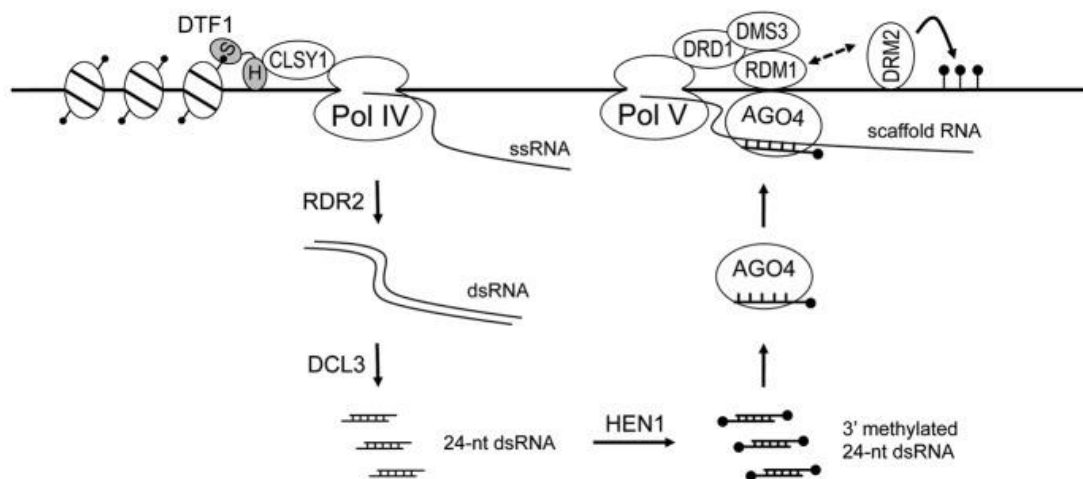
domenom leucinskog zatvarača proteina HB6, ali ne i sa homodomenom pa može potencijalno potaknuti interferencije s homo ili heterodimerizacijama. Regulacija proteina HB6 također je regulirana preko CUL3 vezajuće uloge proteina BPM1 koji ga reusmjerava prema proteasomu 26S (Lechner i sur., 2011).

## 1.4. DNA metilacija usmjerena pomoću RNA

Transkripcijsko gensko utišavanje (engl. *Transcription Gene Silencing*, TGS) usmjereno molekulom RNA je čest proces koji se javlja u gljivama, biljkama i životinjama. Glavna uloga mu je u utišavanju transpozona, održavanju genske stabilnosti i identiteta stanice te u obrani od stranih nukleinskih kiselina (Castel i Martienssen, 2013). Kod biljaka je TGS usmjeren molekulom RNA u putu DNA metilacije usmjerene pomoću RNA (RdDM) (Sanger i sur., 1994). RdDM je epigenetski put *de novo* metilacije citozina molekule DNA u biljkama. Mehanizam puta RdDM je usko povezan uz biogenezu malih nekodirajućih molekula RNA (engl. *Non-coding RNA*, ncRNA) koje se još zovu i male interferirajuće molekule RNA (engl. *Small Interfering RNA*, siRNA). One su u većini eukariotskih sustava formirane pomoću DNA ovisne RNA polimeraze II (Pol II) no u biljaka su generirane pomoću Pol II, Pol IV i Pol V (Zhang i sur., 2013). Molekule siRNA većinom imaju konzerviranu duljinu od 21 do 24 nukleotida, a stupaju u interakciju s proteinima Argonaut (AGO) koji imaju katalitičku ulogu pomoću koje cijepaju mRNA u procesu RNA-utišavanja. Osim što protein AGO može imati enzimatsku funkciju, može djelovati i kao kalup koji privlači enzime za degradaciju homologne nukleinske kiseline za koju se veže molekula siRNA, ali može stupiti u interakciju i s proteinima koji modificiraju DNA (Aufsatz i sur., 2002). Klasično, TGS uključuje formiranje dvolančane molekule RNA (engl. *Double Stranded RNA*, dsRNA) koja se procesira putem proteina Dicera u male molekule siRNA koje stupaju u interakciju s ribonukleaznim kompleksom, najčešće proteinom AGO koji uzima samo jedan lanac siRNA te ju vodi prema ciljanom mjestu degradacije mRNA (Bernstein, i sur., 2001). Drugi tip TGS-a je RdDM koji uključuje promjene na genomu.

Put RdDM se bazira na aktivnosti transkripcijske mašinerije Pol IV i V. Pol IV se veže za molekulu DNA pomoću faktora remodeliranja kromatina ovisnog o ATP-u CLASSY1 (CLSY1) koji veže homeodomenu proteina DTF1 (engl. *DNA Transcription Factor 1*) vezanog domenom SAWADEE za metilirane histone. Nakon generacije jednolančane molekule RNA (engl. *Single Stranded RNA*, ssRNA) putem Pol IV, Pol II transkribira ssRNA i formira dsRNA koja se dalje cijepa pomoću proteina DCL3 (engl. *Dicer-Like 3*) u male molekule siRNA

veličine od 24 nukleotida sa duljim 3' krajem metiliranim pomoću proteina HEN1 (engl. *Hua Enhancer 1*). Metilirane siRNA se vežu za protein AGO4 ili AGO6 koji razdvaja lance i veže samo jedan lanac formirajući efektorski kompleks (Smith i sur., 2007). Takav kompleks (AGO4 i siRNA) putuju prema jednolančanoj RNA koju generira Pol V. Ta jednolančana RNA čini okosnicu za koju se komplementarno veže siRNA. Protein AGO4 privlači kompleks DDR koji je dobio naziv po prvim slovima proteina koji ga čine, DMS3, DRD1 (engl. *Defective in RNA-Directed DNA Methylation*) i RDM1. DRD1 je faktor remodeliranja kromatina ovisan o ATP-u, DMS3 je kohezinski tip proteina, a RDM1 ima aktivnost vezanja molekule ssDNA. Ukoliko kompleks DDR nije prisutan u blizini molekule DNA, Pol V se ne može pravilno vezati za DNA. RDM1 također ima ulogu u privlačenju proteina AGO4. Kada su svi proteini pravilno vezani, RDM1 privlači i asocira s metiltransferazom DRM2 (engl. *Domain Rearranged Methyltransferase 2*) koja katalizira metilacije CG, CHG i CHH. Također faktor SPT5L/KTF1 (engl. *SPT5-Like/Kow Domain-Containing Transcription Factor 1*) se veže za transkript nastao pomoću Pol V neovisno o interakciji s proteinom AGO kao dodatan stabilizator kompleksa, a proteinski kompleks IDN2-IDP vezan za Pol V transkripte privlači kromatin remodelirajući kompleks SWI/SNF (Zhang i sur., 2012; Zhu i sur., 2013). Pojednostavnjeni mehanizam puta RdDM je prikazan na **Slici 5**.



**Slika 5.** DNA metilacija usmjerena pomoću RNA. RNA Polimeraza IV vezana preko proteina CLSY1 sintetizira ssRNA koju RNA-ovisna DNA Polimeraza II prepisuje u dsRNA. dsRNA se procesira pomoću proteina DCL3 koji formira 24-nt molekule dsRNA. One se metiliraju na 3' kraju pomoću proteina HEN1 te se vežu kao jednolančane molekule za protein AGO4. AGO4 se pozicionira za molekulu DNA te komplementarno veže molekulu ssRNA formiranu putem Pol V pomoću molekule siRNA. PolV se pozicionira za molekulu DNA pomoću kompleksa DDR koji se sastoji od proteina

DMS3, DRD1 i RDM1, a RDM1 dodatno pozicionira AGO4 za molekulu DNA. Novoformirani kompleks DDR privlači metilirajući kompleks DRM2 koji mijenja *de novo* metilirani obrazac molekule DNA. Izvor: Zhang i sur. (2013).

Put RdDM ima glavnu ulogu u kontroli transpozona, obrane od patogena, odgovora na stres, unutar i izvanstanične komunikacije, reprodukciju i stvaranje epialela (Zemach i sur., 2013). Nedavna istraživanja su pokazala da protein BPM1 interagira s proteinima DMS3 i RDM1 (Rendulić, 2018; Tokić, 2019) te da djeluje kao potencijalni negativni regulator puta RdDM kako bi održao homeostazu *de novo* metilacije koja djeluje na prethodno navedene procese, ali točan mehanizam djelovanja nije još poznat. Osim spomenutih komponenta, u put RdDM je uključeno puno više proteina, ali nisu sve funkcije poznate (Lorković i sur., 2012).

#### **1.4.1. RNA polimeraza IV i V**

RNA polimeraze ovisne o DNA su holoenzimi koji se sastoje od katalitičke i nekatalitičke regulatorne regije. Biljke kao i ostali eukarioti posjeduju 3 glavna tipa: Pol I, Pol II i Pol III no otkriveno je da biljke posjeduju i dvije neobavezne polimeraze, Pol IV i Pol V (Zhou i Law, 2015). Pol IV i V se razlikuju po strukturi i funkciji od Pol II. Sve polimeraze imaju srž od 12 podjedinica od kojih je oko pola podjedinica konzervirano u sve tri polimeraze dok su jedinstvene domene od Pol IV i Pol V nastale nezavisnom duplikacijom još prije postojanja kopnenih biljaka što govori o tome da imaju zajedničkog pretka. Pol IV i V imaju istu veliku podjedinicu srži, NRPD/E2 te svaka ima još jednu jedinstvenu najveću podjedinicu NRPD1 odnosno NRPE1 (Ream i sur., 2009). Također podjedinice NRPD1 i NRPE1 nemaju konzerviranu domenu CTD unutar koje se nalazi omča koja regulira funkciju polimeraze kao što to ima Pol II unutar svoje najveće domene NRPB1 (Ream i sur., 2014). Pol V ima regiju koja formira AGO-omču kojom interagira s proteinom AGO4 u procesu DNA metilacije. Iako se AGO-omča javlja i u CTD domeni Pol II, sekvenca AGO-omče Pol V razlikuje se od Pol II što je dokaz nagle evolucije kojom je regija CTD izgubila originalnu funkciju (Haag i sur., 2014). Što se tiče nekatalitičkih jedinica, od 10 polimeraznih podjedinica, četiri podjedinice su jedinstvene u Pol IV i V u odnosu na Pol II, a pola njih se razlikuju međusobno između Pol IV i V pa su ovo vjerojatno ključne regije koje definiraju uloge ovih polimeraza. Uloga Pol V je da zajedno sa svojim transkriptima služi kao okosnica za koju se veže protein AGO4 koji onda privlači i veže dodatne faktore puta RdDM kako bi se uspostavila DNA metilacija (Wierzbicki i sur., 2008). Za razliku od Pol V, Pol IV je potrebna za produkciju gotovo više od 90% 24 nukleotidnih molekula miRNA u *A. thaliana* te se predlaže mehanizam kojim ova

polimeraza stvara dugačke ssRNA koje služe kao supstrati za stvaranje molekula siRNA. Hipoteze predlažu da uz Pol IV u sinergiji djeluju i nepoznate specijalizirane molekule RNA koje procesiraju i stvaraju molekule siRNA (Li i sur., 2015). S obzirom da se Pol IV i V ne vežu za promotore u putu RdDM, one se pozicioniraju na molekulu DNA putem interakcije s kromatinom. Pol V se veže pomoću kompleksa DDR i metil-DNA vezajućih proteina SUVH2 i SUVH9 (engl. *SU(VAR)3-9 homolog*) (Law i sur., 2010) dok se Pol IV veže preko proteina SHH1 (engl. *Sawadee Homeodomain Homolog*) koji prepoznaje metilaciju H3K9 na molekuli DNA (Law i sur., 2011).

#### **1.4.2. Kompleks DDR**

Kompleks DDR je interakcijski kompleks proteina DMS3, DRD1 i RDM1, a ima ulogu u odmatanju molekule DNA u putu RdDM i održavanju strukture ssDNA kako bi se mogla vezati Pol V. Potencijalni mehanizam kojim kompleks DDR odmata strukturu je vezan uz svojstva kompleksa DDR, a to su aktivnost translokaze DNA ovisna o ATP-u, mogućnost vezanja za ssDNA i kohezinska svojstva vezanja lanca DNA (Haag et al., 2014). Iako je glavna uloga kompleksa DDR da veže i pozicionira Pol V za molekulu DNA, moguće je da ima ulogu i u regulaciji njene aktivnosti (Zhong i sur., 2012). Članovi kompleksa DDR se vežu za dvije intragenomske regije, IGN5 i MEA-ISR kako bi pomogli u produkciji Pol-V nekodirajućih RNA, a DRD1 i DMS3 također usmjeravaju vezanje PolV na nekoliko intragenomskih lokusa te potencijalno potiču njenu aktivaciju koja je ovisna o interakciji s kompleksom DDR (Wierzbicki i sur., 2009). Protein DRD1 kao član kompleksa DDR interagira i s Pol IV i Pol V te regulira DNA metilaciju usmjerenu pomoću siRNA potičući formiranje epigenetskih modifikacija i održavanje heterokromatina. Pripada skupini remodulatora kromatina SWI/SNF (Kanno i sur., 2008). Zajedno s Pol V održava epigenetičko egzogeno utišavanje transgeničnog transkribirajućeg obrnuto-ponavljajućeg utišavatelja (*exo-Pdsi*) kako bi regulirao akumulaciju dsRNA i time spriječio prekomjerno utišavanje aktivnih gena putem puta RdDM. Također pokazano je da je i jedan od glavnih medijatora kod smanjenja metilacije kada se uklanja induktor utišavanja. Osim ovih uloga, bitan je i u održavanju dugih terminalnih ponavljanja transpozonskih elemenata, transkripcijske represije određenom pericentromeričnim ponavljanjima kondenzacijom histona H3 na lizinu 9 dimetilacijom te u poticanju bazalne rezistencije nekrotrofičnih gljivičnih patogena *P. cucumerina* putem metilacije i/ili demetilacije (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q9SIW2> uključujući i reference unutar web-linka).



DMS3 je drugi član kompleksa DDR u putu RdDM. DMS3 kodira za protein koji je slične forme kao domena šarke proteina SMC (engl. *Structural Maintenance of Chromosomes*) kojem nedostaje domena ATP što implicira da DMS3 ima ulogu kao arhitektonski protein koji potencijalno može povezati nukleinske kiseline i potaknuti epigenetske modifikacije pomoću molekule siRNA (Kanno i sur., 2008; Lorković i sur., 2012). Reguliran je aktivnošću gena APC/C (engl. *Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome*) koji potiče formiranje kompleksa DDR. APC/C je negativni regulator koji označava DMS3 i šalje ga u degradaciju što je pokazano u mutantima *apc/c* i *polv* gdje je ekspresija proteina DMS3 naglo porasla što je potaknulo destabilizaciju signala u putu RdDM i smanjeno vezanje Pol V za DNA, a to je dokaz da se DMS3 mora nalaziti u idealnoj koncentraciji kako bi potaknuo vezanje Pol V. APC/C je kompleks koji se sastoji od više podjedinica koji potiče prelazak iz metafaze u anafazu ciljajući supstrate koje ubikvitinira i šalje u proteolizu te djeluje kao i većina ubikvitin ligaza E3 iz RING obitelji gdje ima ulogu kao okosnica koja veže specifični supstrat i enzim E2 koji ubikvitinira supstrat. Stoga se predlaže mehanizam degradacije proteina DMS3 putem ubikvitinacije preko APC/C koji ga šalje prema proteasomu 26S, a njegova ekspresija je regulirana u ovisnosti o staničnom ciklusu (Capron et al., 2003; Zhong i sur., 2012). Preliminarna istraživanja predlažu i potencijalni negativni regulator protein BPM1 koji također pripada skupini proteina koji imaju ulogu kao okosnica vezanja enzima E2, ali se pretpostavlja da on regulira ekspresiju DMS3 neovisno o proteolizi putem proteasoma 26S već neutralizacijom kompleksa DMS3 i RDM1 ili reusmjeravanjem na novu genomsku poziciju.

DMS3 interagira i s proteinom DMS11 koji nije član kompleksa DDR. DMS11 u interakciji s DMS3 simulira ATP-aznu aktivnost proteina DMS3 pa je predložena hipoteza da ova dva proteina kada interagiraju u *in vivo* uvjetima formiraju analog proteina SmcHD1 u *A. thaliana* koji ima domenu ATP-aze GHKL (engl. *Gyrase, Hsp90, Histidine Kinase, MutL*) (koju ima DMS11) i SMC domenu (koji liči proteinu DMS3) (Lorković i sur., 2012).

RDM1 ili DMS7 je posljednji član kompleksa DDR koji sudjeluje u putu RdDM. Pripada biljno specifičnim proteinima koji osim s članovima kompleksa DDR interagira s Pol II, AGO4 i metiltransferazom DRM2. Ima jednu konzerviranu regiju DUF1950, a uočena je i regija koja formira hidrofobni džep koji potiče formaciju homodimera što je esencijalno za njegovu funkciju (Sasaki i sur., 2014). Sastoji se od 163 aminokiseline, a osim domene DUF1950 nema nijednu drugu prepoznatljivu konzerviranu regiju. Osim što interagira s Pol II u jezgri, dokazano je da interagira i s Pol V u perinuklearnom prostoru. Mutacijom metionina M50A otkriveno je da je RDM1 glavni interaktor koji privlači metiltransferazu DRM2 i protein AGO4 čime povezuje čitav put RdDM (Gao i sur., 2010). Također kao protein koji ima sposobnost

vezanja ssDNA, vjerojatno se nalazi u područjima DNA replikacije ili transkripcijskim regijama što dodatno pokazuje njegova lokalizacija u nukleoplazmi što je kasnije potvrđeno i zajedničkom kolokalizacijom između RDM1 i Pol II (Gao i sur., 2010). Iako mu je točan mehanizam djelovanja nepoznat, pretpostavlja se da u interakciji s proteinima DRD1 i DMS3 otvara replikacijske rašlje nakon čega se vežu homodimeri RDM1 zajedno s proteinom AGO i metiltransferazom DRM2 koja potiče promjenu metilacijskog obrasca (Sasaki i sur., 2014). Ukoliko se uspostave mutanti *rdm1* povećava se akumulacija 24 nukleotidnih siRNA, smanjuje se metiliranost DNA i gubi se transkripcijsko utišavanje na lokusima za koje se vjeruje da su kontrolirani putem RdDM (Gao i sur., 2010).

## 1.5. Cilj rada

Prema preliminarnim i objavljenim istraživanjima (Rendulić, 2018; Tokić, 2019) dokazano je da protein BPM1 interagira s proteinima DMS3 i RDM1, članovima puta RdDM čija je unutarstanična lokalizacija vezana uz staničnu jezgru (Gao i sur., 2010). Na temelju navedenih interakcija te činjenice da se protein BPM1 osim u citoplazmi nakuplja i u jezgri postavljena je hipoteza o funkciji proteina BPM1 u metilaciji DNA mehanizmom RdDM. Prema njoj najvjerojatnija funkcija proteina BPM1 u RdDM-u bila bi eliminacija proteina DMS3 i RDM1 proteasomskom degradacijom posredovanom kulinom 3. Obzirom na izostanak kolokalizacije kulina 3 i proteina BPM1 u području jezgrice, postoji mogućnost mehanizama neovisnima o kulinu 3 (Leljak-Levanić i sur., 2012) u kojim protein BPM1 svojom interakcijom s transkripcijskim faktorima sudjeluje pri lokalizaciji kompleksa DMS3-RDM1 na genomu i pozicioniranju metilacijskog kompleksa RdDM-a.

Kako bi se navedene hipoteze provjerile, cilj ovog rada bio je utvrditi koja domena proteina BPM1, MATH, BTB ili SPOP ostvaruje interakciju s proteinima DMS3 i RDM1 paralelno s provjerom interakcija pojedinih domena BPM1 s već dokazanim interakcijskim partnerom transkripcijskim faktorom HB6 (Lechner i sur., 2011).

U tu svrhu bilo je potrebno konstruirati plazmide koji nose gene za rekombinantne proteine BPM1 i njihove delecijske varijante obilježene odgovarajućim privjeskom (His ili GST), te optimizirati postupke ekspresije navedenih fuzijskih varijanti proteina BPM1 i histidinom obilježenih proteina DMS3, RDM1 i HB6 te njihovo pročišćavanje iz ekspresijskih bakterijskih sojeva. Konačni cilj je bio provjeriti interakciju proteina DMS3, RDM1 i HB6 s proteinom BPM1 i njegovim delecijским varijantama metodom kopurifikacije „jedan na jedan“ te usporediti afinitet vezanja pojedinih interakcijskih partnera za svaku domenu proteina BPM1.

## 2. MATERIJALI I METODE

### 2.1. MATERIJALI

#### 2.1.1. Bakterijski sojevi

U istraživanju su korišteni kompetentni sojevi bakterije *Escherichia coli* za kloniranje gena i indukciju proteina. Sojevi korišteni za kloniranje su XL10-Gold® Ultracompetent Cells (Stratagene), Stellar™ Competent Cells (Clontech) i NEB 5-alpha (New England BioLabs), dok su za transformaciju ekspresijskim plazmidom i indukciju proteina korišteni sojevi Rosetta™ (DE3) (Novagen MSDS) i BL21 (DE3) (New England BioLabs). Svi bakterijski sojevi uzgajani su na 37 °C u tekućem ili krutom mediju LB s odgovarajućim antibioticima.

#### 2.1.2. Bakterijski mediji za rast

##### 2.1.2.1. Mediji LB, 2 × YT, 4 × YT i TB

Medij LB (Luria Bertani) (pH = 7,0) korišten je za rast bakterija. Kruti medij LB sadrži 15 g/L agara. Uz medij LB korišteni su mediji 2 × YT (pH = 7,0), 4 × YT (pH = 6,8-7,0) (engl. 2 × ili 4 × *Yeast Tryptone*) i TB (engl. *Terrific Broth*) (pH = 7,2). Sastavi medija su prikazani u **Tablici 1**. Mediji su autoklavirani 20 min na temperaturi od 121 °C i pri tlaku od 1,5 bara. Za selekciju uzgoja bakterija soja Rosetta (DE3) korišten je kloramfenikol (Chl) u konačnoj koncentraciji od 0,034 mg/mL dok su za selekciju plazmida korišteni antibiotici ampicilin (Amp) u konačnoj koncentraciji od 0,1 mg/mL ili kanamicin (Kan) u konačnoj koncentraciji od 0,05 mg/mL.

**Tablica 1.** Sastavi medija LB 2 × YT, 4 × YT i TB. Vrijednost glicerola izražena je u mL/L dok su ostale vrijednosti izražene u g/L.

Sastav	LB	2 × YT	4 × YT	TB
Tripton	10	16	32	12
Ekstrakt kvasca	5	10	20	24
NaCl	10	5	5	-
Glicerol	-	-	-	4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	-	2,31
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	-	-	12,54

### 2.1.2.2. Medij SOC

Medij SOC (engl. *Super Optimal Broth with Catabolic Repression*) (5 g/L ekstrakt kvasca, 20 g/L tripton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> i MgSO<sub>4</sub>, 20 mM glukoza) korišten je za oporavak bakterija nakon transformacije toplinskim šokom na 42 °C. Medij je autoklaviran 20 min na temperaturi od 121 °C i pri tlaku od 1,5 bara.

### 2.1.3. Nukleotidne sekvence gena

Genska sekvenca gena *BPM1* preuzeta je iz baze podataka TAIR (engl. *The Arabidopsis Information Resource*, <https://www.arabidopsis.org/>) pod notacijom AT5G19000.1. Sekvenca kodirajuće DNA (engl. *coding sequence*, CDS) *BPM1* korištena je za konstrukciju ekspresijskih plazmida sa delecijским varijantama proteina BPM1 u programu SnapGene Viewer (Version 4.1.6., GSL Biotech).

### 2.1.4. Plazmidi

Plazmidi pET-28a(+)-DMS3 (Lorković i sur., 2012), pET-28a(+)-RDM1 i pPROEx-Htb-HB6 (Tokić, 2019) koji kodiraju za protein DMS3, RDM1 i HB6 s His-privjeskom bili su dostupni u laboratoriju. Vektorske mape su prikazane u dodacima (**Prilog Slika I.**). Za dobivanje proteina GST korišten je protein pGEX-4T-1 (Amersham) također dostupan u laboratoriju.

Plazmidi pET-53-DEST-BPM1 (N. Bauer, nepublicirano) i pGEX-4T1-BPM1 (N. Bauer, nepublicirano) korišteni su za dobivanje delecijских varijanti BPM1 s His- ili GST-privjeskom. Plazmidi s delecijским varijantama proteina His-BPM1 su dobiveni metodom mjesno specifične mutageneze, a plazmidi s delecijским varijantama proteina GST-BPM1 tehnikom kloniranja pomoću T4 ligaze (sekcija 2.2.8.).

### 2.1.5. Početnice

Početnice korištene za konstrukciju pET-53-DEST i pGEX-4T-1 sa željenim delecijama MATH, BTB i SPOP proteina BPM1 prikazane su u **Tablici 2.** In-Fusion početnice (InF fw i InF rev) konstruirane su u programu Clontech In-Fusion Cloning Tool. In-Fusion početnice za kloniranje delecija BPM1 u plazmid pGEX-4T-1 dodatno sadrže i restrikcijsko mjesto BamHI te se mogu koristiti u metodi kloniranja In-Fusion i u metodi kloniranja tehnikom ligacije. Početnice attB1BPM1 fw i BPM1-STOPattB2 rev (N. Bauer) (**Tablica 2.**) korištene su u svrhu provjere uspješnosti transformacije bakterija s plazmidima koji imaju ugrađenu sekvencu

*BPM1* ili njegove delecije varijante ( $T_a = 58\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $t_e = 1\text{ min}$ ). In-Fusion *DMS3*, *HB6* i *RDM1* početnice (M. Jagić) korištene su za provjeru uspješnosti transformacije bakterija ( $T_a = 58\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $t_e = 1:30\text{ min}$ ). Početnice su priređene kao  $100\text{ }\mu\text{M}$  otopine. Radna otopina početnica pripremljena je u redestiliranoj vodi (Mili-Q<sup>®</sup>) u konačnoj koncentraciji  $10\text{ }\mu\text{M}$ . Matične i radne otopine početnica skladištene su na  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .

**Tablica 2.** Sekvence svih korištenih početnica i odgovarajuće veličine fragmenta dobivenih nakon reakcije PCR. Podcrtan slijed nukleotida je ekvivalentan restrikcijom mjesta enzima BamHI.

Naziv početnice	Nukleotidna sekvenca početnice (5'-3')	Veličina fragmenta (pb)
<b>Konstrukcija pET-53-DEST-BPM1 delecija</b>		
MATHdel fw	GGTGTGGTGAAGTCAGTTACGGAGGG	5996
MATHdel rev	GACTGTTTCTGTGGTAGAGGTCGATACC	
BTBdel fw	GGGGTTGCCATAAACACGGTTGCAAC	6047
BTBdel rev	CTGTTGTCCCAAGTTAGAACTGGCAC	
SPOPdel fw	CTAAGTGAACACTCTGTTATAGTATCTGG	6209
SPOPdel rev	CCCTTCACAGAGTTTGGACTCACAGATT	
<b>Konstrukcija pGEX-4-T-1 BPM1 delecija</b>		
InF_BPM1_GEX fw	GGTTCCGCGTGGATCCATGGGCACAACACTAGGGTCTGCTCGG	856 <sup>a</sup>
InF_BPM1_GEX rev	CCCGGGAATTCCGGGGATCCTCAGTGCAACCGGGGCTTCACTCG	897 <sup>b</sup> 1069 <sup>c</sup>
<b>Provjera uspješnosti transformacije</b>		
attB1BPM1 fw	ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGGCACAACACTAGGGTC	869 <sup>a</sup> 920 <sup>b</sup>
BPM1-STOPattB2 rev	ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGTGCAACCGGGGCTTCAC	1082 <sup>c</sup> 1274 <sup>d</sup>
InF_HB6 fw	GAATTCCCGGGGATCCTGATGAAGAGATTAAGTAGTTTCAAG	936
InF_HB6 rev	GCAGGTCGACGGATCCTCAATTCCAATGATCAACGGTG	
InF_DMS3 fw	GGTTCCGCGTGGATCCATGTATCCGACTGGTCAACA	1263
InF_DMS3 rev	GTTCGACCCGGGAATTCTCATCTGGGTGTGTTTCAATTGG	
InF_RDM1 fw	ATCACAAGTTTGTACGAATTCATGCAAGCTCAATGACAATGGAAC	492
InF_RDM1 rev	TGTACAAGAAAGCTGGAATTCTCATTTCTCAGGAAAGATTGGG	

Početnice InF\_BPM1\_GEX fw i InF\_BPM1\_GEX rev te početnice attB1BPM1 fw i BPM1-STOPattB2 vežu se za početak i kraj gen *BPM1* i veličine umnoženih fragmenata ovise o ciljanom fragmentu: BPM1 $\Delta$ MATH<sup>a</sup>, BPM1 $\Delta$ BTB<sup>b</sup>, BPM1 $\Delta$ SPOP<sup>c</sup> i BPM1<sup>d</sup>.

## 2.1.6. Aminokiselinske sekvence proteina

Program ExPASy Translate tool (<https://web.expasy.org/translate>) korišten je za dobivanje aminokiselinske sekvence proteina na temelju sekvenca gena koji kodiraju za fuzijske proteine. Proteinske sekvence fuzijskih proteina analizirane su koristeći ProtParam tool (<https://web.expasy.org/protparam/>) te su dobivene sljedeće vrijednosti: broj aminokiselina (N),

molekulska masa proteina (Mr) u kDa, izoelektrična točka (pI), faktor nestabilnosti (engl. *instability index*, II) i faktor topivosti u vodi (engl. *aliphatic indeks*, AI). U **Tablici 3** nalaze se vrijednosti prethodno navedenih karakteristika svih fuzijskih proteina, te samog proteina GST bez privjeska.

**Tablica 3.** Teoretske vrijednosti aminokiselinskog broja (N), molekulske mase (Mr), izoelektrične točke (pI), faktora nestabilnosti (II) i faktora topivosti u vodi (AI) za proteine korištene u ovom istraživanju.

<b>His fuzijski protein</b>	<b>N</b>	<b>Mr / kDa</b>	<b>pI</b>	<b>II</b>	<b>AI</b>
His-BPM1	444	49,04	7,62	31,72	86,71
His-BPM1 $\Delta$ MATH	309	33,94	6,56	35,68	93,69
His-BPM1 $\Delta$ BTB	326	35,99	9,01	34,05	79,79
His-BPM1 $\Delta$ SPOP	380	41,98	8,04	29,48	81,29
His-DMS3	442	49,08	7,26	40,14	81,2
His-HB6	339	38,39	4,88	70,34	65,31
His-RDM1	198	22,38	5,91	60,76	68,94
<b>GST fuzijski protein</b>	<b>N</b>	<b>Mr / kDa</b>	<b>pI</b>	<b>II</b>	<b>AI</b>
GST-BPM1	633	71,02	6,54	33,41	89
GST-BPM1 $\Delta$ MATH	498	55,92	6,00	36,33	93,96
GST-BPM1 $\Delta$ BTB	548	61,55	8,08	33,79	87,52
GST-BPM1 $\Delta$ SPOP	569	63,96	6,61	32,1	85,64
<b>Protein bez privjeska</b>	<b>N</b>	<b>Mr / kDa</b>	<b>pI</b>	<b>II</b>	<b>AI</b>
GST	232	26,98	6,18	37,39	87,41

## 2.1.7. Pufferi

### 2.1.7.1. PBS

Pufer 1  $\times$  PBS (engl. *Phosphate-Buffered Saline*) (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 7,3) korišten je u svrhu ispiranja membrane od primarnog odnosno sekundarnog antitijela u metodi hibridizacije po Westernu, ispiranju nekih bakterijskih taloga tokom procesa indukcije proteina i ispiranju glutation sefarnih kuglica kod pročišćavanja proteina i u metodi kopurifikacije.

### 2.1.7.2. TAE

Za izradu agaroznih gelova i elektroforezu DNA korišten je pufer 1  $\times$  TAE (engl. *Tris-HCl Acetate Ethylenediaminetetraacetic acid*) (40 mM Tris-HCl, pH = 8,3, 1 mM EDTA).

### 2.1.7.3. 5 × SLB

Kod pripreme proteinskih uzoraka za nanošenje na poliakrilamidni gel korišten je pufer 5 × SLB (engl. *Sample Loading Buffer*) (125 mM Tris-HCl pH = 6,8, 4% SDS (engl. *Sodium Dodecyle Sulfate*), 32% glicerol, 10% β-merkaptoetanol (β-ME), 0,01 % bromfenol-plavo).

### 2.1.7.4. Puferi za pročišćavanje His označenih proteina

Za pročišćavanje His označenih proteina korišteno je nekoliko pufera. Puferi LyB1 ili LyB2 (engl. *Lysis Buffer* 1 ili 2) korišteni su za lizu bakterijskih stanica kako bi se oslobodili proteini iz stanica. Za ispiranje proteina koji se ne mogu vezati za nikal nitrilotriocetnu agaroznu (engl. *Nickel Nitrilotriacetic Agarose*, Ni-NTA) matricu (Qiagen) korišteni su puferi WB1-WB3 (engl. *Wash Buffer* 1-3). Pufer EB (engl. *Elution Buffer*) je korišten za eluciju His označenih proteina sa Ni-NTA matrice. Sastavi pufera prikazani su u **Tablici 4**.

**Tablica 4.** Sastav puferskih otopina za sonikaciju bakterija korištenih kod pročišćavanja His označenih proteina.

Sastav	LyB1	LyB2	WB1	WB2	WB3	EB
HEPES* pH = 7,45	-	250 mM	-	-	-	-
Tris-HCl, pH = 8	50 mM	-	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM
KCl	-	300 mM				
NaCl	300 mM	-	1 M	500 mM	50 mM	50 mM
β-ME (Sigma)	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	-
Imidazol	10 mM	-	20 mM	10 mM	10 mM	500 mM
Triton-X 100	0,50%	-	-	-	-	-
Glicerol	-	5%	-	-	-	-
Lizozim (Sigma)	1 mg/mL	1 mg / mL	-	-	-	-
Fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF)	1 mM	1 mM	-	-	-	-

\* HEPES (engl. *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*) je zwitterionski pufer baziran na sulfoničnoj kiselini.

### 2.1.7.5. Puferi za pročišćavanje GST označenih proteina

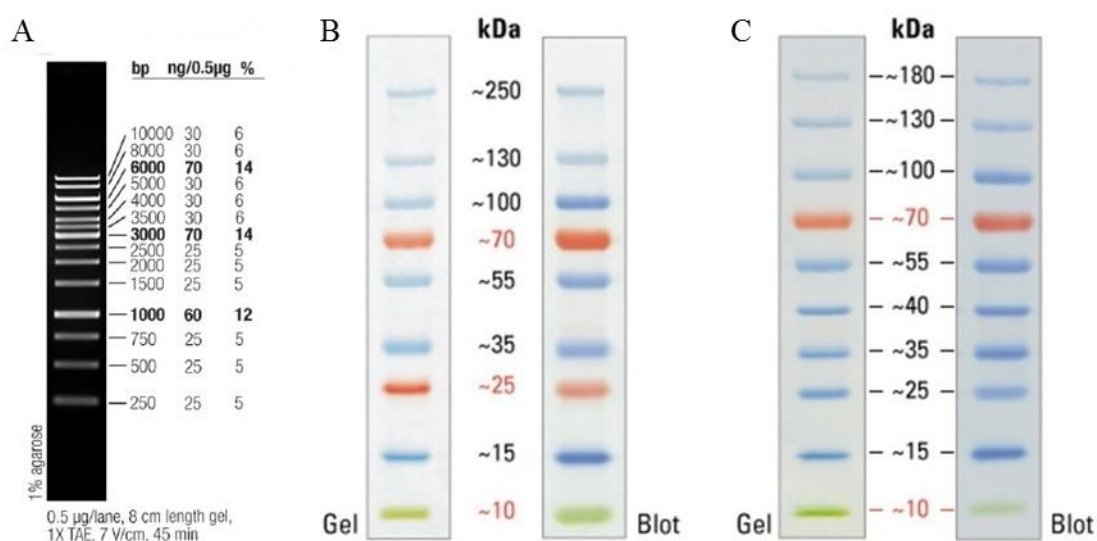
Za pročišćavanje GST označenih proteina korišten je pufer za lizu bakterijskih stanica LyB3 (engl. *Lysis Buffer* 3). Za ispiranje proteina koji se ne mogu vezati za glutation sefarozne (engl. *Glutathione Sepharose* 4B (GE Healthcare 17075601) kuglice korišteni su puferi W1-W3 (engl. *Wash* 1-3). Sastavi pufera prikazani su u **Tablici 5**.

**Tablica 5.** Sastav puferских otopina za sonikaciju bakterija korištenih kod pročišćavanja GST označenih proteina.

Sastav	LyB3	W1	W2	W3
1 × PBS	100%	100%	100%	100%
NaCl	-	-	0,5 M	-
Tween 20	-	0,05%	-	-
Triton-X 100	0,10%	-	-	-
Lizozim (Sigma)	1 mg/mL	-	-	-
Fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF)	1 mM	-	-	-

## 2.1.8. Proteinski i DNA molekularni standardi

Za analizu DNA nakon agarozne gel elektroforeze korišteni su molekularni standard Gene Ruler 1 kb (Thermo Scientific) (**Slika 6A**), a za analizu proteina nakon SDS-PAG (engl. *SDS Polyacrilamide Gel*) elektroforeze, proteinski molekularni standardi PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder 10-250 kDa (Thermo Scientific) (**Slika 6B**) odnosno PageRuler™ Prestained Protein Ladder 10-180 kDa (Fermentas) (**Slika 6C**).



**Slika 6.** Molekulski standardi za provjeru veličine molekule DNA odnosno proteina. A) Gene Ruler 1 kb (Thermo Scientific), B) PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder 10-250 kDa (Thermo Scientific), C) PageRuler™ Prestained Protein Ladder 10-180 kDa (Fermentas).

## 2.2. METODE

### 2.2.1. Priprema prekonocne bakterijske kulture

Prekonocne bakterijske kulture pripremao sam iz pojedinačnih kolonija s krutog medija ili iz matičnih bakterijskih otopina. S krutog medija pojedinačne kolonije su sterilnom čačalicom



prebačene u 3 mL tekućeg medija LB uz dodatak odgovarajućeg antibiotika. Za regeneraciju prekonoćne kulture 300  $\mu$ L stare prekonoćne kulture inokulirano je u 5 mL svježeg tekućeg medija LB s odgovarajućim antibiotikom. Bakterije se inkubiraju preko noći na 37 °C uz trešnju, a drugi dan se spremaju na 4 °C.

### **2.2.2. Priprema kemijski kompetentnih bakterijskih stanica**

Kompetentne stanice *E. coli* BL21 (DE3) i Rosetta (DE3) za transformaciju s ekspresijskim plazmidom pripremio sam kemijskom metodom upotrebom kalcijeva klorida. Koristeći matične otopine (50:50 = glicerol:bakterijska suspenzija) navedenih bakterija pripremljene su prekonoćne bakterijske kulture u 3 mL tekućeg medija LB bez antibiotika za soj BL21 (DE3) ili s dodatkom Chl za soj Rosetta. Bakterije su rasle preko noći uz trešnju na 37 °C. U 35 mL tekućeg medija LB bez antibiotika inokulirano je 350  $\mu$ L prekonoćne kulture. Bakterije su rasle uz trešnju na 37 °C otprilike 3 h do optičke gustoće (engl. *Optical Density*, OD) vrijednosti 0,35 – 0,7. Bakterijski talog je skupljen centrifugiranjem 5 min na 1000 rcf na 4 °C (Sigma 3K30, 11390/13150R ) te resuspendiran u 10 mL sterilnog ledeno hladnog 75 mM CaCl<sub>2</sub>. Nakon toga bakterije su inkubirane na ledu 10 min te ponovno centrifugirane kao i u prethodnom koraku. Bakterijski talog je resuspendiran u 3,5 mL (1/10 početnog volumena) sterilne ledeno hladne otopine sastava: 75 mM CaCl<sub>2</sub> i 15% glicerol. Resuspendirane bakterije alikvotirane su po 100  $\mu$ L u 1,5 mL mikroepruvete i zamrznute u tekućem dušiku te pohranjene na -80 °C.

### **2.2.3. Transformacija bakterijskih stanica toplinskim šokom**

Transformaciju kemijski kompetentnih bakterija radio sam metodom toplinskog šoka. Kompetentnim stanicama dodan je 1-5  $\mu$ L (10 pg-100 ng) odgovarajućeg plazmida te su inkubirane na ledu 30 min. Nakon toga transformacijska smjesa je izložena 45 s toplinskom šoku u vodenoj kupelji (42 °C) i odmah prebačena na led na 90 s. Nakon inkubacije na ledu dodano je 500  $\mu$ L medija SOC predgrijanog na 37 °C. Bakterije su inkubirane 1 h na 37 °C uz trešnju da se regeneriraju i umnože. Transformanti su selektirani na ploči s krutim medijem LB uz odgovarajući antibiotik.

### **2.2.4. Provjera uspješnosti transformacije bakterija**

Uspješnost transformacije plazmidnom DNA provjerio sam metodom lančane reakcije polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR). Kao DNA kalup korištene su direktno kolonije sa krute LB ploče ili prekonoćne kulture. DNA kalup iz prekonoćne kulture

pripremljen je na način da se 100  $\mu\text{L}$  bakterija centrifugira 2 min na sobnoj temperaturi (engl. *Room Temperature*, RT, 14 000 rcf), ukloni tekući medij LB i resuspendira bakterijski talog u 100  $\mu\text{L}$  sterilne vode. Resuspendirane bakterije inkubirane su 5 min na 95 °C. Sastav reakcije PCR razlikovao se ovisno o vrsti DNA polimeraze. U **Tablici 6** su prikazani volumeni reagensa i uvjeti reakcije ovisno o vrsti korištenih reagensa. Sve reakcije PCR provedene su u uređaju GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems).

**Tablica 6.** Sastav jedne reakcijske smjese PCR ukupnog volumena 25  $\mu\text{L}$  i uvjeti reakcije.

Reagens	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Uvjeti reakcije
EmeraldAmp® MAX PCR Master Mix 10 $\times$ (Takara)	12,5	98 °C 3 min <b>98 °C 10 s</b> <b>T<sub>a</sub> (* °C) 30 s</b> <b>72 °C t<sub>e</sub> († min)</b> 72 °C 2 min 4 °C $\infty$
Uzvodna početnica (10 $\mu\text{M}$ )	0,5	
Nizvodna početnica (10 $\mu\text{M}$ )	0,5	
H <sub>2</sub> O	9,5	
Kalup	2	
		} 40 $\times$
Reagens	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Uvjeti reakcije
Taq Buffer (10 $\times$ ) s KCl (Fermentas)	5	95 °C 2 min <b>95 °C 30 s</b> <b>T<sub>a</sub> (* °C) 1 min</b> <b>72 °C t<sub>e</sub> († min)</b> 72 °C 5 min 4 °C $\infty$
dNTP mix (10 mM) (Fermentas)	0,5	
MgCl <sub>2</sub> (25 mM) (Fermentas)	2,5	
Uzvodna početnica (10 $\mu\text{M}$ )	0,5	
Nizvodna početnica (10 $\mu\text{M}$ )	0,5	
GoTaq® DNA Polymerase (Promega)	0,1	
H <sub>2</sub> O	14,9	
Kalup	2	
		} 40 $\times$

\* Temperatura vezanja početnica T<sub>a</sub> (engl. *Temperature Annealing*) se računa kao T<sub>m</sub> (engl. *Melting Temperature*) – 5 °C. T<sub>m</sub> se računa po formuli  $T_m = T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$  gdje A, T, G i C predstavljaju broj dušičnih baza početnica.

† Vrijeme elongacije (t<sub>e</sub>, engl. *Elongation Time*) na 72 °C ovisi o duljini očekivanog produkta (1 kb/min).

## 2.2.5. Elektroforeza u agaroznom gelu

Za analizu DNA koristio sam horizontalnu agaroznu elektroforezu (RunOne™ System, Embi Tec). Agarozni gel (1%) napravljen je u 1  $\times$  TAE puferu. Po potrebi uzorci su pomiješani sa 6  $\times$  DNA Loading Dye (Thermo Scientific) prije nanošenja na gel. Elektroforeza je provedena u 1  $\times$  TAE puferu 2 min pri naponu od 25 V, a zatim 20 min na 100 V. Nukleinske kiseline su detektirane koristeći 10 ng/L otopinu etidij bromida (EtBr) koji se interkalira u dvolančanu molekulu DNA te su vizualizirane UV svjetlom uz ekspoziciju od 2 s (Kodak EDAS 290).

## 2.2.6. Izolacija plazmidne DNA

Plazmidnu DNA sam izolirao iz prekonocnih bakterijskih kultura koristeći komercijalni paket Wizard<sup>®</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) prema uputama proizvođača. Dva mililitra prekonocne kulture centrifugirana su 5 minuta (RT) na 14 000 rcf (Eppendorf 5415R). Talog je resuspendiran u 250 µL Cell Resuspension Solution te je dodano 250 µL Cell Lysis Solution. Nakon toga dodano je 10 µL Alkaline Protease Solution te 350 µL Neutralization Solution. Uzorak je centrifugiran 10 min (RT) na 14 000 rcf. Nakon centrifuge, 850 µL supernatanta nanoseno je na kolonu (engl. *Spin Column*) koja se nalazila u epruveti za sakupljanje eluata (engl. *Collection Tube*). Nakon centrifugiranja (1 min, RT, 14000 rcf) kolona je isprana dva puta sa 750 µL te 250 µL Wash Solution (uz dodatak EtOH). Kolona je prebačena na novu 1,5 mL mikroeprevetetu. Plazmid je eluiran sa kolone pomoću 50 µL vode oslobođene od nukleaza uz inkubaciju od 15 min na 37 °C. Nakon inkubacije eluat je skupljen centrifugiranjem (1 min na 14000 rcf na RT) te je ponovljen korak eluacije. Koncentracija i čistoća plazmida izmjerena je spektrofotometrijski na uređaju Nanodrop2000 (Thermo Scientific). Plazmidi su provjereni restrikcijskom digestijom i sekvenciranjem (Macrogen, Europa, Amsterdam).

## 2.2.7. Restrikcijska digestija molekule DNA

Provjeru restrikcijskom digestijom molekule DNA sam koristio u kloniranju metodom ligacije te prilikom analize konstruiranih plazmida.

Jednostruka restrikcija rađena je s BamHI, EcoRI ili XbaI (FastDigest, Thermo Scientific). U reakcijsku smjesu dodano je 1 µL restrikcijskog enzima, 2 µL 10 x FastDigest Green pufera (Thermo Scientific), 1 µg plazmida (ili 0,5 µg PCR produkta) te H<sub>2</sub>O do 20 µL. Reakcijska smjesa inkubirana je 1 h na 37 °C. Nakon digestije enzim je inaktiviran 5 min na 80 °C.

U slučaju dvostruke restrikcije korišteni su restrikcijski enzimi EcoRI (FastDigest, Thermo Scientific) i Mlu NI (Roche). DNA je prvo pocijepana s EcoRI kako je opisano u prethodnom poglavlju te pročišćena NucleoSpin<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel). Nakon toga DNA je pocijepana s Mlu NI restrikcijskim enzimom u puferu A (Roche) 2 h na 37 °C. Enzim je inaktiviran 20 min na 65 °C.

Dvostruka digestija je rađena i sa enzimima XbaI (Fermentas) i Eco130I (Thermo Scientific Scientific) u puferu 10 x Tango (Thermo Scientific). Cijepanja su provedena uzastopno 3 h na 37 °C nakon čega su enzimi inaktivirani 20 min na 65 °C.

Veličine dobivenih fragmenta provjerene su na agaroznom gelu.

## 2.2.8. Konstrukcija delecijjskih varijanti gena *BPM1*

Plazmid pET-53-DEST-BPM1 (N. Bauer, nepublicirano) korišten je kao kalup za dobivanje delecijjskih varijanti BPM1 proteina s His-privjeskom uvođenjem ciljano specifičnih delecija domena MATH, BTB i SPOP. Plazmidi dobiveni metodom mjesno specifične mutageneze su služili kao DNA kalupi za umnožavanje inserta u metodi kloniranja tehnikom ligacije u svrhu dobivanja delecijjskih varijanta gena *BPM1* ukloniranih u plazmid pGEX-4T-1-BPM1 (N. Bauer, nepublicirano). Kloniranje ligacijom podrazumijeva da DNA insert i lineariziran plazmidni kalup imaju iste ljepljive krajeve koji se mogu spojiti T4 ligazom. Vektorske mape ovih plazmida su prikazane u prilogu (**Prilog Slika III.**). Plazmidi konstruirani u ovo radu prikazani su u **Tablici 7.**

**Tablica 7.** DNA kalupi i početnice korištene za konstrukciju ekspresijskih plazmida.

Privjesak	Konstrukt	Kalup	Metoda	Početnice		
His	BPM1 $\Delta$ BTB	pET-53-DEST-BPM1	Mjesno specifična mutageneza	BTBdel fw		
				BTBdel rev		
				MATHdel fw		
	BPM1 $\Delta$ MATH	pET-53-DEST-BPM1		MATHdel rev		
				BPM1 $\Delta$ SPOP	pET-53-DEST-BPM1	SPOPdel fw
						SPOPdel rev
GST	BPM1 $\Delta$ BTB	pET-53-DEST-BPM1 $\Delta$ BTB	Ligacija	InF_BPM1_GEX fw InF_BPM1_GEX rev		
	BPM1 $\Delta$ MATH	pET-53-DEST-BPM1 $\Delta$ MATH				
	BPM1 $\Delta$ SPOP	pET-53-DEST-BPM1 $\Delta$ SPOP				

### 2.2.8.1. Konstrukcija delecijjskih varijanti gena *BPM1* obilježenih His-privjeskom

Plazmid pET-53-DEST-BPM1 je umnožen u bakterijskom soju *E. coli* XL10-Gold® Ultracompetent Cells (Stratagene) i provjeren restriksijskom analizom enzimima XbaI i EcoRI (nije prikazano). Delecijjske varijante proteina BPM1 s His-privjeskom u plazmidu pET-53-DEST sam konstruirao metodom mjesno specifične mutageneze (engl. *Site Directed Mutagenesis*). U tu svrhu korišten je Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (New England BioLabs). Za deleciju domena MATH, BTB i SPOP iz BPM1 kao kalup korišten je pET-53-DEST-BPM1 te početnice koje prepisuju cijeli plazmid osim željenih domena gena *BPM1* (engl. *Back to Back Primers*). Reakcijska PCR smjesa sastojala se od Q5® Hot Start High-Fidelity 1  $\times$  Master Mix , 0,5  $\mu$ M uzvodne i 0,5  $\mu$ M nizvodne početnice

(MATH/BTB/SPOPdel fw i rev, **Tablica 2**), 10 ng pET-53-DEST-BPM1 i vode oslobođene od nukleaza. Uvjeti reakcije PCR bili su sljedeći: početna denaturacija 98 °C 30 s, 25 ciklusa ponavljanja denaturacije na 98 °C 10 s, prijanjanja početnica na 69 °C 30 s i elongacije na 72 °C 3 min i 10 s. Završna elongacija je provedena na 72 °C 2 min, nakon čega su uzorci bili ohlađeni na 4 °C.

Uspješnost umnažanja delecijskog produkta provjerena je agaroznom gel elektroforezom, nakon čega je uslijedila reakcija KLD (engl. *Kinase Ligation DpnI*). Reakcijska smjesa KLD je bila sastava: 1 µL dobivenog delecijskog produkta PCR reakcije, 5 µL pufera 2 × KLD Reaction Buffer, 1 µL enzima 10 × KLD Enzyme Mix i 3 µL vode oslobođene od nukleaza. Smjesa KLD inkubirana je 5 min (RT). Transformacija *E. coli* NEB 5-alpha (50 µL) provedena je s 5 µL ligacijske smjese KLD kako je opisano u poglavlju 2.2.2. uz izmjenu duljine toplinskog šoka na 42 °C na 30 s i inkubacije na ledu 5 min nakon čega je dodano 950 µL SOC medija (New England BioLabs) umjesto 500 µL. Uspješno transformirane bakterije selektirane su na krutom mediju LB s Amp.

Sva tri dobivena plazmida (pET-53-DEST-BPM1ΔBTB, pET-53-DEST-BPM1ΔMATH, pET-53-DEST-BPM1ΔSPOP) izolirana su prema prethodno navedenom protokolu izolacije plazmida. Plazmid pET-53-DEST-BPM1ΔSPOP provjeren je restrikcijskom analizom enzimima Eco130I i XbaI te PCR produkt BPM1ΔSPOP enzimom XbaI nakon čega su poslani na sekvenciranje (Macrogen, Europa, Amsterdam).

## **2.2.8.2. Konstrukcija delecijskih varijanti gena *BPM1* obilježenih GST-privjeskom**

### **2.2.8.2.1. Linearizacija kalupa pGEX-4T-1-BPM1**

Kalup u koji sam ugradio delecijске fragmente gena *BPM1* je bio pGEX-4T-1-BPM1 koji je umnožen u bakterijskom soju *E. coli* Stellar™ Izrezivanje cjelovitog gen *BPM1*, a linearizacija kalupa ostvarena je FD restrikcijskim enzimom BamHI (Thermo Scientific) kako je ranije opisano. Linearizirani kalup direktno je pročišćen iz restrikcijske smjese pomoću NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel). Na 20 µL pGEX-4T-1-BPM1 restrikcijske smjese dodano je 30 µL H<sub>2</sub>O i 100 µL pufera NTI te je sve nanoseno na kolonu. Nakon centrifuge 30 s na 11000 rcf (RT) (Eppendorf 5415R) kolona je isprana dva puta sa 700 µL pufera NT3 uz centrifugiranje. Kolona je prebačena na 1,5 mL mikroeprevetu te je linearizirani kalup eluiran sa kolone pomoću 30 µL pufera NE predgrijanog na 70 °C. Nakon inkubacije od 5 min (70 °C) eluat je sakupljen centrifugiranjem 1 min na 11000 rcf (RT).

#### **2.2.8.2.2. Defosforilacija linearizirane plazmidne DNA**

Pročišćeni BamHI linearizirani plazmid ima komplementarne ljepljive krajeve. Kako bi izbjegli neželjenu cirkularizaciju praznog plazmida provedena je reakcija defosforilacije koja uklanja 5' fosfatnu skupinu i time sprečava spajanje 5'-P i 3'-OH kraja molekule DNA. Reakcijska smjesa za defosforilaciju je bila sastava: 1  $\mu$ L (1 U) alkalne fosfataze (engl. *Alkaline Phosphatase, Shrimp, Roche*), 3,2  $\mu$ L defosforilacijskog pufera (engl. *Dephosphorylation Buffer* 10  $\times$ ) (Matična otopina: 0.5 M Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH = 8,5) i 150 ng pročišćenog kalupa. Defosforilacijska smjesa inkubirana je 10 min na 37 °C nakon čega je fosfataza inaktivirana inkubacijom 5 min na 70 °C.

#### **2.2.8.2.3. Umnožavanje ciljnih sekvenci iz plazmidnih vektora reakcijom PCR**

Delecijски konstrukti BPM1 $\Delta$ BTB, BPM1 $\Delta$ MATH i BPM1 $\Delta$ SPOP umnoženi su pomoću CloneAmp polimeraze iz tri kalupa: pET-53-DEST-BPM1 $\Delta$ BTB, pET-53-DEST-BPM1 $\Delta$ MATH i pET-53-DEST-BPM1 $\Delta$ SPOP. Reakcijska smjesa PCR za sva tri konstrukta je imala sastav: 12,5  $\mu$ L CloneAmp<sup>TM</sup> HiFi PCR Premix (Takara), 0,75  $\mu$ L početnica InF\_BPM1\_GEX fw i 0,75  $\mu$ L InF\_BPM1\_GEX rev konačnih koncentracija 0,3  $\mu$ M, 100 ng kalupa i H<sub>2</sub>O do ukupnog volumena 25  $\mu$ L. Reakcija PCR je provedena u 35 ciklusa ponavljanja denaturacije na 98 °C 10 s, prijanjanja početnica na 55 °C 10 s i elongacije na 72 °C 5 s.

#### **2.2.8.2.4. Pročišćavanje umnoženih ciljnih sekvenci i defosforiliranog plazmida iz gela**

Umnoženi PCR produkti i defosforilirani linearizirani pGEX-4T-1 razdvojeni su na agaroznom gelu na 50 V. Inerti i kalup izrezani su s gela i pročišćeni prema protokolu NucleoSpin<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) uz izmjenu u prvom koraku gdje je dodan dvostruki volumen pufera NTI (mL) u odnosu na izvaganu masu (mg) izrezanog fragmenta gela. Fragmenti DNA oslobođeni su iz gela inkubacijom izrezanog gela 5 min na 50 °C uz povremeno vorteksiranje. Ostali koraci pročišćavanja opisani su u poglavlju 2.2.8.2.1.

#### **2.2.8.2.5. Restriksijsko cijepanje produkta PCR-a**

Završni korak pripreme inserata bilo je restriksijsko cijepanje FD enzimom BamHI (Thermo Scientific) pročišćenih PCR produkata kako bi inserti imali kompatibilne krajeve kao i kalup pGEX-4T-1. Nakon restriksijskog cijepanja inserata, inserti su pročišćeni prema protokolu NucleoSpin<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) iz restriksijske smjese uz izmjenu u

prvom koraku gdje je na ukupni volumen restrikcijske smjese dodano H<sub>2</sub>O do volumena od 100  $\mu$ L te dvostruki volumen pufera NTI. Ostali koraci su isti kao i u prethodnim pročišćavanjima. Potpuno pročišćeni inserti i kalup još jednom su provjereni agaroznom gel elektroforezom.

#### **2.2.8.2.6. Reakcija ligacije**

Dobiveni pročišćeni inserti BPM1 $\Delta$ BTB, BPM1 $\Delta$ MATH i BPM1 $\Delta$ SPOP i kalup pGEX-4T-1 imaju ljepljive kompatibilne krajeve dobivene cijepanjem enzimom BamHI. Za spajanje inserata i kalupa korištena je T4 ligaza. Reakcijska smjesa ligacije je imala sastav: 0,2  $\mu$ L (1 U) T4 ligaze (Thermo Scientific), 2  $\mu$ L pufera T4 DNA Ligase Buffer (10  $\times$ ) (Thermo Scientific), 60 ng/ $\mu$ L inserta, 15 ng/ $\mu$ L vektora i H<sub>2</sub>O do ukupnog volumena od 20  $\mu$ L. Reakcijska smjesa inkubirana je 19,5 h na 22  $^{\circ}$ C, zatim 1,5 h na 4  $^{\circ}$ C, a nakraju je ligaza inaktivirana inkubacijom 10 min na 65  $^{\circ}$ C. *E. coli* NEB 5-alpha (New England BioLabs) transformirane su s ligacijskom smjesom prema ranije opisanom protokolu. Transformanti su selektirani na krutom mediju LB sa Amp, a prisutnost inserta provjerena je reakcijom PCR. Plazmidna DNA izolirana je iz prekonoćne bakterijske kulture.

#### **2.2.8.2.7. Provjera orijentacije ciljnih slijedova u plazmidnom vektoru**

Kloniranje je rađeno s jednim restrikcijskim enzimom (BamHI) te inserti i kalup s obje strane imaju jednake ljepljive krajeve pa je potrebno provjeriti orijentaciju ugrađivanja inserta u vektor.

Provjera orijentacije ugradnje provedena je restrikcijskom analizom. Plazmidi pGEX-4T-1-BPM1 $\Delta$ BTB i pGEX-4T-1-BPM1 $\Delta$ SPOP pocijepani su restrikcijskim enzimom EcoRI (Thermo Scientific), a pGEX-4T-1-BPM1 $\Delta$ MATH s EcoRI (Thermo Scientific) i Mlu NI (Roche) prema ranije opisanom protokolu.

Dodatna potvrda orijentacije dobivena je sekvenciranjem (Macrogen, Europa, Amsterdam) i analizom u programu Clustal  $\times$  (Larkin i sur., 2007).

### **2.2.9. Provjera sinteze proteina u ekspresijskim bakterijskim sojevima**

Dobiveni ekspresijski plazmidi transformirani su u ekspresijske bakterijske sojeve Rosetta (DE3) ili BL21 (DE3). Pozitivni transformanti selektirani su na krutom mediju LB uz odgovarajući antibiotik. Prisutnost željenih inserata provjerena je reakcijom PCR.

U veći volumen (10-300 mL) svježeg medija LB, 2  $\times$  YT, 4  $\times$  YT ili TB s odgovarajućim antibioticima inokuliran je određeni volumen prekonoćne bakterijske kulture. Bakterije su

nakon toga rasle 37 °C uz miješanje dok OD nije bio između 0,6 i 1,0 (otprilike 3 h). Svi korišteni plazmidi imaju reguliranu gensku ekspresiju dodatkom izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozida (IPTG) (Biochemica, AppliChem CmBH) koji inducira gensku ekspresiju i sintezu proteina. Koncentracija dodanog IPTG-a je bila između 0,3 i 1,0 mM ovisno o optimizaciji uvjeta indukcije proteina. Indukcija proteina trajala je 3 h na 37 °C ili 10-24 h na 15-20 °C uz trešnju. Po završetku sinteze proteina, bakterijske suspenzije centrifugirane su 15 min (4 °C) na 4000 rcf (Sigma 3K30 11390/13150R ili SORVALL RC-5B Centrifuge). Nakon centrifuge medij je bačen, a talog je resuspendiran u 20 mM Tris-HCl, pH = 7,0 (His označeni proteini) ili u 1 × PBS (GST označeni proteini) kako bi uklonili ostatke medija i antibiotika. Centrifuga je ponovljena u istim uvjetima, supernatant je bačen, a talog je zamrznut u tekućem dušiku i spremljen na -80 °C.

Kako bi se provjerila indukcija proteina, prije i poslije dodatka IPTG-a uzeto je 0,5-1 mL bakterijske suspenzije. Bakterijski talog skupljen je centrifugiranjem 5 min na 4000 rcf pri 4 °C (Eppendorf 5415R). Talog je resuspendiran u odgovarajućem volumenu pufera 5 × SLB nakon čega su proteini denaturirani 10 min na 95 °C. Uzorci su provjereni SDS-PAGE-om i/ili hibridizacijom po Westernu kao što je objašnjeno u sekciji 2.2.14.

### **2.2.10. Ekstrakcija bakterijskih proteina**

Prije ekstrakcije proteina zamrznuti bakterijski talozi otapani su 30 min na ledu. Bakterijski talozi resuspendirani su u 20 mL pufera za lizu LyB1, LyB2 (His-privjesak) ili LyB3 (GST-privjesak) ovisno o fuzijskom privjesku pročišćavanog proteina. Bakterije su inkubirane u puferu za lizu 30 min (RT) uz miješanje (Phoenix RS-TR 10) kako bi dopustili lizozimu da djeluje nakon čega je uslijedila sonikacija. Bakterijska suspenzija sonicirana je na ledu u sonikatoru Bioblock Scientific Vibracell™ šest puta po 40 sekundi (na 200-300 W) uz pauze od 30 sekundi između svakog soniciranja. Nakon sonikacije bakterijski lizat je prebačen u 50 mL Nalgen (3110-9500) epruvete (Thermo Scientific) i centrifugiran 20 min na 20000 rcf pri 4 °C (Sigma 3K30 12150R). Bakterijski supernatant u kojem se nalaze topivi proteini profiltriran je kroz filtere Ministart filters 0,2 μm (Sartorius Stedim Biotech). Bakterijski talog resuspendiran je u 10 mL H<sub>2</sub>O. Uzorci taloga (engl. *Pellet*, P) i supernatanta (S) sačuvani su za provjeru topivosti proteina SDS-PAGE-om i/ili hibridizacijom po Westernu (sekcija 2.2.14.).



### 2.2.11. Pročišćavanje proteina obilježenih His-privjeskom

Proteine označene privjeskom 6 × His (His-HB6, His-DMS3, His-RDM1, His-BPM1ΔMATH) sam pročišćavao na Ni-NTA matrici (Qiagen). Nikal (Ni<sup>2+</sup>) ima šest koordinacijskih mjesta od kojih dva interagiraju s atomima dušika iz imidazolnog prstena histidina i na taj način omogućuju pročišćavanje proteina s His-privjeskom. Prije dodavanja Ni-NTA kuglica na proteinski ekstrakt, 100-200 μL Ni-NTA kuglica po reakciji isprano je i ekvilibrirano 2-3 puta s 1 mL pufera za lizu (LyB1 ili 2; bez lizozima i proteaznog inhibitora) uz centrifugiranje 2 min na 500 rcf (Eppendorf 5415R). Nakon ispiranja kuglice su nanese na proteinski ekstrakt. Vezivanje proteina na Ni-NTA kuglice odvijalo se preko noći (15-18 h) na 4 °C uz stalnu rotaciju (Phoenix RS-TR 10).

Nakon prekonodne inkubacije, uzorci su centrifugirani 5 min na 500 rcf pri 4 °C (Sigma 3K30 11390/13150R) te je uklonjena nevezana frakcija (engl. *Flowthrough*, FT). Nakon uklanjanja nevezanih proteina kuglice sa vezanim proteinima ispirane su četiri puta s 10 mL odgovarajućeg pufera za ispiranje: jednom u puferu WB1, dva puta u puferu WB2 i jednom u puferu WB3. Nakon svakog ispiranja je slijedila centrifuga 5 min na 500 rcf (4 °C) te se supernatant bacao.

Nakon četvrtog ispiranja kuglice s vezanim proteinima prenesene su na kolonu s filterom (35 μm, Mobicol M2135, MoBiTec). Kolona je prethodno isprana dva puta sa 500 μL H<sub>2</sub>O te ekvilibrirana tri puta sa 700 μL pufera WB3. Nakon svakog dodatka vode ili pufera, kolona je centrifugirana 2 min na 2000 rcf. Nakon pripreme na kolonu je nanese 2 mL kuglica sa vezanim proteinima u puferu WB3. Kuglice s vezanim proteinima na koloni dodatno su ispirane tri puta sa po 500 μL pufera WB3 (500 rcf, 5 min pri 4 °C).

His fuzijski proteini sa kuglica eluirani su u tri koraka. Proteini su dva puta eluirani s 200 μL pufera EB uz inkubaciju od 15 min na 4 °C nakon čega su eluat 1 (E1) odnosno eluat 2 (E2) skupljeni centrifugiranjem 3 min na 500 rcf (4 °C). Eluat 3 dobiven je ispiranjem kolone sa 2 M imidazolom uz inkubaciju od 15 min na 4 °C.

Za provjeru postupka pročišćavanja na SDS-PAG elektroforezi uzete su frakcije taloga (P), supernatanta (S), nevezane frakcije (FT), ispiranja (WB1, WB2 i WB3) te sve tri frakcije eluata E1, E2 i E3.

#### 2.2.11.1. Promjena pufera pročišćenih proteina obilježenih His-privjeskom

Kako bi uspješno proveli kopurifikaciju proteina sa His- i GST-privjeskom potrebno je ukloniti imidazol iz eluata pročišćenih proteina sa His-privjeskom te oba tipa proteina imati u

istom puferском sustavu. Budući da su proteini sa GST-privjeskom purificirani u 1 × PBS (Sekcija 2.2.14.) te da se reakcija kopurifikacije odvija u 1 × PBS, pufer u kojem se nalaze proteini sa His-privjeskom promijenjen je u 1 × PBS.

Tri frakcije eluata (E1-3) proteina sa His-privjeskom spojeni su u jednu zajedničku frakciju E. Promjena pufera provedena je na centrikonima Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Devices (Merck Millipore Sigma, 10 kDa). Ukupni volumen frakcije E nanesen je na centrikon koja ima pore koje propuštaju sve molekule manje od molekularne mase od 10 kDa. Frakcija E centrifugirana je 15-20 min na 4000 rcf (4 °C) (Sigma 3K30 11390/13150R) dok se volumen nije smanjio na 200-250 µL. Nakon toga proteini su isprani 3 puta sa 1 mL 1 × PBS-a i centrifugirani u istim uvjetima. Pročišćenih proteini sa His-privjeskom u promijenjenom puferu skladišteni su do upotrebe na 4 °C ili su uz dodatak glicerola (konačne koncentracije 10%) na -80 °C.

### 2.2.11.2. Optimizacija topivosti proteina His-BPM1ΔMATH

Nakon indukcije proteina pokusaj pročišćavanja His-BPM1ΔMATH započet je sonikacijom bakterija u puferu MATH. His-BPM1ΔMATH je dalje pročišćavan prema protokolu u sekciji 2.2.11. Rezultati pročišćavanja analizirani su SDS-PAG elektroforezom (P, S, W, E1-2) i imunodetekcijom uzorka eluensa.

Za povećanje topivost proteina His-BPM1ΔMATH tesirana su dodatno tri MATH pufera (1-3) prikazana u **Tablici 8** nakon čega su frakcije P i S provjerene metodom hibridizacije po Westernu (2.2.14.) kako bi se usporedila količina netopivog proteina u talogu i topivog proteina u supernatantu.

**Tablica 8.** Puferi za solubilizaciju proteina His-BPM1ΔMATH. Puferi su bili korišteni kako bi se pokušala optimizirati topivost proteina.

Sastav	MATH	MATH1	MATH2	MATH3
Tris-HCl pH = 8	50 mM	-	-	-
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH = 5,8	-	50 mM	50 mM	50 mM
NaCl	100 mM	500 mM	500 mM	-
β-ME (Sigma)	10 mM	-	-	-
0,5 × Proteazni inhibitor (Roche)	+	-	-	-
Glicerol	5%	5%	5%	5%
Lizozim (Sigma)	0,5 mg/mL	-	-	-
Deoksiholna kiselina	-	0,50%	0,50%	0,50%
Arginin	-	375 mM	-	-
Prolin	-	-	500 mM	-
Manitol	-	-	-	500 mM
DNaza	-	1 µg/mL	1 µg/mL	1 µg/mL

### 2.2.12. Pročišćavanje proteina obilježenih GST-privjeskom

Proteine sa GST-privjeskom (GST, GST-BPM1, GST-BPM1 $\Delta$ BTB, GST-BPM1 $\Delta$ MATH, GST-BPM1 $\Delta$ SPOP) sam pročistio na glutation sefarnim kuglicama (GE Healthcare 17075601). Pročišćavanje se temelji na reverzibilnom vezanju GST-privjeska na glutation imobiliziran na sefarnim kuglicama. Prije dodavanja glutation sefarnih kuglica na proteinski ekstrakt, 50-200  $\mu$ L kuglica po reakciji ispirano je i ekvilibrirano tri puta s 1 mL 1  $\times$  PBS pri čemu su nakon svakog ispiranja kuglice centrifugirane 2 min na 500 rcf (Eppendorf 5415R). Poslije ispiranja, kuglice su nanosene na proteinski ekstrakt. Vezivanje proteina na glutation sefarnu kuglicu odvijalo se preko noći (15-18 h) na 4 °C uz stalnu rotaciju (Phoenix RS-TR 10).

Nakon prekonoćne inkubacije, uzorci su centrifugirani 5 min na 500 rcf pri 4 °C (Sigma 3K30 11390/13150R) te je uklonjena nevezana frakcija (FT). Nakon uklanjanja nevezanih proteina, kuglice sa vezanim proteinima ispirane po jedan put s puferom W1 i W2 te četiri puta s puferom W3. Između svakog ispiranja kuglice su centrifugirane 5 min na 500 rcf pri 4 °C. Nakon zadnjeg ispiranja i centrifuge ostaci pufera među kuglicama uklonjeni su inzulinskom špricom (30 G). Kuglice s vezanim proteinima završno su resuspendirane u 200  $\mu$ L 1  $\times$  PBS-a i spremljene na 4 °C do uporabe.

Za provjeru postupka pročišćavanja na SDS-PAGE elektroforezi uzete su frakcije taloga (P), supernatanta (S), nevezane frakcije (FT), ispiranja (WB1, WB2 i WB3) te mali volumen kuglica s vezanim proteinima.

### 2.2.13. Elektroforeza SDS-PAGE

Za analizu proteinske ekspresije koristio sam metodu SDS-PAGE koja se bazira na odvajanju proteina isključivo na temelju njihove molekulske mase. Sastav poliakrilamidnog gela od 12% gela za razdvajanje i 4% gela za sabijanje nalazi se u **Tablici 9**. Za bržu polimerizaciju, gel za razdvajanje nadslojen je otopinom 20% etanola i 5% bromfenol-plavo. Uz gelove izlijevane u laboratoriju korišteni su i komercijalni 12% SDS gelovi (NXG01212, RunBlue, Expedeon). Elektroforeza na komercijalnim gelovima SDS Precast Gels odvijala se u puferu 1  $\times$  SDS RunBlue buffer (TEO-Tricine-SDS, Expedeon) i uređaju DCX-700 CBS Scientific dok se elektroforeza na izlijevanim gelovima odvijala u 1  $\times$  elektrodnom puferu sastava 3 g/L Tris, 14,4 g/L glicin, 1 g/L SDS pH = 8,3 i uređaju MINI Vertical Dual Plate Electrophoresis Unit (Carl Roth). Na gelove su nanošeni prethodno pripremljeni proteinski uzorci u 5  $\times$  SLB puferu (95 °C 10 min) u volumenu 5-30  $\mu$ L ovisno o količini proteina. Uvjeti

elektroforeze su bili 30 min na 90 V i 1,5 h na 190 V (Consort EV243 Power Supply).

**Tablica 9.** Sastav poliakrilamidnog gela.

Sastav	12% Gel za razdvajanje	4% Gel za sabijanje
reH <sub>2</sub> O	1,67 mL	1,201 mL
1,5 M Tris-HCl pH = 8,8	1,25 mL	-
0,5 M Tris-HCl pH = 6,8	-	0,500 mL
30% Akrilamid/bisakrilamid (A/Bis)	2,00 mL	0,267 mL
10% SDS	50 $\mu$ L	20 $\mu$ L
10% Amonijev persulfat (APS)	25 $\mu$ L	10 $\mu$ L
Tetrametiletilendiamin (TEMED)	7 $\mu$ L	5 $\mu$ L

## 2.2.14. Hibridizacija po Westernu

Hibridizaciju po Westernu sam koristio u svrhu imunodetekcije željenih proteina. Ukoliko se neki proteini nisu mogli detektirati SDS-PAGE-om, potencijalno su se mogli detektirati hibridizacijom po Westernu gdje se mogu detektirati puno manje količine proteina nego bojanjem poliakrilamidnih gelova.

### 2.2.14.1. Prijenos proteina na membranu

Nakon razdvajanja proteina SDS-PAGE elektroforezom proteini su preneseni na poliviniliden fluoridnu (engl. *Polyvinylidene Fluoride*, PVDF) membranu (Immobilion-P). PVDF membrana pripremljena je ispiranjem jednom u metanolu i tri puta u reH<sub>2</sub>O po minutu. Gel i PVDF membrana složeni su u kazetu između katode i anode u redosljed: katoda (-), spužva, filter papir (Whatman 3M), gel, PVDF membrana, filter papir, spužva, anoda (+). Kod slaganja kazete, mjehurići zraka su bili uklonjeni istiskivanjem jer ometaju proteinski prijenos, a svi filter papiri, gelovi, membrane i spužve su bili namočeni u puferu za prijenos. Prijenos se odvijao u Mini-PROTEAN 3 i Trans-Blot Cell (BioRad) sustavu s ledenim blokom u puferu za prijenos sastava 3,39 g/L Tris HCl, 14,4 g/L glicin, 200 mL/L metanol, pH = 8,3, a transfer se provodio 2 h na 200 mA.

### 2.2.14.2. Imunodetekcija proteina na PVDF membrani

Nakon završenog prijenosa, membrane su blokirane 1 h u 20 mL 2% mlijeka otopljenog u 1  $\times$  PBS-u. Nakon blokiranja membrane, dodano je primarno antitijelo pripremljeno u 10 mL 2% mlijeka u 1  $\times$  PBS-u s anti-GST SC138 mouse (Santa Cruz) ili anti-His mouse 11922416001 (Roche) monoklonskim primarnim antitijelom razrijeđenim u omjeru 1:1000. Nakon inkubacije u primarnom antitijelu 3 h ili preko noći, membrana je isprana tri puta s 10 mL 1  $\times$  PBS-a po 10 min. Nakon toga membrane su inkubirane 2 h u 1:5000 sekundarnog antitijela (Anti-mouse

IgG Peroxidase Conjugate, A4416, Sigma) pripremljenog u 2% mlijeku otopljenom u  $1 \times$  PBS-u. Po završetku inkubacije, membrana je ponovno isprana tri puta sa 10 mL  $1 \times$  PBS-a po 10 min. Prilikom detekcije direktno na membranu, na stranu membrane s proteinima, dodano je 500  $\mu$ L supstrata HRP substrate (Luminata<sup>TM</sup> Forte, Millipore) uz inkubaciju od 3 minute.

Nakon inkubacije membrana je prenesena u plastičnu foliju i stavljena u prethodno osvijetljenu kazetu za razvijanje sa filmom HS X-Ray Film Pan-G  $12 \times 30$ cm 100pk (Henry Schein) na membrani. Film se inkubirao na membrani u mraku 2-60 min. Signal na filmu je detektiran u u razvijaču (85 mL H<sub>2</sub>O + 15 mL Agfa Dentus<sup>®</sup> X-Ray Developer – Kulzer) i fiksiran u fiksiru (85 mL H<sub>2</sub>O + 15 mL Agfa Dentus<sup>®</sup> X-Ray Fixer – Kulzer). Signal na membrani također je detektiran na uređaju C-DiGit Chemiluminescent Western Blot Scanner (LI-COR, BioSciences) na visokoj osjetljivosti tokom 12 min ili na uređaju iBright Western Blot Imaging Systems (ThermoScientific) s vremenom ekspozicije od 2-20 min.

### **2.2.14.3. Vizualizacija proteina na poliakrilamidnom gelu i PVDF membrani bojom Coomassie Brilliant Blue**

Proteinske vrpce u poliakrilamidnim gelovima vizualizirane su u otopini *Coommassie Brilliant Blue* (CBB) (0,1 % (w/v) CBB R-250, 45 % (v/v) metanol i 10 % (v/v) ledena octena kiselina) ili u komercijalno dostupnoj boji InstantBlue<sup>TM</sup> Coomassie Protein Stain (Expedeon). Gelovi bojani otopinom CBB odbojavani su u vrućoj destiliranoj vodi uz trešnju do pojave proteinskih vrpca.

PVDF membrane bojane su u otopini CBB sastava: 0,1% (w/v) CBB R-250, 50% (v/v) MetOH, 7% (v/v) octena kiselina. Nakon inkubacije od 5 min (RT) na tresilici, boja je uklonjena i dodano je 30 mL otopine za odbojavanje 1 (50% metanol, 7% octena kiselina). Membrana je inkubirana 5 min u otopini za odbojavanje 1 na tresilici nakon čega je otopina uklonjena te je dodana otopina za odbojavanje 2 (90% metanol, 10% octena kiselina). Membrana je inkubirana u otopini za odbojavanje 2 do pojave proteinskih vrpca. Na kraju, membrana je isprana u destiliranoj vodi i posušena na papirnatom ručniku.

### **2.2.15. Kopurifikacija proteina**

Kako bih istražio interakciju proteina DMS3, RDM1 i HB6 s proteinom BPM1 i njegovim delecijским varijantama koristio sam metodu kopurifikacije (engl. *Pull Down*). Metoda se zasniva na afinitetnom vezanju proteina od interesa (mamac, engl. *Bait*) za matricu i propuštnju potencijalnih interkacijskih partnera (plijen, engl. *Prey*). Ukoliko protein plijen stupa u

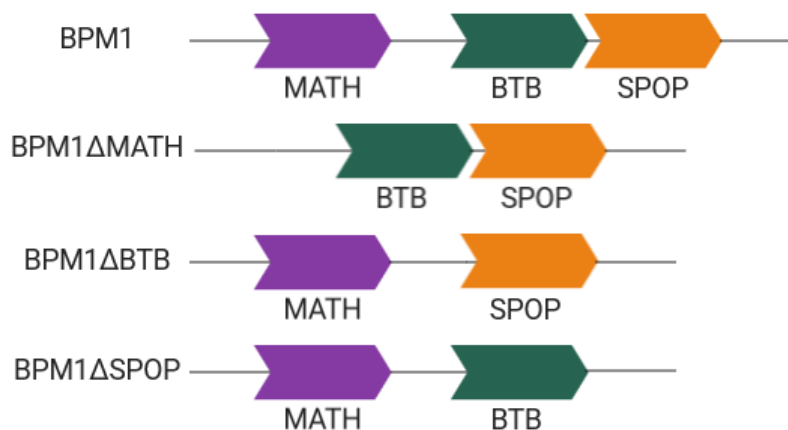
interakcije s proteinom mamcem, on se neće isprati tijekom ispiranja matrice od nevezanih proteina.

U ovom istraživanju GST označeni protein BPM1 i njegove delecijske varijante bili su mamac vezan za glutation sefaroenu matricu, dok su His označeni DMS3, HB6 i RDM1 bili plijen. Reakcija vezanja provedena je u 0,5 mL mikroepruvetama u volumenu od 200  $\mu$ L. Deset (GST protein) do trideset (GST-BPM1, GST-BPM1 $\Delta$ BTB, GST-BPM1 $\Delta$ MATH, GST-BPM1 $\Delta$ SPOP) mikrolitara kuglica s odgovarajućim proteinom mamcem pomiješano je s pročišćenim proteinom plijenom (His-RDM1, His-DMS3 ili His-HB6) te se volumen do 200  $\mu$ L nadopunio s 1  $\times$  PBS-om. Reakcija vezivanja inkubirana je 5-6,5 h na 4  $^{\circ}$ C uz konstanto rotiranje (Dyna sample mixer, model MXICI – Bidspotter). Kada je inkubacija završila, nakon prve centrifuge (500 rcf, 4  $^{\circ}$ C, 2 min) sakupljena je nevezana frakcija (FT) te su kuglice isprane pet puta sa 0,5-1 mL 1  $\times$  PBS uz centrifugiranje pri istim uvjetima. Nakon zadnjeg ispiranja ostatak pufera uklonjen je inzulinskom špricom (30 G). Na kuglice je dodano 30  $\mu$ L pufera 5  $\times$  SLB, a na 20  $\mu$ L FT dodano je 5  $\mu$ L pufera 5  $\times$  SLB. Uzorci su analizirani hibridizacijom po Westernu koristeći anti-His antitijelo kojim bi se detektirati proteini DMS3, RDM1 i HB6, dok su GST fuzionirani proteini vizualizirani bojanjem PVDF membrane otopinom CBB.

## 3. REZULTATI

### 3.1. Konstrukcija delecijских varijanti gena *BPM1*

Kako bismo istražili ulogu konzerviranih domena MATH, BTB i SPOP proteina BPM1 u interakciji s proteinima DMS3, RDM1 i HB6, konstruirane su delecijske varijante proteina BPM1. Kako bi se uspješno inducirale delecijske varijante proteina BPM1 (**Slika 7.**) konstruirani su ekspresijski plazmidi. Svaki ekspresijski plazmid ima ugrađen gen za jednu od spomenutih varijanta proteina BPM1 sa fuzioniranim His- ili GST-privjeskom za lakše pročišćavanje proteina. Uspješno je konstruirano šest plazmida koristeći vektorske kalupe pET-53-DEST-BPM1 odnosno pGEX-4T-1-BPM1. Konstrukcija plazmida je provjerena restrikcijским cijepanjem i sekvenciranjem.

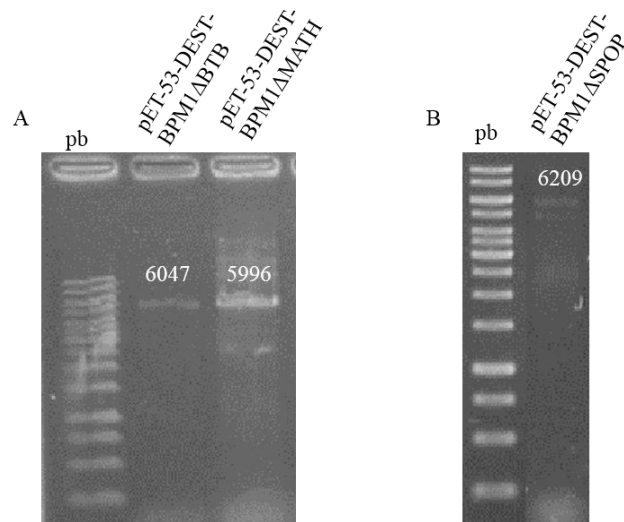


**Slika 7.** Shematski prikaz kodirajuće sekvence *BPM1* s označenim domenama MATH, BTB i SPOP te njegovih delecijских varijanta. Veličine domena nisu prikazane u realnom omjeru. (Izvor: Slika je izrađena u programu Biorender, <https://biorender.com/>).

#### 3.1.1. Konstrukcija delecijских varijanti gena *BPM1* obilježenih His-privjeskom

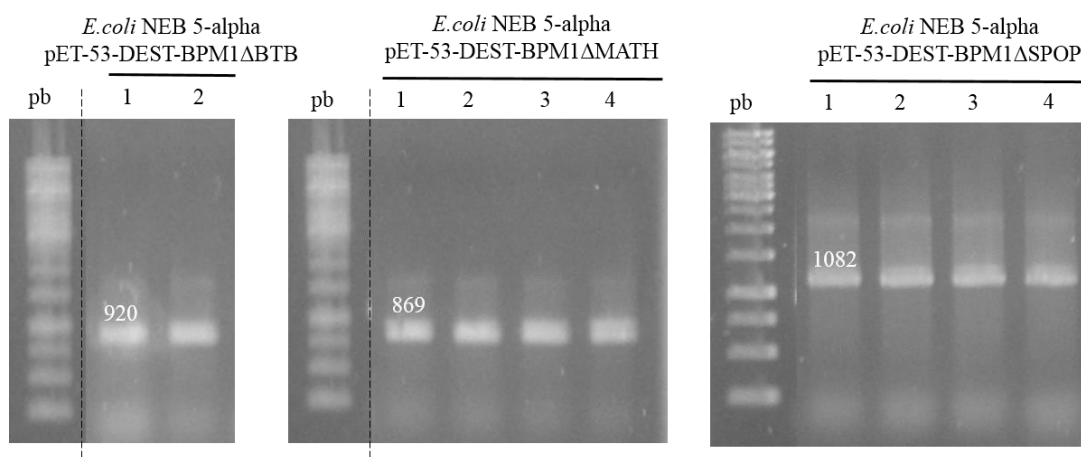
Plazmidni konstrukti koji sadrže delecijske varijante gena *BPM1* s His-privjeskom su konstruirani metodom mjesno-specifične mutageneze koristeći kalup pET-53-DEST-BPM1 (N. Bauer, nepublicirano) i početnice iz **Tablice 7.** Početnice su dizajnirane na način da se vežu za vanjske krajeve domene i prepisuju cijeli plazmid oko domene koja se deletira pri čemu formiraju linearizirani plazmid sa željenom delecijom. Veličine dobivenih vizualiziranih

lineariziranih plazmida su: pET-53-DEST-BPM1 $\Delta$ BTB 6047 pb, pET-53-DEST-BPM1 $\Delta$ MATH 5996 pb (**Slika 8A**) i pET-53-DEST-BPM1 $\Delta$ SPOP 6209 pb (**Slika 8B**).



**Slika 8.** Linearizirani plazmid pET-53-DEST-BPM1 s deletiranim domenama **A**) BTB i MATH te **B**) SPOP, dobiveni reakcijom PCR. Veličine fragmenata u parovima baza prikazane su povrh fragmenta. Oznaka pb označava molekularni standard Gene Ruler 1 kb DNA Ladder.

Plazmidi su nakon cirkularizacije uneseni transformacijom u bakterijski soj *E. coli* NEB 5-alpha uz selekciju na Amp. Uspješnost transformacije provjerena je na bakterijskim kolonijama reakcijom PCR početnicama attB1BPM1 fw i BPM1-STOPattB2 rev. Fragmenti DNA veličine od 920 kb dokazuju prisustvo pET-53-DEST-BPM1 $\Delta$ BTB, 869 pb pET-53-DEST-BPM1 $\Delta$ MATH i 1082 pb pET-53-DEST-BPM1 $\Delta$ SPOP (**Slika 9**). Vektorske mape plazmida su prikazane u prilogu (**Prilog Slika II**).



**Slika 9.** Fragmenti BPM1 $\Delta$ BTB, BPM1 $\Delta$ MATH i BPM1 $\Delta$ SPOP umnoženi iz transformiranih bakterijskih kolonija *E. coli* NEB 5-alpha plazmidima pET-53-DEST-BPM1 $\Delta$ BTB, pET-53-DEST-BPM1 $\Delta$ MATH i pET-53-DEST-BPM1 $\Delta$ SPOP. Veličine umnoženih fragmenata u



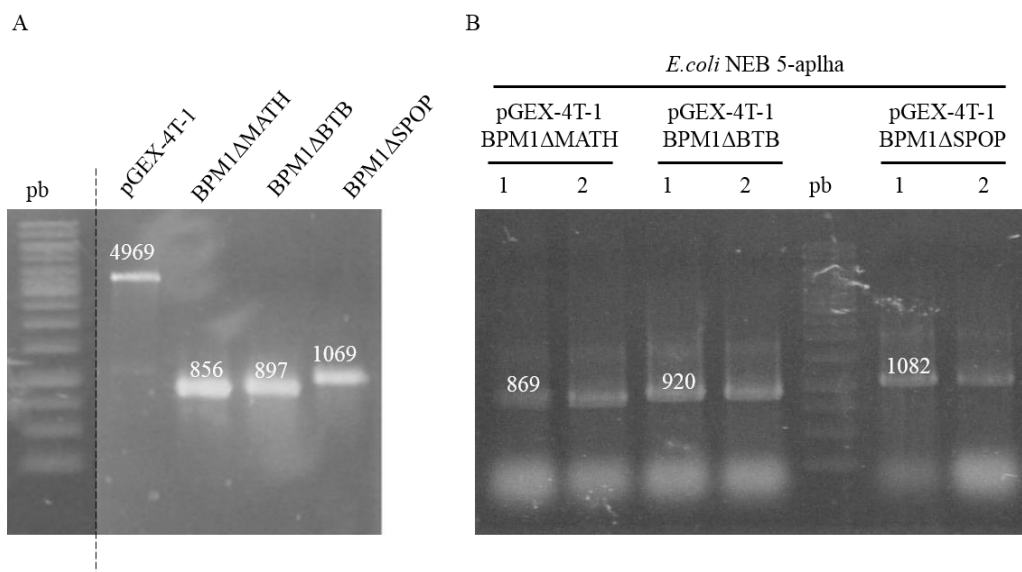
parovima baza prikazane su povrh fragmenta. Brojevi 1-4 označavaju pojedinačne kolonije. Oznaka pb označava molekularni standard Gene Ruler 1 kb DNA Ladder.

Dobiveni plazmidi su provjereni sekvenciranjem (Macrogen, Europa, Amsterdam), a plazmid pET-53-DEST-BPM1 $\Delta$ SPOP je dodatno provjeren dvostrukim restrikcijskim cijepanjem enzimima XbaI i Eco130I. Ukoliko oba enzima uspješno cijepaju plazmid, na agaroznom gelu se trebaju detektirati fragmenti DNA veličina 4977, 651, 448, 54, 40 i 39 pb. U slučaju cijepanja s XbaI vizualiziraju se fragmenti od 5668 i 541 pb odnosno s Eco130I 5016, 1099, 54 i 40 pb. Enzim XbaI nije uspješno pocijepao plazmid te je uspjela samo digestija s Eco130I (**Prilog Slika IIIA**) pa je dodatna provjera restrikcijskim cijepanjem napravljena s FD enzimom XbaI na purificiranom PCR produktu (1082 pb) umnoženim početnicama attB1BPM1 fw i BPM1-STOPattB2 rev. Cijepanjem PCR produkta BPM1 $\Delta$ SPOP dobiveni su fragmenti od 608 i 474 pb (**Prilog Slika IIIB**).

### **3.1.2. Konstrukcija delecijjskih varijanti gena *BPM1* obilježenih GST-privjeskom**

Delecijjski fragmenti BPM1 $\Delta$ BTB, BPM1 $\Delta$ MATH i BPM1 $\Delta$ SPOP su umnoženi s kalupa pET-53-DEST-BPM1 $\Delta$ BTB, pET-53-DEST-BPM1 $\Delta$ MATH i pET-53-DEST-BPM1 $\Delta$ SPOP pomoću početnica koje imaju dodano restrikcijsko mjesto za enzim BamHI (**Tablica 2.**). Defosforilirani i linearizirani vektor pGEX-4T-1 (4969 pb) kao i pocijepani delecijjski fragmenti BPM1 $\Delta$ BTB (897 pb), BPM1 $\Delta$ MATH (856 pb) i BPM1 $\Delta$ SPOP (1069 pb) su vizualizirani agaroznom gel elektroforezom i pročišćeni iz gela (**Slika 10A**).

Delecijjski fragmenti ugrađeni su u defosforilirani linearizirani vektor zahvaljujući komplementarnim lijepljivim BamHI krajevima. Uspješnost transformacije *E. coli* NEB 5-alpha plazmidima je provjerena reakcijom PCR pomoću početnica attB1BPM1 fw i BPM1-STOPattB2 rev. Dobiveni fragmenti dokazuju prisustvo pGEX-4T-1-BPM1 $\Delta$ BTB (920 pb), pGEX-4T-1-BPM1 $\Delta$ MATH (869 pb) i pGEX-4T-1-BPM1 $\Delta$ SPOP (1082 pb) (**Slika 10B**). Vektorske mape plazmida su prikazane u prilogu (**Prilog Slika IV.**).

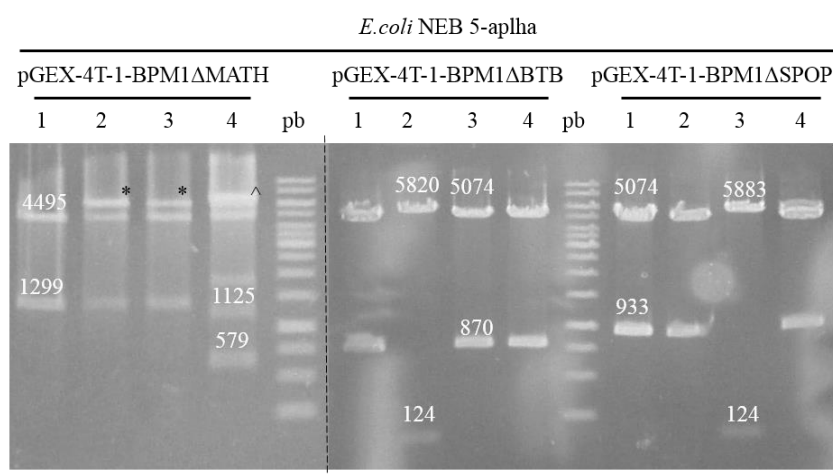


**Slika 10. A)** Linearizirani vektor pGEX-4T-1 i umnoženi delecijски fragmenti BPM1ΔMATH, BPM1ΔBTB i BPM1ΔSPOP pocijepani enzimom BamHI. **B)** Fragmenti BPM1ΔMATH, BPM1ΔBTB i BPM1ΔSPOP umnoženi iz bakterijskih kolonija (1-2) *E. coli* NEB 5-alpha transformiranih s pGEX-4T-1-BPM1ΔMATH, pGEX-4T-1-BPM1ΔBTB odnosno pGEX-4T-1-BPM1ΔSPOP. Veličine umnoženih fragmenata u parovima baza prikazane su povrh fragmenta. Oznaka pb označava molekularni standard Gene Ruler 1 kb DNA Ladder.

Obzirom da je rađeno kloniranje pomoću jednog restrikcijskog enzima (BamHI), napravljena je provjera orijentacije ugradnje gena u vektor. Plazmidi pGEX-4T-1-BPM1ΔBTB i pGEX-4T-1-BPM1ΔSPOP su pocijepani enzimom EcoRI dok je pGEX-4T-1-BPM1ΔMATH pocijepan enzimima EcoRI i Mlu NI. U **Tablici 10** su prikazane veličine fragmenata koje nastaju nakon restrikcijskog cijepanja ovih plazmida u slučaju dobre i krive orijentacije ugradnje gena. Uspješno su konstruirane replike 1, 3 i 4 plazmida pGEX-4T-1-BPM1ΔBTB, 1, 2 i 4 plazmida pGEX-4T-1-BPM1ΔSPOP te 1, 2 i 3 plazmida pGEX-4T-1-BPM1ΔMATH (**Slika 11**). Replika 4 plazmida pGEX-4T-1-BPM1ΔMATH nije uspjela te prikazuje pocijepani plazmid pGEX-4T-1-BPM1 (6199 pb) s dodatnom vrpcom koja ne odgovara nijednoj teoretskoj visini cijepanja u **Tablici 10**.

**Tablica 10.** Veličine fragmenata plazmida pGEX-4T-1-BPM1 $\Delta$ BTB, pGEX-4T-1-BPM1 $\Delta$ SPOP i pGEX-4T-1-BPM1 $\Delta$ MATH nakon restrikcijskog cijepanja u slučaju dobre i krive orijentacije ugradnje gena BPM1 $\Delta$ BTB, BPM1 $\Delta$ MATH i BPM1 $\Delta$ SPOP u vektor pGEX-4T-1-BPM1. Oznaka pb označava parove baza.

Plazmid	Restrikcijski enzim	Dobra orijentacija (pb)	Kriva orijentacija (pb)
pGEX-4T-1-BPM1	EcoRI	1125, 5074	124, 6075
	EcoRI + Mlu NI	579, 1125, 4495	460, 1125, 4614
pGEX-4T-1-BPM1 $\Delta$ MATH	EcoRI + Mlu NI	1299, 4495	460, 5334
pGEX-4T-1-BPM1 $\Delta$ BTB	EcoRI	870, 5074	124, 5820
pGEX-4T-1-BPM1 $\Delta$ SPOP	EcoRI	933, 5074	124, 5883

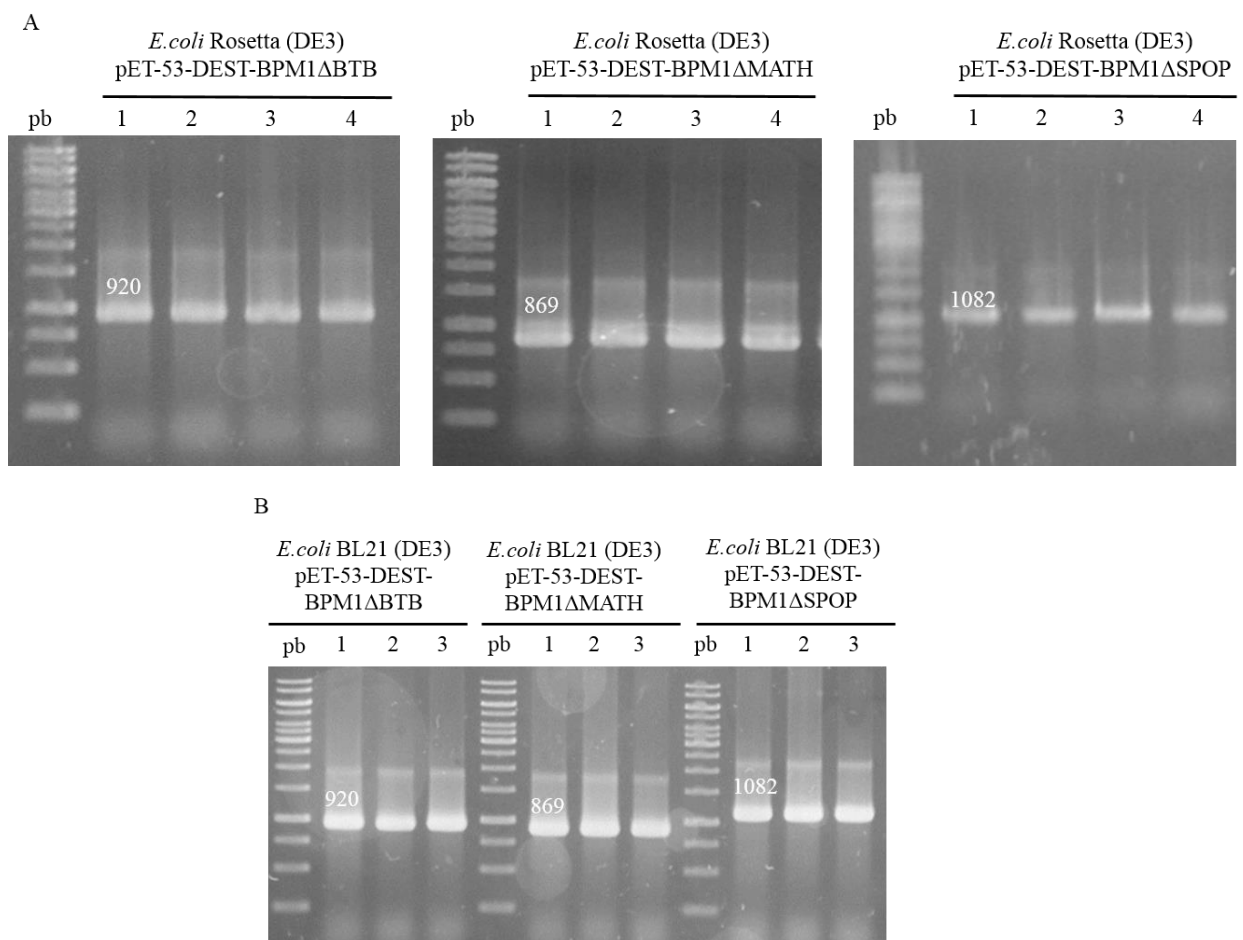


**Slika 11.** Fragmenti dobiveni restrikcijskim cijepanjem plazmida pGEX-4T-1-BPM1 $\Delta$ MATH, pGEX-4T-1-BPM1 $\Delta$ BTB i pGEX-4T-1-BPM1 $\Delta$ SPOP u slučaju dobre i krive orijentacije ugradnje gena BPM1 $\Delta$ BTB, BPM1 $\Delta$ MATH i BPM1 $\Delta$ SPOP u vektor pGEX-4T-1 prema **Tablici 10**. Zvezdica (\*) označava nepocijepani plazmid pGEX-4T-1-BPM1 $\Delta$ MATH (5794 pb). Strelica (^) prikazuje nepocijepani plazmid pGEX-4T-1-BPM1 (6199 pb), a fragment veličine od oko 1600 pb vjerojatno prikazuje nespecifično cijepanje jer ne odgovara nijednoj veličini iz tablice. Veličine fragmenata u parovima baza prikazane su povrh svakog fragmenta. Oznaka pb označava molekularni standard Gene Ruler 1 kb DNA Ladder, a brojevi 1-4 broj bakterijske kolonije.

## 3.2. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje delecijских varijanta proteina His-BPM1

Kako bi se inducirala sinteza proteina His-BPM1 i njegovih delecijских varijanta, bakterijski sojevi *E. coli* Rosetta<sup>TM</sup> (DE3) i/ili BL21 (DE3) su transformirani plazmidima pET-53-DEST-BPM1 $\Delta$ BTB, pET-53-DEST-BPM1 $\Delta$ MATH i pET-53-DEST-BPM1 $\Delta$ SPOP uz selekcijski

pritisak. Transformacija je provjerena reakcijom PCR početnicama attB1BPM1 fw i BPM1-STOPattB2 rev. Dobiveni su fragmenti DNA koji dokazuju prisutnost pET-53-DEST-BPM1 $\Delta$ BTB (920 pb), pET-53-DEST-BPM1 $\Delta$ MATH (869 pb) i pET-53-DEST-BPM1 $\Delta$ SPOP (1082 pb) u soju Rosetta (**Slika 12A**) odnosno BL21 (**Slika 12B**). Proteinska ekspresija je inducirana dodatkom IPTG-a, a proteini su vizualizirani SDS-PAG elektroforezom. Uspješno je inducirani samo protein His-BPM1 $\Delta$ MATH koji nije pročišćen uslijed niske topivosti, dok proteini His-BPM1 $\Delta$ BTB odnosno His-BPM1 $\Delta$ SPOP nisu uspješno inducirani čak ni nakon optimizacije različitih faktora koji utječu na rast i/ili indukciju.



**Slika 12.** Provjera transformacije bakterijskih sojeva *E. coli* **A**) Rosetta i **B**) BL21 plazmidima pET-53-DEST-BPM1 $\Delta$ BTB, pET-53-DEST-BPM1 $\Delta$ MATH i pET-53-DEST-BPM1 $\Delta$ SPOP. Veličine fragmenata u parovima baza prikazane su povrh fragmenta. Brojevi 1-4 označavaju pojedinačne bakterijske kolonije, a oznaka pb označava molekularni standard Gene Ruler 1 kb DNA Ladder.

### 3.2.1. Optimizacija prekomjerne ekspresije proteina His-BPM1 $\Delta$ BTB

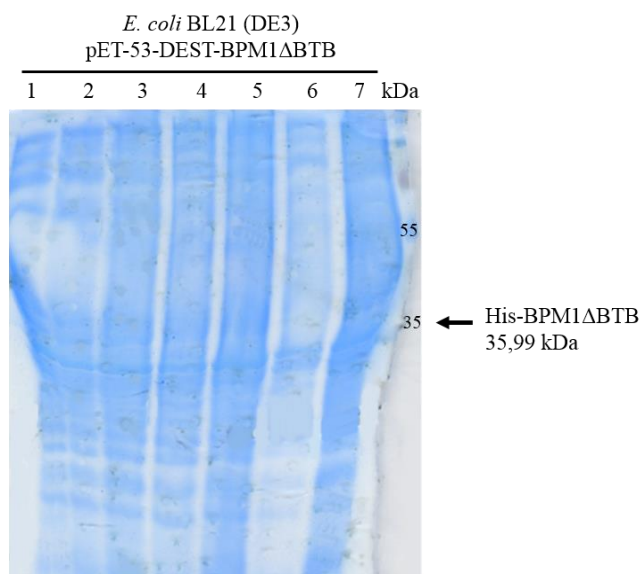
Nakon uspješne transformacije *E. coli* BL21 (DE3), uspostavljena je bakterijska kultura u volumenu od 10 mL u svrhu preparativne indukcije proteina. Rađena su dva preparativna pokušaja indukcije His-BPM1 $\Delta$ BTB.

Prvi pokušaj preparativne indukcije proveden je u medijima 4  $\times$  YT i TB (ukupno 7 kombinacija). U dvije replike je dodana 1% glukoza (Glc) koja je uklonjena centrifugiranjem prije indukcije IPTG-om te su bakterije resuspendirane u svježem mediju bez antibiotika. Sve kombinacije rasta bakterija su tretirane hladnim šokom 20 min na ledu nakon čega je dodan IPTG. Dvije su kombinacije dodatno tretirane toplinskim šokom 20 min na 47 °C nakon dodatka IPTG-a. Uvjeti rasta i indukcije svih kombinacija detaljno su opisani na **Slici 13A**. Protein His-BPM1 $\Delta$ BTB ima teoretsku veličinu od 35,99 kDa. Usporedbom kombinacije neinducirane IPTG-om (jažica 1) s induciranim kombinacijama (jažice 2-7) vidimo da ni promijena medija kao ni dodatak glukoze za vrijeme rasta niti različite temperature indukcije nisu potakle produkciju proteina His-BPM1 $\Delta$ BTB (**Slika 13B**).

A

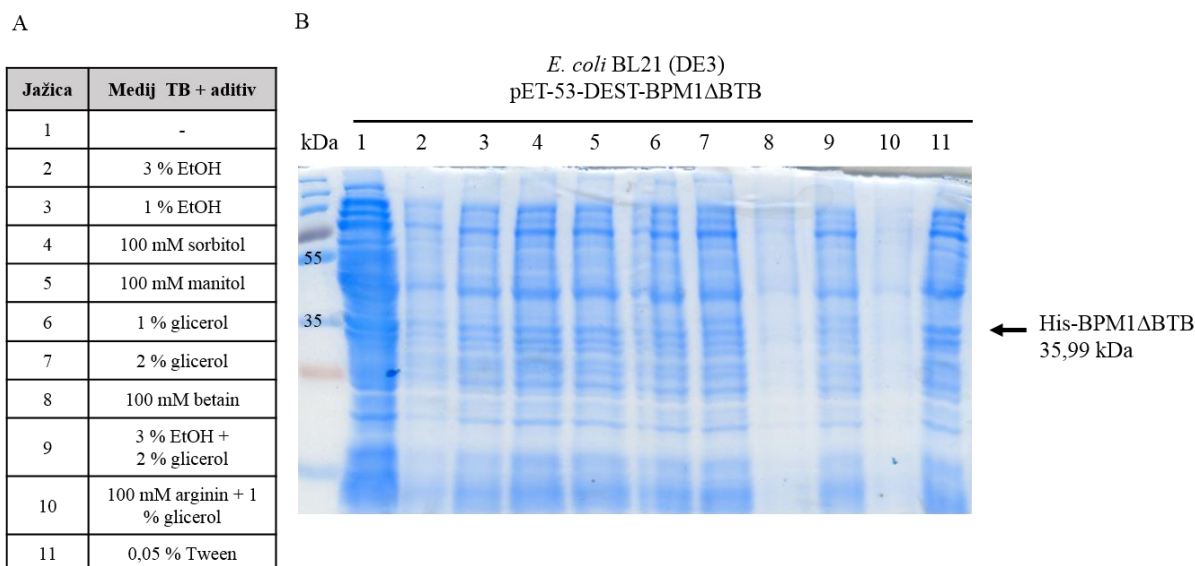
Jažica	Medij + aditiv	Indukcija
1	4 $\times$ YT	0 mM IPTG – 20 °C / 18 h
2	4 $\times$ YT + 1 % Glc*	0,5 mM IPTG – 20 °C / 18 h
3	4 $\times$ YT*	0,5 mM IPTG – 30 °C / 18 h
4	4 $\times$ YT	0,5 mM IPTG – 20 °C / 18 h
5	TB*	0,5 mM IPTG – 30 °C / 18 h
6	TB + 1 % Glc	0,5 mM IPTG – 20 °C / 18 h
7	TB	0,5 mM IPTG – 30 °C / 18 h

B



**Slika 13. A)** Uvjeti rasta i indukcije bakterija *E. coli* BL21 (DE3) uz varijacije medija, tretmana i dodatka glukoze. Zvezdica (\*) označava dodatni tretman bakterija 20 min na 47 °C nakon dodatka IPTG-a. **B)** Rezultati SDS-PAG elektroforeze. Crnom strelicom je označena teoretska veličina proteina His-BPM1 $\Delta$ BTB koji nije uspješno induciran u nijednoj kombinaciji uvjeta. Oznaka kDa označava molekularni standard PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder 10-250 kDa .

Drugi pokušaj preparativne indukcije je proveden u mediju TB. U svaku repliku je dodan različit aditiv kako bi potakli indukciju proteina (**Slika 14A**). Dodatak različitih aditiva nije pomogao u poticanju ekspresije proteina His-BPM1 $\Delta$ BTB (**Slika 14B**).



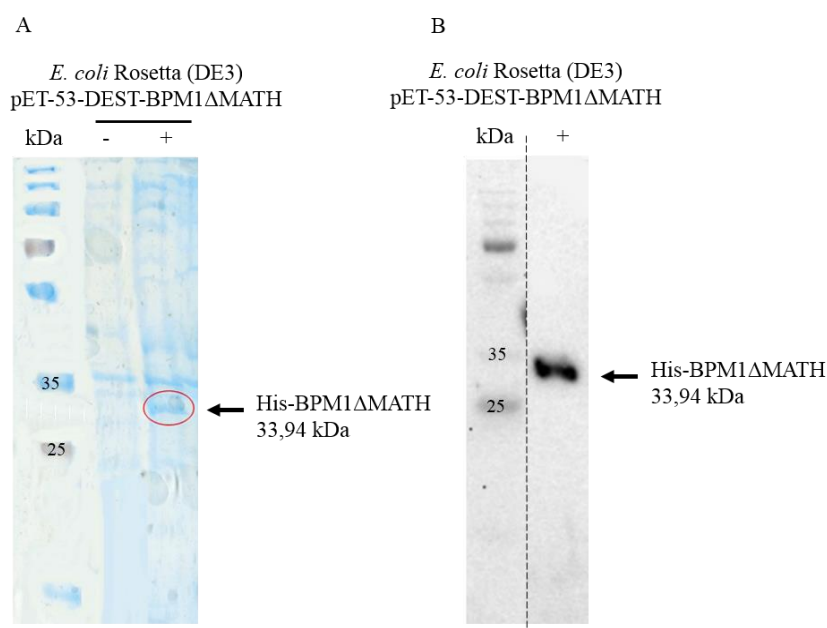
**Slika 14. A)** Aditivi dodani u medij TB kod rasta bakterije *E. coli* BL21 (DE3). Indukcija je provedena na 24 h pri 15 °C uz dodatak 0,5 mM IPTG-a. Uzorak 1 označava negativnu kontrolu u koji nije dodan IPTG. **B)** Rezultati SDS-PAG elektroforeze. Crnom strelicom je označena teoretska veličina proteina His-BPM1 $\Delta$ BTB koji se nije uspješno inducirao u nijednom pokušaju optimizacije. Oznaka kDa označava molekulski standard PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder 10-250 kDa.

### 3.2.2. Prekomjerna ekspresija i optimizacija pročišćavanja proteina

#### His-BPM1 $\Delta$ MATH

##### 3.2.2.1. Indukcija His-BPM1 $\Delta$ MATH

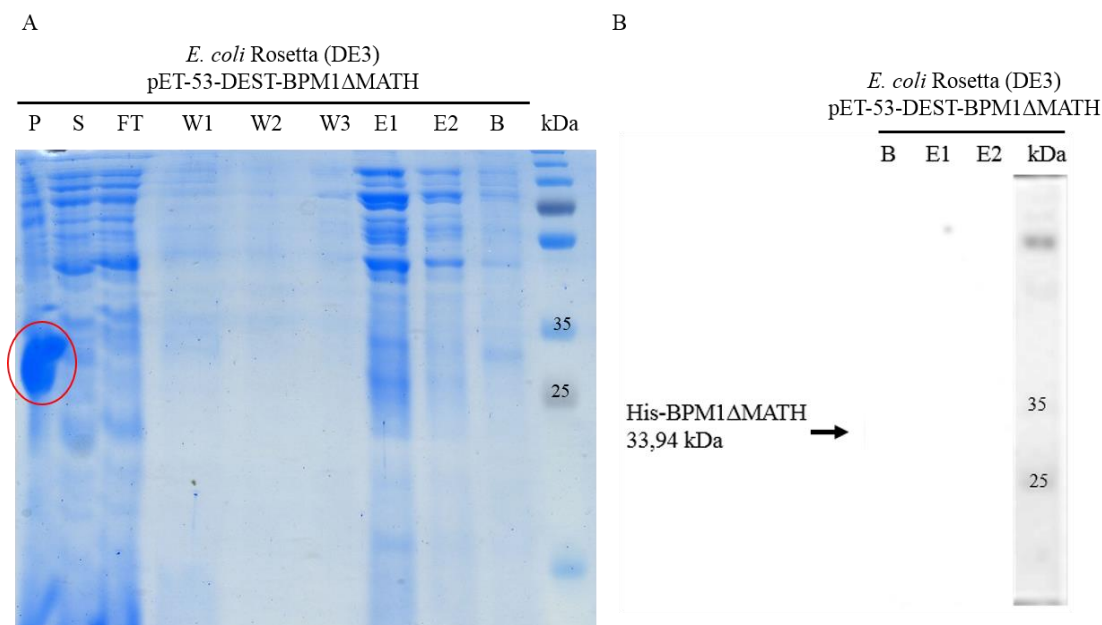
Indukcija His-BPM1 $\Delta$ MATH proteina provedena je u soju *E. coli* Rosetta™ (DE3) transformiranim s pET-53-DEST-BPM1 $\Delta$ MATH. Bakterije su inducirane u 50 mL medija 2 × YT. Prije indukcije bakterije su tretirane 30 min na 4 °C. Indukcija je provedena 18 h na 15 °C uz dodatak 0,5 mM IPTG-a. U uzorku tretiranim IPTG-om na gelu je vidljiva vrpca koja odgovara His-BPM1 $\Delta$ MATH na teoretskoj veličini od 33,94 kDa koja nije vidljiva u neinduciranom uzorku (**Slika 15A**). Indukcija proteina dodatno je potvrđena imunodetekcijom His-BPM1 $\Delta$ MATH na PVDF membrani antitijelom anti-His u induciranom uzorku (**Slika 15B**).



**Slika 15.** Indukcija proteina His-BPM1 $\Delta$ MATH. **A)** Detekcija indukcije proteina His-BPM1 $\Delta$ MATH nakon SDS-PAG elektroforeze. Protein ima teoretsku veličinu 33,94 kDa i označen je crvenim krugom odnosno crnom strelicom. U negativnoj kontroli (-, bez IPTG-a) nije vidljiv na teoretskoj veličini. **B)** Imunodetekcija proteina His-BPM1 $\Delta$ MATH na PVDF membrani antitijelom anti-His. Crna strelica označava protein na visini od 33,94 kDa. Membrana je slikana na uređaju iBright Western Blot Imaging Systems uz ekspoziciju od 20 min. Oznaka kDa označava molekularni standard PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder 10-250 kDa.

### 3.2.2.2. Pročišćavanje His-BPM1 $\Delta$ MATH

Nakon uspješne proteinske indukcije za testiranje pročišćavanja proteina His-BPM1 $\Delta$ MATH korištene su Ni-NTA kuglice kao što je opisano u sekcijama 2.2.10. i 2.2.11. Na temelju dobivenih rezultata (**Slika 16A**) inducirani protein His-BPM1 $\Delta$ MATH je u potpunosti prisutan u talogu u obliku inkluzija te je netopiv. Protein nije bio prisutan u supernatantu u topivom obliku. U pročišćenim uzorcima (eluensima E1 i E2) su bile vidljive vrpce koje odgovaraju teoretskoj veličini proteina od 33,94 kDa, ali imunodetekcijom antitijelom anti-His je pokazano da te vrpce ne pripadaju proteinu His-BPM1 $\Delta$ MATH (**Slika 16B**).

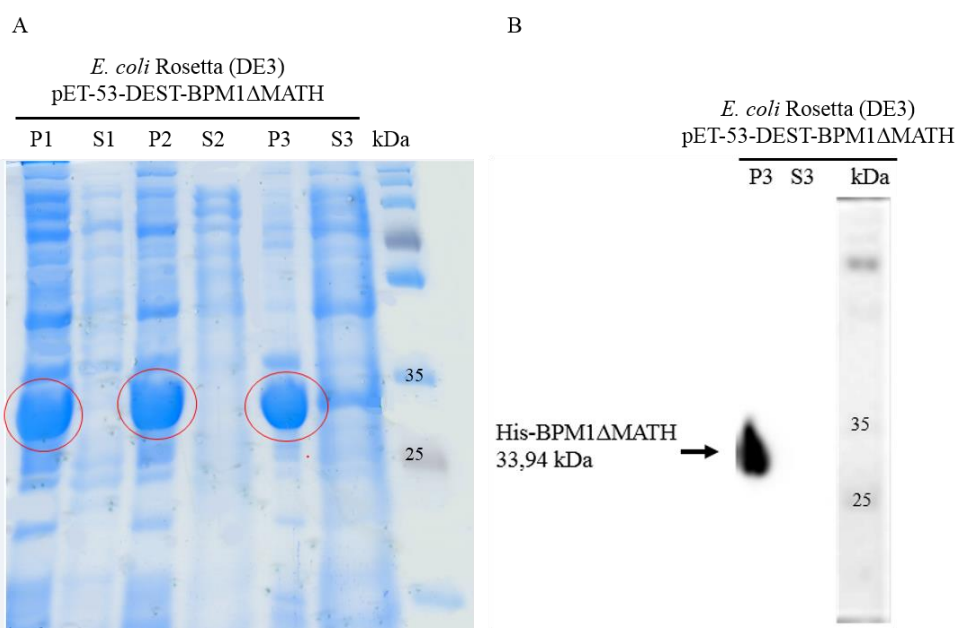


**Slika 16.** Pročišćavanje His-BPM1 $\Delta$ MATH. **A)** Analiza pročišćavanja SDS-PAG elektroforezom i **B)** Imunodetekcija na PVDF membrani antitijelom anti-His proteina His-BPM1 $\Delta$ MATH nakon pročišćavanja na Ni-NTA matrici. Protein ima teoretsku veličinu od 33,94 kDa i označen je crvenim krugom u talogu i crnom strelicom na membrani gdje se ne vidi pozitivan signal. Membrana je slikana na uređaju iBright Western Blot Imaging Systems uz ekspoziciju od 20 min. Oznake uzoraka: talog (P), supernatant (S), nevezana frakcija (FT), ispiranja (W1-W3), eluensi (E1, E2) i Ni-NTA agarozna matrica nakon ispiranja proteina (B). Oznaka kDa označava molekulski standard PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder 10-250 kDa.

### 3.2.2.3. Optimizacija topivosti His-BPM1 $\Delta$ MATH

Zbog netopivosti proteina His-BPM1 $\Delta$ MATH uslijedio je pokušaj optimizacije topivosti korištenjem različitih pufera za lizu bakterija. Ponovljeni su isti uvjeti rasta i indukcije koji su bili pozitivni u prvom pokušaju indukcije. Tri replike taloga His-BPM1 $\Delta$ MATH su solubilizirane u puferima MATH1, MATH2 i MATH3 (**Tablica 8**). Rezultati su pokazali da se His-BPM1 $\Delta$ MATH i dalje u potpunosti nalazi u talogu te da nije topiv (**Slika 17A**). U supernatantu MATH3 (S3) nazirala se proteinska vrpca koja bi potencijalno mogla pripadati solubiliziranom His-BPM1 $\Delta$ MATH no imunodetekcija je pokazala negativan signal u S3 (**Slika 17B**). Optimizacija topivosti His-BPM1 $\Delta$ MATH nije uspjela promjenom pufera.



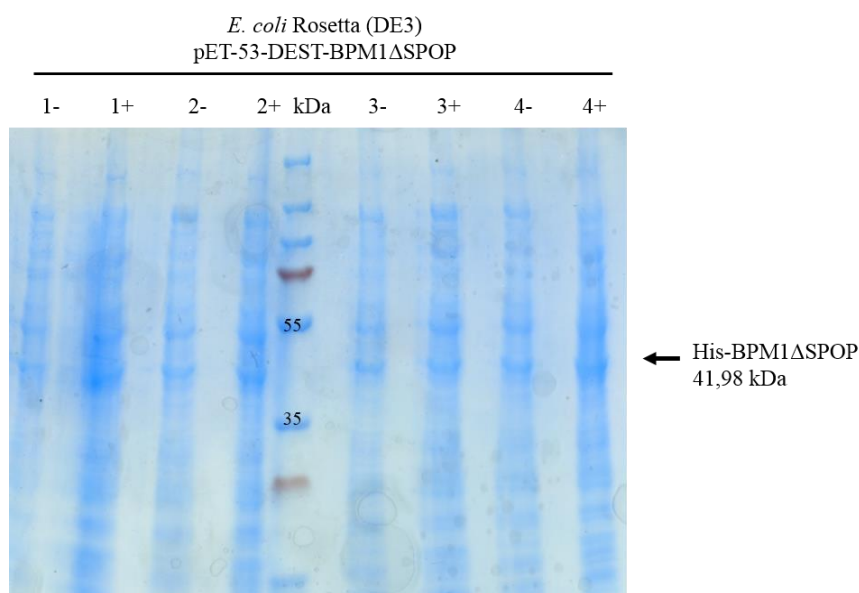


**Slika 17.** Optimizacija topivosti His-BPM1ΔMATH. **A)** Analiza topivosti proteina nakon sonikacije u puferima MATH1, MATH2 i MATH3. Crvenim krugom označen je protein His-BPM1ΔMATH. U talozima. **B)** Imunodetekcija proteina His-BPM1ΔMATH u P3 i S3 na PVDF membrani antitijelom anti-His. Pozitivan signal je prikazan crnom strelicom. Membrana je slikana na uređaju iBright Western Blot Imaging Systems uz ekspoziciju od 20 min. Oznake uzoraka: talog (P), supernatant (S), abrojjevi uz P i S odgovaraju brojevima MATH pufera. Oznaka kDa označava molekularni standard PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder 10-250 kDa.

### 3.2.3. Optimizacija prekomjerne ekspresije proteina His-BPM1ΔSPOP

Indukcija His-BPM1ΔMATH proteina provedena je u soju *E. coli* Rosetta i BL21 transformiranim s plazmidom pET-53-DEST-BPM1ΔSPOP.

Prvi pokušaj indukcije proveden je u 30 mL medija LB i 500 μL prekončne kulture *E. coli* Rosetta. Bakterije su izložene hladnom tretmanu 10 min na 4 °C nakon čega je uslijedila indukcija na 18 h pri 15 °C nakon dodatka 1 mM IPTG-a. Analiza neinduciranih i induciranih uzoraka pokazala je da protein His-BPM1ΔSPOP teoretske veličine od 41,98 kDa nije uspješno eksprimiran (**Slika 18**). Dodatna provjera indukcije provedena je imunodetekcijom na PVDF membrani antitijelom anti-His, ali ni neinducirani ni inducirani uzorci nisu imali pozitivne signale (nije prikazano).



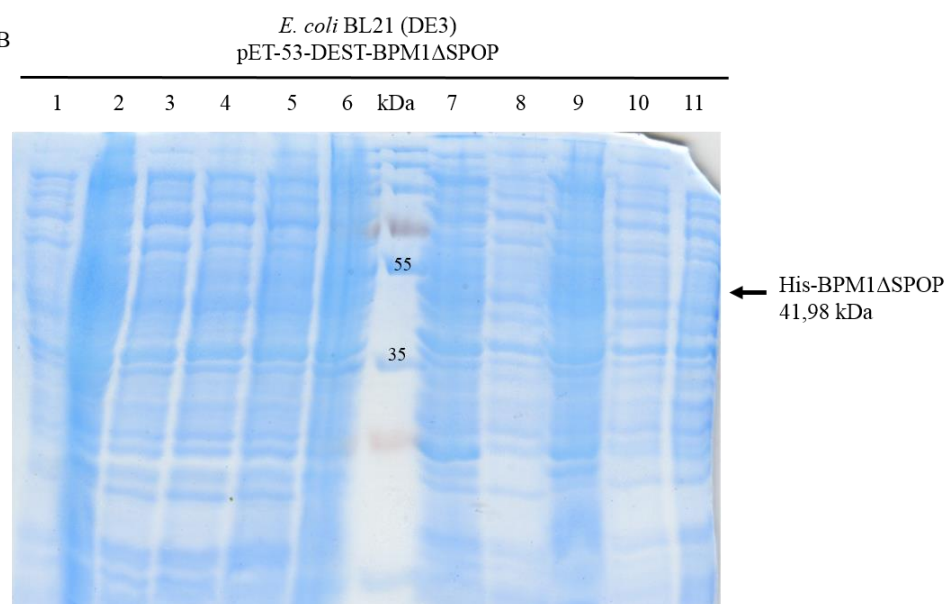
**Slika 18.** Detekcija proteina His-BPM1ΔSPOP nakon SDS-PAG elektroforeze. Protein ima teoretsku veličinu 44,98 kDa (označen crnom strelicom). Brojevi 1-4 označavaju pojedinačne kolonije, a – i + označavaju neinducirane odnosno inducirane uzorke. Oznaka kDa označava molekulski standard PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder 10-250 kDa.

Drugi pokušaj preparativne indukcije je proveden u mediju TB ili  $4 \times$  YT prekonoćne kulture *E. coli* BL21. U dva uzorka dodana je 0,5% Glc koja je uklonjena prije indukcije kao i u prijašnjim preparativnim indukcijama. Svi uzorci su predtretirani na 4 °C nakon rasta, a neki uzorci su dodatno tretirani toplinskim šokom 20 min na 47 °C nakon dodatka 0,5 mM IPTG-a. Uvjeti indukcije svih kombinacija detaljno su opisani na **Slici 19A**. Analiza rezultata SDS-PAG elektroforezom i imunodetekcijom s antijelom anti-His u svim uzorcima pokazala je negativne rezultate (**Slika 19B**).

A

Jažica	Medij + reagens	Indukcija
1	TB	0 mM IPTG – 20 °C/18 h
2	TB + 0,5 % Glc*	0,5 mM IPTG – 30 °C/18 h
3	4 × YT + 0,5 % Glc*	0,5 mM IPTG – 20 °C/18 h
4	TB	0,5 mM IPTG – 20 °C/18 h
5	4 × YT	0,5 mM IPTG – 20 °C/18 h
6	TB	0,5 mM IPTG – 30 °C/18 h
7	4 × YT	0,5 mM IPTG – 30 °C/18 h
8	4 × YT	0,5 mM IPTG – 20 °C/18 h
9	TB	0,5 mM IPTG – 20 °C/18 h
10	TB	0,5 mM IPTG – 30 °C/4 h
11	TB	0 mM IPTG – 20 °C/18 h

B



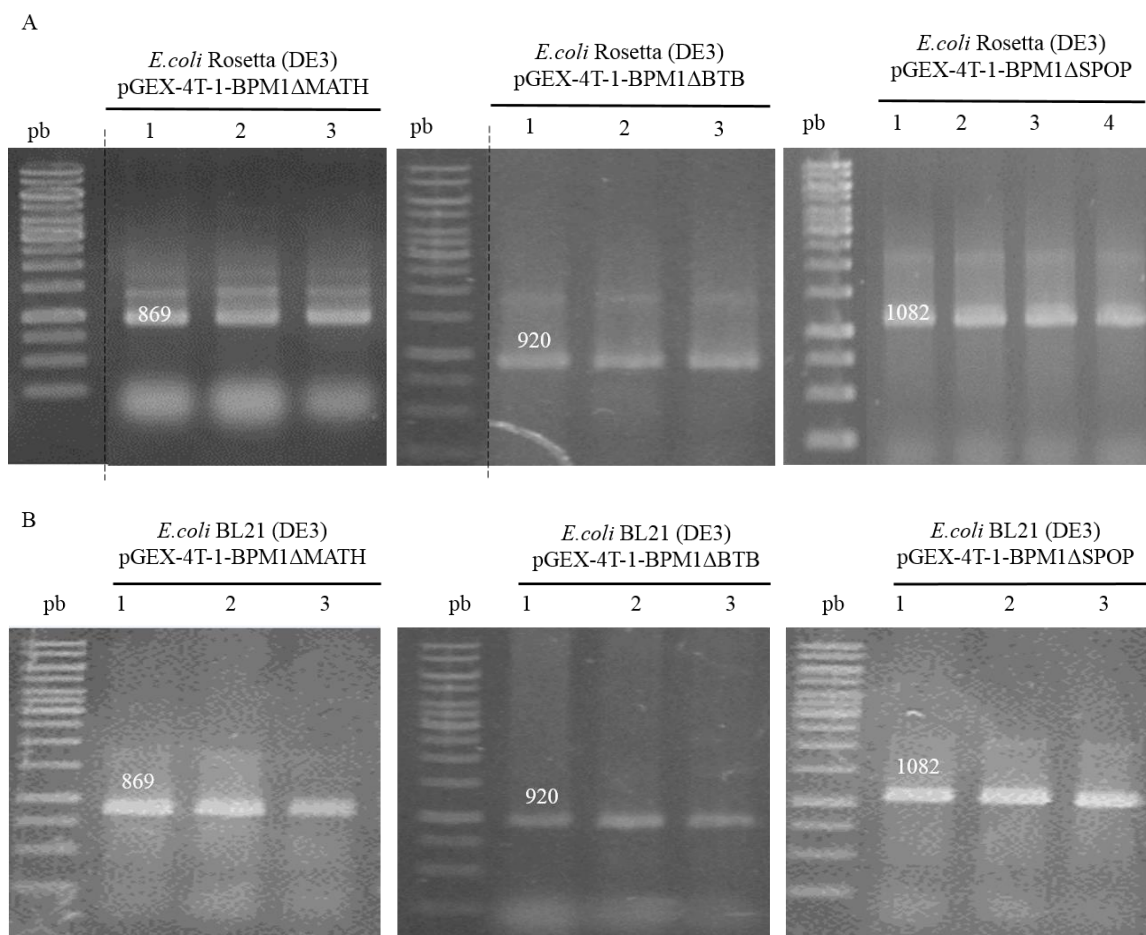
**Slika 19. A)** Uvjeti rasta i indukcije bakterije *E. coli* BL21 (DE3) uz varijacije medija, tretmana i dodatka glukoze. Zvezdica (\*) označava predtretman 20 min na 47 °C. **B)** Analiza indukcije His-BPM1ΔSPOP nakon SDS-PAG elektroforeze. Crnom strelicom je označena teoretska veličina proteina His-BPM1ΔSPOP od 41,98 kDa. Oznaka kDa označava molekulski standard PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder 10-250 kDa.

### 3.2.4. Optimizacija indukcije delecijских varijanta proteina His-BPM1 dodatkom MgCl<sub>2</sub>

Indukciju proteina His-BPM1ΔBTB, His-BPM1ΔMATH i His-BPM1ΔSPOP pokušao sam optimizirati dodatkom MgCl<sub>2</sub> tokom bakterijskog rasta. Pripremljene su tri preparativne indukcije u mediju TB i 100 μL prekonocne bakterijske kulture *E. coli* BL21 transformirane plazmidima pET-53-DEST-BPM1ΔBTB, pET-53-DEST-BPM1ΔMATH ili pET-53-DEST-BPM1ΔSPOP. U medij TB je dodan 2% glicerol i 0,1 M MgCl<sub>2</sub>. Bakterije transformirane plazmidom pET-53-DEST-BPM1ΔSPOP su rasle 40 min dok su ostala dva transformanta rasla 2 h na 37 °C. Uzorci su prije indukcije tretirani 20 min na 4 °C. Indukcija se pokušala potaknuti 15 h na 20 °C uz dodatak 0,5 mM IPTG-a. Uzorci prije i poslije indukcije analizirani su imunodetekcijom. Nijedna delecijсka varijanta proteina His-BPM1 nije uspješno inducirana (nije prikazano).

### 3.3. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje proteina GST-BPM1 i njegovih delecijских varijanta

Delecijske varijante proteina His-BPM1 su se pokazale netopivima ili se uopće nisu mogle inducirati. Kako bi se mogla proučiti interakcija proteina DMS3, RDM1 i HB6 s proteinskim domenama proteina BPM1, konstruirana su tri nova plazmida koji sadrže delecijske varijante *GST-BPM1* s ciljem poboljšanja indukcije proteina. Plazmidi pGEX-4T-1-BPM1 $\Delta$ MATH, pGEX-4T-1-BPM1 $\Delta$ BTB i pGEX-4T-1-BPM1 $\Delta$ SPOP su uneseni transformacijom u bakterijske sojeve *E. coli* Rosetta (DE3) i BL21 (DE3). Provjera transformacije je kao u sekciji 3.2, a fragmenti DNA veličine od 869 pb dokazuju prisustvo pGEX-4T-1-BPM1 $\Delta$ MATH, 920 kb pGEX-4T-1-BPM1 $\Delta$ BTB i 1082 pb pGEX-4T-1-BPM1 $\Delta$ SPOP u soju Rosetta (**Slika 20A**) odnosno BL21 (**Slika 20B**). Nakon uspješne transformacije, potaknuta je indukcija ekspresije proteina u oba bakterijska soja nakon čega je SDS-PAG elektroforezom i/ili hibridizacijom po Westernu provjerena uspješnost topivosti i indukcije proteina GST-BPM1 i njegovih delecijских varijanta. Uspješno su inducirani i pročišćeni svi ciljani proteini (GST-BPM1, GST-BPM1 $\Delta$ BTB, GST-BPM1 $\Delta$ MATH i GST-BPM1 $\Delta$ SPOP), ali im ekspresija i topivost varira ovisno o korištenom ekspresijskom soju *E. coli*, vrsti medija i aditivu korištenom za indukciju.

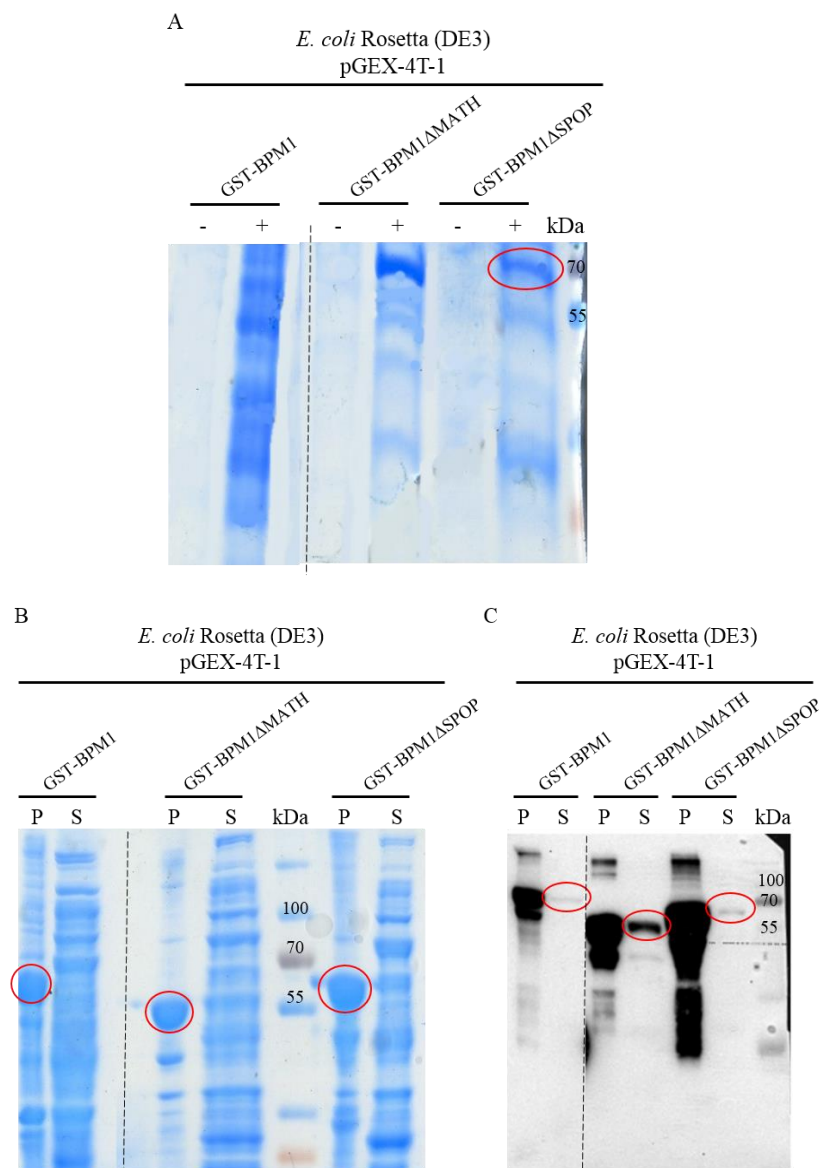


**Slika 20.** Provjera transformacije bakterijskih sojeva *E. coli* **A)** Rosetta i **B)** BL21 plazmidima pGEX-4T-1-BPM1 $\Delta$ MATH, pGEX-4T-1-BPM1 $\Delta$ BTB i pGEX-4T-1-BPM1 $\Delta$ SPOP. Oznake 1-4 su izolirani plazmidi iz pojedinačnih bakterijskih kolonija. Veličine fragmenata u parovima baza prikazane su povrh fragmenata. Oznaka pb označava molekularni standard Gene Ruler 1 kb DNA Ladder.

### 3.3.1. Optimizacija indukcije i pročišćavanja proteina GST-BPM1, GST-BPM1 $\Delta$ MATH i GST-BPM1 $\Delta$ SPOP

Proizvodnja proteina GST-BPM1, GST-BPM1 $\Delta$ MATH i GST-BPM1 $\Delta$ SPOP inducirana je 18 h na 15 °C dodatkom 0,5 mM IPTG-a u 250 mL medija 2  $\times$  YT iz prekonocne kulture *E. coli* Rosetta. Na gelu je vidljiva uspješna indukcija proteina GST-BPM1 $\Delta$ SPOP na očekivanoj visini od 63,96 kDa. Vizualizacija ekspresije GST-BPM1 i GST-BPM1 $\Delta$ MATH u ukupnim proteinima induciranog uzorka nije bila uspješna (**Slika 21A**). Kako bi se dodatno provjerila indukcija proteina, inducirani uzorci su centrifugirani, isprani i sonicirani u puferu LyB3 (**Tablica 5**) nakon čega su provjereni uzorci taloga i supernatanta SDS-PAG elektroforezom i hibridizacijom po Westernu. Analizom gela uočen je pozitivan signal proteina GST-BPM1 $\Delta$ SPOP na teoretskoj visini od 63,96 kDa, GST-BPM1 $\Delta$ MATH na teoretskoj visini od

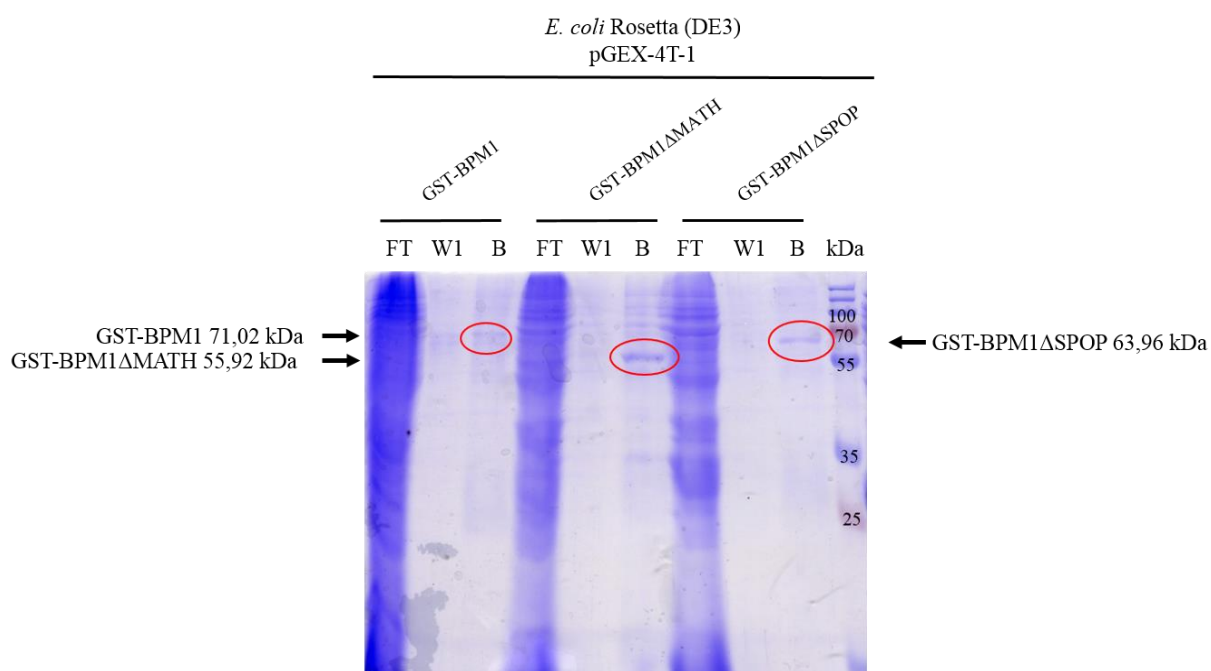
55,92 kDa i GST-BPM1 koji ima pomak u kretanju kroz gel pošto je detektiran na visini oko 60 kDa dok mu je teoretska visina 71,02 kDa (**Slika 21B**). Svi detektirani proteini imali su jasno razlučiv signal u talogu, dok u supernatantu signal nije bio toliko jasan. Stoga je provedena hibridizacija po Westernu kako bi se pokazalo postoje li solubilizirani proteini u supernatantu. Imunodetekcija antitijelom anti-GST je dokazala postojanje signala svih proteina u supernatantu na teoretskim visinama, uključujući i GST-BPM1 koji je u supernatantu detektiran na očekivanoj visini od 71,02 kDa (**Slika 20C**). Signali prekomjerno eksprimiranih proteina u supernatantu bili su mnogo slabiji od signala u talogu. Protein BPM1 $\Delta$ BTB-GST sam pokušao inducirati na isti način kao i ostale proteine s GST privjeskom, ali njegova indukcija nije uspjela (**Prilog Slika V.**).



**Slika 21.** Indukcija sinteze proteina GST-BPM1, GST-BPM1 $\Delta$ MATH i GST-BPM1 $\Delta$ SPOP u bakteriji *E. coli* Rosetta u mediju  $2 \times$  YT. **A)** Detekcija indukcije proteina GST-BPM1, GST-

BPM1 $\Delta$ MATH i GST-BPM1 $\Delta$ SPOP SDS-PAG elektroforezom analizom ukupnih proteina u neinduciranom (-) i IPTG induciranom (+) uzorku. **B)** Analiza solubilitnosti proteina proteina GST-BPM1, GST-BPM1 $\Delta$ MATH i GST-BPM1 $\Delta$ SPOP nakon sonikacije vizualizacijom sastava taloga (P) i supernatanta (S) SDS-PAG elektroforezom i **C)** imunodetekcijom proteina s GST-privjeskom na PVDF membrani antitijelom anti-GST. Membrana je slikana na uređaju iBright Western Blot Imaging Systems uz ekspoziciju od 20 min. Proteini imaju teoretsku visinu od 71,02, 55,92 i 63,96 kDa. Crvenim krugom su zaokruženi uspješno vizualizirani proteini. Oznaka kDa označava molekularni standard PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder 10-250 kDa .

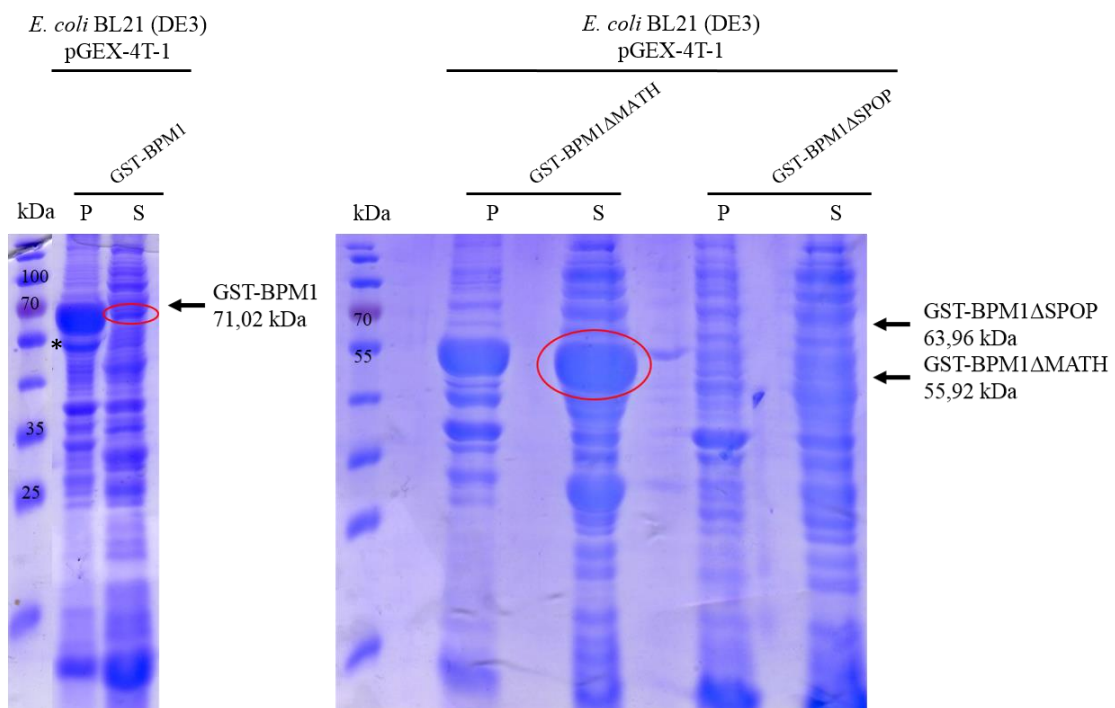
Nakon uspješnog dobivanja GST-BPM1, GST-BPM1 $\Delta$ MATH i GST-BPM1 $\Delta$ SPOP u topivoj fazi (supernatantu) proteini su pročišćeni kako je opisano u sekciji 2.2.12 koristeći 200  $\mu$ L glutation sefarnih kuglica. Sva tri proteina su uspješno pročišćena, ali količina pročišćenih proteina bila je jako mala kao što je vidljivo iz vrlo slabo vidljivi signala (**Slika 22.**).



**Slika 22.** Vizualizacija pročišćavanja GST-BPM1, GST-BPM1 $\Delta$ MATH, GST-BPM1 $\Delta$ SPOP na glutation sefarnoj matrici SDS-PAG elektroforezom. Proteini imaju označenu teoretsku visinu crnim strelicama, a uspješno pročišćeni proteini zaokruženi su crvenim krugom. Oznake uzoraka: nevezana frakcija (FT), ispiranje 1 (W1), proteini vezani na glutation sefarnu matricu (B). Oznaka kDa označava molekularni standard PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder 10-250 kDa.

Kako bi se povećala ekspresija i topivost proteinima GST-BPM1, GST-BPM1 $\Delta$ MATH i GST-BPM1 $\Delta$ SPOP, postupak sam pokušao optimizirati promjenom ekspresijskog bakterijskog

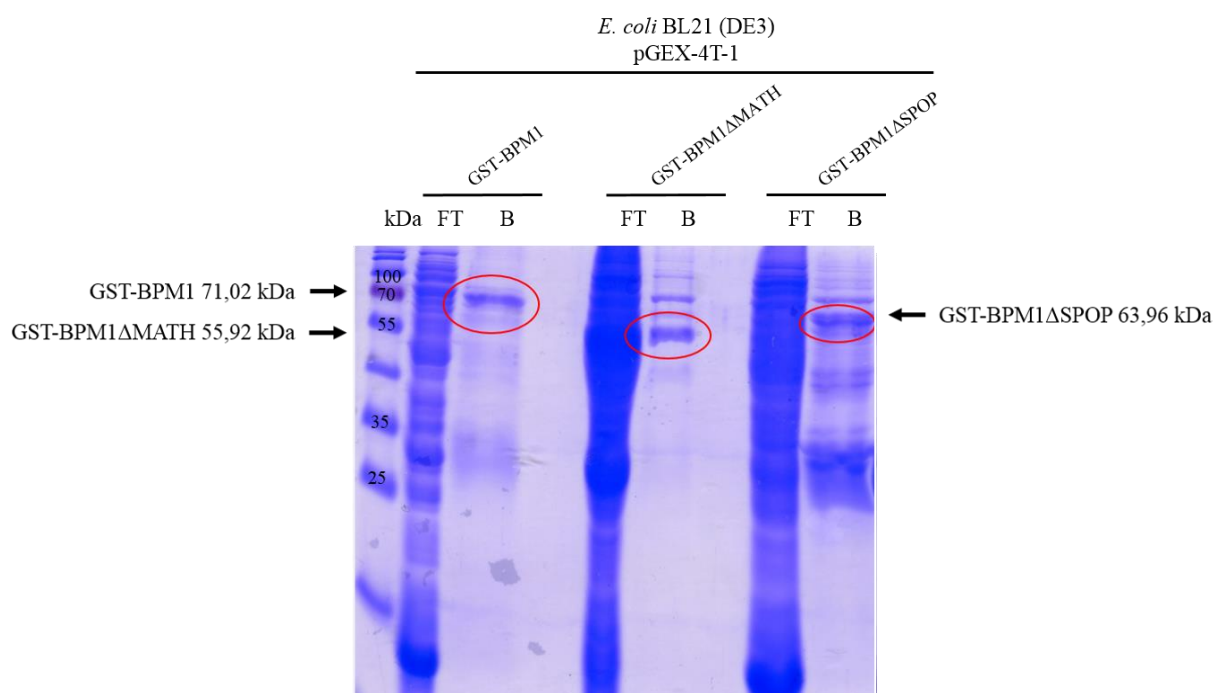
soja *E. coli* i vrste medija za rast. Plazmidi pGEX-4T-1-BPM1, pGEX-4T-1-BPM1 $\Delta$ MATH i pGEX-4T-1-BPM1 $\Delta$ SPOP uneseni su transformacijom u soj *E. coli* BL21 (DE3). Indukcija je uspostavljena u 250 mL medija 4  $\times$  YT pri istim uvjetima kao i prvi. Pripremljeni uzorci taloga i supernatanta su provjereni SDS-PAG elektroforezom (**Slika 23**). Na gelu su vidljivi pozitivni signali za sve proteine na teoretskim visinama u puno većem prihodu u odnosu na prvi pokušaj indukcije osim za GST-BPM1 $\Delta$ SPOP koji na gelu nije vidljiv ni u talogu ni u supernatantu. Najveća razlika u odnosu na prvi pokušaj indukcije vidljiva je u indukciji proteina GST-BPM1 $\Delta$ MATH gdje je znatno povećana ekspresija i topivost proteina obzirom na signale prilikom prvog pokušaja indukcije (**Slika 21B**). Prekomjerna ekspresija GST-BPM1 $\Delta$ MATH također stvara parcijalne produkte na visini od 26,98 kDa koji odgovaraju visini proteina GST. Promjena ekspresijskog soja i medija dovela je do veće ekspresije i topivosti proteina GST-BPM1 u odnosu na prvi pokušaj indukcije, ali je njegova količina u supernatantu vidljivo manja od proteina GST-BPM1 $\Delta$ MATH.



**Slika 23.** Detekcija proizvodnje i solubilizacije proteina GST-BPM1, GST-BPM1 $\Delta$ MATH i GST-BPM1 $\Delta$ SPOP u bakterijama *E. coli* BL21 u mediju 4  $\times$  YT. Proteini prisutni u talogu (P) i supernatantu (S) nakon sonikacije vizualizirani su SDS-PAG elektroforezom. Svi proteini osim GST-BPM1 $\Delta$ SPOP su detektirani u supernatantu te su zaokruženi crvenim krugom. Teoretske visine proteina označene su crnim strelicama. Zvezdica (\*) označava izoformu proteina GST-BPM1. Oznaka kDa označava molekulski standard PageRuler™ Prestained Protein Ladder 10-180 kDa.



Solubilizirani proteini su pročišćeni kao i prvi put s 200  $\mu$ L glutation sefarnoznih kuglica. Proteini GST-BPM1 i GST-BPM1 $\Delta$ SPOP uspješno su pročišćeni na očekivanim visinama te su signali bili vidljivo jači u odnosu na prvi pokušaj pročišćavanja. Usprkos neuspješne vizualizacije proteina u supernatantu nakon sonikacije i protein GST-BPM1 $\Delta$ SPOP uspješno je pročišćen u boljem priходу nego prilikom prvog pročišćavanja (**Slika 24**). Svi proteini pročišćeni su u većim količinama nakon indukcije u bakterijskom soju BL21 u mediju 4  $\times$  YT u odnosu na indukciju u bakterijskom soju Rosetta u mediju 2  $\times$  YT.



**Slika 24.** Detekcija proteina GST-BPM1, GST-BPM1 $\Delta$ MATH i GST-BPM1 $\Delta$ SPOP SDS-PAG elektroforezom nakon pročišćavanja na glutation sefarnoznoj matrici. Uspješno pročišćeni proteini označeni su crvenim krugom. Teoretske visine proteina označene su crnim strelicama. Oznake uzoraka: nevezana frakcija (FT), procisceni proteini vezani na glutation sefarnoznu matricu. Volumeni nanesenih uzoraka GST-BPM1 i GST-BPM1 $\Delta$ SPOP su 15  $\mu$ L, a GST-BPM1 $\Delta$ MATH 2  $\mu$ L zbog razlike u jačini ekspresije proteina. S proteinima GST-BPM1 $\Delta$ SPOP i GST-BPM1 $\Delta$ MATH pročistili su se i proteini koji odgovaraju visini proteina GST-BPM1, ali su to proteini koji imaju nespecifično vezanje za matricu kod pročišćavanja i ne predstavljaju GST-BPM1 protein. Oznaka kDa označava molekularni standard PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10-180 kDa.

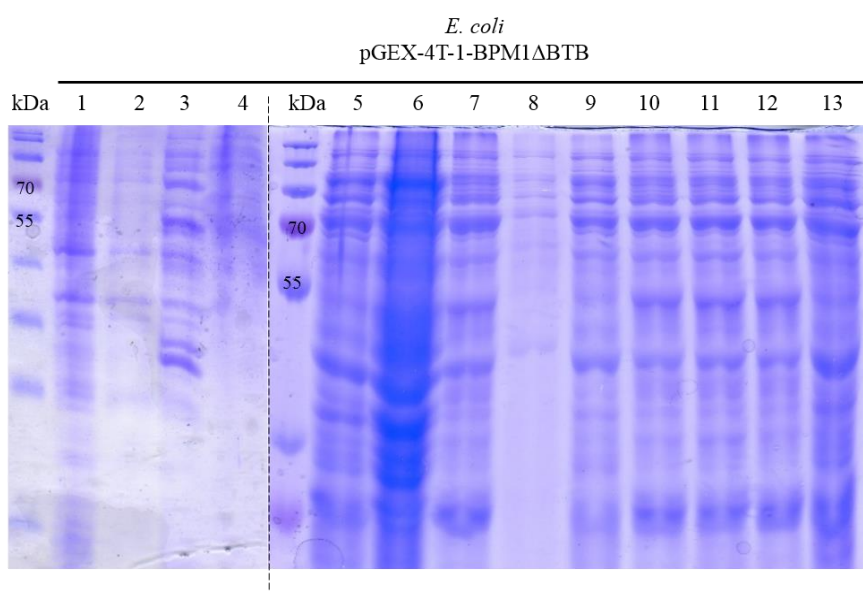
### 3.3.2. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanja proteina GST-BPM1 $\Delta$ BTB

Plazmid pGEX-4T-1-BPM1 $\Delta$ BTB korišten je za indukciju protein GST-BPM1 $\Delta$ BTB (očekivane veličine 61,55 kDa) u bakterijskim sojevima *E. coli* Rosetta i BL21. Obzirom na pretpostavku da delecija domene BTB uzrokuje najveću nestabilnost proteina BPM1, pripravljena je preparativna indukcija GST-BPM1 $\Delta$ BTB soja BL21 ili Rosetta u mediju TB uz prisutnost različitih aditiva (**Slika 25A**). Nakon bakterijskog rasta svi su uzorci tretirani 20 min na ledu nakon čega su proteini inducirani 18 h na 15 °C dodatkom 0,3 do 1 mM IPTG-a. Neki uzorci su imali predtretman na 47 °C 20 min nakon dodatka IPTG-a. Uspješnost indukcije proteina provjerena je analizom ukupnih proteina uzoraka svih tretmana i negativne kontrole (bez dodanog IPTG-a). Nijedan uzorak nije imao vidljivu indukciju u usporedbi s neinduciranim uzorcima (**Slika 25B**) zbog čega je provedena imunodetekcija antitijelom anti-GST. Jedini pozitivan signal na pravoj visini od 61,55 kDa je imala inducirana bakterijska kultura *E. coli* Rosetta kojoj je dodan 0,1 M MgCl<sub>2</sub> i 2% glicerol. Ovaj uzorak također pokazuje signal parcijalne translacije na otprilike 35 kDa što ukazuje na to da tijekom indukcije GST-BPM1 $\Delta$ BTB dolazi do proizvodnje krnjeg produkta uz proizvodnju cjelovitog protein (**Slika 25C**). Negativni rezultati imunodetekcije nisu prikazani.

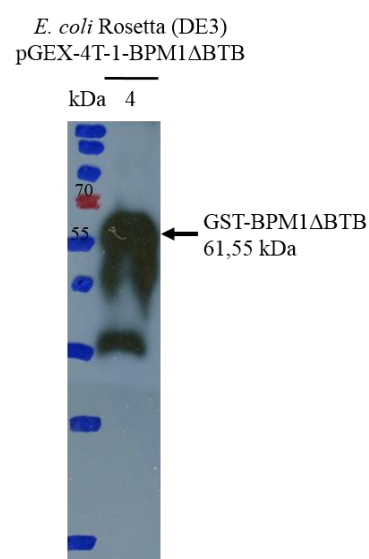
A

Jažica	Aditiv	IPTG (mM)	Soj	Jažica	Aditiv	IPTG (mM)	Soj
1	-	0	R	8	0,2 % Glc*	0,5	R
2	0,1 M MgCl <sub>2</sub> + 2 % glicerol	0	R	9	1 mM betain + 0,5 M NaCl + 0,2 % Glc	0,3	B
3	-	0,5	R	10	0,05 % Tween-20 + 100 mM manitol	0,5	R
4	0,1 M MgCl <sub>2</sub> + 2 % glicerol	0,5	R	11	500 mM prolin	0,5	R
5	1 % EtOH	1	B	12	100 mM sorbitol	0,5	R
6	3 % EtOH	0,5	B	13	50 mM L-arginin + 50 mM L-glutamat	0,5	B
7	2 % glicerol	0,5	R				

B



C

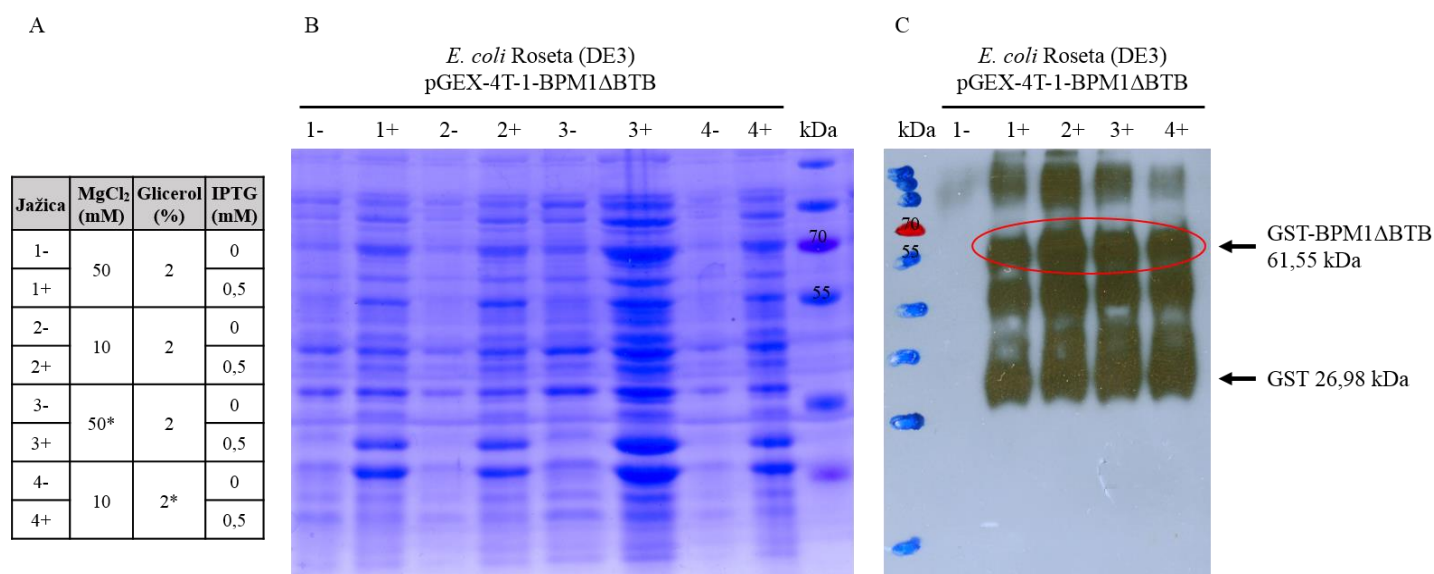


**Slika 25.** Preparativna indukcija GST-BPM1ΔBTB **A)** Uvjeti indukcije bakterija *E. coli* BL21 **(B)** ili Rosetta **(R)** u mediju TB uz varijacije aditiva, tretmana i dodatka glukoze. Zvezdica (\*) označava predtretman na 47 °C 20 min nakon dodatka IPTG-a. Indukcija je trajala 18 h na 15 °C. Jažice 1 i 2 su negativne kontrole u koje nije dodan IPTG. **B)** Analiza ukupnih proteina SDS-PAG elektroforezom. Nijedna jažica ne pokazuje jasan signal na očekivanoj visini proteina GST-BPM1ΔBTB (61,55 kDa). **C)** Imunodetekcija proteina GST-BPM1ΔBTB na PVDF membrani anti-GST antitijelom u uzorku s 0,1 M MgCl<sub>2</sub> i 2% glicerolom. Protein je detektiran na teoretskoj visini od 61,55 kDa kao i njegov parcijalni produkt translacije na 35 kDa. Signal je detektiran uz ekspoziciju od 15 min. Oznaka kDa označava molekulski standard PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10-180 kDa odnosno PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder 10-250 kDa.

Nakon potvrde uspješne indukcije GST-BPM1ΔBTB za pročišćavanje proteina potaknuta je indukcija u većem volumenu uz iste uvjete. Protein su inducirani dva puta u prisutnosti 0,1 M MgCl<sub>2</sub> i 2% glicerola. Bakterije su prvi put rasle u 250 mL medija TB 2,5 h na 37 °C, a drugi

put u 300 mL medija TB 1 h na 37 °C. U oba slučaja su signali indukcije bili negativni (nije prikazano). U oba pokušaja u trenutku indukcije bakterije su izašle iz eksponencijalne faze rasta i ušle u stacionarnu fazu odumiranja, čak i nakon 1 h rasta (OD = 1,7) dok je za indukciju proteina idealna OD vrijednost od 0,6 do 1,0.

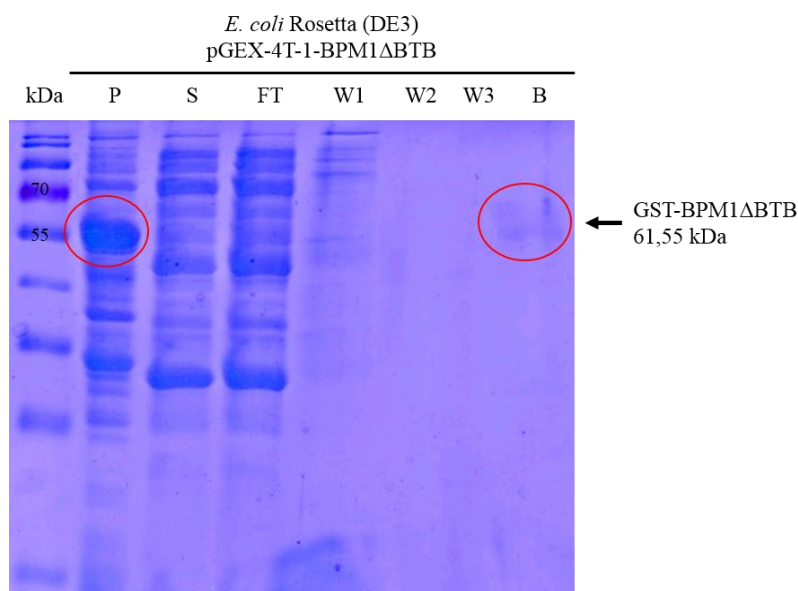
Indukcija proteina GST-BPM1ΔBTB u većem volumenu nakon pozitivne preparativne indukcije nije bila uspješna. Obzirom da je vrlo vjerojatno MgCl<sub>2</sub> razlog pretjeranog bakterijskog rasta, protokol je optimiziran smanjenjem koncentracije MgCl<sub>2</sub> u 50 mL medija 4 × YT. Rast bakterija uspostavljen je koristeći 150 μL prekonoćne kulture *E. coli* Rosetta. U medij je dodano 10 mM ili 50 mM MgCl<sub>2</sub> i 2% glicerol koji su dodavani prije početka bakterijskog rasta ili neposredno nakon indukcije IPTG-om. Detaljni opis sastava uzoraka indukcije nalazi se na **Slici 26A**. Bakterije su bile predtretirane 30 min hladnim tremanom na 4 °C, a indukcija je tekla 18 h na 20 °C na 120 rpm. Nijedan uzorak nije imao vidljiv signal proteina GST-BPM1ΔBTB u induciranim uzorcima (**Slika 26B**), ali su rezultati imunodetekcije antitijelom anti-GST pokazali da je indukcija proteina GST-BPM1ΔBTB uspjela u sva četiri tretmana uz pojavu dva parcijalna produkta na veličinama od 40 kDa i 26,98 kDa čija visina odgovara proteinu GST (**Slika 26C**).



**Slika 26. A)** Uvjeti indukcije bakterije *E. coli* Rosetta u mediju 4 × YT uz varijacije koncentracije MgCl<sub>2</sub> i vremena dodavanja MgCl<sub>2</sub> i glicerola. Zvezdica (\*) označava da je aditiv dodan neposredno prije dodatka IPTG-a. Indukcija je tekla 18 h na 20 °C. **B)** Rezultati SDS-PAG elektroforeze indukcije proteina GST-BPM1ΔBTB. Teoretska visina proteina GST-BPM1ΔBTB je 61,55 kDa, ali nijedna jažica nije imala pozitivan signal. **C)** Imunodetekcija proteina GST-BPM1ΔBTB na PVDF membrani antitijelom anti-GST. Protein je detektiran na očekivanoj visini u svim tretmanima kao i parcijalni produkti translacije na 40 kDa odnosno 26,98 kDa (protein GST). Signal je detektiran na filmu uz

ekspoziciju od 30 min. Oznaka kDa označava molekularni standard PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10-180 kDa.

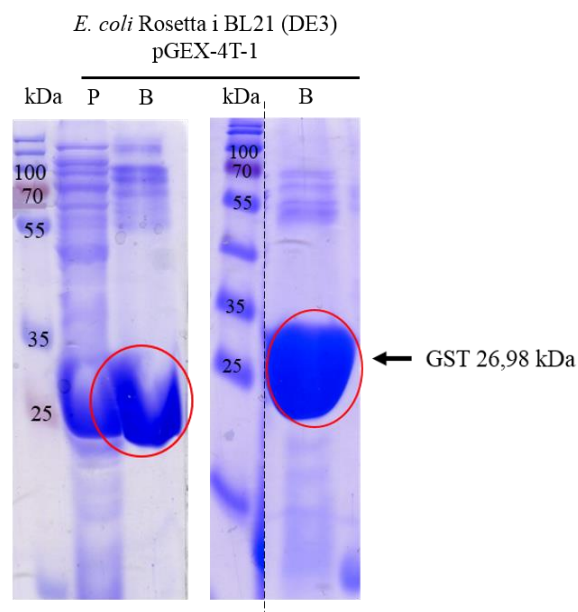
Za pročišćavanje proteina GST-BPM1 $\Delta$ BTB korištena je indukcija 3 (50 mM MgCl<sub>2</sub> dodan neposredno prije dodavanja IPTG-a i 2% glicerol dodan prije bakterijskog rasta). Protein GST-BPM1 $\Delta$ BTB pročišćen je prema ranije opisanoj protokolu sa 300  $\mu$ L glutation sefarnih kuglica. Na temelju dobivenih rezultata (**Slika 27**) vidljivo je da je protein GST-BPM1 $\Delta$ BTB izrazito netopiv pošto se većinskim dijelom nalazio u talogu, a vrlo malo proteina je bilo vidljivo u supernatantu. Protein je uspješno pročišćen, ali mu je prihod manji, usprkos većem volumenu korištenih glutation sefarnih kuglica nego kod ostalih delecijских varijanta proteina GST-BPM1.



**Slika 27.** Detekcija proteina GST-BPM1 $\Delta$ BTB SDS-PAGE elektroforezom nakon pročišćavanja na glutation sefarnoj matrici. Teoretska visina proteina označena je crnom strelicom, a uspješno pročišćen protein zaokružen je crvenim krugom. Oznake uzoraka: talog (P), supernatant (S), nevezana frakcija (FT), ispiranja 1-3 (W1-W3), pročišćeni protein vezan na glutation sefarnu matricu (B). Većina proteina GST-BPM1 $\Delta$ BTB zaostala je u talogu te je vrlo mala količina bila prisutna u supernatantu. Oznaka kDa označava molekularni standard PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10-180 kDa.

### 3.3.3. Pročišćavanje proteina GST

Plazmid pGEX-4T-1 korišten je za indukciju protein GST (očekivane veličine 26,98 kDa) u bakterijskim stanicama *E. coli* Rosetta (DE3) i BL21 (DE3). Indukcija i pročišćavanje proteina GST je rađena dva puta paralelno sa ostalim GST-označenim proteinima, u 100 mL medija 2 × YT iz bakterije *E. coli* Rosetta i u 100 mL medija 4 × YT (BL21). Nakon indukcije protein je pročišćen prema protokolu opisanom u sekciji 2.2.12 s 50 μL odnosno 100 μL glutation sefarnoznih kuglica. Protein GST uspješno je pročišćen i detektiran SDS PAG elektroforezom na očekivanoj visini (**Slika 28**).

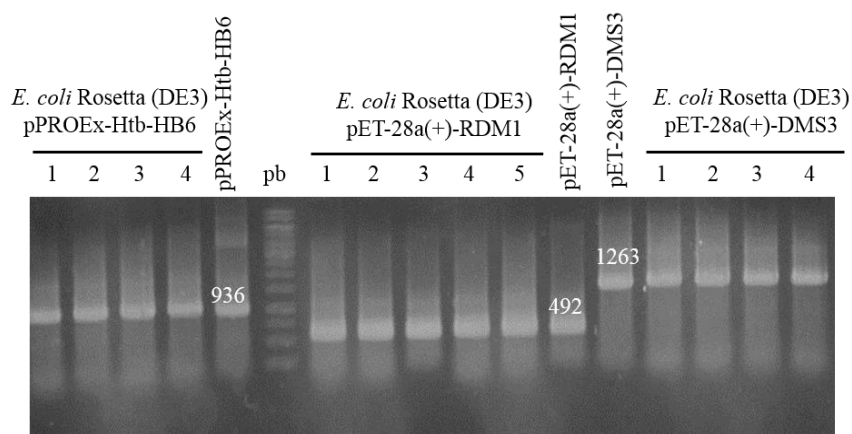


**Slika 28.** Detekcija proteina GST SDS-PAG elektroforezom nakon pročišćavanja na glutation sefarnoznoj matrici. Teoretska visina proteina označena je crnom strelicom, a uspješno pročišćen protein zaokružen je crvenim krugom. Lijevi gel označava repliku 1 (medij 2 × YT, Rosetta), a desni repliku 2 (4 × YT, BL21). Oznake uzoraka: talog (P), pročišćeni protein vezan na glutation sefarnoznu matricu (B). Oznaka kDa označava molekulski standard PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10-250 kDa odnosno PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10-180 kDa.

## 3.4. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje interakcijskih partnera proteina BPM1

Interakcijski partneri (DMS3, RDM1 i HB6) proteina BPM1 su izvorno trebali biti prekomjerno ekspimirani s GST-privjeskom, ali obzirom da su za reakciju kopurifikacije

inducirani i uspješno pročišćeni isključivo protein BPM1 i njegove delecije varijante s GST-privjeskom, interakcijski partneri su inducirani sa  $6 \times$  His-privjeskom. Plazmidi pET-28a(+)-DMS3 (Lorković i sur., 2012), pET-28a(+)-RDM1 i pPROEx-Htb-HB6 (Tokić, 2019) koji kodiraju za protein His-DMS3, His-RDM1 i His-HB6 su uspješno uneseni transformacijom u bakterijski soj *E. coli* Rosetta™ (DE3). Transformacija je provjerena reakcijom PCR In fusion početnicama (**Tablica 2**). Veličine vizualiziranih DNA fragmenata koje potvrđuju prisustvo plazmida su: 492 pb za pET-28a(+)-RDM1, 936 pb za pPROEx-Htb-HB6 i 1263 pb za pET-28a(+)-DMS3 (**Slika 29**). Iz uspješno transformiranih bakterija je uspostavljena prekonoćna kultura koja je služila za uspostavljanje kultura većih volumena u svrhu indukcije proteina His-DMS3, His-RDM1 i His-HB6.



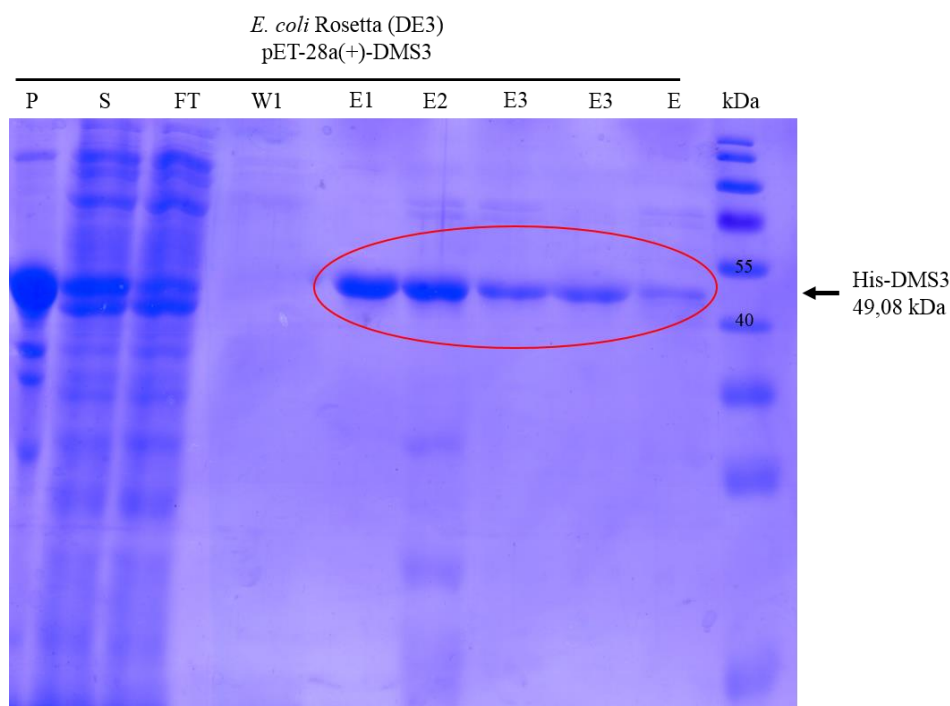
**Slika 29.** Provjera transformacije bakterijskog soja *E. coli* Rosetta plazmidima pPROEX-Htb-HB6, pET-28a(+)-RDM1 i pET-28a(+)-DMS3. Kao pozitivne kontrole korišteni su plazmidi. Veličine fragmenata u parovima baza prikazane su povrh fragmenta. Oznaka pb označava molekularni standard Gene Ruler 1 kb DNA Ladder, a brojevi 1-4 broj replike bakterijske kolonije.

### 3.4.1. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanja proteina His-DMS3

Protein His-DMS3 pročišćen je u tri replike. Prvi put je induciran u 300 mL medija  $4 \times$  YT i 0,5 mM IPTG. Indukcija je trajala 3 h na  $37^\circ\text{C}$ , a protein je pročišćen s 200  $\mu\text{L}$  Ni-NTA kuglica prema protokolu iz sekcije 2.2.11. te mu je promijenjen pufer kako bi imao isti puferski sustav kao i proteini mamci (sekcija 2.2.11.1.). Protein je uspješno pročišćen (nije prikazano). U eluensima su bili prisutni i proteini koji su se nespecifično vezali za Ni-NTA matricu s obzirom da proteini prirodno mogu imati nekoliko uzastopnih histidna.

Druga i treća replika su inducirane paralelno u 100 mL medija  $4 \times$  YT s 0,5 mM IPTG-om.

Postupak pročišćavanja je isti kao i za repliku 1, ali je za drugu repliku korišteno 100  $\mu$ L Ni-NTA kuglica, a za repliku 3 300  $\mu$ L Ni-NTA kuglica. Rezultati su bili pozitivni za obje replike te je protein His-DMS3 pročišćen na očekivanoj visini od 49,08 kDa. Replika 2 ima višu stopu čistoće proteina His-DMS3 vjerovatno zbog upotrebe manje količine Ni-NTA kuglica što je smanjilo nespecifično vezanje budući da je većinu mjesta na  $\text{Ni}^{2+}$  popunio protein His-DMS3 (**Slika 30.**). Iako je replika 3 imala lošiju čistoću, imala je puno veću količinu proteina His-DMS3 (**Prilog Slika VI.**).



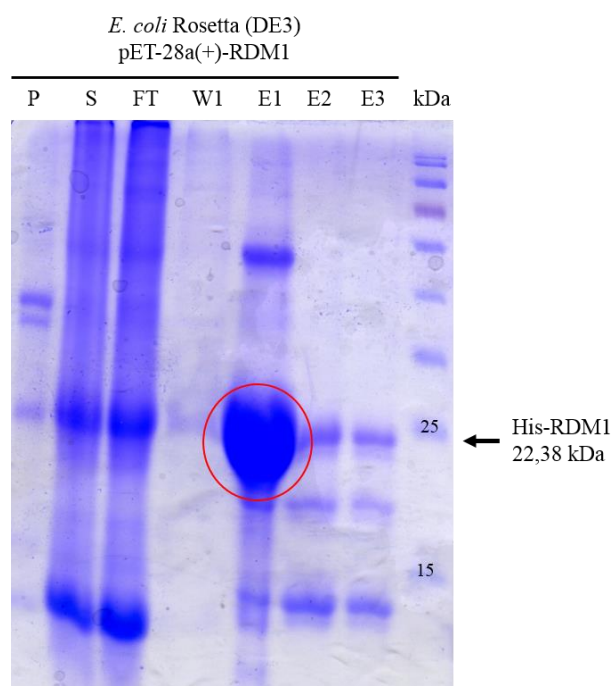
**Slika 30.** Detekcija proteina His-DMS3 SDS-PAG elektroforezom nakon pročišćavanja na Ni-NTA matrici (replika 2). Protein ima označenu teoretsku visinu crnom strelicom, a zaokružen je crvenim krugom u eluensima. Protein His-DMS3 uspješno je pročišćen te se nalazi u topivom obliku u supernatantu i eluensima. Oznake uzoraka: talog (P), supernatant (S), nevezana frakcija (FT), ispiranje 1 (W1), ciljani protein ispran sa Ni-NTA matrice (E1-E3), spojene frakcije eluensa sa promijenjenim puferkim sustavom (E). Oznaka kDa označava molekulski standard PageRuler™ Prestained Protein Ladder 10-180 kDa.

### 3.4.2. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanja proteina His-RDM1

Protein His-RDM1 je pročišćen jednom. Induciran je u 300 mL medija  $4 \times$  YT 0,5 mM IPTG-om. Indukcija je trajala 3 h na 37 °C, a proteini su pročišćeni kao i replika 1 proteina His-DMS3. Rezultati su pokazali uspješno pročišćavanje proteina His-RDM1 uz visoku čistoću u odnosu na pročišćene proteine His-DMS3 i His-HB6 kada se koristio isti volumen Ni-NTA kuglica.



Zbog izrazite ekspresije i topivosti His-RDM1 zasiti većinu slobodnih koordinacijskih mjesta na Ni-NTA matrici. His-RDM1 je detektiran na teoretskoj visini od 22,38 kDa u supernatantu i eluensima. Protein His-RDM1 je pokazao najveću stabilnost od svih interakcijskih partnera te vrlo nisku stopu degradacije u odnosu na proteine His-DMS3 i His-HB6 (**Slika 31**).



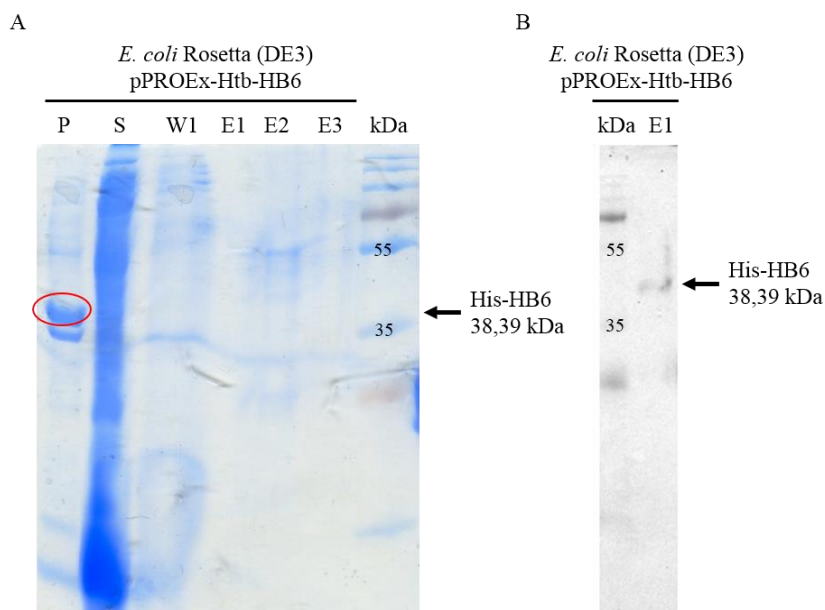
**Slika 31.** Detekcija proteina His-RDM1 SDS-PAG elektroforezom nakon pročišćavanja na Ni-NTA matrici. Protein ima označenu teoretsku visinu proteina crnom strelicom, a zaokružen je crvenim krugom u eluensu 1. Uspješno se pročistio te se nalazi u topivom obliku u supernatantu i eluensima. Oznake uzoraka: talog (P), supernatant (S), nevezana frakcija (FT), ispiranja (W1), ciljani protein ispran sa Ni-NTA matrice (E1-E3). Oznaka kDa označava molekularni standard PageRuler™ Prestained Protein Ladder 10-180 kDa.

### 3.4.3. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanja proteina His-HB6

Protein His-HB6 je zbog izrazite nestabilnosti, slabe ekspresije, visoke stope onečišćenja proteinima koji se vežu nespecifično za Ni-NTA matricu i kratkog poluživota, pročišćen tri puta. Sva tri puta je pročišćen uspješno, ali u preniskoj koncentraciji za uspješnu reakciju kopurifikacije s proteinom GST-BPM1 i njegovim delecijским varijantama.

Prva replika je pročišćena iz inducirane prekonocne kulture u 300 mL medija  $4 \times$  YT u tikvicama od 2 L. Proizvodnja proteina inducirana je 3 h na 37 °C dodatkom 0,5 mM IPTG-a, a His-HB6 je pročišćen kao i proteini DMS3-His i RDM1-His s 200  $\mu$ L Ni-NTA kuglica. Rezultati su pokazali pozitivan signal za protein His-HB6 u talogu na teoretskoj visini od 38,39

kDa. U supernatantu i eluensima signal nije bio vidljiv (**Slika 32A**), ali nakon imunodetekcije antitijelom anti-His, His-HB6 je vizualiziran u eluensu na očekivanoj visini (**Slika 32B**).



**Slika 32.** Pročišćavanje proteina His-HB6 (replika 1) **A)** Analiza pročišćavanja proteina His-HB6 nakon SDS-PAG elektroforeze. Protein ima teoretsku visinu od 38,39 kDa i označen je crvenim krugom u talogu, odnosno crnom strelicom. Oznake uzoraka: talog (P), supernatant (S), ispiranja (W1), ciljani protein ispran sa Ni-NTA matrice (E1-E3). **B)** Imunodetekcija proteina His-HB6 u eluensu 1 na PVDF membrani antitijelom anti-His. Crna strelica označava protein na visini od 38,9 kDa. Membrana je slikana na uređaju iBright Western Blot Imaging Systems uz ekspoziciju od 20 min. Oznaka kDa označava molekularni standard PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder 10-250 kDa.

Druga replika je inducirana u dvije tikvice od 200 mL u 50 mL medija  $4 \times$  YT. Indukcija je potaknuta 3,5 h na  $37^\circ\text{C}$  dodatkom 0,5 mM IPTG-a. Nakon završene indukcije, dvije frakcije od 50 mL su spojene, centrifugirane, isprane i sonicirane u puferu LyB1 (**Tablica 4**) nakon čega su proteini pročišćeni sa 200  $\mu\text{L}$  Ni-NTA kuglica kao i replika 1. Rezultati su pokazali da je protein His-HB6 ponovno induciran na dobroj visini od 38,39 kDa. Za razliku od replike 1 u ovoj replici se u eluensima naziru signali na teoretskoj visini koji bi potencijalno mogli odgovarati His-HB6 (**Prilog Slika VII**). Ova replika je imala puno više nespecifičnih vezanja proteina tokom pročišćavanja u odnosu na repliku 1 pa je i veća koncentracije proteina nego u replici 1.

Zadnja replika je inducirana u tikvici od 1 L u 200 mL medija  $4 \times$  YT. Indukcija je trajala 18 h na  $15^\circ\text{C}$  uz dodatak 0,5 mM IPTG-a. Cijeli postupak ekstrakcije proteina je isti kao u prethodne dvije replike osim što je bakterijski talog soniciran u puferu LyB2 (**Tablica 4**). Proteini su pročišćeni sa 100  $\mu\text{L}$  Ni-NTA kuglica prema već spomenutom protokolu. Rezultati

SDS-PAG elektroforeze su pokazali najveću stopu onečišćenja proteinima koji se vežu nespecifično u odnosu na prethodne dvije replike. Signal od 38,39 kDa je samo vidljiv u talogu i potencijalno u supernatantu dok se u eluensima ne nazire vidljiv signal (nije prikazano).

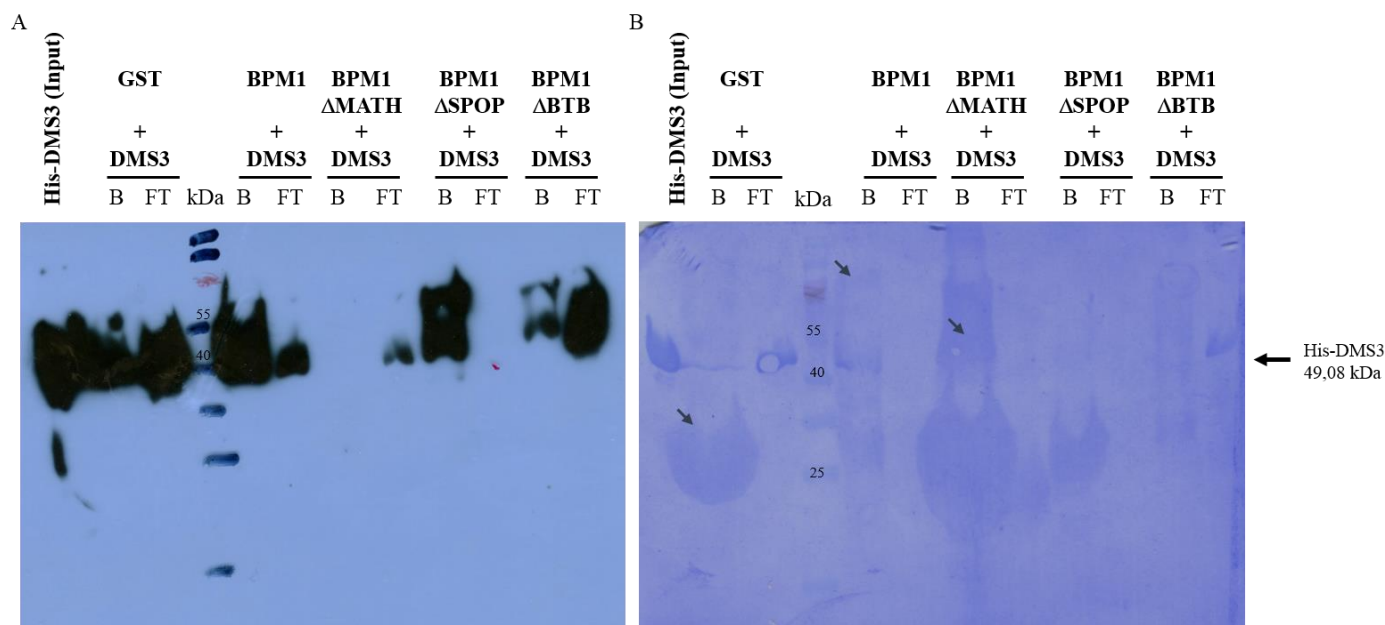
## **3.5. Kopurifikacija proteina GST-BPM1 i njegovih delecijских varijanta s His-DMS3, His-RDM1 i His-HB6**

Interakcije proteina GST-BPM1 i njegovih delecijских varijanta s proteinima His-DMS3, His-RDM1 i His-HB6 su provjerene kopurifikacijom. Mamac (protein s GST-privjeskom) je vezan za glutation sefarožnu matricu, a plijen (protein s His-privjeskom) ukoliko se veže za mamac se pročišćuje zajedno s mamcem nakon niza ispiranja na glutation sefaroži. Detekcija interakcija je provjerena hibridizacijom po Westernu antitijelom anti-His koje detektira interakcijske partnere, dok su proteini s GST-privjeskom detektirani direktno na PVDF membrani obojanom bojom CBB.

### **3.5.1. Kopurifikacija proteina GST-BPM1 i njegovih delecijских varijanta s proteinom His-DMS3**

Interakcija proteina GST-BPM1 $\Delta$ MATH, GST-BPM1 $\Delta$ SPOP i GST-BPM1 $\Delta$ BTB s proteinom His-DMS3 je provjerena kopurifikacijom „jedan na jedan“. Zbog izrazite nestabilnosti proteina His-DMS3 i kratkog poluživota, kopurifikacija je rađena u četiri replike, od kojih je treća bila uspješna. Ona je imala najvišu koncentraciju proteina His-DMS3 u odnosu na ostale dvije replike pročišćavanja (0,57 mg/mL). Svaka reakcija se sastojala od 50  $\mu$ L proteina His-DMS3 i 30  $\mu$ L proteina mamca vezanim za glutation sefarožne kuglice. Kao negativna kontrola korišten je protein GST vezan za glutation sefarožne kuglice (10  $\mu$ L) sa 50  $\mu$ L His-DMS3 (kako bi se spriječili lažno pozitivni signali radi vezanja proteina na sam GST), a za pozitivnu kontrolu korišten je cijeli GST-BPM1 čije je vezivanje s His-DMS3 poznato od prije. Protein His-DMS3 je imunodetektiran antitijelom anti-His na PVDF membrani na teoretskoj visini od 49,08 kDa u *input*-u (plijen bez mamca). Signali od 49,08 kDa u jažicama s reakcijskim smjesama (oznaka B na **Slici 23A**) ukazuju na vezivanje proteina His-DMS3 s proteinima GST-BPM1, GST-BPM1 $\Delta$ SPOP i GST-BPM1 $\Delta$ BTB, dok je za GST-BPM1 $\Delta$ MATH negativan te je signal His-DMS3 vidljiv samo u nevezanoj frakciji. Signal

u nevezanoj frakciji His-DMS3 + GST-BPM1 $\Delta$ MATH puno je slabiji u odnosu na ostale nevezane frakcije (FT) gdje postoji pozitivan signal vezanja na mamcima. Budući da bi u slučaju ne vezivanja His-DMS3 proteina na GST-BPM1 $\Delta$ MATH očekivali puno jači signal u frakciji FT postoji mogućnost da se dio proteina izgubio tijekom manipulacije te ne možemo sa sigurnošću odbaciti mogućnost interakcije His-DMS3 i GST-BPM1 $\Delta$ MATH. Negativan signal His-DMS3 u nevezanoj frakciji proteina GST-BPM1 $\Delta$ SPOP sugerira snažan afinitet His-DMS3 prema GST-BPM1 $\Delta$ SPOP (**Slika 33A**). Signal je vidljiv i u negativnoj kontroli, proteinu GST vezanim za glutation sefarnu matricu uslijed preduge ekspozicije filma. Signal se nije pojavljivao u reakciji s GST nakon smanjenja trajanja ekspozicije (nije prikazano) ili slikanjem membrane na uređaju C-DiGit Chemiluminescent Western Blot Scanner (LI-COR, BioSciences) (nije prikazano). Na membrani su vidljivi mamci GST-BPM1 na teoretskoj visini od 71,02 kDa i GST-BPM1 $\Delta$ MATH na teoretskoj visini od 55,92 kDa kao i njegov parcijalni produkt koji je nastao vjerojatno uslijed degradacije. Proteini GST-BPM1 $\Delta$ SPOP i GST-BPM1 $\Delta$ BTB nisu vidljivi vjerojatno uslijed preniske koncentracije ili potencijalne degradacije na membrani. His-DMS3 je vidljiv u istim jažicama kao i na filmu te nema pozitivan signal na proteinu GST, GST-BPM1 $\Delta$ MATH i nevezanoj frakciji proteina GST-BPM1 $\Delta$ SPOP. Na membrani signal His-DMS3 nije vidljiv u nevezanoj frakciji proteina BPM1-GST i BPM1 $\Delta$ MATH-GST, ali su ti signali na filmu najslabiji u odnosu na ostale nevezane frakcije u kojima se javlja signal pa je vjerojatno premala količina proteina His-DMS3 na membrani da se detektira bojom CBB (**Slika 33B**). His-DMS3 interagira sa svim proteinima mamcima osim GST-BPM1 $\Delta$ MATH.

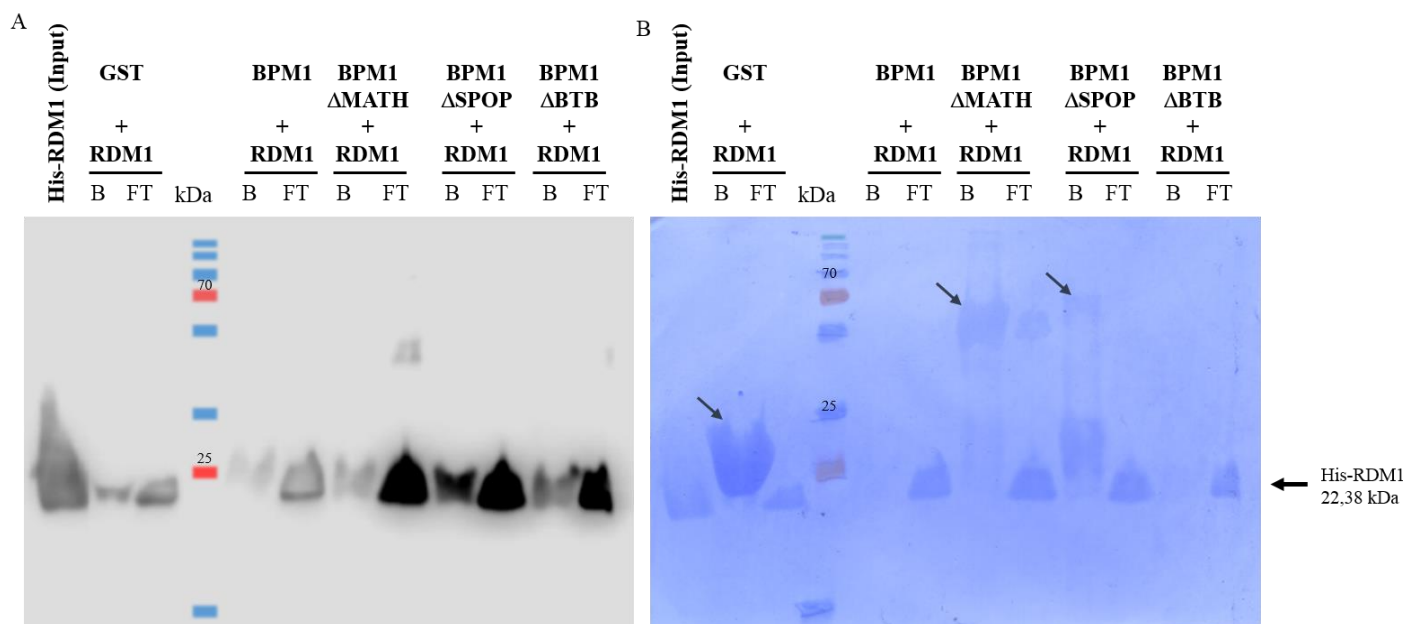


**Slika 33.** Vezivanje proteina His-DMS3 na GST-BPM1 i njegove delecijske varijante. **A)** Imunodetekcija His-DMS3 antitijelom anti-His na teoretskoj visini od 49,08 kDa u reakciji kopurifikacije. His-DMS3 je interagirao sa svim mamcima osim GST-BPM1ΔMATH. Signal je negativan u nevezanoj frakciji proteina GST-BPM1ΔSPOP. Oznake: reakcija vezivanja His-DMS3 proteina na mamce (B) i nevezana frakcija proteina (FT). Signali su detektirani na filmu uz ekspoziciju od 30 min. **B)** Detekcija proteina mamca i plijena u reakciji kopurifikacije na PVDF membrani obojanom CBB-om. Crnim strelicama su označeni detektirani mamci na teoretskim visinama (GST 26,98 kDa, GST-BPM1 71,02 kDa i GST-BPM1ΔMATH 55,92 kDa). Oznaka kDa označava molekularni standard PageRuler™ Prestained Protein Ladder 10-180 kDa.

### 3.5.2. Kopurifikacija proteina GST-BPM1 i njegovih delecijskih varijanta s proteinom His-RDM1

Interakcija proteina GST-BPM1ΔMATH, GST-BPM1ΔSPOP i GST-BPM1ΔBTB s proteinom His-RDM1 je provjerena kopurifikacijom „jedan na jedan“. Kopurifikacija je rađena u dvije uspješne replike na kojima su vidljivi jednaki rezultati interakcija. U replici 2 reakcija se sastojala od 4 μL proteina His-RDM1 (konačne koncentracije 0,11 μg/mL) i 30 μL proteina mamca vezanim za glutation sefarozone kuglice. Kao negativna kontrola korišten je protein GST vezan za glutation sefarozone kuglice (10 μL) pomiješan sa 4 μL His-RDM1-His, a za pozitivnu kontrolu korišten je GST-BPM1 čije je vezivanje s His-RDM1 otprije poznato. Imunodetekcija antitijelom anti-His pokazala je protein His-RDM1 na teoretskoj visini od 22,38 kDa u pozitivnoj kontroli kao i u negativnoj kontroli te u svim uzorcima proteina mamaca i njihovih

nevezanih frakcija. Iako se His-RDM1 veže za negativnu kontrolu GST i glutation sefarozne kuglice, signal vezanja je vidljivo puno slabiji u odnosu na interakciju s proteinima mamcima, a signal mamca GST je puno snažniji od ostalih signala mamaca (**Slika 34A**). U replici 1 signal vezanja His-RDM1 za GST je negativan (**Prilog Slika VIII.**), ali se vidi slabi pozitivan signal na glutation sefaroznim kuglicama koje su korištene kao dodatna negativna kontrola. Postoji mogućnost da zbog male veličine proteina His-RDM1 zapinje u pore kuglica. Rezultati se podudaraju sa signalima na PVDF membrani obojanom CBB-om gdje se vidi pozitivan signal His-RDM1 u svim jažicama kao i na membrani osim u interakciji s proteinom GST-BPM1 uslijed vrlo male količine proteina koja je bila u reakcijskoj smjesi zbog gubitka glutation sefaroznih kuglica tokom procesa ispiranja. Usprkos maloj količini GST-BPM1 proteina, interakcija vezanja s proteinom His-RDM1 je i dalje vidljiva imunodetekcijom na membrani. Na membrani su vizualizirani mamci GST-BPM1 $\Delta$ MATH (55,92 kDa) i GST-BPM1 $\Delta$ SPOP (63,96 kDa) dok ostali mamci nisu detektirani bojom CBB vjerojatno uslijed premale količine proteina (**Slika 34B**). His-RDM1 se veže za sve domene proteina BPM1 te ne pokazuje veći afinitet vezanja ni za jednu domenu, ali se slabo veže za negativnu kontrolu.

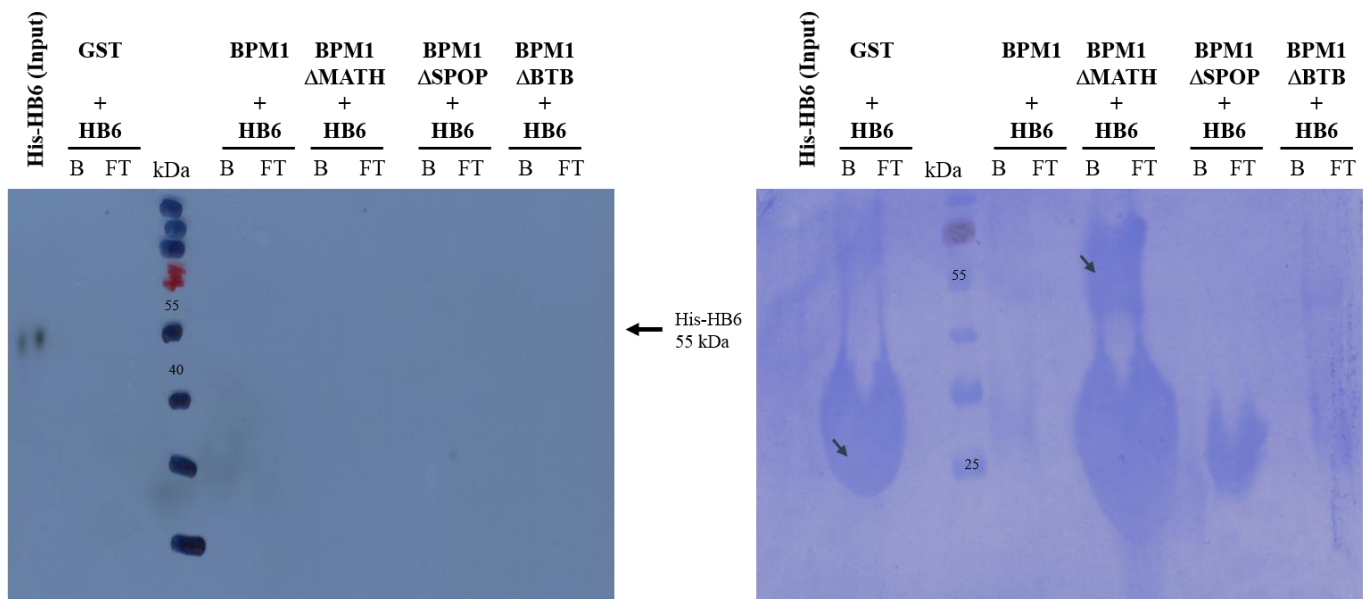


**Slika 34.** Vezivanje proteina His-RDM1 na GST-BPM1 i njegove delcijske varijante (replika 2). **A**) Imunodetekcija His-RDM1 antitijelom anti-His na teoretskoj visini od 22,38 kDa u reakciji kopurifikacije. His-RDM1 ima pozitivnu interakciju sa svim uzorcima. Signal je pozitivan u reakciji s proteinom GST, ali je intenzitet vezanja puno slabiji u odnosu na ostale proteine. Oznake: reakcija vezivanja His-RDM1 proteina na mamce (B) i nevezana frakcija proteina (FT). Membrana je detektirana na uređaju C-DiGit Chemiluminescent Western Blot Scanner (LI-COR, BioSciences) na visokoj osjetljivosti (12 min) **B**) Vizualizacija proteina mamca i plijena u reakciji kopurifikacije na PVDF

membrani bojom CBB. Crnim strelicama su označeni detektirani mamci na teoretskim visinama (GST 26,98 kDa, GST-BPM1 $\Delta$ MATH 55,92 kDa i GST-BPM1 $\Delta$ SPOP 63,96 kDa). Oznaka kDa označava molekularni standard PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder 10-250 kDa.

### 3.5.3. Kopurifikacija proteina GST-BPM1 i njegovih delecijских varijanta s proteinom His-HB6

Interakcija proteina GST-BPM1 $\Delta$ MATH, GST-BPM1 $\Delta$ SPOP i GST-BPM1 $\Delta$ BTB s proteinom His-HB6 je provjerena kopurifikacijom „jedan na jedan“. Kopurifikacija je rađena u 4 replike od kojih nijedna replika nije imala pozitivne signale uslijed vrlo niske koncentracije i stabilnosti proteina His-HB6. Početna koncentracija His-HB6 se kretala od 0,11 do 0,79 mg/mL ovisno o replici pročišćavanja, ali je ovaj protein pokazao najvišu stopu onečišćenja proteinima koji se vežu nespecifično za Ni-NTA matricu pa je realna koncentracija proteina His-HB6 puno manja od izmjerene. U svakoj replici kopurifikacije pomiješan je maksimalan mogući volumen proteina His-HB6 s 30  $\mu$ L proteina mamca vezanim za glutation sefarozne kuglice. Kao negativna kontrola korišten je protein GST vezan za glutation sefarozne kuglice, a pozitivna kontrola vezivanja bio je GST-BPM1 čija je interakcija s HB6 od prije poznata. Četvrti pokušaj kopurifikacije je jedini imao pozitivan signal u *inputu* imunodetekcijom antitijelom anti-His, ali je visina proteina His-HB6 na visini od 55 kDa umjesto na teoretskoj visini od 38,39 kDa (**Slika 35A**). Rezultati se podudaraju s PVDF membranom obojanom bojom CBB gdje se ne vidi nijedan pozitivan signal His-HB6. U *inputu* nema pozitivnog signala vjerojatno uslijed premale količine proteina His-HB6 da se detektira bojom CBB. Na membrani je samo vizualiziran mamac GST-BPM1 $\Delta$ MATH (55,92 kDa) te njegovi parcijalni produkti nastali uslijed degradacije kao i parcijalni produkti degradacije GST-BPM1 $\Delta$ SPOP dok ostali mamci nisu detektirani bojom CBB vjerojatno uslijed premale količine ili uslijed degradacije proteina na membrani i/ili na glutation sefaroznim kuglicama (**Slika 35B**). Na temelju dobivenih rezultata ne može se zaključiti ništa o interakciji proteina HB6 s domenama MATH, BTB i SPOP proteina BPM1 uslijed vjerojatne degradacije proteina HB6 i/ili premale koncentracije koja bi se vizualizirala imunodetekcijom.



**Slika 35.** Vezivanje proteina His-HB6 na GST-BPM1 i njegove delcijske varijante. **A)** Imunodetekcija His-HB6 antitijelom anti-His na visini od 55 kDa. Teoretska visina proteina je 38,39 kDa. His-HB6 nije detektiran u ostalim uzorcima vjerojatno uslijed degradacije proteina ili premale količine proteina za imunodetekciju. Oznake: reakcija vezivanja proteina His-HB6 na mamce (B) i nevezana frakcija proteina (FT). Signali su detektirani na filmu uz ekspoziciju od 60 min. **B)** Detekcija proteina mamca i plijena u reakciji kopurifikacije na PVDF membrani obojanom CBB-om. Crnim strelicama su označeni detektirani mamci na teoretskim visinama (GST 26,98 kDa, i BPM1 $\Delta$ MATH-GST 55,92 kDa). Oznaka kDa označava molekulski standard PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10-180 kDa.



## 4. RASPRAVA

Cilj ovog istraživanja je bio istražiti ulogu domena MATH, BTB i SPOP proteina BPM1 u interakciji s proteinima RdDM puta DMS3 i RDM1 te transkripcijskim faktorom HB6. U tu svrhu bilo je potrebno inducirati i pročistiti protein BPM1 i njegove delecijske varijante BPM1 $\Delta$ MATH, BPM1 $\Delta$ BTB i BPM1 $\Delta$ SPOP te interakcijske partnere DMS3, RDM1 i HB6 obilježene s GST- odnosno His -privjeskom što podrazumijeva niz metodološki zahtjevnih postupaka ekspresije i pročišćavanja proteina koji za svaki protein ili varijantu moraju biti specifično uspostavljeni.

### 4.1. Ekspresija proteina i uspješnost pročišćavanja

#### 4.1.1. Ekspresija i pročišćavanje proteina BPM1, BPM1 $\Delta$ MATH, BPM1 $\Delta$ BTB i BPM1 $\Delta$ SPOP obilježenih privjeskom GST

*Escherichia coli* je najčešći domaćin za proizvodnju i prekomjernu produkciju proteina usprkos limitirajućim faktorima proteinske ekspresije. Glavni limitirajući faktor proteinske indukcije u prokariotskom sustavu je mogućnost formiranja proteinskih agregata i netopivih inkluzijskih tjelešaca (Costa i sur., 2014). Kako bi se pospješio proteinski prihod, protein BPM1 je konstruiran u obliku fuzijskog proteina sa proteinskim privjeskom His odnosno GST. Proteinski privjesci se koriste kako bi se omogućila lakša purifikacija proteina i povećala proteinska topivost, ali ponekad mogu i destabilizirati proteine (Costa i sur., 2014). Privjesci GST i MBP (engl. *Maltose binding protein*) dokazano poboljšavaju prekomjernu ekspresiju i topivost u odnosu na proteine koji nemaju ove privjeske (Zhou i Wagner, 2010). Protein GST-BPM1 je ranije uspješno induciran u mediju LB, ali uz slabu ekspresiju i topivost (Tokić, 2019). U ovom radu se pokušala optimizirati topivosti proteina BPM1 promjenom bakterijskog ekspresijskog soja *E. coli* i medija za rast. Naime proteinska ekspresija se najčešće provodi u mediju LB, ali u svrhu većeg prihoda proteina i u nekim slučajevima bolje topivosti te manje produkcije toksičnih metabolita, koriste se visoko hranjivi mediji kao što su TB, 2  $\times$  YT i 4  $\times$  YT. Razlike u preživljenju bakterija, a time i proteinske indukcije proizlaze iz činjenice da se bakterijama mijenja stopa metaboliziranja komponenta koje se nalaze u visoko hranjivim medijima (Kram i Finkel, 2015). Bilgimol i sur. (2015) navode da različita koncentracija peptona i ekstrakta kvasca može povećati koncentraciju rekombinantnih proteina. Na temelju dobivenih rezultata vidljivo je da se topivost i razina ekspresije proteina GST-BPM1 povećala

promjenom medija  $2 \times \text{YT}$  u medij  $4 \times \text{YT}$ . Potencijalan razlog povećane ekspresije može se objasniti time što je medij  $4 \times \text{YT}$  bogatiji izvor ugljika uslijed veće koncentracije peptona koji podržava rast bakterijske biomase (Ukkonen, 2014).

Drugi potencijalan razlog većeg prihoda rekombinantnog proteina GST-BPM1 može biti promjena ekspresijskog bakterijskog soja. Veći prihod proteina je ostvaren u replici u kojoj je korišten bakterijski soj *E. coli* BL21 (DE3) u odnosu na soj Rosetta (DE3) u kojem je prihod bio manji. Oba soja ne proizvode proteaze Lon i OmpT što stabilizira ekspresiju rekombinantnih proteina. Rosetta (DE3) sadrži vektor pRARE koji kodira za deset kodona u koje se ubrajaju i kodoni RIL (AGG/AGA, AUA, i CUA) koji su slabo zastupljeni u *E. coli*, a specifični su za eukariotske organizme. Općeniti problem je kada ribosom prepozna rijetki kodon (poput kodona RIL) nedovoljan broj potrebnih tRNA može uzrokovati translacijske pauze, prekid translacije i slabiju proizvodnju proteina (Novy i sur., 2001; Rosano i Ceccarelli, 2014). Stoga soj Rosetta (DE3) s plazmidom pRARE može doprinjeti većem proteinskom prihodu uslijed translacijskog ubrzanja (Bilgimol i sur., 2015). S druge strane povećana razina translacije može dovesti do nepravilnog smatanja proteina uz smanjenje topivosti proteina (Rosano i Ceccarelli, 2014). Ranija istraživanja su pokazala da ekspimirani proteini s više od 5% kodona RIL se većinom nalaze u netopivoj fazi (Rosano i Ceccarelli, 2014). Kodirajća sekvenca proteina BPM1 sadrži 5,8% kodona RIL, odnosno GST-BPM1 5,04%, a pojava translacijskog ubrzanja i njene negativne posljedice javljaju se ako je učestalost veća od 5%. Dodatni nedostatak soja Rosetta je da dio metaboličkog resursa usmjerava u održavanje plazmida pRARE ([wolfson.huji.ac.il/expression/rosetta.pdf](http://wolfson.huji.ac.il/expression/rosetta.pdf)).

GST-BPM1 je pokazao blagi pomak kretanja na gelu u slučaju indukcije u mediju  $2 \times \text{YT}$  (*E. coli* Rosetta). Detektiran je na visini od 60-65 kDa u talogu dok mu je teoretska visina 71,02 kDa. Sličan problem opaža i Tokić (2019). Tokić (2019) objašnjava ovu pojavu utjecajem privjeska GST na kretanje GST-BPM1 kroz gel pošto u svom radu opisuje i pomak kretanja za protein GST. U ovom istraživanju nije bila uočena takva pojava za GST te se vjerojatno radi o utjecaju drugih čimbenika eksperimenta. U prilog tome ide činjenica da je u nekim replikama istog eksperimenta protein GST-BPM1 imunodetekcijom bio detektiran na teoretskoj visini od 71,02 kDa. Treba napomenuti da je detekcija indukcije proteina GST-BPM1 u talogu gdje se uočava pomak kretanja kroz gel bila provjerena na 7,5% poliakrilamidnom gelu dok se u svim ostalim slučajevima njegova pozicija provjeravala na 12% gelu. Rath i sur. (2013) uočavaju da se neki proteini kreću sporije ili brže ovisno o koncentraciji akrilamida. Smatraju da koncentracija akrilamida i molekularna masa polipeptida određuju utjecaj faktora jačine i smjera pomaka kretanja na gelu. Autori sugeriraju da gelovi koji imaju koncentraciju

akrilamida nižu od ekvivalentne mobilnosti na gelu ( $T_{eq}$ ) povećavaju naboj kompleksa SDS-protein zbog čega kompleks postaje negativniji te se unutar električnog polja brže kreće kroz gel prema pozitivnom naboju. S obzirom da se ova pojava javlja većinom kod visoko helikalnih i transmembranskih proteina, ova hipoteza bi se trebala potvrditi eksperimentalno na gelovima koji imaju veću gustoću od 12% kako bi se vidjelo dolazi li do promjene visine detekcije.

Proteini GST-BPM1 $\Delta$ MATH i GST-BPM1 $\Delta$ SPOP bili su inducirani paralelno sa proteinom GST-BPM1. S obzirom da su delecijske proteinske varijante BPM1 $\Delta$ SPOP i BPM1 $\Delta$ MATH prvi puta inducirane i pročišćene metodom *in vivo* u ovom radu, ne postoje literaturni podaci koji bi služili za usporedbu dobivenih rezultata. Na temelju rezultata zaključuje se da je topivost proteina GST-BPM1 $\Delta$ MATH zadovoljavajuća dok je slaba topivost varijante GST-BPM1 $\Delta$ SPOP nadomještena uspješnijim pročišćavanjem. Razlozi uspješne optimizacije su jednaki kao i za GST-BPM1 jer se i za ove varijante povećala ekspresija i topivost proteina promjenom soja Rosetta u BL21 i medija  $2 \times$  YT u  $4 \times$  YT.

Na topivost proteina utječu insercije ili delecije domena koje mogu značajno utjecati na smatanje, ali i stopu ekspresije (Prakash i Bateman, 2015). Što se tiče proteina BPM1, čini se da delecija domene MATH (405 pb) povećava stabilnost i ekspresiju, koja je bila puno jača u odnosu na protein BPM1 i druge delecijske varijante. Također BPM1 $\Delta$ MATH je jedina delecijska varijanta BPM1 proteina koja je uspješno inducirana u slučaju obilježavanja privjeskom His.

Rezultati ukazuju da se stabilnost proteina BPM1 smanjuje ako se uklanjaju dijelovi bliži C-terminalnom kraju proteina. Ipak uklanjanje domene SPOP (192 pb) nije imalo poseban utjecaj na stabilnost ni na ekspresiju u varijanti BPM1 $\Delta$ SPOP, ali uklanjanje domene BTB (354 pb) iznimno je destabiliziralo protein. Tako je varijanta BPM1 $\Delta$ BTB imala smanjenu ekspresiju te je bila vrlo netopiva u odnosu na BPM1. Proteinska varijanta GST-BPM1 $\Delta$ BTB se stoga nije mogla inducirati klasičnom metodom kojom su inducirane ostale varijante proteina GST-BPM1. Moguće je da je uklanjanje BTB domene više destabilizirajuće nego uklanjanje SPOP domene jer se uklanja veći dio proteina ili jer se uklanja središnji dio domene. Naime BTB i SPOP domena se u svim radovima označavaju samo kao BTB/POZ domena s obzirom da imaju zajedničku ulogu, no u ovom radu su po prvi puta ove domene, odvojene samo jednom aminokiselinom (Gly), istraživane zasebno su prikazane kao dvije subdomene veće domene BTB/POZ. Uzme li se u obzir da se domene BTB i SPOP ipak, zbog barem jedne zajedničke funkcije – interakcije s kulinom3, mogu promatrati kao jedinstvena domena, delecija bilo koje od ovih dviju domena formira tzv. krnju odnosno atrofiranu domenu BTB/POZ. Prakash i

Bateman (2015) uvode pojam atrofije domena za slučajeve kada se, umjesto delecije cjelovite regije, uklanja dio jedne domene pri čemu zaostaje krnja domena. Smatra se da su gubitci od 10 aminokiselina ili više, vrlo destabilizirajući pogotovo ako se događaju unutar srži domene (u ovom slučaju to bi bila domena BTB) dok se gubitci na N ili C terminalnim krajevima lakše toleriraju (u ovom slučaju domena SPOP). Iako bi delecija aminokiselina i na N i na C terminalnom kraju potencijalno uzrokovala destabilizaciju proteina, smatra se da u tim slučajevima postoje kompenzatorni mehanizmi stabilizacije. Stoga je moguće da delecija domene BTB destabilizira protein jer se nalazi u njegovom središnjem dijelu. U radu Weber i sur. (2005) konstruirana je delecijaska varijanta BPM1 nazvana AtBPM1<sup>L189Stop</sup> gdje je uveden kodon STOP na lokaciji leucina 189 koji se nalazi između domene MATH i BTB/POZ. Takva proteinska varijanta BPM1 $\Delta$ BTB $\Delta$ SPOP nije toliko nestabilna kao BPM1 $\Delta$ BTB. To dodatno ukazuje na to da je delecija čitave domene BTB/POZ (uključujući i subdomenu SPOP) manje destabilizirajuća od krnje delecije BTB (bez subdomene SPOP) koja potencijalno destabilizira protein što uzrokuje njegovo krivo namatanje zbog čega većinskim djelom ostaje netopiv u talogu u obliku inkluzijskih tjelešaca.

Domena MATH ima ulogu selektivnog prepoznavanja ciljnih proteina u putu degradacije proteina ovisnom o ubikvitinu (Pintard i sur., 2003) te nema direktno povezanu ulogu sa domenama BTB i SPOP. Stoga delecija domene MATH potencijalno ne utječe nužno na aktivnost ostale dvije domene što bi objasnilo poboljšanje ekspresije ove delecijске varijante u odnosu na ostale. Neki radovi poput Lu i sur. (2016) spominju da delecija N-terminalne domene može povećati stabilnost proteina, ali to ovisi o termodinamici smatanja i strukturi cjelovitog proteina. Nadalje, Nitharwal i sur. (2007) opisuju protein kod kojeg delecija N-terminalne domene ne destabilizira protein, dok je C-terminalna domena esencijalna za funkciju.

Rezultati preprativne indukcije BPM1 $\Delta$ BTB nisu pokazali bolju ekspresiju proteina ovisno o korištenom bakterijskom soju (BL21 i Rosetta) kao što su imale ostale delecijске varijante GST-BPM1. Dodatak 1% i 3% etanola nije utjecao na ekspresiju željenog proteina, ali je vizualno vidljivo da je ekspresija cjelokupnih bakterijskih proteina viša u odnosu na ostale uzorke s drugačijim aditivima. Etanol uspostavlja uvjete u bakterijskoj stanici koji oponašaju toplinski šok što bi trebalo povećati ekspresiju šaperona koji imaju ulogu u namatanju proteina i time povećavanju topivosti (Kusano i sur., 1999). Aminokiseline prolin, arginin i glutamat dodavane su s ciljem pozitivnog učinka na smatanje proteina tijekom translacije obzirom da delecija BTB domene vjerojatno uzrokuje poteškoće u smatanju. Tsumoto i sur. (2004) uočavaju da 0,1-1 M arginin pomaže kod namatanja proteina te čak povećava topivost proteina koji imaju tendenciju taloženja u inkluzijska tjelešca. Buchner i Rudolph (1991) su također

pokazali da arginin pomaže kod topivosti proteina. Tsuomoto i sur. (2008) smatraju da se proteinska agregacija smanjuje uslijed interakcije s gvanidinskom grupom arginina, ali u ovom eksperimentu arginin nije imao značajan utjecaj na proteinsku ekspresiju. Prolin također djeluje kao kemijski proteinski šaperon koji teoretski smanjuje proteinsku agregaciju i stabilizira proteine. S obzirom da je glutamat glavni prekursor u biokemijskom putu sinteze prolina koji se akumulira u biljkama uslijed stresnih uvjeta, trebao bi imati sličnu ulogu prolina (Liang i sur., 2013). Alibolandi i Mirzahoseini (2011) smatraju da je mehanizam stabilizacije proteina prolinom povezan uz vezanje prolina i intermedijarnih formi proteina tokom namatanja pri čemu nastaju amfipatski supramolekularni kompleksi, ali ni prolin ni glutamat nisu bili učinkoviti u opisanim eksperimentima. Osim dodatka aminokiselina, osmolitske molekule su najčešći aditivi koji se dodaju u medij u svrhu bolje sinteze proteina i topivosti (Leibly i sue., 2012). Od osmolita u ovom radu korišteni su betain (glicinbetain), polioli (manitol), sorbitol i glicerol. Osmoliti poput manitola štite protein od termičke denaturacije u *in vivo* uvjetima (Ignatova i Gierasch, 2006), ali i povećavaju topivost poput betaina i sorbitola što su pokazali Leibly i sur. (2012) koji su pomoću betaina solubilizirali 21 netopiv protein. Blackwell i Horgan (1991) su također pomoću betaina solubilizirali rekombinantni protein koji je zaostajao u talogu u obliku inkluzija. Iako bi u teoriji viša koncentracija osmolita povećala osmotski pritisak što bi rezultiralo akumulacijom osmo-protektanta koji reguliraju proteinsko namatanje i termodinamiku topivosti (Rösgen, 2007), osmoliti nisu imali pozitivan učinak na ekspresiju varijante BPM1ΔBTB. Od osmolita, glicerol je najčešći polioli koji se dodaje u medij za rast. Prema Alibolandi i Mirzahoseini (2011), glicerol djeluje kao blagi stabilizator proteinskog namatanja. Smanjuje površinsku napetost, ali povećava viskoznost vode te se povećavanjem koncentracije glicerola povećava proteinska stabilnost. Ipak, postoji potencijalna mogućnost smanjene stope namatanja ukoliko se doda u povišenim koncentracijama (Gekko i Morikawa, 1981). Vagenende i sur. (2009) predlažu mehanizam kojim bi glicerol povećao proteinsku topivost i stabilnost. Glicerol se veže za površinu proteina elektrostatskim interakcijama koje orijentiraju glicerol na površini na način da kompaktno okruži protein i time smanjuju prostor za pravilno namatanje te stvara topivu površinu između hidrofobne površine samog proteina i polarnog otapala čime proteini postaju topljiviji. Literaturni podaci također pokazuju da glicerol može povećati bakterijski prihod tijekom samog rasta bakterija s obzirom da je glicerol izvor ugljika bakterijskog rasta (Kopp i sur., 2017). Glicerol, kao ni ostali osmoliti, nije pomogao ni u bakterijskom rastu ni u ekspresiji rekombinantnih proteina u ovom radu. Sol NaCl se također dodaje kako bi se promijenili osmotski uvjeti u bakterijskoj stanici (Bilgimol i sur., 2015), no ni ona nije potaknula proteinsku ekspresiju.

Za slučaj da je protein BPM1 $\Delta$ BTB toksičan za bakterije, kako bi se smanjila njegova bazalna ekspresija i time stabilizirala razina u stanici testiran je utjecaj glukoze. S obzirom da je BPM1 $\Delta$ BTB eksprimiran iz plazmidnog sustava pGEX-4T-1 pod kontrolom tac operona, indukcija proteina se postiže dodatkom IPTG-a koji se veže za protein represor LACI koji blokira transkripciju gena za rekombinantni protein jer sjeda na operatorsko mjesto i time ometa RNA polimerazu. Ukoliko IPTG nije dodan, protein LACI će blokirati operatorsko mjesto i time spriječiti transkripciju mRNA odnosno konačno translaciju. Međutim u bakterijama uvijek može doći do propusne transkripcije (engl. „*Leaky Transcription*“). Za uspješnu transkripciju potrebno je prisustvo molekule cikličkog adenozin monofosfata (engl. *Cyclic Adenosine Monophosphate*, cAMP) koja se veže za receptorski protein CAP (engl. *Catabolic Activator Protein*) uzvodno od lac promotra. Ukoliko se cAMP veže za protein CAP povećava se bazalna transkripcija jer raste aktivnost RNA polimeraze neovisno o tome je li blokirano operatorsko mjesto proteinom LACI ili nije. Stoga čak i bez prisustva IPTG-a može postojati razina bazalne transkripcije. Budući da vezanje proteina CAP ovisi o dostupnosti cAMP, a na dostupnost cAMP utječe dostupan izvor ugljika kako bi se smanjila razina slobodnog cAMP-a u stanici, često se dodaje 0,5-2% glukoza (Glc) koja smanjuje razinu cAMP-a u stanici čime se smanjuje bazalna transkripcija gena reguliranih lac promotorima. Dodatak Glc neće utjecati na tac promotor, međutim u sustavu pGEX postoji lac promotor s kojeg je također zabilježena transkripcija gena ukloniranih u MCS što može dovesti do ekspresije fuzijskog proteina i u odsustvu IPTG-a.

<http://wolfson.huji.ac.il/expression/procedures/bacterial/Glucose%20supression.pdf>).

Rezultati tretmana glukozom pokazuju nisku razinu svih bakterijskih proteina u odnosu na ostale tretmane, no s obzirom da je korišten medij TB koji ima dodatni izvor ugljika (glicerol), postoji mogućnost da se razina cAMP-a povećala zbog njegove prisutnosti (<http://wolfson.huji.ac.il/expression/procedures/bacterial/Glucose%20supression.pdf>). Time je mogla biti povećana bazalna transkripcija proteina BPM1 $\Delta$ BTB za koji postoji mogućnost da je štetan i/ili toksičan za bakterijsku stanicu te bi bakterijske stanice mogle ranije odumirati i time formirati manje cjelokupnih proteina. Ovo je ujedno i potencijalan razlog zašto je ekspresija proteina GST-BPM1 $\Delta$ BTB uspjela promjenom medija TB u 4  $\times$  YT s obzirom da taj medij nema dodatan izvor ugljika, a time se smanjuje bazalna transkripcija.

Od ostalih aditiva koji nisu imali pozitivan utjecaj na ekspresiju BPM1 $\Delta$ BTB provjeravan je detergent Tween-20. Tween-20 može solubilizirati proteine iz inkluzijskih tjelešaca (Singh i sur., 2015). Alibolandi i Mirzahoseini (2011) smatraju da aditivi niskih molekularnih masa poput

detergenta Triton-X i Tween-80 mogu promovirati proces smatanja nestabilnih proteina.

Jedini pozitivan učinak na ekspresiju proteina GST-BPM1 $\Delta$ BTB postignut je u tretmanu s dodatkom 0,1 M MgCl<sub>2</sub> i 2% glicerola. Kod ovog tretmana pojavljivalo se ubrzanje ulaska bakterije u eksponencijalnu fazu (već nakon 40 min) te vrlo brzi ulazak u stacionarnu fazu. Ukoliko bakterije uđu u stacionarnu fazu, počinju odumirati i prestaju sintetizirati proteine (Pletnev i sur., 2015). Kako je u ovom radu pokazano da glicerol nema gotovo nikakav utjecaj na bakterijski rast, razlog pretjeranog bakterijskog rasta bio je uzrokovan s MgCl<sub>2</sub>. Kako bi se usporio bakterijski rast i time povećao proteinski prihod, optimizirani su uvjeti u mediju 4 × YT sa nižim koncentracijama MgCl<sub>2</sub> (10 i 50 mM) te je rast bakterija uspješno normaliziran. U navedenim tretmanima protein GST-BPM1 $\Delta$ BTB je ujedno imunodetekcijom potvrđen na svojoj pravoj poziciji uz pojavu dva parcijalno formirana produkta. Ovo nam indicira da protein BPM1 $\Delta$ BTB ima visoku stopu parcijalne translacije pri čemu stvara krnje produkte. S obzirom da je uloga Mg<sup>2+</sup> da stabilizira ribosome i da neutralizira negativan naboj ATP-a koji je nužan za sintezu ribosoma (Pontes i sur., 2016), postoji mogućnost da je prisustvo MgCl<sub>2</sub> u mediju utjecalo na stabilizaciju ribosoma tijekom translacije proteina GST-BPM1 $\Delta$ BTB. To je dovelo do stvaranja cjelovitog proteina. S obzirom da količina ribosoma određuje kolika je stopa stvaranja proteina (Forchhammer i Lindahl, 1971), a ATP promovira sintezu ribosomskih RNA (rRNA), količina ATP-a čini limitirajući korak sinteze ribosoma (Condon i sur., 1993). McCarthy (1962) spominje da bakterije koje imaju manjak Mg<sup>2+</sup> ili pretjeranu potrošnju, imaju smanjenju količinu ribosoma iako mogu održati svoju vijabilnost. Pošto GST-BPM1 $\Delta$ BTB prirodno stvara veliku količinu krnjih produkata, moguće je da se većina Mg<sup>2+</sup> utroši na translaciju ovih proteina uslijed čega nastaje vrlo malo cjelovitog produkta. Što se tiče bakterijskog rasta, mehanizam je nepoznat i ne postoje literaturni podaci u kojima se javlja anomalija prebrzog ulaska u stacionarnu fazu rasta tretmanom s MgCl<sub>2</sub>. Vernon (1998) spominje da magnezij ima ulogu u regulaciji rasta stanica i diobe, ali se ne zna točna metabolička regulacija. Potencijalan razlog koji se spominje jest da magnezij kao kofaktor povećava stopu sinteze purina i pirimidina te da ima važnu ulogu u DNA replikaciji i transkripciji kao i translaciji. Protein GST-BPM1 $\Delta$ BTB se većinskim djelom inducirao u obliku netopivih inkluzija no kako je djelomično dobiven i u supernatantu znači da ima određenu razinu topivosti. Metalni ioni mogu djelovati kao faktori topivosti za određene rekombinantne proteine, a Yang i sur. (2003) spominju magnezij kao najbolji metalni ion koji ima to svojstvo čime se može objasniti djelomična topivost proteina GST-BPM1 $\Delta$ BTB. S obzirom da je purifikacija rađena samo sa jednim tretmanom (50 mM) trebalo bi se eksperimentalno provjeriti

mijenja li se solubilizacija GST-BPM1 $\Delta$ BTB u replikama u kojima je korištena niža koncentracija MgCl<sub>2</sub> (10 mM). Sina i sur. (2015) također uočavaju da dodatak 10 mM MgCl<sub>2</sub> u medij za rast povećava solubilizaciju proteina scFv kojem odgovara dodatak ovog aditiva što se podudara sa rezultatima dobivenim u ovom istraživanju. Kako bi se solubilizacija proteina GST-BPM1 $\Delta$ BTB povećala maksimalno, treba pronaći optimalnu koncentraciju MgCl<sub>2</sub> koja bi favorizirala njegovu povećanu topivost jer neki proteini smanjuju topivost u slučaju previsoke koncentracije dodanog MgCl<sub>2</sub> (Pradeep i Udgaonkar, 2002). Topivost se može i povećati ukoliko se MgCl<sub>2</sub> ili bilo koji od prethodno korištenih aditiva koji nisu utjecali na ekspresiju proteina dodaju u pufer za lizu u kojem se bakterije soniciraju nakon proteinske indukcije (Leibly i sur., 2011). Autori predlažu mehanizam kojim se proteini oblažu tim aditivima tijekom sonikacije i na temelju toga povećavaju topivost zbog stvaranja hidrofilnog omotača ili privlačenja šaperona koji pomažu u proteinskom namatanju. Ukoliko se ne dodaju tijekom sonikacije, proteini koji su potencijalno bili solubilizirani dodatkom aditiva u medij za rast, mogu se odmotati i istaložiti u inkluzijska tjelešca ukoliko pufer ne odgovara u potpunosti uvjetima namatanja proteina.

#### **4.1.2. Ekspresija i pročišćavanje proteina DMS3, RDM1 i HB6 obilježenih privjeskom His**

Rezultati pročišćavanja proteina His-DMS3 i His-RDM1 se podudaraju sa literaturnim podacima (Tokić, 2019) te su uspješno pročišćeni. Protein His-HB6 je uspješno induciran i pročišćen budući da postoje standardizirani protokoli indukcije i pročišćavanja. Međutim, uslijed niske ekspresije i topivosti optimizacija protokola uzgoja provedena je promjenom volumena medija, veličine tikvice, temperature i trajanja indukcije proteina. Na temelju dobivenih rezultata ekspresiji proteina His-HB6 ne odgovara indukcija na 15 °C tijekom 18 h te su indukcije provedene na 37 °C u trajanju 3 h doprinijele većem prihodu proteina. S obzirom da je rast bakterija vrlo spor, bakterijama vjerojatno odgovara dodatnih 3 h rasta na 37 °C tokom indukcije. Naime, naglo spuštanje uzgojne temperature od 37 °C na 15-20 °C tijekom ekspresije proteina zaustavlja/usporeva bakterijski rast na neko vrijeme (Jones i sur., 1987) pa je moguće da se na 15 °C ne eksprimira dovoljno proteina u odnosu na indukciju pri 37 °C gdje bakterije rastu i induciraju proteine simultano. Najbolja indukcija u ovom radu se postigla kod omjera volumena medija i volumena tikvice od 6,67. Vázquez i sur. (2005) iskazuju da volumen medija u odnosu na volumen tikvice uzgoja utječe na dostupnost kisika koja utječe na bakterijski rast. Somerville i Proctor (2013) također predlažu da se treba podesiti omjer volumena tikvice i



medija te brzina rotacijske trešnje kako bi se optimizirala kultivacija bakterija u aerobnim uvjetima. S obzirom da je difuzijski koeficijent kisika u vodi, odnosno mediju, vrlo nizak, kisik ne može difundirati duboko u medij. Kako bi se pojačala aeracija, površina medija se treba izložiti većoj površini kisika tako da je razina medija što niža u tikvici (Somerville i Proctor, 2013). Umjesto da se smanji volumen medija, u ovom radu je optimiziran volumen medija u odnosu na volumen tikvice. Što je veći volumen tikvice u odnosu na volumen medija to je veća dodirna površina ispod koje se nalazi medij i tanji sloj medija u tikvici. Trešnja dodatno pojačava aeraciju uslijed neprestanog ravnomjernog miješanja medija.

His-HB6 je u eluensu detektiran imunodetekcijom anti-His antitijelom ili SDS-PAG elektroforezom što ukazuje na njegovu topivost. U jednom ponavljanju detektiran je isključivo u talogu. Imunodetekcija proteina His-HB6 u jednom slučaju pokazuje pomak kretanja proteina u gelu te je His-HB6 detektiran na poziciji od 55 kDa dok mu je teoretska pozicija 38,39 kDa. Sličan problem opisuje Tokić (2019) u svom radu gdje je His-HB6 detektiran na 55 kDa već kod samog procesa pročišćavanja što nije slučaj u ovom radu niti u radovima Lechner i sur. (2011) te Himmelbach i sur. (2002). Tokić (2019) smatra da se ova pojava javlja uslijed izrazito visoke razine negativnih aminokiselina arginina i glutamata (18%) u proteinskoj sekvenci His-HB6 koji potencijalno mogu odbijati molekule SDS i ujedno utjecati na stopu denaturacije što bi potencijalno usporilo prolazak uzoraka kroz gel. Navedeno ne objašnjava zašto je u ovom radu protein bio detektiran na njegovoj teoretskoj visini. Potencijalno objašnjenje jest duže trajanje SDS-PAG elektroforeze kod detekcije His-HB6 na teoretskoj visini nego kada je His-HB6 detektiran na visini od 55 kDa.

S obzirom da ekspresija i solubilnost proteina His-HB6 nije bila najuspješnija, u budućnosti je potrebno promijeniti određene faktore koji bi utjecali na veći proteinski prihod. Potencijalno bi se ekspresija His-HB6 mogla mijenjati ovisno o ekspresijskom soju *E. coli* pa bi se njegova ekspresija trebala provjeriti u BL21 (DE3) ili nekom drugom soju. Drugi način na koji bi se mogao povećati proteinski prihod je promjenom vektora. Preliminarna istraživanja su pokazala da je ekspresija proteina His-RDM1 slabija ukoliko je eksprimiran u plazmidu pPROEX-Htb u odnosu na plazmid pET-28a(+) pa bi sljedeći korak bio uklonirati *HB6* u plazmid pET-28a(+) i usporediti njegovu ekspresiju i topivost sa proteinom His-HB6 eksprimiranim s plazmida pPROEX-Htb. Ukoliko nijedna opcija ne bi promijenila efektivnost ekspresije His-HB6, potencijalno rješenje bi bilo obogaćivanje medija za rast aditivima koji su spomenuti u sekciji 4.1.1.

### 4.1.3. Niska ekspresija proteina BPM1 $\Delta$ BTB i BPM1 $\Delta$ SPOP obilježenih privjeskom His

Proteini His-BPM1 $\Delta$ BTB i His-BPM1 $\Delta$ SPOP nisu uspješno inducirani ni detektirani u ovom radu. S obzirom da su njihove GST-varijante uspješno eksprimirane, postoji vjerojatnost da His-privjesak destabilizira strukturu uslijed čega se obilježeni proteini ne mogu inducirati. Ovaj problem se potencijalno može ukloniti ukoliko se His-privjesak fuzionira na C-terminalni kraj proteina BPM1 $\Delta$ BTB i BPM1 $\Delta$ SPOP s obzirom da odabir N- ili C-terminalne domene fuzije utječe drastično na topivost i ekspresiju proteina (Structural Genomics Consortium i sur., 2008).

Bilgimol i sur. (2015) navode nekoliko bitnih faktora koji se trebaju uzeti u obzir u slučaju ekspresije proteina u bakteriji *E. coli*. To su odabir promotora, terminatora, upotreba modificiranih sojeva *E. coli* koji mogu formirati disulfidne veze u reducirajućem okolišu citoplazme te koekspresiju šaperona tijekom indukcije proteina. Šaperoni su proteini koji pomažu u namatanju proteina, a mogu se inducirati na niskim i visokim temperaturama (Keto-Timonen i sur., 2016; Verghese i sur., 2012). Ekspresija šaperona koji se induciraju na niskim temperaturama (engl. *Cold Shock Proteins*, Csp) bila je pokušana tretmanom bakterija na 4 °C i/ili na ledu 20-30 min. Naime tijekom hladnog tretmana naglim spuštanjem temperature, mijenja se fluidnost membrane te se usporava aktivnost svih enzima, a struktura DNA destabilizira se formiranjem sekundarnih struktura čime se smanjuje efektivnost transkripcije i translacije. Kako bi se ovi učinci smanjili, bakterije induciraju proteine Csp koji djeluju kao šaperoni nukleinskih kiselina te uklanjaju štetne sekundarne strukture DNA i mRNA (Keto-Timonen i sur., 2016). Nakon inicijalnog hladnog tretmana naglo se povećava translacija svih proteina te se omogućava da bakterije rastu usporeno na nižim temperaturama (15-20 °C) umjesto da zaustave svoj rast (Ermolenko i Makhatadze, 2002). Stoga je ekspresija proteina His-BPM1 $\Delta$ BTB i His-BPM1 $\Delta$ SPOP bila inducirana na tim temperaturama. Proteini Csp se također induciraju i dodatkom etanola (Keto-Timonen i sur., 2016), no niti hladni tretman, niti dodatak etanola, a niti indukcija na nižim temperaturama nisu pomogli u indukciji proteina His-BPM1 $\Delta$ BTB i His-BPM1 $\Delta$ SPOP. Neki bakterijski uzorci su bili tretirani toplinskim šokom 20 min pri 47 °C kako bi se potaknula indukcija proteina Hsp (engl. *Heat Shock Proteins*) koji također djeluju kao proteinski šaperoni u namatanju i transportu proteina (Craig i sur., 1993), ali su se rezultati pokazali negativnima. Na kraju, proučavan je temperaturni utjecaj tijekom indukcije proteina His-BPM1 $\Delta$ BTB i His-BPM1 $\Delta$ SPOP kako bi se usporedio rast i ekspresija na 20 °C odnosno 30 °C nakon dodatka IPTG-a. Prema literaturnim podacima (Farewell i

Neidhardt, 1998) stopa efektivnosti rada ribosoma tokom elongacije polipeptidnih lanaca pada smanjenjem temperature. Stoga bi na temperaturama od 20 °C produkcija proteina bila manja što bi favoriziralo prihod proteina His-BPM1 $\Delta$ BTB i His-BPM1 $\Delta$ SPOP u slučaju njihove toksičnosti, dok bi na temperaturama od 30 °C produkcija proteina bila veća uslijed veće efektivnosti ribosoma što bi favoriziralo ekspresiju proteina niske stope ekspresije. Nijedna temperaturna optimizacija nije utjecala na uspješnu indukciju proteina His-BPM1 $\Delta$ BTB i His-BPM1 $\Delta$ SPOP.

Optimizacija ekspresije pokušavana je i uzgojem u različitim tipovima visoko hranjivih medija kao što su TB i 4  $\times$  YT te dodatkom aditiva iz istih razloga spomenutih u sekciji 4.1.1., ali nijedan pokušaj se nije pokazao efektivnim. Štoviše, dodatak osmolita kao što su betain i glicerol su još više smanjili cjelokupnu proteinsku ekspresiju u odnosu na ostale tretmane što je suprotno literaturnim podacima (Kopp i sur., 2017; Leibly i sur., 2011) dok promjena medija nije utjecala na promjenu ekspresije proteina. Također, bakterijski sojevi *E. coli* BL21 (DE) i Rosetta (DE3) nisu utjecali na ekspresiju proteina s His-privjeskom. Potencijalno se ekspresija može promijeniti ukoliko se koristi neki drugi ekspresijski partner poput sojeva *E. coli* NiCo21 (DE3) koji povećava proteinski prihod proteina s His-privjeskom (<https://www.neb.com>), SHuffle T7 koji promovira formiranje disulfidnih veza u redukcijskom okolišu (<https://www.neb.com>) ili Origami (DE3) u kojima se javlja proteinski prihod 10 puta veći u odnosu na ostale ekspresijske sojeve (Prinz i sur., 1997).

Potencijalan razlog nestabilnosti delecijjskih varijanta His-BPM1 može biti uslijed aminokiselinske sekvence proteina. Proteini koji su bogati aminokiselinama Arg, Lys, Leu, Phe, Tyr i Trp na N-terminalnom kraju su podložni degradaciji te bi zamjena ovih aminokiselina potencijalno stabilizirala protein (Hosur i sur., 2014). Protein BPM1 sam po sebi nije bogat ovim aminokiselinama na N-terminalnom kraju, ali ukoliko se uklonira ispred His-privjeska, njegov okvir čitanja postaje dulji te se obogaćuje se ovim aminokiselinama. Bilgimol i sur. (2015) spominju i važnost u odabiru ekspresijskog vektora. Strukturne jedinice vektora imaju velik utjecaj na proteinski prihod s obzirom da određuju poziciju vezanja kodona, broj i učestalost kodona START i STOP te terminatora. Moguće je da vektor pET-53-DEST ne odgovara za idealnu ekspresiju delecijjskih varijanta proteina His-BPM1 te da se gen *BPM1* treba ugraditi u neki drugi plazmid koji eksprimira His-privjesak no to je potrebno provjeriti eksperimentalno. Također ukoliko je protein His-BPM1 toksičan za bakterije, potrebno je koristiti promotor koji ima slabiju ekspresiju. Suprotno tome moguće je da se protein His-BPM1 prirodno slabo eksprimira te da je potrebno koristiti promotor sa jačom ekspresijom kako bi se

optimizirao proteinski prihod. Od ostalih problema niske ekspresije proteina, Bilgimol i sur. (2015) spominju mogućnost nekompatibilnosti kodona gena od interesa sa domaćinskim tRNA no ovaj problem se pokušao prevladati korištenjem soja Rosetta koja s plazmidom pRARE no nije došlo do poboljšanja proteinske ekspresije. Što se tiče stabilnosti mRNA, uočen je potencijalan problem formiranja sekundarnih struktura u mRNA molekulama ovih proteina. Prema programu RNAfold WebServer (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>), čini se da mRNA molekule proteina His-BPM1 $\Delta$ SPOP i His-BPM1 $\Delta$ BTB formiraju iznimno puno sekundarnih struktura poput ukosnica i omča što bi moglo otežavati proces translacije iako ova pojava vrlo vjerojatno nije glavni razlog njihove neuspješne indukcije.

Posljednji pokušaj optimizacije ekspresije proteina je isproban promjenom koncentracije IPTG-a u slučaju ekspresije proteina His-BPM1 $\Delta$ SPOP. Ukoliko bakterija inducira previše proteina od kojih je većina nebitna za rast i osnovni metabolizam, javit će se supresija rasta (Malakar i Venkatesh, 2012), a time i manji prihod proteina od interesa. Kako se ne bi javio ovaj problem, za indukciju proteina većinom se koriste niže koncentracije IPTG-a, ali smanjenje koncentracije s 1 mM na 0,5 mM nije pomoglo u indukciji His-BPM1 $\Delta$ SPOP.

Ukoliko se želi raditi s ovim fuzijskim proteinima u budućim istraživanjima potrebno je riješiti problem indukcije. Jedno od potencijalnih rješenja ovog problema bio bi dodatno fuzionirati novi privjesak na N- ili C-terminalni kraj uz His-privjesak koji bi povećao topivost i stabilnost te ga kasnije odcijepiti proteazom kako bi ostao samo His-privjesak. Ovaj pristup korišten je u radu Morimoto i sur. (2017) gdje je protein DREB2A fuzioniran sa His i tioredoksin (Trx) privjeskom uspješno induciran dok je neuspješno induciran ukoliko je fuzioniran samo s His-privjeskom. S obzirom da u ovom radu nije provjerena indukcija proteina His-BPM1 $\Delta$ SPOP i His-BPM1 $\Delta$ BTB u mediju za autoindukciju, postoji mogućnost da bi ekspresija u tom mediju bila uspješnija. Naime, medij za autoindukciju ima dodanu glukozu uz ostale izvore ugljika poput laktoze i glicerola. Glukoza smanjuje ekspresiju proteina sve dok se ne metabolizira pri visokim vrijednostima OD-a. Ekspresija proteina počinje tek uslijed metaboliziranja laktoze koja je limitirajući faktor ekspresije proteina. Ukoliko su proteini toksični za stanicu, bakterijska stanica će autoregulirati količinu koju će sintetizirati i time smanjiti nepotrebnu sintezu (Fox i Blommel, 2009).

#### 4.1.4. Formiranje inkluzijskih tjelešaca proteina BPM1 $\Delta$ MATH označenog privjeskom His

Protein His-BPM1 $\Delta$ MATH je uspješno induciran bez potrebe za optimizacijom uvjeta rasta i/ili indukcije što, kao i u slučaju varijante GST-BPM1 $\Delta$ MATH, ukazuje da delecija MATH domene najmanje destabilizira protein. S obzirom da His-privjesak vjerojatno destabilizira konformaciju namatanja delecijjskih varijanta proteina His-BPM1 (spomenuto u sekciji 4.1.3.), protein His-BPM1 $\Delta$ MATH je u potpunosti prisutan u talogu u obliku netopivih inkluzijskih tjelešaca. Prema stranici <https://protein-sol.manchester.ac.uk/> protein His-BPM1 $\Delta$ MATH na skali od 0 do 1 ima predviđeni faktor topivosti 0,338, što je niska topivost u odnosu na prosječne topive proteine *E. coli* koji imaju faktor veći od 0,45. S obzirom da se protein inducirao u obliku inkluzijskih tjelešaca koja se javljaju najčešće uslijed pogrešne konformacije (Martínez-Alonso i sur., 2009) naizgled se čini da nema potrebe solubilizirati protein jer ne može poprimiti nativnu formu, ali postoje dokazi da se puno proteina taloži u inkluzijska tjelešca u nativnoj formi pri čemu i dalje zadržavaju svoju funkciju (García-Fruitós i sur., 2007); de Groot i Ventura, 2006; Peternel i sur., 2009). Protein se može potencijalno pročistiti ukoliko se optimizira protokol solubilizacije proteina His-BPM1 $\Delta$ MATH bez narušavanja trenutne strukture. Nijedan neinvazivan pokušaj optimizacije topivosti nije uspio u ovom radu. Detergent deoksiholna kiselina nije pomogao u povećavanju topivosti proteina iako prema literaturnim podacima povećava topivost proteina koji zaostaju u inkluzijskim tjeleščima (Zhou i sur., 2006). Topivost bi se potencijalno mogla povećati dodatkom amonijevog sulfata (Kramer i sur., 2012). Sulfatni ioni povećavaju površinsku napetost vode pa se termodinamički preferira nativno smotana konfiguracija proteina uslijed smanjenog doticaja između proteina i vode (Baldwin, 1996) no to je moguće samo ukoliko su proteini istaloženi u svojoj nativnoj formi. Ukoliko su formirana prava inkluzijska tjelešca koja imaju povećanu pojavu sekundarnih struktura  $\beta$ -naboranih ploča, potrebna je izrazito visoka koncentracija denaturanata i detergenata koji bi u potpunosti otopili proteine u konformacijski odmotan polipeptidni lanac koji bi se morao raznim protokolima pokušati namotati (Ventura, 2005).

Na proteinsku topivost utječu unutarnji faktori (Zhou i sur., 2006) od kojih je najvažnija aminokiselinska struktura (Riès-kautt i Ducruix, 1997; Schein, 1993). Negativne aminokiseline povećavaju topivost. Protein His-BPM1 $\Delta$ MATH ima ukupno 10% negativnih aminokiselina u proteinskoj sekvenci što je potencijalno preniski udio da bi topivost proteina bila velika. S obzirom da promjena hidrofobnih aminokiselina u hidrofilne mijenja čitavu konformaciju i/ili

funkciju proteina, jedno od mogućih rješenja bilo bi ciljati hidrofilne aminokiseline koje ne favoriziraju proteinsku topivost kao što su asparagin, glutamin, treonin, lizin i arginin i zamijeniti ih hidrofilnim aminokiselinama koje to podupiru poput aspartata, glutamata i serina (Trevino i sur., 2008). Što se tiče vanjskih faktora koji utječu na topivost proteina (Zhou i sur., 2006), u ovom radu se osim dodatka osmolitskih aditiva topivost pokušala povećati smanjenjem temperature tijekom indukcije te hladnim tretmanom pri 4 °C. Iako literaturni podaci predlažu da topivost proteina raste pri nižim temperaturama (Smialowski i sur., 2007; Vera i sur., 2007), primijenjene modifikacije temperature nisu promijenile topivost proteina His-BPM1 $\Delta$ MATH.

Neka od potencijalnih rješenja problema netopivosti proteina His-BPM1 $\Delta$ MATH bila bi promjena domaćina, ekspresija proteina uz dodatan privjesak koji povećava topivost, ekspresija u *in vitro* sustavu te solubilizacija denurantima (Vallejo i Rinas, 2004). Paraskevopoulou i Falcone (2018) predlažu da je mehanizam kojim privjesci povećavaju topivost baziran na povećanju ukupnog proteinskog naboja uslijed čega se uspostavljaju odbojne elektrostatske sile između pojedinih proteina čime oni postaju topljiviji. Od najčešćih privjesaka koji povećavaju topivost predlažu fuziju proteina sa GST, Trx, MBP i SUMO (engl. *Small Ubiquitin-Related Modifier*) privjescima nakon čega se oni mogu odcijepiti kako bi ostao samo privjesak od interesa. Za His-privjesak su Paraskevopoulou i Falcone (2018) uočili da smanjuje stabilnost i topivost nekih proteina ukoliko se koristi kao samostalna fuzija na proteinu. Što se tiče resolubilizacije inkluzijskih tjelešaca, Vallejo i Rinas (2004) predlažu protokol za resolubilizaciju *in vivo* tretmanom gvanidin hidrokloridom i ureom te uklanjanjem nepotrebnih proteina iz inkluzija lizozim-EDTA tretmanom uz dodatak detergenta Triton-X. Nakon što bi se protein solubilizirao potrebno bi bilo djelovati tretmanom koji bi potaknuo pravilno uspostavljanje konformacije. Neki od tretmana koje spominju su direktna dilucija, uklanjanje denuranta kontrolirano membranom, kromatografske metode namatanja, dodatak L-arginina i micela te liposoma kao pomoćnika u proteinskom namatanju i dodatak šaperona i šaperonina. Ukoliko nijedna od ovih metoda ne bi bila uspješna, protein His-BPM1 $\Delta$ MATH se potencijalno može inducirati u sustavu *in vitro* kao što je npr. Rapid Translation System (RTS 500) (Roche Molecular Biochemicals) gdje je moguća indukcija proteina dulja od 24 h uz vjerojatno drugačiju efektivnost topivosti proteina s obzirom da uzgoj u domaćinu utječe na uspostavljanje pravilne konformacije proteina (redoks uvjeti citoplazme) (Martin i sur., 2001).

## **4.2. Kopurifikacija proteina GST-BPM1 i njegovih delecijских varijanta s interakcijskim partnerima DMS3, RDM1 i HB6**

Metoda kopurifikacije je *in vitro* metoda koja se koristi za istraživanje interakcija protein-protein. Metoda se kombinira s metodom dvaju kvašćeva hibrida (engl. Yeast Two Hybrid, Y2H), u kojoj se često javlja problem lažno pozitivnih rezultata što čini kombinaciju dviju metoda najboljom solucijom (Brymora i sur., 2004; Ito i sur., 2001).

### **4.2.1. Kopurifikacija proteina GST-BPM1 i njegovih delecijских varijanta s proteinom His-HB6**

Interakcija proteina HB6 i BPM1 je uspješno dokazana u Lechner i sur. (2011). Kako bi se potvrdilo da je mehanizam utišavanja proteina HB6 baziran na njegovom obilježavanju ubikvitinom i degradacijom (Lechner i sur., 2011) bitno je potvrditi da je interakcija proteina HB6 s proteinom BPM1 posredovana njegovom domenom MATH. Pošto je sugerirano da protein BPM1 ima i aktivnost neovisnu o kulinu 3 (Leljak-Levanić i sur., 2012) moguće je da BPM1, osim što označava protein HB6 ubikvitinom u citoplazmi i šalje ga na degradaciju ovisnu o kulinu 3, reusmjerava DDR kompleks puta RdDM na poziciju na genomu određenu pozicijom transkripcijskog faktora HB6 te na taj način utišava njegove ciljne gene. Uslijed izrazito niske proteinske koncentracije i nestabilnosti proteina His-HB6 nijedan pokušaj kopurifikacije nije bio uspješan. U kopurifikaciji je bila vidljiva samo pozitivna kontrola HB6. Dokaz da je kopurifikacija neuspješna uslijed proteinske degradacije i/ili preslabe koncentracije proteina da se detektira na filmu jesu negativni signali u nevezanim frakcijama. Naime, protein bi u nevezanim frakcijama trebao biti prisutan neovisno o afinitetu vezanja na mamac. Također pozitivna kontrola HB6-BPM1 pokazuje negativan signal što ove rezultate kopurifikacije čini ne validnim. Lechner i sur. (2011) predlažu da je glavni mehanizam utišavanja ekspresije HB6 proteinskom degradacijom usmjerenom ubikvitinom s obzirom da su detektirani signali ubikvitina na proteinu HB6. Autori također predlažu da je domena MATH najvažnija u vezanju proteina HB6. Kako bi se dokazalo koja je domena proteina BPM1 važna, potrebno je ponoviti ovu reakciju kopurifikacije. Reakcija bi potencijalno uspjela ukoliko bi se značajno povećala koncentracija proteina korištena za pojedinu reakciju. Koncentracija bi se mogla povećati

dodatnim pročišćavanjem His-HB6 nakon prve purifikacije čime bi se uklonila većina proteina koji se vežu nespecifično za Ni-NTA matricu, ili optimizacijom metode indukcije kako bi bio veći proteinski prihod što je već predloženo u sekciji 4.1.2.

#### **4.2.2. Kopurifikacija proteina GST-BPM1 i njegovih delecijских varijanta s proteinom His-DMS3 i His-RDM1**

Dosadašnja istraživanja interakcijskih odnosa su većinom bazirana na interakciji proteina BPM1 s transkripcijskim faktorima (Weber i Helman., 2009; Lechner, 2011; Chen i sur., 2013, 2015; Morimoto i sur., 2017) dok nekoliko preliminarnih istraživanja (Bauer i sur., 2014) i objavljenih diplomskih radova (Rendulić, 2018; Tokić, 2019) predlažu da BPM1 može interagirati i s proteinima DMS3 odnosno RDM1 koji sudjeluju u putu RNA usmjerene DNA metilacije u vrste *Arabidopsis thaliana* (Wierzbicki i sur., 2012). S obzirom da su interakcije proteina DMS3 i BPM1 odnosno RDM1 i BPM1 dokazane u preliminarnom istraživanju metodom TAP (engl. *Tandem Affinity Purification*) i Y2H te u Tokić (2019) metodom kopurifikacije, GST-BPM1 je služio kao pozitivna kontrola vezanja za proteine DMS3 i RDM1 u ovom radu. U Rendulić (2018) je također pokazana interakcija proteina DMS3 i BPM1 metodom bimolekularne fluorescencijske komplementacije. Ovaj rad se bazira na istraživanju interakcije domena MATH, BTB i SPOP s navedenim partnerima kako bi se bolje shvatilo koja domena veže protein DMS3 odnosno RDM1. S obzirom da je subdomena SPOP razdvojena od subdomene BTB u ovom radu po prvi puta, ne postoje publicirani radovi s kojima bi se usporedili rezultati vezani uz ovu domenu osim preliminarnog istraživanja rađenom u sustavu Y2H (Jagić i sur., neobjavljeno). Rezultati reakcije kopurifikacije proteina DMS3 i BPM1 su u skladu s preliminarnim istraživanjem interakcija u kvascima. Na temelju dobivenih rezultata čini se da delecija domene MATH onemogućuje vezanje proteina BPM1 za DMS3. U Tokić (2019) se također predlaže da je domena MATH najvažnija domena za vezanje proteina DMS3. Najjača interakcija je postignuta u reakciji His-DMS3 i GST-BPM1 $\Delta$ SPOP kod koje se većina proteina DMS3 vezala za GST-BPM1 $\Delta$ SPOP. U preliminarnom istraživanju kvantifikacije interakcije sustavom dvaju kvašćevih hibrida (Jagić i sur., neobjavljeno) se također uočava jak signal interakcije proteina DMS3 i BPM1 $\Delta$ SPOP, ali nije utvrđena razlika u intenzitetu interakcije u odnosu na BPM1 $\Delta$ BTB. U ovom radu se primjećuje da je vezanje His-DMS3 i GST-BPM1 $\Delta$ BTB slabije u odnosu na vezanje His-DMS3 i GST-BPM1 $\Delta$ SPOP budući da je u slučaju delecije domene BTB velika količina proteina DMS3 zaostajala u nevezanoj frakciji. Kako bi se provjerila preferencija vezanja DMS3 za BPM1 $\Delta$ SPOP odnosno BPM1 $\Delta$ BTB



trebalo bi ponoviti reakcije kopurifikacije sa ekvimolarnim koncentracijama proteina mamaca. Naime, moguće je da je u ovom radu protein BPM1 $\Delta$ SPOP bio korišten u višoj koncentraciji nego protein BPM1 $\Delta$ BTB. Budući da proteine GST-BPM1 $\Delta$ SPOP i GST-BPM1 $\Delta$ BTB nisam detekirao na membrani pretpostavlja se da je njihova masa u eksperimentu bila manja od 10 ng obzirom da se CBB bojom mogu detektirati samo mase proteina veće od 10 ng (Gauci i sur., 2011), što onemogućava usporedbu afiniteta interakcije .

Rezultati ove kopurifikacije sugestiraju da se protein DMS3 preferencijalno veže na domenu MATH s obzirom da se njegov signal ne detektira u slučaju delecije ove domene. Pošto domena MATH ima ulogu u vezanju supstrata kako bi se mogao ubikvitinirati i time postati označen za degradaciju ovisnu o ubikvitinu (Pintard i sur., 2003) ovo bi upućivalo da se BPM1 u interakciji s proteinom DMS3 ponaša kao posrednik proteinske degradacije. To bi značilo da protein BPM1 djeluje kao potencijalan negativan regulator puta RdDM mehanizmom u kojem smanjuje koncentraciju proteina DMS3. Prema literaturnim podacima DMS3 i ostali članovi DDR kompleksa potiču aktivaciju mehanizma za metilaciju DNA (Wierzbicki i sur., 2012), što bi išlo u prilog spomenute hipoteze.

Rezultati kopurifikacije delecijских varijanta GST-BPM1 s His-RDM1 pokazuju da protein His-RDM1 interagira sa svim domenama proteina BPM1 te se čini da delecija domene MATH ne utječe na interakciju vezanja. Preliminarna istraživanja pokazuju da RDM1 preferencijalno veže domenu BTB, a ne MATH što bi značilo da BPM1 ne djeluje kao supstrat-specifični adapter za ubikvitinaciju RDM1 (Jagić i sur., neobjavljeno). Ovaj rezultat ukazuje na to da BPM1 može imati ulogu neovisnu o usmjeravanju proteina u degradaciju putem kulina 3.

## 5. ZAKLJUČAK

Uspješno je konstruirano 6 plazmida koji kodiraju za His- odnosno GST- fuzijske rekombinantne proteine BPM1, BPM1 $\Delta$ MATH, BPM1 $\Delta$ BTB i BPM1 $\Delta$ SPOP u vektorima pET-53-DEST odnosno pGEX-4T-1. Indukcija i purifikacija proteina obilježenih GST-privjeskom je bila uspješna i optimizirana u bakterijskom soju *E. coli* BL21 (DE3) i upotrebom medija 4  $\times$  YT.

U slučaju histidinskog obilježavanje proteina BPM1 i njegovih varijanta uspješno je bila inducirana samo varijanta His-BPM1 $\Delta$ MATH, ali je njezino pročišćavanje bilo otežano.

Interakcija proteina BPM1, BPM1 $\Delta$ MATH, BPM1 $\Delta$ BTB i BPM1 $\Delta$ SPOP sa induciranim i pročišćenim proteinima DMS3 odnosno RDM1 je uspješno provjerena metodom kopurifikacije. Dobiveni rezultati ukazuju da je domena MATH ključna za vezanje proteina DMS3, dok interakcija s proteinom RDM1 ne ovisi isključivo niti o jednoj domeni proteina BPM1.

Iako bi najjednostavnija moguća uloga proteina BPM1 u procesu RdDM bila regulacija proteasomske razgradnje proteina DMS3, vjerojatnost navedenog mehanizma umanjuje visoka stabilnost i preferencijalno pojavljivanje proteina DMS3 i RDM1 u kompleksu (Lorković i sur., 2012).

Stoga je na temelju dobivenih rezultata predložen mehanizam koji podrazumijeva istovremenu interakciju proteina BPM1 sa partnerima RDM1 i DMS3. Prema njemu stabilan kompleks DMS3-RDM1 interagira vezivanjem proteina DMS3 s domenom MATH dok domene BTB i SPOP dodatnom interakcijom s proteinom RDM1 stabiliziraju funkcionalnu cjelinu BPM1-DMS3-RDM1. Zbog okupiranosti domena ovakav kompleks ne može stupiti u interakciju s CUL3 niti sa transkripcijskim faktorima. Stoga BPM1 ne sudjeluje isključivo u proteasomskoj degradaciji transkripcijskih faktora (Lechner i sur., 2012, Chen i sur., 2013, Morimoto i sur., 2017) ili proteina DMS3, već ostvaruje svoju funkciju u sklopu kompleksa BPM1-DMS3-RDM1 odnosno kompleksa DDR, u putu RdDM-a.

Sudjeluju li transkripcijski faktori u navođenju kompleksa BPM1-DMS3-RDM1 na specifične lokuse na genome, balansirajući tako transkripcijsku i metilacijsku aktivnost predmet je budućih istraživanja.

## 6. LITERATURA

- Alibolandi, M., & Mirzahoseini, H. (2011). Chemical assistance in refolding of bacterial inclusion bodies. *Biochemistry Research International*, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/631607>
- Aufsatz, W., Mette, M. F., van der Winden, J., Matzke, A. J. M., & Matzke, M. (2002). RNA-directed DNA methylation in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 4, **16499–16506**. <https://doi.org/10.1073/pnas.162371499>
- Baldwin, R. L. (1996). How Hofmeister ion interactions affect protein stability. *Biophysical Journal*, 71(4), **2056**. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79404-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79404-3)
- Bauer, N., Leljak-Levanić, D., Vuković, R., & Razdorov G. (2014). MATH-BTB domain protein AtBPM1 directly interact with DMS3, important component of RNA-directed DNA methylation in plants. *FEBS-EMBO Paris, Francuska*, 30.8.-4.9, **306-306**.
- Bernstein, E., Denli, A. M., & Hannon, G. J. (2001). The rest is silence. *RNA (New York, N.Y.)*, 7(11), **1509–1521**.
- Blackwell, J. R., & Horgan, R. (1991). A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form. *FEBS Letters*, 295(1–3), **10–12**. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)81372-F](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)81372-F)
- Brymora, A., Valova, V. A., & Robinson, P. J. (2004). Protein-protein interactions identified by pull-down experiments and mass spectrometry. *Current Protocols in Cell Biology*, 22(1), **17.5.1–17.5.51**. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb1705s22>
- Buchner, J., & Rudolph, R. (1991). Renaturation, purification and characterization of recombinant Fab-fragments produced in Escherichia coli. *Biology/Technology (Nature Publishing Company)*, 9(2), **157–162**.
- Busk, P. K., & Pagès, M. (1998). Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Molecular Biology*, 37(3), **425–435**.
- Capron, A., Serralbo, O., Fülöp, K., Frugier, F., Parmentier, Y., Dong, A., ... Genschik, P. (2003). The Arabidopsis anaphase-promoting complex or cyclosome: molecular and genetic characterization of the APC2 subunit. *The Plant Cell*, 15(10), **2370–2382**. <https://doi.org/10.1105/tpc.013847>
- Castel, S. E., & Martienssen, R. A. (2013). RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 14(2), **100–112**. <https://doi.org/10.1038/nrg3355>
- Chen, L., Lee, J. H., Weber, H., Tohge, T., Witt, S., Roje, S., ... Hellmann, H. (2013). Arabidopsis BPM proteins function as substrate adaptors to a cullin3-based E3 ligase to affect fatty acid metabolism in plants. *The Plant Cell*, 25(6), **2253–2264**. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.107292>

- Chen, L., Bernhardt, A., Lee, J., & Hellmann, H. (2015). Identification of Arabidopsis MYB56 as a novel substrate for CRL3 (BPM) E3 ligases. *Molecular Plant*, 8(2), **242–250**. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.10.004>
- Condon, C., French, S., Squires, C., & Squires, C. L. (1993). Depletion of functional ribosomal RNA operons in Escherichia coli causes increased expression of the remaining intact copies. *The EMBO Journal*, 12(11), **4305**.
- Costa, S., Almeida, A., Castro, A., & Domingues, L. (2014). Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in Escherichia coli: the novel Fh8 system. *Frontiers in Microbiology*, 5, **63**. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00063>
- Craig, E. A., Gambill, B. D., & Nelson, R. J. (1993). Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiological Reviews*, 57(2), **402–414**.
- Ermolenko, D. N., & Makhatadze, G. I. (2002). Bacterial cold-shock proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 59(11), **1902–1913**.
- Farewell, A., & Neidhardt, F. C. (1998). Effect of temperature on in vivo protein synthetic capacity in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, 180(17), **4704–4710**.
- Forchhammer, J., & Lindahl, L. (1971). Growth rate of polypeptide chains as a function of the cell growth rate in a mutant of Escherichia coli 15. *Journal of Molecular Biology*, 55(3), **563–568**. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(71\)90337-8](https://doi.org/10.1016/0022-2836(71)90337-8)
- Fox, B. G., & Blommel, P. G. (2009). Autoinduction of protein expression. *Current Protocols in Protein Science*, Poglavlje 5, Jedinica 5.23. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0523s56>
- Gao, Z., Liu, H.-L., Daxinger, L., Pontes, O., He, X., Qian, W., ... Zhu, J.-K. (2010). An RNA polymerase II- and AGO4-associated protein acts in RNA-directed DNA methylation. *Nature*, 465(7294), **106–109**. <https://doi.org/10.1038/nature09025>
- García-Fruitós, E., Arís, A., & Villaverde, A. (2007). Localization of functional polypeptides in bacterial inclusion bodies. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(1), **289–294**. <https://doi.org/10.1128/AEM.01952-06>
- Gauci, V. J., Wright, E. P., & Coorsen, J. R. (2011). Quantitative proteomics: assessing the spectrum of in-gel protein detection methods. *Journal of Chemical Biology*, 4(1), **3–29**. <https://doi.org/10.1007/s12154-010-0043-5>
- Gekko, K., & Morikawa, T. (1981). Thermodynamics of polyol-induced thermal stabilization of chymotrypsinogen1. *The Journal of Biochemistry*, 90(1), **51–60**. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a133469>
- Gingerich, D. J., Gagne, J. M., Salter, D. W., Hellmann, H., Estelle, M., Ma, L., & Vierstra, R. D. (2005). Cullins 3a and 3b assemble with members of the broad complex/tramtrack/bric-a-brac (BTB) protein family to form essential ubiquitin-protein ligases (E3s) in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 280(19), **18810–18821**.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M413247200>

- Gingerich, D. J., Hanada, K., Shiu, S.-H., & Vierstra, R. D. (2007). Large-scale, lineage-specific expansion of a Bric-a-Brac/Tramtrack/Broad Complex Ubiquitin-Ligase Gene family in rice. *The Plant Cell*, 19(8), **2329**. <https://doi.org/10.1105/TPC.107.051300>
- de Groot, N. S., & Ventura, S. (2006). Protein activity in bacterial inclusion bodies correlates with predicted aggregation rates. *Journal of Biotechnology*, 125, **110–113**. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec>.
- Haag, J. R., Brower-Toland, B., Krieger, E. K., Sidorenko, L., Nicora, C. D., Norbeck, A. D., ... Pikaard, C. S. (2014). Functional diversification of maize RNA polymerase IV and V subtypes via alternative catalytic subunits. *Cell Reports*, 9(1), **378–390**. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.067>
- Himmelbach, A., Hoffmann, T., Leube, M., Höhener, B., & Grill, E. (2002). Homeodomain protein ATHB6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in Arabidopsis. *The EMBO Journal*, 21(12), **3029–3038**. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf316>
- Horn, M., Collingro, A., Schmitz-Esser, S., Beier, C. L., Purkhold, U., Fartmann, B., ... Wagner, M. (2004). Illuminating the Evolutionary History of Chlamydiae. *Science*, 304(5671), **728–730**. <https://doi.org/10.1126/science.1096330>
- Hosur, V., Johnson, K. R., Burzenski, L. M., Stearns, T. M., Maser, R. S., & Shultz, L. D. (2014). Rhbdf2 mutations increase its protein stability and drive EGFR hyperactivation through enhanced secretion of amphiregulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(21), **2200–2209**. <https://doi.org/10.1073/pnas.1323908111>
- Hua, Z., & Vierstra, R. D. (2011). The cullin-RING ubiquitin-protein ligases. *Annual Review of Plant Biology*, 62(1), **299–334**. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112256>
- Huang, C. J., Chen, C. Y., Chen, H. H., Tsai, S. F., & Choo, K. B. (2004). TDPOZ, a family of bipartite animal and plant proteins that contain the TRAF (TD) and POZ/BTB domains. *Gene*, 324, **117–127**. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2003.09.022>
- Huang, C.-J., Lin, W.-Y., Chang, C.-M., & Choo, K.-B. (2009). Transcription of the rat testis-specific Rtdpoz-T1 and -T2 retrogenes during embryo development: co-transcription and frequent exonisation of transposable element sequences. *BMC Molecular Biology*, 10(1), **74**. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-10-74>
- Huibregtse, J. M., Scheffner, M., Beaudenon, S., & Howley, P. M. (1995). A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(7), **2563–2567**. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.7.2563>
- Ignatova, Z., & Gierasch, L. M. (2006). Inhibition of protein aggregation in vitro and in vivo

- by a natural osmoprotectant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(36), **13357–13361**. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603772103>
- Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M., & Sakaki, Y. (2001). A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(8), **4569–4574**. <https://doi.org/10.1073/pnas.061034498>
- Ji, X.-J., Mao, X., Hao, Q.-T., Liu, B.-L., Xue, J.-A., & Li, R.-Z. (2018). Splice variants of the castor WR11 gene ipregulate fatty acid and oil biosynthesis when expressed in tobacco leaves. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), **146**. <https://doi.org/10.3390/ijms19010146>
- Johnson, E. S. (2002). Ubiquitin branches out. *Nature Cell Biology*, 4(12), **295–298**. <https://doi.org/10.1038/ncb1202-e295>
- Jones, P. G., VanBogelen, R. A., & Neidhardt, F. C. (1987). Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 169(5), **2092–2095**. <https://doi.org/10.1128/jb.169.5.2092-2095.1987>
- Joseph, B. C., Pichaimuthu, S., & Srimeenakshi, S. (2015). An overview of the parameters for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Cell Science & Therapy*, 6(05). <https://doi.org/10.4172/2157-7013.1000221>
- Juranić, M., Srilunchang, K., Krohn, N. G., Leljak-Levanić, D., Sprunck, S., & Dresselhaus, T. (2012). Germline-specific MATH-BTB substrate adaptor MAB1 regulates spindle length and nuclei identity in maize. *The Plant Cell*, 24(12), **4974–4991**. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.107169>
- Juranić, M., & Dresselhaus, T. (2014). Phylogenetic analysis of the expansion of the MATH-BTB gene family in the grasses. *Plant Signaling & Behavior*, 9(3), **28242**. <https://doi.org/10.4161/PSB.28242>
- Kanno, T., Bucher, E., Daxinger, L., Huettel, B., Böhmendorfer, G., Gregor, W., ... Matzke, A. J. M. (2008). A structural-maintenance-of-chromosomes hinge domain-containing protein is required for RNA-directed DNA methylation. *Nature Genetics*, 40(5), **670–675**. <https://doi.org/10.1038/ng.119>
- Keto-Timonen, R., Hietala, N., Palonen, E., Hakakorpi, A., Lindström, M., & Korkeala, H. (2016). Cold Shock Proteins: A Minireview with Special Emphasis on Csp-family of Enteropathogenic *Yersinia*. *Frontiers in Microbiology*, 7, **1151**. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01151>
- Koonin, E. V., Senkevich, T. G., & Chernos, V. I. (1992). A family of DNA virus genes that consists of fused portions of unrelated cellular genes. *Trends in Biochemical Sciences*, 17(6), **213–214**.
- Kopp, J., Slouka, C., Ulonska, S., Kager, J., Fricke, J., Spadiut, O., & Herwig, C. (2017). Impact of glycerol as carbon source onto specific sugar and inducer uptake rates and inclusion body productivity in *E. coli* BL21(DE3). *Bioengineering (Basel, Switzerland)*,

5(1). <https://doi.org/10.3390/bioengineering5010001>

- Kram, K. E., & Finkel, S. E. (2015). Rich medium composition affects *Escherichia coli* survival, glycation, and mutation frequency during long-term batch culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(13), **4442–4450**. <https://doi.org/10.1128/AEM.00722-15>
- Kramer, R. M., Shende, V. R., Motl, N., Pace, C. N., & Scholtz, J. M. (2012). Toward a molecular understanding of protein solubility: increased negative surface charge correlates with increased solubility. *Biophysical Journal*, 102(8), **1907–1915**. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.01.060>
- Kusano, K., Waterman, M. R., Sakaguchi, M., Omura, T., & Kagawa, N. (1999). Protein synthesis inhibitors and ethanol selectively enhance heterologous expression of P450s and related proteins in *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 367(1), **129–136**. <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1248>
- Law, J. A., Ausin, I., Johnson, L. M., Vashisht, A. A., Zhu, J.-K., Wohlschlegel, J. A., & Jacobsen, S. E. (2010). A protein complex required for polymerase V transcripts and RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 20(10), **951–956**. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.03.062>
- Law, J. A., Vashisht, A. A., Wohlschlegel, J. A., & Jacobsen, S. E. (2011). SHH1, a homeodomain protein required for DNA methylation, as well as RDR2, RDM4, and chromatin remodeling factors, associate with RNA polymerase IV. *PLoS Genetics*, 7(7), **1002195**. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002195>
- Lechner, E., Leonhardt, N., Eisler, H., Parmentier, Y., Alioua, M., Jacquet, H., ... Genschik, P. (2011). MATH/BTB CRL3 receptors target the homeodomain-leucine zipper ATHB6 to modulate abscisic acid signaling. *Developmental Cell*, 21(6), **1116–1128**. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.10.018>
- Leibly, D. J., Nguyen, T. N., Kao, L. T., Hewitt, S. N., Barrett, L. K., & Van Voorhis, W. C. (2012). Stabilizing additives added during cell lysis aid in the solubilization of recombinant proteins. *PloS One*, 7(12), **52482**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052482>
- Leljak Levanić, D., Horvat, T., Martinčić, J., & Bauer, N. (2012). A novel bipartite nuclear localization signal guides BPM1 protein to nucleolus suggesting its cullin3 independent function. *PLoS ONE*, 7(12), 51184. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051184>
- Leung, J., & Giraudat, J. (1998). Abscisic acid signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49(1), **199–222**. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.199>
- Li, S., Vandivier, L. E., Tu, B., Gao, L., Won, S. Y., Li, S., ... Chen, X. (2015). Detection of Pol IV/RDR2-dependent transcripts at the genomic scale in *Arabidopsis* reveals features and regulation of siRNA biogenesis. *Genome Research*, 25(2), **235–245**. <https://doi.org/10.1101/gr.182238.114>

- Liang, X., Zhang, L., Natarajan, S. K., & Becker, D. F. (2013). Proline mechanisms of stress survival. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(9), **998–1011**.  
<https://doi.org/10.1089/ars.2012.5074>
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sánchez-Serrano, J. J., & Solano, R. (2003). Ethylene response factor1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *The Plant Cell*, 15(1), **165–178**. <https://doi.org/10.1105/tpc.007468>
- Lorković, Z. J., Naumann, U., Matzke, A. J. M., & Matzke, M. (2012). Involvement of a GHKL ATPase in RNA-Directed DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology*, 22(10), **933–938**. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2012.03.061>
- Lowe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W., & Huber, R. (1995). Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science*, 268(5210), **533–539**. <https://doi.org/10.1126/science.7725097>
- Lu, Z., Wang, Q., Jiang, S., Zhang, G., & Ma, Y. (2016). Truncation of the unique N-terminal domain improved the thermos-stability and specific activity of alkaline  $\alpha$ -amylase Amy703. *Scientific Reports*, 6, 22465. <https://doi.org/10.1038/srep22465>
- Maeo, K., Tokuda, T., Ayame, A., Mitsui, N., Kawai, T., Tsukagoshi, H., ... Nakamura, K. (2009). An AP2-type transcription factor, WRINKLED1, of *Arabidopsis thaliana* binds to the AW-box sequence conserved among proximal upstream regions of genes involved in fatty acid synthesis. *The Plant Journal*, 60(3), **476–487**.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03967.x>
- Malakar, P., & Venkatesh, K. V. (2012). Effect of substrate and IPTG concentrations on the burden to growth of *Escherichia coli* on glycerol due to the expression of Lac proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(6), **2543–2549**.  
<https://doi.org/10.1007/s00253-011-3642-3>
- Marín, I. (2015). Origin and diversification of meprin proteases. *PLOS ONE*, 10(8), **135924**.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135924>
- Martin, G. A., Kawaguchi, R., Lam, Y., DeGiovanni, A., Fukushima, M., & Mutter, W. (2001). High-yield, *in vitro* protein expression using a continuous-exchange, coupled transcription/translation system. *BioTechniques*, 31(4), **948–953**.  
<https://doi.org/10.2144/01314pf01>
- Martínez-Alonso, M., González-Montalbán, N., García-Fruitós, E., & Villaverde, A. (2009). Learning about protein solubility from bacterial inclusion bodies. *Microbial Cell Factories*, 8, **4**. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-4>
- McCarthy, B. J. (1962). The effects of magnesium starvation on the ribosome content of *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Nucleic Acids and Related Subjects*, 55(6), **880–889**. [https://doi.org/10.1016/0926-6550\(62\)90345-6](https://doi.org/10.1016/0926-6550(62)90345-6)
- Meinke, D. W., Cherry, J. M., Dean, C., Rounsley, S. D., & Koornneef, M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: A model plant for genome analysis. *Science*, 282(5389), **662–682**.



<https://doi.org/10.1126/science.282.5389.662>

- Merlot, S., Gosti, F., Guerrier, D., Vavasseur, A., & Giraudat, J. (2001). The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 25(3), **295–303**.
- Minor, D. L., Lin, Y. F., Mobley, B. C., Avelar, A., Jan, Y. N., Jan, L. Y., & Berger, J. M. (2000). The polar T1 interface is linked to conformational changes that open the voltage-gated potassium channel. *Cell*, 102(5), **657–670**. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00088-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00088-x)
- Miyazono, K., Miyakawa, T., Sawano, Y., Kubota, K., Kang, H.-J., Asano, A., ... Tanokura, M. (2009). Structural basis of abscisic acid signalling. *Nature*, 462(7273), **609–614**. <https://doi.org/10.1038/nature08583>
- Moon, J., Parry, G., & Estelle, M. (2004). The ubiquitin-proteasome pathway and plant development. *The Plant Cell*, 16(12), **3181–3195**. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.161220>
- Morimoto, K., Ohama, N., Kidokoro, S., Mizoi, J., Takahashi, F., Todaka, D., ... Yamaguchi-Shinozaki, K. (2017). BPM-CUL3 E3 ligase modulates thermotolerance by facilitating negative regulatory domain-mediated degradation of DREB2A in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(40), **8528–8536**. <https://doi.org/10.1073/pnas.1704189114>
- Nitharwal, R. G., Paul, S., Dar, A., Choudhury, N. R., Soni, R. K., Prusty, D., ... Dhar, S. K. (2007). The domain structure of *Helicobacter pylori* DnaB helicase: the N-terminal domain can be dispensable for helicase activity whereas the extreme C-terminal region is essential for its function. *Nucleic Acids Research*, 35(9), **2861–2874**. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm167>
- Novy, R., & Morris, B. (2001). Use of glucose to control basal expression in the pET system innovations. *BioTechniques*, 12, **1-3**. doi:10.1002/9783527620937.ch.
- Paraskevopoulou, V., & Falcone, F. (2018). Polyionic tags as enhancers of protein solubility in recombinant protein expression. *Microorganisms*, 6(2), **47**. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6020047>
- Peternel, S., Gaberc-Porekar, V., & Komel, R. (2009). Bacterial growth conditions affect quality of GFP expressed inside inclusion bodies. *Acta Chimica Slovenica*, 56, **860–867**.
- Pintard, L., Willis, J. H., Willems, A., Johnson, J.-L. F., Srayko, M., Kurz, T., ... Peter, M. (2003). The BTB protein MEL-26 is a substrate-specific adaptor of the CUL-3 ubiquitin-ligase. *Nature*, 425(6955), **311–316**. <https://doi.org/10.1038/nature01959>
- Pletnev, P., Osterman, I., Sergiev, P., Bogdanov, A., & Dontsova, O. (2015). Survival guide: *Escherichia coli* in the stationary phase. *Acta Naturae*, 7(4), **22–33**.
- Pontes, M. H., Yeom, J., & Groisman, E. A. (2016). Reducing ribosome biosynthesis promotes translation during Low Mg<sup>2+</sup> stress. *Molecular Cell*, 64(3), **480–492**.

<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.008>

- Pradeep, L., & Udgaonkar, J. B. (2002). Differential salt-induced stabilization of structure in the initial folding intermediate ensemble of barstar. *Journal of Molecular Biology*, 324(2), **331–347**. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(02\)01068-9](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(02)01068-9)
- Prakash, A., & Bateman, A. (2015). Domain atrophy creates rare cases of functional partial protein domains. *Genome Biology*, 16(1), **88**. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0655-8>
- Prinz, W. A., Åslund, F., Holmgren, A., & Beckwith, J. (1997). The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Journal of Biological Chemistry*, 272(25), **15661–15667**. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.25.15661>
- Rath, A., Cunningham, F., & Deber, C. M. (2013). Acrylamide concentration determines the direction and magnitude of helical membrane protein gel shifts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(39), **15668–15673**. <https://doi.org/10.1073/pnas.1311305110>
- Ream, T. S., Haag, J. R., Wierzbicki, A. T., Nicora, C. D., Norbeck, A. D., Zhu, J.-K., ... Pikaard, C. S. (2009). Subunit compositions of the RNA-silencing enzymes Pol IV and Pol V reveal their origins as specialized forms of RNA polymerase II. *Molecular Cell*, 33(2), **192–203**. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.12.015>
- Ream, T. S., Haag, J. R., & Pikaard, C. S. (2014). *Plant Multisubunit RNA Polymerases IV and V*. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-39796-7\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-642-39796-7_13)
- Rendulić, T. (2018). Protein interaction analysis of BPM1, DMS3 and RDM1 in tobacco cells using bimolecular fluorescent complementation. Graduation Thesis, University of Zagreb, Faculty of Science.
- Riès-kautt, M., & Ducruix, A. (1997). Inferences drawn from physicochemical studies of crystallogenesis and precrystalline state. In: Carter C.W. Jr., editor. *Methods in Enzymology*. Academic Press; New York: **23–59**.
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5, **172**. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Rösgen, J. (2007). Molecular basis of osmolyte effects on protein and metabolites. *Methods in Enzymology*, 428, **459–486**. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)28026-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)28026-7)
- Sakuma, Y., Maruyama, K., Osakabe, Y., Qin, F., Seki, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006). Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *The Plant Cell*, 18(5), **1292–1309**. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.035881>
- Sasaki, T., Lorković, Z. J., Liang, S.-C., Matzke, A. J. M., & Matzke, M. (2014). The ability to form homodimers is essential for RDM1 to function in RNA-Directed DNA methylation. *PLoS ONE*, 9(2), **88190**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088190>

- Schein, C. H. (1993). Solubility and secretability. *Current Opinion in Biotechnology*, 4(4), **456–461**.
- Schrader, E. K., Harstad, K. G., & Matouschek, A. (2009). Targeting proteins for degradation. *Nature Chemical Biology*, 5(11), **815**. <https://doi.org/10.1038/NCHEMBIO.250>
- Sharma, B., Joshi, D., Yadav, P. K., Gupta, A. K., & Bhatt, T. K. (2016). Role of ubiquitin-mediated degradation system in plant biology. *Frontiers in Plant Science*, 7, **806**. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00806>
- Sina, M., Farajzadeh, D., & Dastmalchi, S. (2015). Effects of environmental factors on soluble expression of a humanized anti-TNF- $\alpha$  scFv antibody in *Escherichia coli*. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 5(4), **455–461**. <https://doi.org/10.15171/apb.2015.062>
- Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A. K., Singh, S. M., & Panda, A. K. (2015). Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microbial Cell Factories*, 14, **41**. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0222-8>
- Smalle, J., & Vierstra, R. D. (2004). The ubiquitin 26S proteasome proteolysis pathway. *Annual Review of Plant Biology*, 55(1), **555–590**. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141801>
- Smialowski, P., Martin-Galiano, A. J., Mikolajka, A., Girschick, T., Holak, T. A., & Frishman, D. (2007). Protein solubility: sequence based prediction and experimental verification. *Bioinformatics*, 23(19), **2536–2542**. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl623>
- Smith, L. M., Pontes, O., Searle, I., Yelina, N., Yousafzai, F. K., Herr, A. J., ... Baulcombe, D. C. (2007). An SNF2 protein associated with nuclear RNA silencing and the spread of a silencing signal between cells in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 19(5), **1507–1521**. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.051540>
- Söderman, E., Hjellström, M., Fahleson, J., & Engström, P. (1999). The HD-Zip gene *ATHB6* in *Arabidopsis* is expressed in developing leaves, roots and carpels and up-regulated by water deficit conditions. *Plant Molecular Biology*, 40(6), **1073–1083**. <https://doi.org/10.1023/A:1006267013170>
- Somerville, G. A., & Proctor, R. A. (2013). Cultivation conditions and the diffusion of oxygen into culture media: the rationale for the flask-to-medium ratio in microbiology. *BMC Microbiology*, 13, **9**. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-9>
- Stogios, P. J., Downs, G. S., Jauhal, J. J., Nandra, S. K., & Privé, G. G. (2005). Sequence and structural analysis of BTB domain proteins. *Genome Biology*, 6(10), **82**. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-10-r82>
- Structural Genomics Consortium, S. G., China Structural Genomics Consortium, A. et F. des M., Northeast Structural Genomics Consortium, B. S. G., Gräslund, S., Nordlund, P., Weigelt, J., ... Gunsalus, K. C. (2008). Protein production and purification. *Nature*

- Methods*, 5(2), **135–146**. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.202>
- Sunnerhagen, M., Pursglove, S., & Fladvad, M. (2002). The new MATH: homology suggests shared binding surfaces in meprin tetramers and TRAF trimers. *FEBS Letters*, 530(1–3), **1–3**. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03330-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03330-6)
- Thomas, J. H. (2006). Adaptive evolution in two large families of ubiquitin-ligase adapters in nematodes and plants. *Genome Research*, 16(8), **1017–1030**. <https://doi.org/10.1101/gr.5089806>
- Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., & Pickart, C. M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *The EMBO Journal*, 19(1), **94–102**. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.1.94>
- Tokić, M. (2019). Preferential protein-protein binding of HB6, RDM1 and DMS3 to BPM1. Graduation Thesis, University of Zagreb, Faculty of Science.
- Trevino, S. R., Scholtz, J. M., & Pace, C. N. (2008). Measuring and increasing protein solubility. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(10), **4155–4166**. <https://doi.org/10.1002/jps.21327>
- Tsumoto, K., Umetsu, M., Kumagai, I., Ejima, D., Philo, J. S., & Arakawa, T. (2004). Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification. *Biotechnology Progress*, 20(5), **1301–1308**. <https://doi.org/10.1021/bp0498793>
- Ukkonen, K. (2014). Improvement of recombinant protein production in shaken cultures. Academic dissertation, Technology and Natural Sciences of the University of Oulu.
- Vagenende, V., Yap, M. G. S., & Trout, B. L. (2009). Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol. *Biochemistry*, 48(46), **11084–11096**. <https://doi.org/10.1021/bi900649t>
- Vallejo, L. F., & Rinas, U. (2004). Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microbial Cell Factories*, 3(1), **11**. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-3-11>
- Vázquez, J. A., Mirón, J., González, M. P., & Murado, M. A. (2005). Effects of aeration on growth and on production of bacteriocins and other metabolites in cultures of eight strains of lactic acid bacteria. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 127(2), **111–124**.
- Ventura, S. (2005). Sequence determinants of protein aggregation: tools to increase protein solubility. *Microbial Cell Factories*, 4(1), **11**. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-4-11>
- Vera, A., González-Montalbán, N., Arís, A., & Villaverde, A. (2007). The conformational quality of insoluble recombinant proteins is enhanced at low growth temperatures. *Biotechnology and Bioengineering*, 96(6), **1101–1106**. <https://doi.org/10.1002/bit.21218>
- Vergheese, J., Abrams, J., Wang, Y., & Morano, K. A. (2012). Biology of the heat shock

- response and protein chaperones: budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a model system. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : *MMBR*, 76(2), **115–158**.  
<https://doi.org/10.1128/MMBR.05018-11>
- Vernon, W. B. (1988). The role of magnesium in nucleic-acid and protein metabolism. *Magnesium*, 7(5–6), **234–248**.
- Weber, H., Bernhardt, A., Dieterle, M., Hano, P., Mutlu, A., Estelle, M., ... Hellmann, H. (2005). Arabidopsis AtCUL3a and AtCUL3b form complexes with members of the BTB/POZ-MATH protein family. *Plant Physiology*, 137(1), **83–93**.  
<https://doi.org/10.1104/pp.104.052654>
- Weber, H., & Hellmann, H. (2009). Arabidopsis thaliana BTB/POZ-MATH proteins interact with members of the ERF/AP2 transcription factor family. *FEBS Journal*, 276(22), **6624–6635**. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07373.x>
- Weissman, A. M. (2001). Themes and variations on ubiquitylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(3), **169–178**. <https://doi.org/10.1038/35056563>
- Wierzbicki, A. T., Haag, J. R., & Pikaard, C. S. (2008). Noncoding transcription by RNA polymerase Pol IVb/Pol V mediates transcriptional silencing of overlapping and adjacent genes. *Cell*, 135(4), **635–648**. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.09.035>
- Wierzbicki, A. T., Ream, T. S., Haag, J. R., & Pikaard, C. S. (2009). RNA polymerase V transcription guides ARGONAUTE4 to chromatin. *Nature Genetics*, 41(5), **630–634**.  
<https://doi.org/10.1038/ng.365>
- Wierzbicki, A. T., Cocklin, R., Mayampurath, A., Lister, R., Rowley, M. J., Gregory, B. D., ... Pikaard, C. S. (2012). Spatial and functional relationships among Pol V-associated loci, Pol IV-dependent siRNAs, and cytosine methylation in the Arabidopsis epigenome. *Genes & Development*, 26(16), **1825–1836**. <https://doi.org/10.1101/gad.197772.112>
- Yang, Q., Xu, J., Li, M., Lei, X., & An, L. (2003). High-level expression of a soluble snake venom enzyme, glosedobin, in *E. coli* in the presence of metal ions. *Biotechnology Letters*, 25(8), **607–610**.
- Zapata, J. M., Martínez-García, V., & Lefebvre, S. (2007). Phylogeny of the TRAF/MATH domain. *TNF Receptor Associated Factors (TRAFs) 597*, **1–24**.  
[https://doi.org/10.1007/978-0-387-70630-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-0-387-70630-6_1)
- Zemach, A., Kim, M. Y., Hsieh, P.-H., Coleman-Derr, D., Eshed-Williams, L., Thao, K., ... Zilberman, D. (2013). The Arabidopsis nucleosome remodeler DDM1 allows DNA methyltransferases to access H1-containing heterochromatin. *Cell*, 153(1), **193–205**.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.033>
- Zhai, Z., Liu, H., & Shanklin, J. (2017). Phosphorylation of WRINKLED1 by KIN10 results in its proteasomal degradation, providing a link between energy homeostasis and lipid biosynthesis. *The Plant Cell*, 29(4), **871–889**. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00019>
- Zhang, C.-J., Ning, Y.-Q., Zhang, S.-W., Chen, Q., Shao, C.-R., Guo, Y.-W., ... He, X.-J.

- (2012). IDN2 and its paralogs form a complex required for RNA-directed DNA methylation. *PLoS Genetics*, 8(5), **1002693**.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002693>
- Zhang, H., He, X., & Zhu, J.-K. (2013). RNA-directed DNA methylation in plants. *RNA Biology*, 10(10), **1593–1596**. <https://doi.org/10.4161/rna.26312>
- Zhang, Y., Liang, W., Shi, J., Xu, J., & Zhang, D. (2013). *MYB 56* encoding a R2R3 MYB transcription factor regulates seed size in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 55(11), **1166–1178**. <https://doi.org/10.1111/jipb.12094>
- Zhong, X., Hale, C. J., Law, J. A., Johnson, L. M., Feng, S., Tu, A., & Jacobsen, S. E. (2012). DDR complex facilitates global association of RNA polymerase V to promoters and evolutionarily young transposons. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(9), **870–875**. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2354>
- Zhou, J., Zhou, T., Cao, R., Liu, Z., Shen, J., Chen, P., ... Liang, S. (2006). Evaluation of the application of sodium deoxycholate to proteomic analysis of rat hippocampal plasma membrane. *Journal of Proteome Research*, 5(10), **2547–2553**.  
<https://doi.org/10.1021/pr060112a>
- Zhou, M., & Law, J. A. (2015). RNA Pol IV and V in gene silencing: Rebel polymerases evolving away from Pol II's rules. *Current Opinion in Plant Biology*, 27, **154–164**.  
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.07.005>
- Zhou, P., & Wagner, G. (2010). Overcoming the solubility limit with solubility-enhancement tags: successful applications in biomolecular NMR studies. *Journal of Biomolecular NMR*, 46(1), **23–31**. <https://doi.org/10.1007/s10858-009-9371-6>
- Zhu, Y., Rowley, M. J., Böhmendorfer, G., & Wierzbicki, A. T. (2013). A SWI/SNF chromatin-remodeling complex acts in noncoding RNA-mediated transcriptional silencing. *Molecular Cell*, 49(2), **298–309**. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.11.011>
- Zhuang, M., Calabrese, M. F., Liu, J., Waddell, M. B., Hammel, M., Miller, D. J., ... Brenda, A. (2010). *NIH Public Access*. 36(1), **39–50**.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.09.022.Structures>
- Ziegelbauer, J., Shan, B., Yager, D., Larabell, C., Hoffmann, B., & Tjian, R. (2001). Transcription factor MIZ-1 is regulated via microtubule association. *Molecular Cell*, 8(2), **339–349**.
- Zollman, S., Godt, D., Prive, G. G., Couderc, J. L., & Laski, F. A. (1994). The BTB domain, found primarily in zinc finger proteins, defines an evolutionarily conserved family that includes several developmentally regulated genes in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(22), **10717–10721**.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.91.22.10717>

<http://wolfson.huji.ac.il/expression/procedures/bacterial/Glucose%20supression.pdf> –  
Pristupljeno kolovoz 2019.

<https://www.arabidopsis.org/> – Pristupljeno kolovoz 2019.

<https://biorender.com/> – Pristupljeno kolovoz 2019.

<https://web.expasy.org/translate> – Pristupljeno kolovoz 2019.

[wolfson.huji.ac.il/expression/rosetta.pdf](http://wolfson.huji.ac.il/expression/rosetta.pdf) – Pristupljeno kolovoz 2019.

<https://www.neb.com> – Pristupljeno kolovoz 2019.

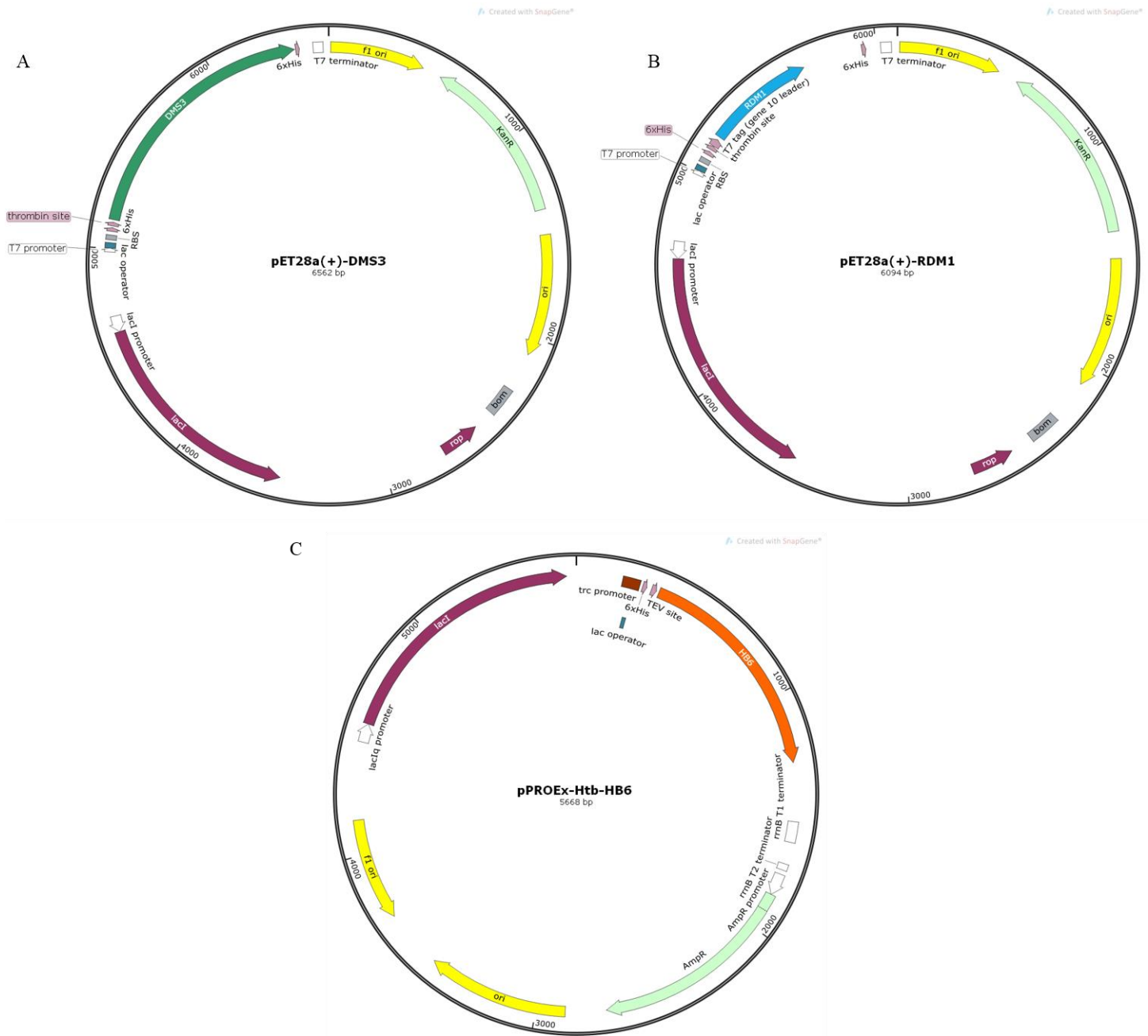
<https://www.neb.com/products/competent-cells/e-coli-expression-strains/e-coli-expression-strains> – Pristupljeno kolovoz 2019.

<https://protein-sol.manchester.ac.uk/> – Pristupljeno kolovoz 2019.

<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi> – Pristupljeno kolovoz 2019.

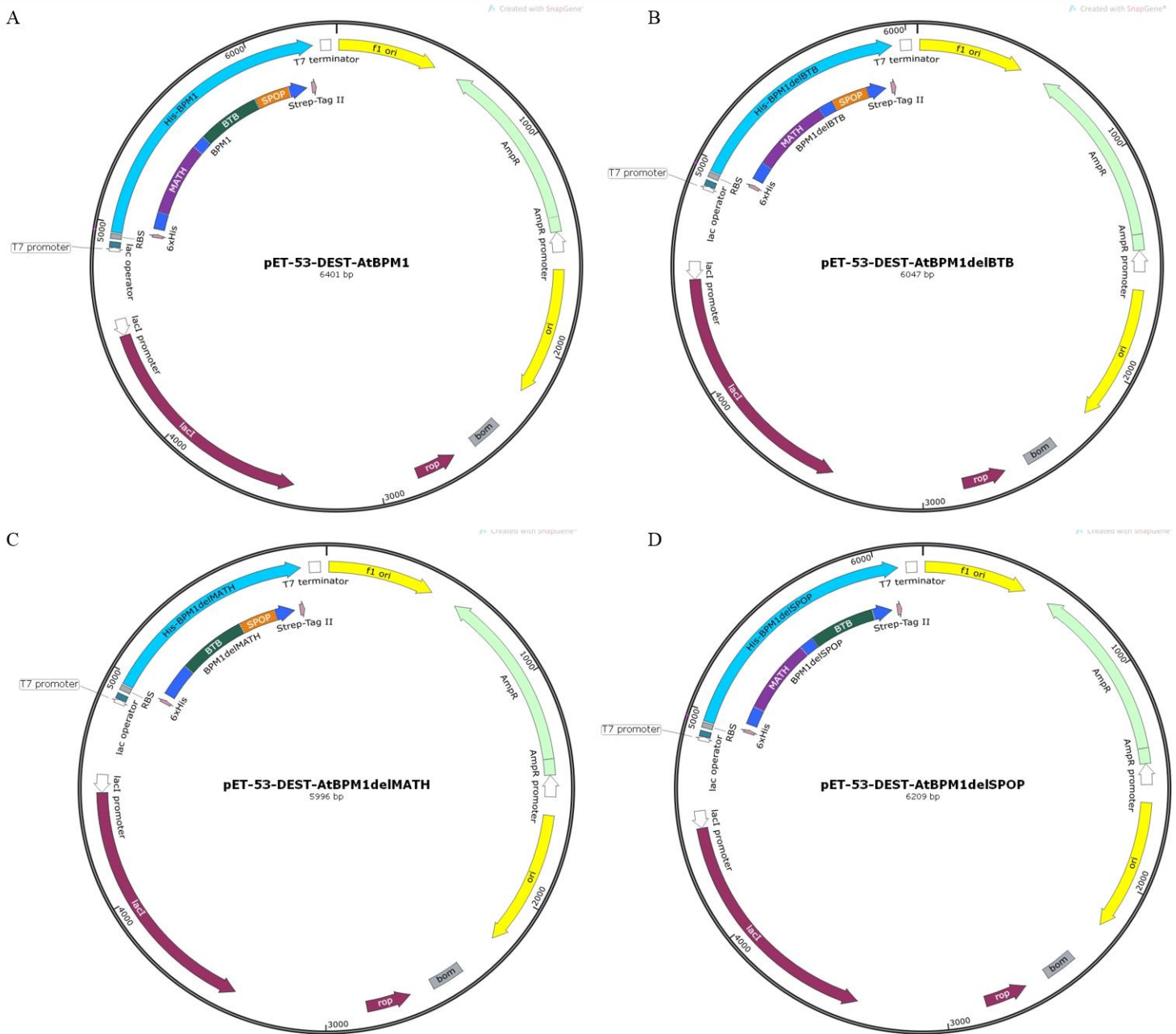
<https://www.uniprot.org/uniprot/Q9SIW2> – Pristupljeno kolovoz 2019.

# PRILOG

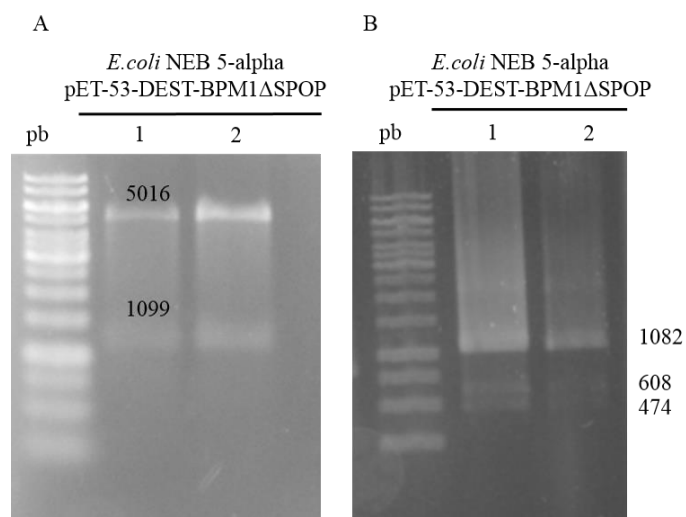


**Slika I.** Vektorske mape plazmida A) pET-28a(+)-DMS3 (Lorković i sur., 2012) B) pET-28a(+)-RDM1 i C) pPROEx-Htb-HB6 (Tokić, 2019).

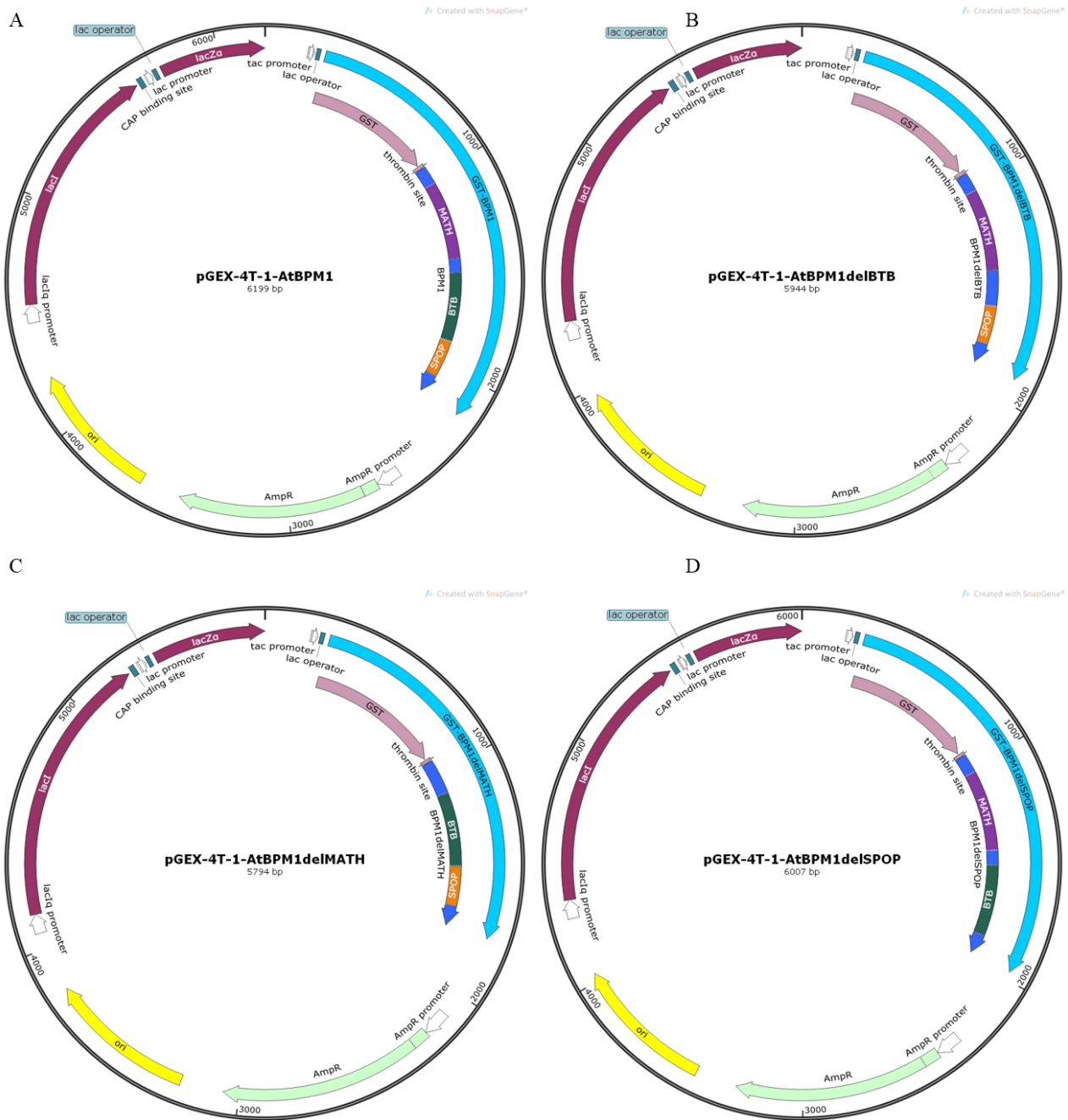




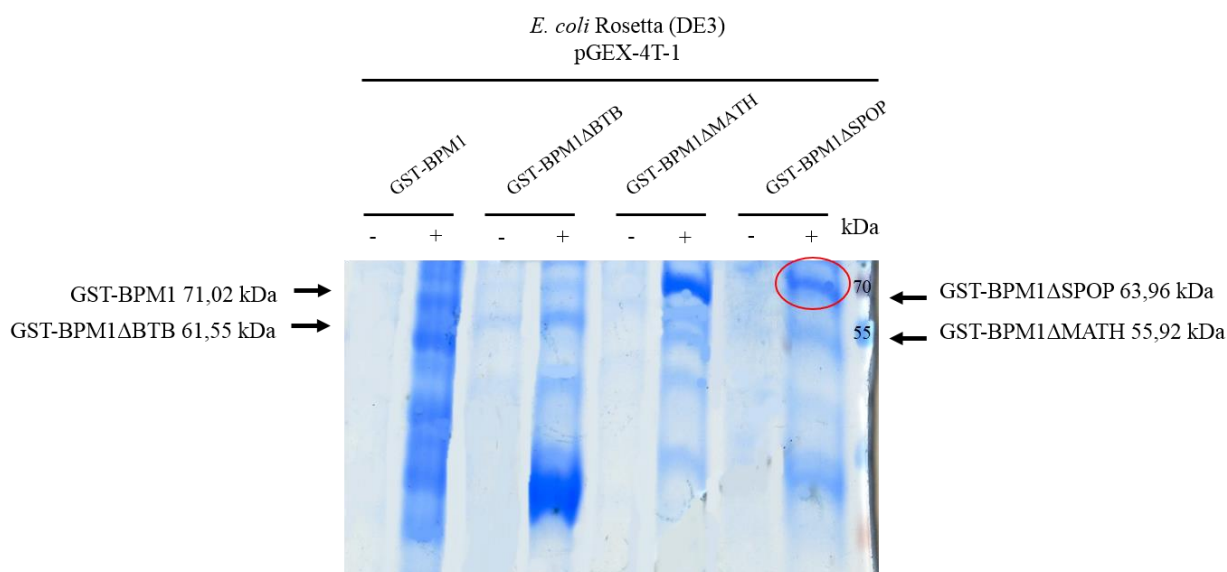
**Slika II.** Vektorske mape plazmida A) pET-53-DEST-BPM1 B) pET-53-DEST-BPM1 $\Delta$ BTB C) pET-53-DEST-BPM1 $\Delta$ MATH i D) pET-53-DEST-BPM1 $\Delta$ SPOP.



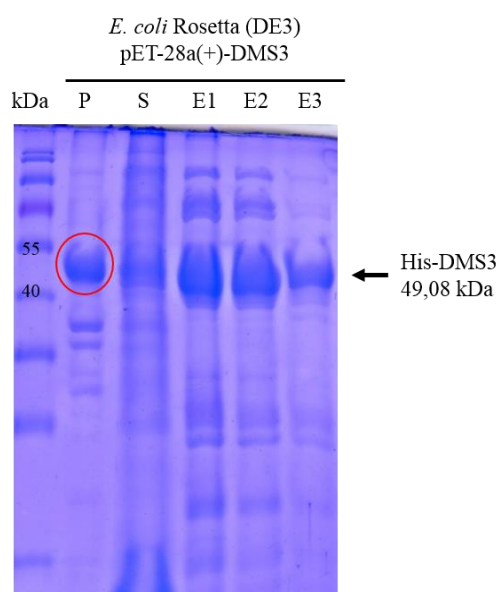
**Slika III.** Restriksijsko cijepanje A) plazmida pET-53-DEST-BPM1ΔSPOP enzimom Eco130I (uspješno) i XbaI (neuspješno) B) BPM1ΔSPOP PCR produkta (1082 pb) enzimom XbaI. Veličine pocijepanih fragmenata u parovima baza prikazane su povrh svakog fragmenta. Brojevi 1-2 označavaju pojedinačne izolacije plazmida. Oznaka pb označava molekularni standard Gene Ruler 1 kb DNA Ladder..



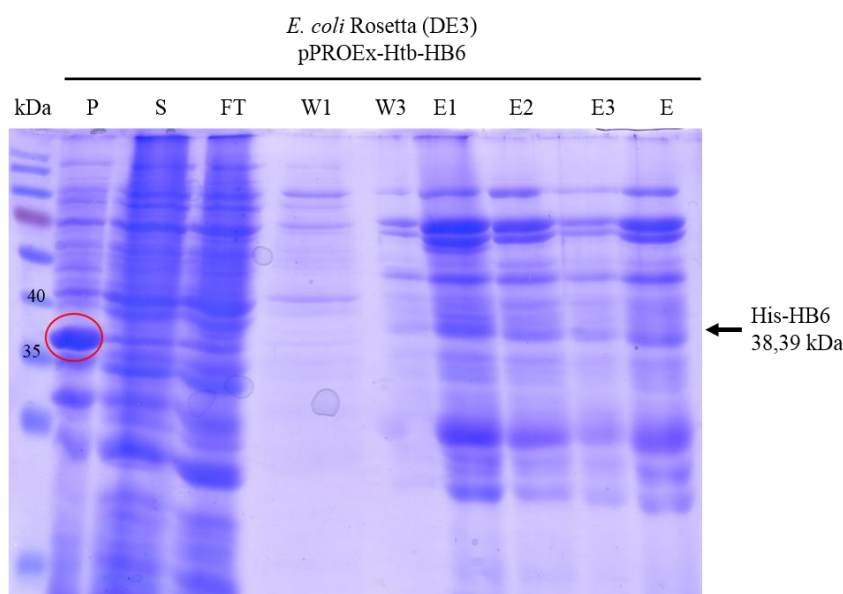
**Slika IV.** Vektorske mape plazmida A) pGEX-4T-1-BPM1 B) pGEX-4T-1-BPM1ΔBTB C) pGEX-4T-1-BPM1ΔMATH i D) pGEX-4T-1-BPM1ΔSPOP.



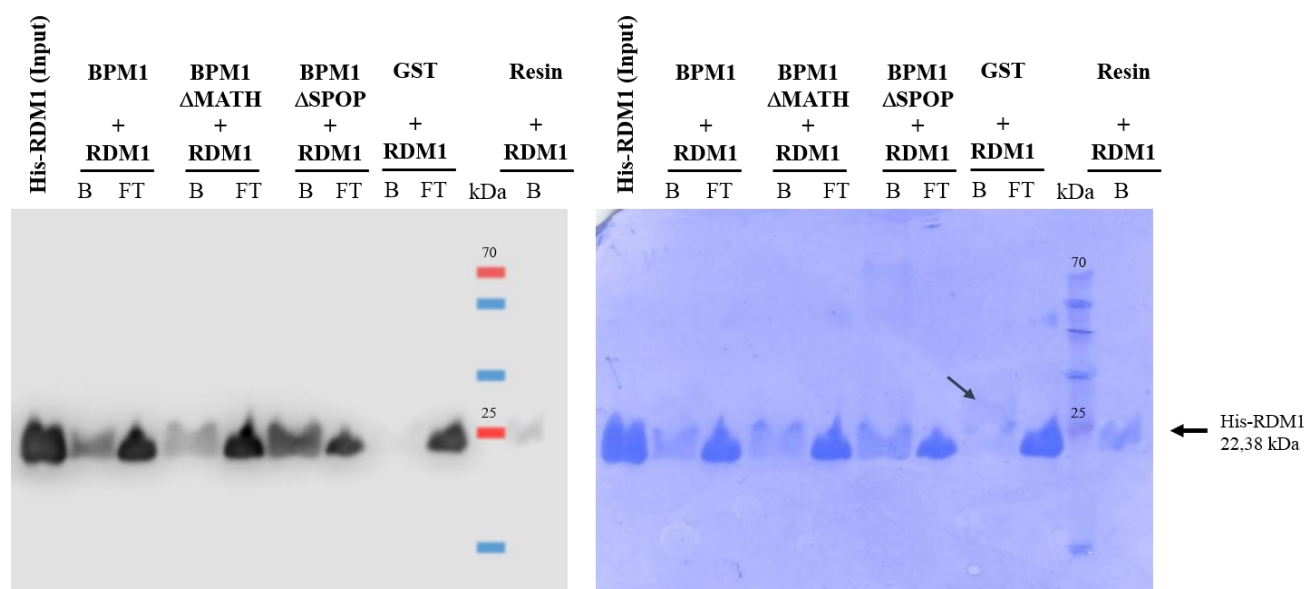
**Slika V.** Cjeloviti gel detekcije indukcije proteina BPM1-GST, BPM1 $\Delta$ MATH-GST i BPM1 $\Delta$ SPOP-GST SDS-PAG elektroforezom. Proteini imaju teoretsku visinu od 71,02, 55,92 i 63,96 kDa. Crvenim krugom su zaokruženi proteini koji su detektirani na teoretskoj visini. Minus (-) je negativna kontrola koja nije bila tretirana IPTG-om. BPM1 $\Delta$ BTB-GST nije detektiran, ali je vidljiv parcijalni produkt translacije koji odgovara visini proteina GST (26,98 kDa). Oznaka kDa označava molekulski standard PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder 10 – 250 kDa (Thermo Scientific).



**Slika VI.** Detekcija proteina His-DMS3 SDS-PAG elektroforezom nakon pročišćavanja na Ni-NTA matrici (replika 3). Teoretska visina proteina označena je crnom strelicom, a zaokružen je crvenim krugom u talogu. Uspješno je pročišćen te se nalazi u topivom obliku u supernatantu i eluensima. Oznake uzoraka: talog (P), supernatant (S), ciljani protein ispran sa Ni-NTA matrice (E1-E3). Oznaka kDa označava molekulski standard PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 – 180 kDa.



**Slika VII.** Detekcija pročišćenog proteina His-HB6 nakon SDS-PAG elektroforeze. Protein ima teoretsku visinu od 38,39 kDa i označen je crvenim krugom u talogu, odnosno crnom strelicom. Oznake uzoraka: talog (P), supernatant (S), nevezana frakcija (FT), ispiranja (W1 i W3), ciljani protein ispran sa Ni-NTA matrice (E1-E3), spojene frakcije eluensa sa promijenjenim puferskim sustavom (E). Oznaka kDa označava molekulski standard PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 – 180 kDa.



**Slika VIII.** Vezivanje proteina His-RDM1 na GST-BPM1 i njegove delcijske varijante (replika 1). Korišteno je 30  $\mu$ l mamca, 10  $\mu$ l proteina GST i *Resina* te 6  $\mu$ l His-RDM1 u volumenu od 200  $\mu$ l dopunjenim 1  $\times$  PBS-om. (Lijevo) Imunodetekcija His-RDM1-His anti-His antitijelom na teoretskoj visini od 22,38 kDa u reakciji kopurifikacije. His-RDM1 ima pozitivnu interakciju sa svim uzorcima

osim sa proteinom GST. Signal je pozitivan u reakciji s glutation sefarnim kuglicama (engl. *Resin*), ali je intenzitet vezanja puno slabiji u odnosu na ostale proteine. Oznake: reakcija vezivanja His-RDM1 proteina na mamce (B) i nevezana frakcija proteina (FT). Membrana je detektirana na uređaju C-DiGit Chemiluminescent Western Blot Scanner (LI-COR, BioSciences) na visokoj osjetljivosti (12 min). (Desno) Vizualizacija proteina mamca i plijena u reakciji kopurifikacije na PVDF membrani bojom CBB. Crnim strelicama su označeni detektirani mamci na teoretskim visinama (GST 26,98 kDa). Oznaka kDa označava molekularni standard PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder 10 – 250 kDa.

# ŽIVOTOPIS

## Osnovne informacije:

Ime: Karlo

Prezime: Miškec

Email: [karlo-miskec@hotmail.com](mailto:karlo-miskec@hotmail.com)

Mjesto i datum rođenja: 16.12.1995. Zagreb, Hrvatska.

## Obrazovanje:

- Srednja škola Gimnazija Antuna Gustava Matoša Zabok (jezično opredjeljenje) 2009. – 2014.
- Prirodoslovno matematički fakultet, smjer preddiplomski studij molekularna biologija titula: univ. bacc. biol. mol. Summa cum laude (2014. – 2017.)
- Prirodoslovno matematički fakultet, smjer diplomski studij molekularna biologija titula: mag. biol. mol. Summa cum laude (2017. – 2019.)

## Iskustvo i praksa:

- Terenska nastava iz zoologije i botanike (akademska godina 2015/16)
- Laboratorijska stručna praksa u laboratoriju za kulturu biljnih stanica (akademska godina 2017/18) – molekularne metode istraživanja proteina i nukleinskih kiselina i njihova primjena na biljkama, bakterijama i kvascima
- Demonstrator iz kolegija Osnove fizikalne kemije (2016/17)
- Demonstrator iz kolegija Biokemija 2 (2016/17)
- Demonstrator iz kolegija Kultura animalnih i biljnih stanica (2017/18 i 2018/19)
- Demonstrator iz kolegija Biologija razvoja (2018/19)
- Demonstrator iz kolegija Mehanizmi biljnog razvitka (2018/19)
- Demonstrator iz kolegija Genetičko inženjerstvo u biotehnologiji (2018/19)
- Položen tečaj LabAnim za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama A kategorija (20.02. 2019.); broj potvrde: 80.2-19 HR 191/02/P
- Sudionik Biostudologije - susret studenata i učenika srednjih škola (2015/16 i 2018/19)
- Sudionik na manifestaciji Noć Biologije (2014/15; 2015/16 i 2018/19)

## Nagrade i priznanja:

- Sudionik na drugom kongresu studenata biotehnologije 2018/19.
- Dekanova nagrada za uspjeh u studiju (2018/19)

## Ostale vještine:

- Položena B1 razina njemačkog jezika - Deutsches Sprachdiplom (27.05.2014.)
- Razgovorno znanje engleskog jezika
- Poznavanje rada u programskom paketu Office
- Konstrukcija plazmida u programu SnapGene
- Vozačka dozvola, kategorija B