

# Konstrukcija vektora za heterolognu ekspresiju produkta gena At4g15590 iz biljke *A. thaliana*(L.) Heynh

---

Viandt, Krešimir

Master's thesis / Diplomski rad

2012

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:181:727613>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
ODJEL ZA BIOLOGIJU  
Diplomski znanstveni studij biologije

Krešimir Viandt

**Konstrukcija vektora za hetrolognu ekspresiju  
produkta gena At4g15590 iz biljke *A. thaliana* (L.)  
Heynh**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, 2012

## **TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Diplomski rad

Odjel za biologiju

Diplomski znanstveni studij biologije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

**Konstrukcija vektora za hetrolognu ekspresiju produkta gena At4g15590 iz biljke *A. thaliana* (L.) Heynh**

**Krešimir Viandt**

**Rad je izrađen:** Laboratorij za elektronsku mikroskopiju, Zavoda za molekularnu biologiju Instituta „Ruđer Bošković“ u Zagrebu

**Mentor:** Dr.sc. Hrvoje Fulgosi, prof.

**Kratak sažetak diplomskog rada**

U genomu biljke *A. thaliana* L. Heynh, identificiran je gen At4g15590 koji kodira suppressor of white apricot (SWAP) regulator prekrajanja (*engl. splicing*). Mikrosekvenconiranjem AM8 frakcije izolirane iz cytb<sub>6f</sub> kompleksa iz špinata (*S. oleracea*) utvrđen je slijed PELDSSALV, koji pokazuje veliku homologiju sa slijedom PELDESALV u biljci *A. thaliana* (SWAP protein). Gen veličine 1677 pb, koji je sastavljen je od 4 ili 5 egzona ovisno o višestrukim varijantama transkripata, na aminoterminalnom kraju gena karakterizira surp-domena, a na karboksiterminalnom kraju ubikvitin-domena. Metodom lančane reakcijom polimerazom (PCR) umnožen je dio gena SWAP, veličine 350 nukleotida, i ugrađen u plazmidni vektor pRSETa, gdje je fuziran na N-terminalnom kraju s peptidnim biljegom (6xHis tag). Ekspresija proteina ispitivana je u različitim bakterijskim stanicama pri različitim uvjetima uzgoja.

**Broj stranica:** 50

**Broj slika:** 21

**Broj tablica:** 5

**Broj literaturnih navoda:** 19

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** SWAP, prekrajanje, vektor pRSETa, *lac* operon, ekspresija proteina

**Datum obrane:** 26. rujna 2012.

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. Dr.sc. Vera Cesar, prof.

2. Dr.sc. Hrvoje Fulgosi, prof.

3. Dr.sc. Elizabeta Has-Schön, prof.

**Rad je pohranjen u:**

U knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

## **BASIC DOCUMENTACION CARD**

**University Josip Juraj Strossmayer in Osijek**

**MS thesis**

**Department of Biology**

**Graduate Study of Biology**

**Scientific Area: Natural science**

**Scientific Field: Biology**

**Vector construction for heterologous expression At4g15590 gene product from plant *A. thaliana* (L.) Heynh**

**Krešimir Viandt**

**Thesis performed at:** Laboratory for Electron Microscopy, Division of Molecular Biology, Ruder Bošković Institute

**Supervisor :** Hrvoje Fulgosi, PhD, prof.

### **Short abstract**

In plant's *A. thaliana* L. Heynh genome a gene At4g15590 that codes suppressor of white apricot (SWAP) regulator for splicing has been discovered. Via microsequencing of AM8 fraction isolated from cytb<sub>6</sub>f spinach complex (*S. oleracea*) a sequence PELDSSALV has been established, a sequence that shows great hegemony with PELDESALV sequence in *A. thaliana* plant (SWAP protein). A 1677 pb sized-gene, constructed from 4 or 5 exons, depending on multiple transcript variants, is characterized by a surp-domaine at the aminothermal gene region, and ubiquitin-domain at the *carboxy-terminal* region. Via polymerase chain reaction (PCR), SWAP part of the gene, 350 nucleotides in size, has been multiplied and built in a plasmidic pRSET vector where it has been fused on N-terminal end with peptide (6xHis) tag. Protein expression has been researched in various bacterial cells under different bacteria breeding conditions.

**Number of page:** 50

**Number of figures:** 21

**Number of tables:** 5

**Number of references:** 19

**Orginal in:** Croatian

**Key words:** SWAP, splicing, pRSETa vector, *lac* operon, protein expression

**Date of the thesis defence:** 26. September 2012.

### **Reviewers:**

**1. Vera Cesar, PhD, prof.**

**2. Hrvoje Fulgosi, PhD, prof.**

**3. Elizabeta Has-Schön, PhD, prof.**

### **Thesis deposited in:**

Library of Department of Biology, University of J.J. Strossmayer in Osijek

*Zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Hrvoju Fulgosiju na predloženoj temi te što mi je omogućio izradu rada.*

*Veliko hvala dr. sc. Ani Tomašić Paić na strpljenju, savjetima i pomoći prilikom izrade rada.*

*Hvala dr. sc. Lei Vojti na pomoći pri pročišćavanju proteina.*

# Sadržaj

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Uvod.....</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1. Fotosinteza.....  | 2         |
| 1.1.1. Tijek svjetlosnih reakcija fotosinteze.....                   | 3         |
| 1.2. <u>S</u> uppressor of <u>w</u> hite <u>a</u> pricot (SWAP)..... | 5         |
| 1.2.1. Surp-domena.....  | 5         |
| 1.2.2. Prekrajanje ( <i>engl. splicing</i> ).....                    | 6         |
| 1.2.3. Ubikvitin-domena.....   | 8         |
| 1.3. Vektor pRSETa.....  | 9         |
| 1.4. Laktoza operon ( <i>lac operon</i> ).....                       | 10        |
| 1.4.1. Negativna kontrola transkripcije <i>lac</i> operona.....      | 11        |
| 1.4.2. Pozitivna kontrola transkripcije <i>lac</i> operona.....      | 12        |
| 1.5. Cilj istraživanja.....  | 13        |
| <br>   |           |
| <b>2. Materijali i metode.....</b>                                   | <b>14</b> |
| 2.1. Materijali.....   | 15        |
| 2.1.1. Kemikalije i enzimi.....                                      | 15        |
| 2.1.2. Uređaji.....  | 15        |
| 2.1.3. Molekularni biljezi.....                                      | 15        |
| 2.1.4. Vektori, bakterijski sojevi i biljni materijal.....           | 16        |
| 2.1.4.1. Vektori.....  | 16        |
| 2.1.4.2. Bakterijski sojevi.....                                     | 16        |
| 2.1.4.3. Biljni materijali.....                                      | 16        |
| 2.1.5. Hranjive podloge.....   | 17        |
| 2.1.6. Antibiotici i otopine pufera.....                             | 18        |
| 2.1.6.1. Izvorne otopine antibiotika.....                            | 18        |
| 2.1.6.2. Otopine za izolaciju plazmidne DNA.....                     | 18        |
| 2.1.6.3. Otopine pufera.....   | 18        |
| 2.1.6.4. Otopine za SDS-PAGE.....                                    | 19        |
| 2.1.6.5. Priprava gelova za SDS-PAGE (mali uređaj).....              | 20        |
| 2.1.7. Oligonukleotidne početnice.....                               | 20        |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.2. Metode.....   | 21        |
| 2.2.1. Izolacija DNA iz biljke <i>Arabidopsis thaliana</i> .....                           | 21        |
| 2.2.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR).....   | 21        |
| 2.2.3. Analiza DNA i proteina.....   | 23        |
| 2.2.3.1. Elektroforeza u gelu agaroze.....   | 23        |
| 2.2.3.2. SDS-elektroforeza u poliakrilamidnom gelu.....                                    | 23        |
| 2.2.3.3. Određivanje primarnog slijeda DNA.....  | 23        |
| 2.2.4. Priprema elektrokompetentnih stanica bakterije <i>E.coli</i> i transformacija ..... | 24        |
| 2.2.5. Transformacija kemijski kompetentnih stanica <i>E.coli</i> .....                    | 24        |
| 2.2.6. Mini- i Midi-preparacija plazmidne DNA.....   | 25        |
| 2.2.7. Pročišćavanje DNA.....  | 26        |
| 2.2.8. Konstrukcija vektora za gen At4g15590.....  | 26        |
| 2.2.9. Ekspresija proteina.....  | 27        |
| 2.2.9.1. „Large-scale“ ekspresija.....   | 27        |
| 2.2.9.2. „Small-scale ekspresija“.....   | 28        |
| 2.2.10. Pročišćavanje proteina u nativnim uvjetima.....                                    | 29        |
| <b>3. Rezultati.....</b>   | <b>30</b> |
| 3.1. Analiza nukleotidnog slijeda gena At4g15590.....                                      | 31        |
| 3.2. Nukleotidni slijed odsječka gena At4g15590 s restrikcijskom kartom.....               | 32        |
| 3.3. Konstrukcija vektora za gen At4g15590.....  | 34        |
| 3.4. Ekspresija proteina.....  | 37        |
| <b>4. Rasprava.....</b>  | <b>42</b> |
| 4.1. SWAP protein.....   | 43        |
| 4.2. Prednosti pRSETa vektora.....   | 44        |
| <b>5. Zaključak.....</b>   | <b>45</b> |
| <b>6. Literatura.....</b>  | <b>47</b> |

**UVOD**



## 1. UVOD

### 1.1. Fotosinteza

Fotosinteza je proces u kojem se djelovanjem energije Sunčevog zračenja anorganske tvari pretvaraju u energijom bogate organske spojeve (Pevalek-Kozlina, 2003). Energija pohranjena u tim spojevima se koristi za provođenje metaboličkih procesa u stanicama biljaka. U biljaka, algi i određenih tipova bakterija (oksigene cijanobakterije), fotosintetski proces rezultira oslobađanjem molekulskog kisika i uklanjanjem ugljikovog dioksida iz atmosfere koji se koristi za sintezu ugljikohidrata. Evolucijski primitivnije bakterije koriste svjetlosnu energiju za sintezu energijom bogatih organskih spojeva iz ugljikovog (IV)-oksida, ali ne proizvode kisik fotolizom vode (Ort i Whitmarsh, 2001). U viših biljaka fotosinteza je najaktivnija u mezofilu lista, odnosno u staničnim organelima, kloroplastima. Kloroplasti imaju tri različite membrane; vanjsku i unutrašnju ovojnicu i tilakoidnu membranu, i tri zasebna prostora; međumembranski, stromu i lumen tilakoida. Fotosintetske reakcije se odvijaju na tilakoidnim membranama, u čiji su lipidni dvosloj uklopljeni proteinski kompleksi koji sudjeluju u prijenosu elektrona. Ti integralni membranski kompleksi su:

- Fotosustav I (PS I) u čijem se reakcijskom središtu nalazi molekula klorofila *a* koja maksimalno apsorbira tamnocrvenu svjetlost valne duljine 700 nm (P700). Tom je fotosustavu pridružen LHCI (engl. *light harvesting complex I*), antenski kompleks izgrađen od apoproteina koji vežu molekule klorofila *a* i *b* i molekule karotenoida. Antenski kompleks prenosi svjetlosnu energiju do P700.
- Fotosustav II (PS II) u svom reakcijskom središtu sadrži molekulu klorofila *a* koja maksimalno apsorbira crvenu svjetlost valne duljine 680 nm (P680). Tom je fotosustavu pridružen LHCII (engl. *light harvesting complex II*) koji prenosi svjetlosnu energiju do P680.
- Citokrom *b<sub>6</sub>f* kompleks, koji povezuje PS I i PS II, izgrađuje ga osam ili devet različitih polipeptidnih podjedinica s nekoliko prostetičkih grupa: citokrom *f*; citokrom *b<sub>6</sub>*, Rieske željezo-sumporni protein, podjedinica IV, četiri mala polipeptida od 3,2 – 4,2 kDa. Ponekad je kompleksu pridružen i deveti polipeptid (FNR) (Zhang i Cramer 2004).
- ATP-sintaza katalizira fosforilaciju molekula ADP-a u ATP koristeći energiju pohranjenu u protonskom elektrokemijskom potencijalu tilakoidne membrane.

---

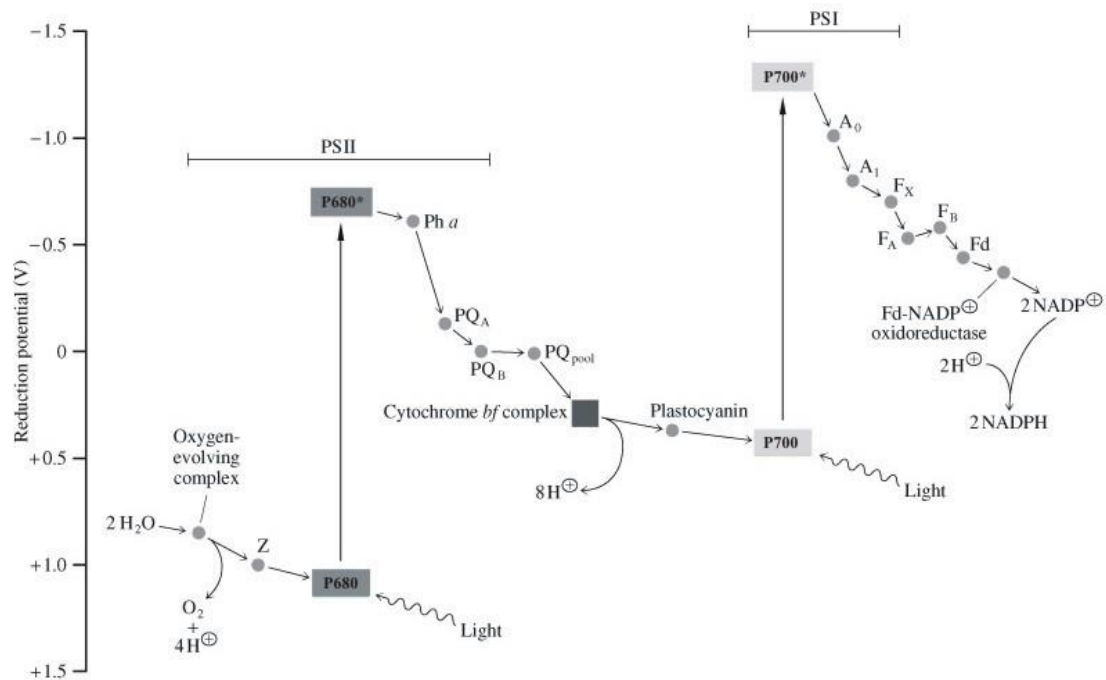
Fotosintetske reakcije se dijele na dva dijela – svjetlosne reakcije, koje sačinjavaju reakcije prijenosa elektrona i protona, i reakcije u tami ili biosinteza ugljikohidrata iz CO<sub>2</sub>.

### 1.1.1. Tijek svjetlosnih reakcija fotosinteze

Svjetlosne reakcije odvijaju se u tilakoidnim membranama, a uključuju fotolizu vode, linearni i ciklički tok elektrona. Svjetlosnim reakcijama nastaju O<sub>2</sub> te NADPH i ATP koji se koriste kao donori elektrona, odnosno izvori energije za fiksaciju i redukciju ugljik (IV)-oksida u ugljikohidrate.

Prvi potrebni korak za pretvorbu svjetlosne energije u kemijsku na tilakoidnim membranama je pretvorba energije fotona svjetlosti u energiju pobuđenog stanja u antenskom kompleksu. Dio energije se oslobađa u obliku topline ili fluorescencije, a dio se prenosi do reakcijskog centra fotosustava II. Primarni fotokemijski događaj je prijenos elektrona iz pobuđenog reakcijskog središta P680 do akceptora elektrona, feofitina, čime P680 prelazi u snažan oksidans, P680<sup>+</sup>. P680<sup>+</sup> se reducira u stanje prije apsorpcije fotona pomoću proteinskog kompleksa nazvanog OEC (engl. *oxygen evolving complex*), koji sadrži 4 atoma mangana. Ukupni rezultat fotolize vode na OEC je prijenos 4 elektrona do P680<sup>+</sup>, otpuštanje protona u lumen tilakoida i oslobađanje O<sub>2</sub>. Elektron kojeg je prihvatila molekula feofitina prenosi se na molekulu plastokinona Q<sub>A</sub> trajno vezanu na polipeptid D2 fotosustava II, koja ga potom predaje drugoj molekuli plastokinona, Q<sub>B</sub>. Ta molekula ostaje vezana na polipeptidu D1 fotosustava II sve dok se potpuno ne reducira, za što su potrebna dva elektrona i dva protona. Potpuno reducirana molekula plastokinona Q<sub>B</sub>, plastokinol, difundira u lipidni matriks tilakoidne membrane i predaje elektrone citokrom *b<sub>6</sub>f* kompleksu. Citokrom *b<sub>6</sub>f* kompleks predaje elektrone molekuli plastocijanina koja ga povezuje s PS I. Osim što služi kao poveznica između dva fotosustava, taj kompleks ima važnu funkciju stvaranja transmembranske pH razlike prijenosom H<sup>+</sup> iona iz strome u lumen. Tako se stvara elektrokemijski potencijal potreban ATP-sintazi za stvaranje molekula ATP-a. Prijenos elektrona s reduciranog plastocijanina na P700<sup>+</sup> omogućava reakcijskom središtu PS I da, kada se ponovno osvijetli, posluži kao donor elektrona za redukciju NADP<sup>+</sup> u NADPH. Osvjetljavanjem fotosustava I P700 prelazi u pobuđeno stanje iz kojeg se izbacuje elektron bogat energijom. Taj elektron, nakon niza prenositelja, prihvaća molekula feredoksina te ga predaje feredoksin-NADP<sup>+</sup> reduktazi (FNR) koja,

elektronima primljenim od dvije molekule ferodoksina, reducira  $\text{NADP}^+$  u  $\text{NADPH}$ . Opisani proces naziva se linearni (neciklički) prijenos elektrona (Slika 1).



Slika 1. Shematski prikaz necikličkog transporta elektrona. Elektroni se prenose sa PSII na citokrom  $b_6f$  preko plastokinona, zatim se prenose preko plastocijanina na PSI.

Ciklički prijenos elektrona prisutan je kada nema dovoljno  $\text{NADP}^+$  koji bi primio elektrone od reducirane molekule ferodoksina. Stoga ferodoksin predaje elektrone citokrom  $b_6f$  kompleksu, koji ih prenosi plastocijaninu kako bi poslužili za regeneraciju P700. S cikličkim prijenosom elektrona povezano je nastajanje molekula ATP cikličkom fotofosforilacijom.

## 1.2. Suppressor of white apricot (SWAP)

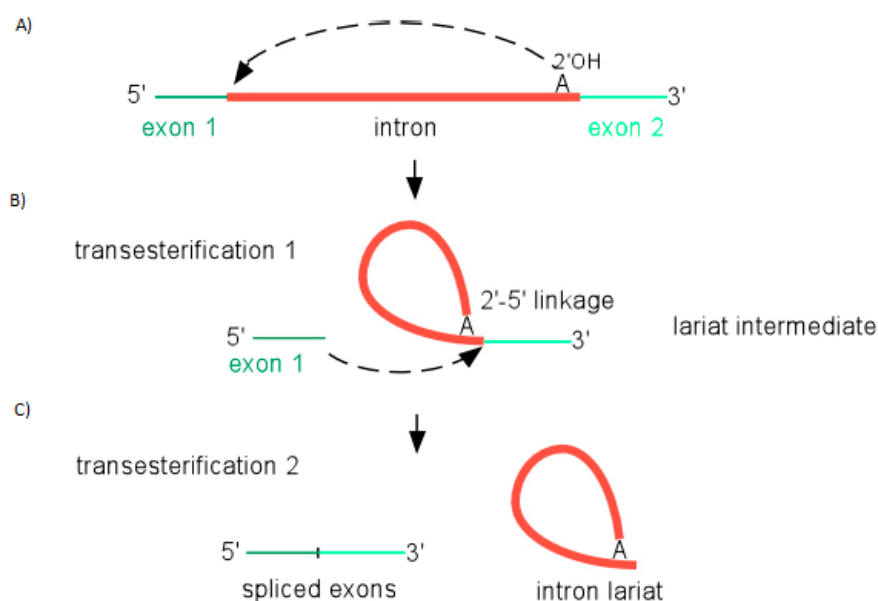
U genomu biljke *A. thaliana* L. Heynh, identificiran je gen At4g15590 koji kodira suppressor of white apricot (SWAP) regulator prekrajanja (engl. *splicing*). Gen veličine 1677 pb, koji je sastavljen je od 4 ili 5 egzona, ovisno o višestrukim varijantama nastalih prilikom prekrajanja samog transkripta. Na aminoterminalnom kraju, gen karakteriziraju ga tri surp-domene, dok je na karboksiterminalnom kraju prisutna ubikvitin-domena. Iz cytb<sub>6</sub>f kompleksa špinata (*S. oleracea*) izolirana je proteinska frakcija koja je podvrgnuta pročišćavanju primjenom AMS-a (amonij-sulfata), tzv. AMS-8 polipeptid. Automatiziranom Edmanovom razgradnjom, tj. mikrosekvencioniranjem AMS-8 frakcije, utvrđen je aminokiselinski slijed PELDSSALV koji pokazuje veliku homologiju (89% sličnosti) sa aminokiselinskim slijedom PELDESALV koji se nalazi na posljednjem egzonu SWAP proteina sličnom faktoru prekrajanja Ceprp21.

### 1.2.1. Surp-domena

Surp domena je prvi put otkrivena kao dva ponavljajuća motiva u sekvenci regulatora prekrajanja (engl. *suppressor of white apricot*), iz vrste *Drosophila melanogaster*. Domena je bogata argininskim i serinskim ostatcima. Proteini bogati argininskim i serinskim ostacima imaju važnu ulogu u samom prekrajanju i odabiru mjesta za prekrajanje u npr. metazoa (Lopato i sur., 2002). Isključivo pojavljivanje surp-domene u proteinima koji su uključeni u prekrajanje upućuje da je nastala pojavom pre mRNA prekrajanja (Denhez i Lafyatis, 1994). Pretpostavlja se da proteini koji sadrže surp domene imaju važnu ulogu u sastavljanju tjelešaca za prekrajanje (engl. *spliceosomes*) (Nesic i Krämer, 2001). Unatoč potencijalno velikom funkcionalnom značaju, svojstva surp domena prilično su neistražena tema (Kuwasako i sur., 2006).

### 1.2.2. Prekrajanje (engl. *splicing*)

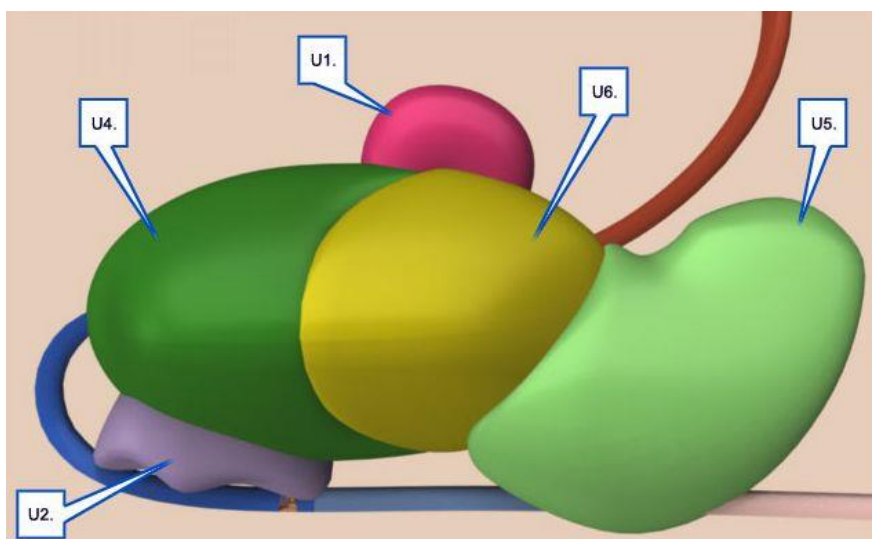
Kodirajući sljedovi većine eukariotskih gena isprekidani su nekodirajućim sljedovima, intronima, koji se precizno izrezuju iz zrele mRNA (Cooper i Hausman, 2004). Prekrajanje mRNA se odvija u dva koraka, preko dvije transesterifikacijske reakcije. Prvo se mRNA pocijepana na 5' mjestu za prekrajanje (engl. *splice site*) i 5' kraj introna se spaja s adeninskim nukleotidom unutar introna (blizu 3' kraja). Tako nastaje neobična veza između 5' kraja introna i 2' hidroksilne skupine adeninskog nukleotida. Nastali intermedijar je sličan lasu (engl. *lariat-like*) u kojem intron pravi omču. Drugi korak u prekrajanju se odvija istodobnim cijepanjem na 3' mjestu za prekrajanje i slijepljivanjem tj. ligacijom dvaju egzona. Intron je tako izrezan u obliku lasa tj. omče ili petlje, potom biva lineariziran i razgrađen u jezgri stanice. Mehanizam prekrajanja prikazan je na slici 2.



**Slika 2. Mehanizam prekrajanja.** a) pre-mRNA, A prikazuje točku grananja, b) prva transesterifikacijska reakcija, c) druga transesterifikacijska reakcija

Reakcije se odvijaju na tjelešcima za prekrajanje. To su veliki i vrlo dinamični makromolekularni kompleksi koji sadrže male nuklearne ribonukleoproteinske čestice tzv. snRNP (engl. *small nuclear ribonucleoproteins*); U1, U2, U4, U5 i U6 (Nilsen, 2003). Svaka snRNP sadržava malu nuklearnu RNA (engl. *small nuclear ribonucleic acid*) i pripadajuće proteinske komponente (Jurica i Moore, 2003). U1, U2 i U5 snRNP svaka sadržava po jednu

snRNA molekulu, dok su U4 i U6 snRNA međusobno združene u jednu zajedničku snRNP (Cooper i Hausman, 2004).



Slika 3. Shematski prikaz tjelešca za prekrajanje sa svim domenama.

Prvi korak u združivanju tjelešaca za prekrajanje (Slika 3) je vezanje U1 snRNP na 5' mjesto za prekrajanje pre-mRNA. Prepoznavanje obuhvaća sparivanje baza između 5' usaglašenog slijeda za prekrajanje i komplementarnog slijeda na 5' kraju U1 snRNA. Potom se U2 snRNP veže na točku grananja (engl. *branch site*), mjesto gdje se 5' kraj introna povezuje kako bi nastala struktura slična lasu, komplementarnim sparivanjem između U2 snRNA i slijeda točke grananja. Zatim dolazi do ugradnje već nastalog kompleksa U4/U6 i U5 snRNP. U5 snRNP sve veže na slijed uzvodno od 5' mjesta za prekrajanje. Reakcija prekrajanja povezana je s preslagivanjem snRNA. Disocijacija U6 s U4 i premještanje U1 na 5' mjesto za prekrajanje, dovode do nastanka intermedijera sličnog lasu. U5 se potom veže na slijedove na 3' mjestu za prekrajanje, nakon čega slijedi izrezivanje introna i sljepljivanje egzona. snRNA ne samo da prepoznaju usaglašene slijedove na točki grananja i mjestima prekrajanja, već one izravno kataliziraju reakciju prekrajanja (Cooper i Hausman, 2004).

---

### 1.2.3. Ubikvitin-domena

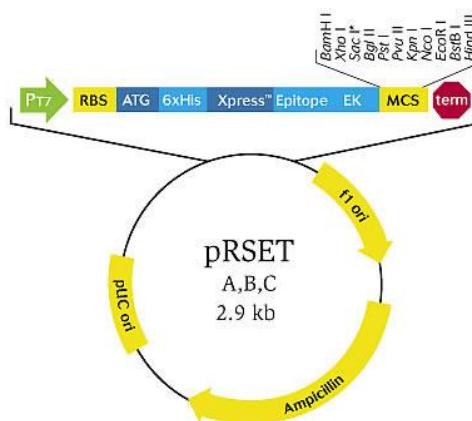
Ubikvitin je mali, konzervirani protein izgrađen od 76 aminokiselina (8,5 kDa), koji se nalazi u svim eukariotskim stanicama (Wang, 2001). Karakterizira ga sedam lizinskih ostataka (K6, K11, K27, K29, K33, K48 i K63), C-terminalni glicinski te N-terminalni metioninski ostatak. Svaki lizinski i metioninski ostatak može formirati isopeptidnu ili peptidnu vezu sa C-terminalnim krajem druge molekule ubikvitina (Strieter i Korasick, 2011).

Ubikvitin je uključen u enzimatsku post-translacijsku modifikaciju, ubikvitinaciju. Ubikvitinirani proteini sudjeluju u popravku DNA, signalnim putevima, transkripciji, proteinskom prijenosu, razgradnji antigena i proteina (Walters i sur., 2004).

Proteini koji pripadaju ubikvitinskoj porodici su podjeljeni u dvije skupine ovisno o njihovoj strukturalnoj homologiji s ubikvitinom. U prvu skupinu se ubrajaju proteini koji podsjećaju na ubikvitin (engl. *ubiquitin-like proteins*) tj. strukturalno su slični ubikvitinu i u stanci se nalaze zasebno ili kovalentno vezani za druge proteine te su uključeni u enzimatske kaskade. Drugu skupinu čine proteini koji imaju domene koje podsjećaju na ubikvitin (engl. *ubiquitin-like domain proteins*). Te domene na C-terminalnom kraju ne sadrže diglicinski motiv, koji je karakterističan za ubikvitin i ne vežu se za druge proteine (Walters i sur., 2004). Takvi proteini imaju ulogu u apoptozi, popravku DNA i signalnim putevima (Zhou i sur., 2001). SWAP protein pripada drugoj skupini. Na C-terminalnom kraju sadrži domenu čija trodimenzionalna struktura odgovara trodimenzionalnoj strukturi ubikvitina i čija uloga nije poznata.

### 1.3. Vektor pRSETa

pRSETa vektor (Invitrogen, SAD) dizajniran je za učinkovitu proteinsku ekspresiju i pročišćavanje kloniranih gena u bakteriji *E. coli* (Slika 4).



Slika 4. Shematski prikaz plazmidnog vektora pRSETa s označenim dijelovima.

Vektor sadržava:

- T7 promotor koji omogućuje kontroliranu heterolognu ekspresiju u bakterijskoj stanici, bez bazalne ekspresije. Služi kao mjesto vezanja za T7 RNA polimerazu.
- mjesto za vezanje na ribosome (engl. *ribosome binding site*, RBS) koji omogućuje efikasnu translaciju gena od interesa
- ATG slijed, mjesto početka translacije
- N-terminalni 6xHis tag, omogućuje pročišćavanje rekombinantnog proteina
- N-terminalni Xpress™ epitopni tag, omogućava detekciju proteina pomoću antitijela
- enterokinazno mjesto cijepanja (engl. *enterokinase cleavage site*, EK), predstavlja mjesto za uklanjanje 6xHis tag-a
- mjesto za višestruko kloniranje (engl. *multiple cloning site*, MCS), služi za umetanje gena od interesa
- f1 ishodište replikacije (engl. *origin*), mjesto početka transkripcije
- T7 terminator, mjesto završetka transkripcije
- bla promotor, omogućuje ekspresiju gena za otpornost na antibiotik ampicilin
- gen za otpornost na antibiotik ampicilin, omogućuje selekciju plazmida u *E. coli*
- pUC ishodište replikacije, omogućuje velik broj kopija plazmida u *E. coli*

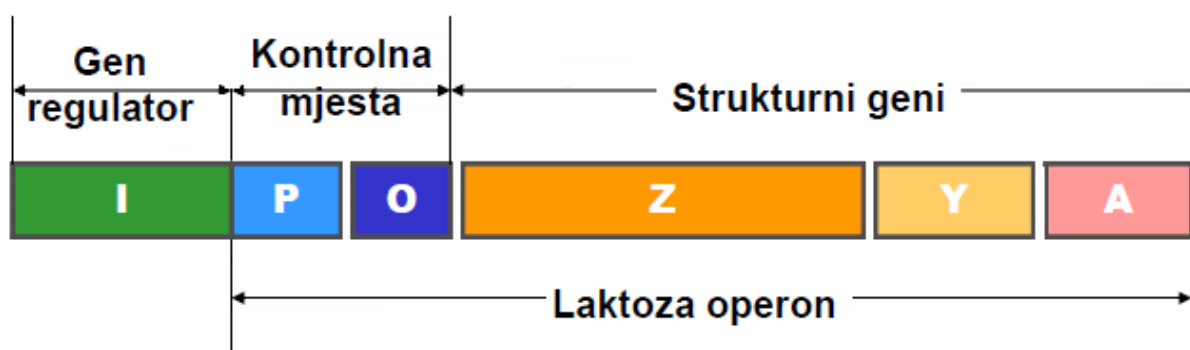


#### 1.4. Laktoza operon (*lac* operon)

Operon predstavlja skupinu gena koji se prepisuju istovremeno te općenito se sastoji od strukturalnih gena i njihovih kontrolnih elemenata.

Prokarioti, kao što je *E. coli*, su razvili efikasnu metodu metabolizma laktoze. Bakterija ne troši energiju na sintezu proteina za metabolizam laktoze u odsutnosti laktoze, nego se proteini sintetiziraju samo kada je laktoza prisutna (Sadava i sur., 2008).

*Lac* operon (engl. *lactose operon*) je operon koji kontrolira transport i metabolizam šećera laktoze u *E. coli*. Sastavni dijelovi *lac* operona su promotor P, operator O (mjesto vezanja represora) te tri funkcionalna gena: *lacZ*, *lacY* i *lacA* (Slika 5).



Slika 5. Shematski prikaz *lac* operona. I predstavlja gen *lacI* koji kodira represor *lac* operona i nije njegov sastavni dio, P promotor, O operator, a Z, Y i A predstavljaju funkcionalne gene *lacZ*, *lacY* i *lacA*.

*LacZ* kodira  $\beta$ -galaktozidazu, enzim koji katalizira hidrolizu laktoze na glukozu i galaktozu (Slika 6). Također je uključen u reakciju izomerizacije pri čemu nastaje izomer laktoze, alolaktoza koja je prirodni induktor *lac* operona. U molekularnoj biologiji, za indukciju *lac* operona se koristi izopropil- $\beta$ -D-galaktozid (IPTG). *LacY* kodira laktoza permeazu koja transportira laktozu u stanicu, a *lacA* kodira galaktozid acetiltransferazu, enzim čija biološka uloga nije u potpunosti poznata (Roderic, 2005), ali se smatra da ima ulogu u detoksifikaciji tiogalaktozida koji se skupa s laktozom transportiraju u stanicu pomoću laktoza permeaze (Cooper i Hausman, 2004). Transkripcija *lac* operona se nalazi pod dvostrukom kontrolom, pozitivnom i negativnom.



Slika 6. Hidroliza i izomerizacija laktoze. Obje reakcije katalizira enzim β-galaktozidaza.

### 1.4.1. Negativna kontrola transkripcije *lac* operona

U bakteriji *E. coli* *lac* represor je kodiran genom *lacI*. *LacI* skupina proteina, kojoj pripada i *lac* represor, sastoji se od preko 20 proteina koji imaju sličan aminokiselinski slijed. Navedeni proteini su uključeni u represiju transkripcije gena koji sudjeluju u metabolizmu i transportu ugljikohidrata i nukleotida (Kercher i sur., 1997). Ujedno reguliraju transkripciju gena time što prepoznaju palindromski slijed veličine 16 - 18 parova baza na samom operatoru te se ujedno vežu na operator (Adhya, 1992). U odsutnosti laktoze, *lac* represor čini kompleks sa operatorom i time blokira vezanje RNA polimeraze na promotor, a samim time sprječava transkripciju *lac* gena (Kozlina, 2003).

Represor je homotetramer, molekularne mase 154 kD. Svaki se monomer sastoji od četiri domene (Müller-Hill, 1998):

- domena za vezanje DNA - nalazi se na N-terminalnom dijelu, sadrži uzvojnica-okret-uzvojnica motiv (engl. *helix-turn-helix motif*), koji se nalazi u mnogim prokariotskim regulatornim proteinima, čija je uloga da prepozna nukleotidni slijed na operatoru
- domena za vezanje liganda
- zglobov (engl. *hinge helix*) - kratki polipeptidni lanac koji povezuje domenu za vezanje DNA s domenom za vezanje liganda
- oligomerizacijska domena - nalazi se na C-terminalnom dijelu, sastoji se od 19 aminokiselinskih ostataka i sudjeluje u stvaranju tetramera

Kada je prisutna, laktoza se veže na represor uzrokujući njegovo odvajanje od operatora. Kada je sekvenca operatora neometana, RNA polimeraza se može pomicati duž DNA, sintetizirajući kontinuiranu mRNA (Kozlina, 2003).

#### **1.4.2. Pozitivna kontrola transkripcije *lac* operona**

*E. coli* prvenstveno koristi glukozu kao izvor energije, i sve dok je glukoza prisutna u hranjivom mediju, neće doći do ekspresije enzima koji sudjeluju u katabolizmu alternativnih izvora energije. Tako glukoza reprimira *lac* operon čak i u prisutnosti normalnog induktora, laktoze (Cooper i Hausman, 2004). Taj učinak glukoze izražava se snižavanjem koncentracije cikličkog adenozin-monofosfata, cAMP (Kozlina, 2003). Enzim adenil-ciklaza, koji prevodi ATP u cAMP, u bakterijama je reguliran tako da pad razine glukoze izaziva porast cAMP. cAMP sudjeluje u indukciji mnogih kataboličkih enzima u *E. coli*. Regulatorni protein CRP (engl. *cAMP receptor protein*) veže cAMP i uzrokuje transkripcijsku aktivaciju ili inhibiciju mnogih promotora (Kolb i sur. 1993).

Kada se CRP protein spoji u kompleks sa svojim efektorom (cAMP) dramatično se povećava njegov afinitet vezanja na DNA (Kozlina, 2003). Kompleks CRP-cAMP se veže oko 60 parova baza uzvodno od početka mjesta transkripcije i stupa u interakciju s  $\alpha$  podjedinicom RNA polimeraze, pri čemu potiče vezanje polimeraze na promotor i tako aktivira transkripciju (Cooper i Hausman, 2004).

## 1.5. Cilj istraživanja

Cilj ovog rada je istražiti potencijalnu funkciju proteina SWAP odnosno njegova slijeda PELDESALV koji se nalazi na karboksiterminalnom kraju gena te izolirati i pročistiti eksprimirani protein za daljnja istraživanja poput proizvodnje antitijela.

Cilj ovog istraživanja je:

- Izolirati genomsku DNA iz divljeg tipa biljke *A. thaliana* Col-0
- Lančanom reakcijom polimerazom umnožiti na karboksiterminalnom dijelu gena SWAP odsječak veličine 350 nukleotida te ga ugraditi u plazmidni vektor pRSETa
- Umnožiti rekombinantni vektor, provjeriti sekvencioniranjem ugradnju odsječka DNA u vektoru te ispitati ekspresiju proteina u odgovarajućim bakterijskim stanicama

## **MATERIJALI I METODE**

---

## 2. MATERIJALI I METODE

### 2.1. MATERIJALI

#### 2.1.1. Kemikalije i enzimi

Standardne kemikalije upotrebljene u ovom radu proizvodi su sljedećih tvrtki: Difco laboratories (SAD), Sigma (Njemačka), Kemika i Pliva (Zagreb). Korišteni restriksijski enzimi (*EcoRI* i *BamHI*) su proizvod tvrtke Invitrogen (SAD). Za lančanu reakciju polimeraze se koristila Phusion Hot Start II DNA polimeraza proizvođača Finnzymes (Finska). Kitovi za izolaciju DNA (DNeasy Plant Mini Prep Kit) su proizvodi tvrtke Qiagen (Njemačka).

#### 2.1.2. Uređaji

Upotrebljene su sljedeće centrifuge: Sigma 202 MK, Njemačka, Multifuge 3 S-R, proizvođača Heraeus, Njemačka. Za lančanu reakciju polimerazom (engl. *PCR polymerase chain reaction*) korišten je termocikler Uno II proizvođača Biometra (Njemačka). Za transformaciju kemijski kompetentnih stanica bakterije *E.coli* upotrebljen je Thermomixer comfort, Eppendorf (Njemačka). Transformacija elektrokompetentnih stanica *E. coli* provedena je na uređaju Gene Pulser Xcell, proizvođača Bio Rad (SAD).

#### 2.1.3. Molekularni biljezi

Kao biljeg molekularnih masa korišten je Precision Plus Protein Standards Dual Color. Navedeni biljeg (Bio-Rad, USA) je mješavina proteina poznatih molekularnih masa u raponu od 10-250 kDa te je korišten prilikom razdvajanja proteina SDS-poliakrilamidnom gel elektroforezom (SDS-PAGE). 1 kb DNA marker (Gene Ruler , #SMO331) proizvođača MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Njemačka) korišten je kao DNA standard.

## 2.1.4. Vektori, bakterijski sojevi i biljni materijal

### 2.1.4.1. Vektori

Korišten je plazmidni vektor pRSETa (Invitrogen, SAD) u koji je ugrađen odsječak gena SWAP veličine 350 nukleotida, u područje višestrukog mjesta za kloniranje (engl. *multiple cloning site*) unutar *BamHI* i *EcoRI* restrikcijskih mjesta. Plazmid nosi rezistenciju na antibiotik ampicilin.

### 2.1.4.2. Bakterijski sojevi

U pokusima su korišteni bakterijski sojevi *E. coli* MC1061(Str<sup>R+</sup>) (Casadaban i Cohen, 1980.), BL21(DE3)pLysS (Novagen), BL21(DE3)pMICO, BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (Stratagene) i Rosetta(DE3)pRARE(Cam<sup>R+</sup>) (Novagen).

### 2.1.4.3. Biljni materijal

U pokusima je korištena biljka *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Talijin uročnjak), ekotip Columbia (Col-0), jednogodišnja dvosupnica iz porodice *Brassicaceae*.

### 2.1.5. Hranjive podloge

LB ploče:

- 1,0% baktotripton
- 0,5% ekstrakt kvasca
- 1,0% NaCl
- Namjestiti pH na 7 pomoću 1M NaOH
- 1,5% agar
- Sterilizirati u autoklavu 20 min. na 120°C
- Ohladiti na temperaturu 55 - 60°C
- 100 mg/ml ampicilina

LB medij:

- 1,0% baktotripton
- 0,5% ekstrakt kvasca
- 1,0% NaCl
- Namjestiti pH na 7 pomoću 1M NaOH
- Sterilizirati u autoklavu 20 min. na 120°C
- Ohladiti na temperaturu 55 - 60°C
- 100 mg/ml ampicilina

M9 medij:

- 50 ml M9 soli (200 ml dH<sub>2</sub>O, 21,37g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>x12H<sub>2</sub>O, 3,37g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,63g NaCl)
- 0,5 ml 1M MgSO<sub>4</sub> (steriliziran)
- 20 ml 5% glukoza
- 25 µl 1M CaCl<sub>2</sub> (steriliziran)
- nadopuniti do 250 ml dH<sub>2</sub>O



## 2.1.6. Antibiotici i otopine pufera

### 2.1.6.1. Izvorne otopine antibiotika

| Antibiotici   | Način pripreme:                                  |
|---------------|--|
| Ampicilin     | 100 mg/ml ( u 50% etanolu, filter sterilizirati) |
| Kloramfenikol | 34 mg/ml ( u etanolu, filter sterilizirati)      |

### 2.1.6.2. Otopine za izolaciju plazmidne DNA

(i) otopina I: 50 mM glukoza, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCL. pH 8,0

(ii) otopina II: 0,2 M NaOH, 1% SDS

(iii) otopina III: 3,0 M kalijev acetat i 1,8 M mravlja kiselina

### 2.1.6.3. Otopine pufera

- TAE pufer: 10 mM Tris-HCl (pH 7,2-8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)
- 10 x Blotting pufer: 1,5 M glicin, 0,2 M Tris-HCl, pH 8,0
- 10 x PBS-pufer: 750 mM NaCl, 30 mM KCl, 45 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- AP pufer: 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris-HCl, pH 9,5
- otopina A: 1 x PBS pufer, 1% Tween 20, 5% mlijeko u prahu
- otopina B: 1 x PBS pufer, 1% Tween 20
- otopina za bojanje SDS-PAGE gelova: 0,1% Comassie blue G-250, 40% CH<sub>3</sub>OH, 10% CH<sub>3</sub>COOH
- otopina za odbojavanje SDS-PAGE gelova: 20% CH<sub>3</sub>OH, 7% CH<sub>3</sub>COOH
- lysis pufer: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, pH 8,0
- loading pufer: 2,5 ml 0,5M Tris-HCl (pH 6,8), 4 ml 10% SDS, 20 mg bromfenol-blue, 400 µl beta merkaptioetanol, 1 ml glicerol, nadopuniti do 10 ml dH<sub>2</sub>O

#### 2.1.6.4. Otopine za SDS-PAGE

- 30% otopina akrilamid (AA/Bis)

|                   |           |
|-------------------|-----------|
| Akrilamid         | 29,2 g    |
| Bis               | 0,8 g     |
| Deionizirana voda | do 100 ml |

- 1.5 M Tris-HCl pH 8,8

|                   |           |
|-------------------|-----------|
| Tris              | 18,2 g    |
| 6.0 M HCl         | do pH 8,8 |
| Deionizirana voda | do 100 ml |

Nakon pripreme filtrirati i čuvati na +4°C.

- 0.5 M Tris-HCl pH 6,8

|                   |           |
|-------------------|-----------|
| Tris              | 6 g       |
| 6.0 M HCl         | do pH 6,8 |
| Deionizirana voda | do 100 ml |

Nakon pripreme filtrirati i čuvati na +4°C.

- 10%-tni amonij-peroksisulfat (APS)

|                   |         |
|-------------------|---------|
| APS               | 500 mg  |
| Deionizirana voda | do 5 ml |

Otopinu podijeliti u alikvote od 0.5 ml i čuvati u Eppendorf tubicama na - 20°C. Odmrznuti neposredno prije izlijevanja gelova.

- 10 × SDS elektrodni pufer

|                   |           |
|-------------------|-----------|
| Tris              | 30,3 g    |
| Glicin            | 114,1 g   |
| SDS               | 10,0 g    |
| 6.0 M HCl         | do pH 8,3 |
| Deionizirana voda | do 1 L    |

Prije upotrebe razrijediti pufer 10 puta. Može se koristiti više puta.

### 2.1.6.5. Priprava gelova za SDS-PAGE (mali uređaj)

(i) Gel za razdvajanje proteina, 12%-tni

|                               |         |
|-------------------------------|---------|
| Deionizirana H <sub>2</sub> O | 4,29 ml |
| 1,5 mM Tris-HCl pH 8,8        | 3,25 ml |
| AA/Bis (30%)                  | 5,2 ml  |
| 10%-tni SDS                   | 130 µl  |
| 10%-tni APS                   | 130 µl  |
| TEMED                         | 15 µl   |

(ii) Gel za sabijanje proteina, 5%-tni

|                               |         |
|-------------------------------|---------|
| Deionizirana H <sub>2</sub> O | 3,36 ml |
| 0,5 mM Tris-HCl pH 6,8        | 1,5 ml  |
| AA/Bis (30%)                  | 996 µl  |
| 10%-tni SDS                   | 60 µl   |
| 10%-tni APS                   | 60 µl   |
| TEMED                         | 25 µl   |

### 2.1.7. Oligonukleotidne početnice

SWAP-check 1

5'-GGGTTTCTTCAGTCAGGGATA-3'

SWAP-check 2

5'-GAGAATTCTATGATTGAGTGG-3'

SWAP-BamHI

5'-CATGGGATCCGATCAAGAGTTGCTACCT-3'

SWAP-EcoRI

5'-CATGGAATTCTCAGACCACGTCCAGTAT-3'

Sve navedene specifične početnice (engl. *primer*) nabavljene su od tvrtke Invitrogen (USA).

## 2.2. Metode

### 2.2.1. Izolacija DNA iz biljke *Arabidopsis thaliana*

Biljna DNA izolirana je iz 2-3 tjedana starih listova biljaka upotrebom DNeasy Plant Mini Kit-a proizvođača QIAGEN prema protokolu. Uzorci se mehanički usitnjuju i potom liziraju primjenom odgovarajućeg pufera. RNA se ukloni tijekom postupka liziranja djelovanjem RNAza. Stanični ostaci se uklanjaju centrifugiranjem. Uzorci se homogeniziraju centrifugiranjem kroz QIA shredder mini spin kolonice. Nakon taloženja proteina i polisaharida, lizat se prenese na DNeasy Plant spin kolonicu pri čemu se DNA selektivno veže na silika-gel membranu dok se ostali sastojci poput kontaminanata i inhibitora enzima uklanjaju uzastopnim ispiranjem membrane. Pročišćena DNA se potom eluira u vodi ili puferu s niskom koncentracijom soli.

### 2.2.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Lančana reakcija polimerazom (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) je brza metoda eksponencijalnog umnažanja ciljnog dijela DNA u uvjetima *in vitro*. Zasniva se na umnažanju dijela dvolančane DNA pomoću enzima DNA-ovisne-DNA polimeraze iz bakterije *Thermus aquaticus* (tzv. *Taq*-polimeraze). Za reakciju se odabiru oligonukleotidni slijedovi (tzv. početnice, engl. *primers*) koji su komplementarni krajevima regije DNA koja se umnaža te se pri određenim uvjetima temperature vezuju na komplementarne dijelove DNA. U prisutnosti enzima *Taq*-polimeraze, odgovarajuće koncentracije  $MgCl_2$  i deoksiribonukleotida (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), dolazi do sinteze DNA.

Tablica 1. Temperaturni režim za umnažanje genomske DNA PCR-om.

| Opis faze                   | Temperatura | Vrijeme | Broj ciklusa |
|-----------------------------|-------------|---------|--------------|
| Denaturacija kalupa         | 98°C        | 2 min   | 1            |
| Faza razvajanja             | 98°C        | 40 sec  |              |
| Vežanje početnica           | 60°C        | 1 min   | 30           |
| Sinteza DNA                 | 72°C        | 40 sec  |              |
| Završna faza<br>produljenja | 72°C        | 7 sec   | 1            |
|                             | 4°C         | ∞       |              |

Tablica 2. Reakcijska smjesa za umnažanje genomske DNA PCR-om.

| Komponente          | Volumen/ 50 $\mu$ l po reakciji |
|---------------------|---------------------------------|
| MB H <sub>2</sub> O | 31,4 $\mu$ l                    |
| HF pufer            | 10,0 $\mu$ l                    |
| dNTP mix            | 1 $\mu$ l                       |
| SWAP-EcoRI          | 2,5 $\mu$ l                     |
| SWAP-BamHI          | 2,5 $\mu$ l                     |
| dsDNA kaplup        | 2,0 $\mu$ l                     |
| F 549-L polimeraza  | 0,6 $\mu$ l                     |

Tablica 3. Temperaturni režim za provjeru plazmida pRSETa PCR-om.

| Opis faze                   | Temperatura | Vrijeme  | Broj ciklusa |
|-----------------------------|-------------|----------|--------------|
| Denaturacija kalupa         | 98°C        | 30 sec   | 1            |
| Faza razvajanja             | 98°C        | 10 sec   |              |
| Vežanje početnica           | 60°C        | 30 sec   | 30           |
| Sinteza DNA                 | 72°C        | 30 sec   |              |
| Završna faza<br>produljenja | 72°C        | 10 sec   | 1            |
|                             | 4°C         | $\infty$ |              |

Tablica 4. Reakcijska smjesa za provjeru plazmida pRSETa PCR-om.

| Komponente          | Volumen/ 25 $\mu$ l po reakciji |
|---------------------|---------------------------------|
| MB H <sub>2</sub> O | 15,7 $\mu$ l                    |
| HF pufer            | 5,0 $\mu$ l                     |
| dNTP mix            | 0,5 $\mu$ l                     |
| SWAP-EcoRI          | 1,25 $\mu$ l                    |
| SWAP-BamHI          | 1,25 $\mu$ l                    |
| dsDNA kaplup        | 1,0 $\mu$ l                     |
| F 549-L polimeraza  | 0,3 $\mu$ l                     |

### **2.2.3. Analiza DNA i proteina**

#### **2.2.3.1. Elektroforeza u gelu agaroze**

Produkti lančane reakcije polimerazom razlučuju se elektroforezom u gelu agaroze. Agarozni gelovi (1%) priređuju se otapanjem 1g agaroze u 100 ml 1 x TAE acetatnog pufera (pH 8,0) s dodatkom interkalirajuće boje etidijev bromid (0,5 $\mu$ g/ml), a obojene molekule DNA se vizualiziraju na UV transiluminatoru (npr. Image Master, Gene Snap) i fotografiraju digitalnim uređajem.

#### **2.2.3.2. SDS-elektroforeza u poliakrilamidnom gelu**

Razdvajanje proteina na temelju molekulske mase elektroforezom u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE) provodi se primjenom 12% gela za razdvajanje proteina i 5% gela za sabijanje proteina, oba puferirana kod različitog pH. Elektroforeza je tekla pri naponu od 300V i različitoj jakosti struje (25mA u gelu za sabijanje, 35mA u gelu za razdvajanje) u trajanju od 90 min. Gelovi su zatim stavljeni u otopinu za bojanje SDS-PAGE gelova u trajanju od 1h, nakon toga se ispiru u destiliranoj vodi i stavljaju u otopinu za odbojavanje SDS-PAGE gelova u trajanju od 3h. Gelovi se potom nose na sušenje.

#### **2.2.3.3. Određivanje primarnog slijeda DNA**

Prvo je potrebno pripremiti reakcijsku smjesu koja sadrži DNA koju želimo sekvencionirati i standardne početnice. Postupak DNA sekvencioniranja je napravljen u DNA servisu Instituta Ruđer Bošković.

#### 2.2.4. Priprema elektrokompetentnih stanica bakterije *E. coli* i transformacija

Priprema elektrokompetentnih stanica *E. coli* počinje s uzgojem prekončne kulture stanica u 3 ml LB medija pri 37°C u tresilici. 1 ml prekončne kulture prenese se u 100 ml LB medija u Erlenmayerovu tikvicu te inkubira 3 sata na tresilici do optičke gustoće  $OD_{600}=0.4-0.6$ , očitane spektrofotometrom pri valnoj duljini od 600 nm. Od ovog koraka nadalje potrebno je sve raditi na ledu u rashlađenom posuđu te s hladnim glicerolom. Volumen od 50 ml bakterijske suspenzije prethodno ohlađene na ledu 30 min, prenese se u dvije sterilne hladne falcon tube te centrifugira 15 min na 4 000 x g pri +4°C. Dobiveni talog se nježno resuspendira u 50 ml hladnog 10% glicerola te centrifugira ponovo 15 min na 4 000 x g pri +4°C. Talog se zatim resuspendira u 25ml hladnog 10% glicerola i ponovo centrifugira. Ponovno se nježno resuspendira dobiveni talog u 4 ml hladnog 10% glicerola. Nakon zadnjeg centrifugiranja, talog se resuspendira u 300 µl ledeno hladnog 10% glicerola te alikvotira po 30 µl kompetentnih stanica u Eppendorf tube, smrzne u tekućem dušiku i pohrani na -80°C. Tako priređene stanice su stabilne najmanje 6 mjeseci.

U 30 µl elektrokompetentnih stanica doda se 2 µl plazmidne DNA, uzorak se inkubira na ledu 1 min te se smjesa stanica prenese u kivetu debljine 2 mm mikropipetom. Nakon elektroporacije (Bio-rad elektroporator, 1,8 kV, 200 Ω), u bakterijske stanice se doda 0,8 ml zagrijanog 2YT medija, potom se transformirane stanice horizontalno inkubiraju na tresilici (250 okr/min) na 37 °C u trajanju od 60 minuta. Nakon inkubacije 50 µl i 100 µl bakterijske suspenzije se nasade na ploče s odgovarajućim antibiotikom te se ploče inkubiraju u termostatu na 37 °C preko noći.

#### 2.2.5. Transformacija kemijski kompetentnih stanica *E. coli*

U 50 µl bakterijskih stanica doda se 2 µl plazmidne DNA. Uzorak se inkubira na ledu 10-15 minuta. Bakterijske stanice se potom podvrgnu toplinskom šoku u trajanju od 30 sekundi pri 42°C i prenesu na led. Uzorku se tada doda 250 µl tekućeg medija 2YT te se horizontalno inkubiraju transformirane bakterijske stanice na tresilici pri 37°C u trajanju od 60 minuta. Po 100 i 150 µl suspenzije transformiranih bakterija nasade se na LB agarne ploče s odgovarajućim antibioticima te inkubiraju preko noći na 37°C.

### 2.2.6. Mini- i Midi-preparacija plazmidne DNA

Bakterijska kolonija s ploče se nacijepi u 3 ml LB tekuće podloge s odgovarajućim antibiotikom i inkubira preko noći na tresilici (250 rpm) pri 37°C. 1,5 ml bakterijske suspenzije prenese se u Eppendorf tubicu i centrifugira 5 min na 3,5 000 x g. Dobiveni talog se resuspendira u 150 µl Otopine I, kojoj je neposredno prije izvođenja pokusa dodan lizozim (4mg/ml). Uzorak se inkubira 15 minuta na sobnoj temperaturi, potom doda 150 µl svježe priređene Otopine II. Nakon inkubacije otopine 5 minuta na ledu doda se 150 µl Otopine III, te ponovno inkubira uzorak 15 minuta na ledu. Slijedi centrifugiranje na 13 000 x g u trajanju od 15 minuta. Nadtalog se prenese u novu Eppendorf tubu uz dodatak 2 µl RNaze A (DNase free, 10mg/ml, Invitrogen) i inkubira u termostatu pri 37°C 45-60 minuta. Plazmidna DNA se istaloži dodatkom 360 µl izopropanola te se smjesa inkubira 60 minuta na sobnoj temperaturi. Uzorak se tada centrifugira 10 min na 8 000 x g, te dobiveni talog ispere s 500 µl 70% etanola i ponovo centrifugira (10 min, 8 000 x g). Nadtalog se izlije iz tube, a talog osuši na sobnoj temperaturi i otopi u 20 µl sterilne redestilirane vode.

Midipreparacija plazmidne DNA izvodi se prema navedenom protokolu za minipreparaciju plazmidne DNA uz korištenje otopina i tekućih podloga većeg volumena. Transformirane bakterijske stanice uzgajaju se u 30 ml LB medija s pripadnim antibiotikom uz dodatak po 6 ml Otopine I, II i III, 10 µl RNaze A te 10,8 ml izopropanola. Dobiveni talog se otopi u 200 µl sterilne redestilirane vode. Otopina se ostavi 20-30 min na sobnoj temperaturi. Za digestiju i analizu na agaroznom gelu dovoljan je 1 µl otopine.



### 2.2.7. Pročišćavanje DNA

U svrhu pročišćavanja DNA korišten je Gel Band Purification Kit. Postupak pročišćavanja proveden je prema uputama objavljenim u kitu.

### 2.2.8. Konstrukcija vektora za gen At4g15590

Metodom lančane reakcije polimerazom na kalupu DNA divljeg tipa biljke *A. thalina*, pomoću početnica SWAP-*BamHI* i SWAP-*EcoRI*, umnožen je posljednji ekson gena At4g15590. Dobivena DNA je pročišćena, te je potom napravljena dvostruka restrikcijska digestija plazmida (vektor pRSETa) i inserta (odsječak gena At4g15590 veličine 350 nukleotida) pomoću restrikcijskih enzima *BamHI* i *EcoRI*.

| dvostruka restrikcijska digestija plazmida |      | dvostruka restrikcijska digestija inserta |      |
|--|------|---|------|
| MB H <sub>2</sub> O                        | 15μl | MB H <sub>2</sub> O                       | 3μl  |
| <i>EcoRI</i>                               | 1μl  | <i>EcoRI</i>                              | 1μl  |
| <i>BamHI</i>                               | 1μl  | <i>BamHI</i>                              | 1μl  |
| Pufer 3 (10x)                              | 3μl  | Pufer 3 (10x)                             | 5μl  |
| DNA (pRSETa)                               | 10μl | DNA (PCR produkt)                         | 30μl |
| inkubacija na 37°C, 1,5h                   |      | inkubacija na 37°C, 3h                    |      |

Zatim su napravljene dvije ligacijske smjese pomoću standardnih formula i stavljene su na inkubaciju u trajanju od 16 h i pri +16°C.

$$\text{ligacija 1} = \frac{\text{veličina inserta}}{\text{veličina vektora}} \times 3 \text{ (3:1)} \times \text{količina vektora}$$

#### Ligacijska smjesa 1

|                       |       |
|-----------------------|-------|
| insert (SWAP produkt) | 3,5μl |
| vektor                | 1,0μl |
| T4 DNA ligaza         | 1,5μl |
| pufer 5x              | 3,0μl |
| MB H <sub>2</sub> O   | 6,0μl |

---

*ligacija 2 = veličina inserta x količina inserta : veličina vektora x količina vektora*

Ligacijska smjesa 2

|                       |       |
|-----------------------|-------|
| insert (SWAP produkt) | 2,4μl |
| vektor                | 0,1μl |
| T4 DNA ligaza         | 1,5μl |
| puffer 5x             | 4,0μl |
| MB H <sub>2</sub> O   | 2,0μl |

Dobiveni vektor, pRSETaSWAP, elektroporiran je u MC elektrokompetentne stanice (MC1061) koje nose resistenciju na antibiotik streptomycin. Umnoženi vektor je izoliran iz bakterijskih stanica, pročišćen te pohranjen na -20°C. Gen je na aminoterminalnom kraju fuziran s proteinskim biljekom (6xHis tag) iz vektora. Proteinski biljeg omogućuje detekciju željenog proteina pomoću imunodetekcije (anti His protutijela) te pročišćavanje proteina pomoću afinitetne kromatografije na nosaču s vezanim ionima kobalta.

## 2.2.9. Ekspresija proteina

### 2.2.9.1. „Large-scale“ ekspresija

Pojedinačne transformirane bakterijske kolonije nacijepimo pomoću sterilne čačkalice u 4 ml LB medija s odgovarajućim antibioticima i inkubiramo na horizontalnoj tresilici pri 37°C te 250 rpm u trajanju od 7 h. Zatim se nacijepi 2 ml bakterijske kulture u 30 ml LB medija s odgovarajućim antibioticima i inkubira preko noći na horizontalnoj tresilici pri 37°C te 250 rpm. Prekonoćnu bakterijsku kulturu razrijedimo 10x (10 ml bakterijske kulture + 90 ml LB medija s odgovarajućim antibioticima), spektrofotometrom provjerimo optičku gustoću ( $OD_{600} \approx 0,1$ ) i inkubiramo na horizontalnoj tresilici pri +37°C te 250 rpm dok  $OD_{600}$  ne dosegne 0,4 do 0,5. Nakon toga otpipetiramo 1 ml bakterijske kulture (*engl. non induced control*) i u preostali volumen otpipetiramo 100 μl 1M IPTG (konačna koncentracija 1mM) i razdijelimo u 2 tikvice od 50 ml, inkubiramo jednu tikvicu na 37°C (250rpm), a drugu na +30°C (250 rpm). Uzimamo 1 ml uzorka nakon 30 min, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h i preko noći (ON). Uzorke centrifugiramo na 14 000g, 10 min, supernatant bacimo, a pelet resuspendiramo u 35 μl loading pufera i pohranimo na -20 °C. Preostali volumen centrifugiramo na 5 000g, 10 min, supernatant bacimo, a pelet smrznemo u tekućem dušiku i pohranimo na -80°C. Pomoću SDS-PAGE elektroforeze provjeravamo ekspresiju proteina.

### 2.2.9.2. „Small scale“ ekspresija

Šest pojedinačne transformiranih bakterijskih kolonija nacijepnjeno je pomoću sterilnih čačkalica u 10 ml LB medija s odgovarajućim antibioticima i inkubirano na horizontalnoj tresilici pri 37°C te 250 rpm preko noći. 1,2 ml prekonodne bakterijske kulture je zatim nacijepnjeno u 10 ml LB medija s odgovarajućim antibioticima i inkubirano pri 37°C te 250 rpm sve dok OD<sub>600</sub> ne dosegne 0,5. Iz svake kulture otpipetira se 1 ml (*engl. non induced control*) i u preostali volumen se otpipetira IPTG te inkubira pri 250 rpm i pri različitim temperaturama (vidi tablica 5).

Tablica 5. Konačna koncentracija IPTG-a i temperaturni režim inkubacije.

| uzorak | IPTG   | inkubacija |
|--------|--------|------------|
| 1      | 1mM    | 37°C       |
| 2      | 1mM    | 20°C       |
| 3      | 0,75mM | 37°C       |
| 4      | 0,75mM | 20°C       |
| 5      | 0,5mM  | 37°C       |
| 6      | 0,5mM  | 20°C       |

Oko 1 ml uzorka odvojeno je nakon 1h, 2h, 3h i nakon noći. Uzorci se potom centrifugiraju na 14 000g, 10 min, supernatant se baca, a pelet resuspendira u 35 µl loading pufera i pohranimo na -20°C. Preostali volumen centrifugiramo na 5 000g, 10 min, supernatant bacimo, a pelet smrzemo u tekućem dušiku i pohranimo na -80°C. Pomoću SDS-PAGE elektroforeze provjeravamo da li je ekspresija bila uspješna.

### 2.2.10. Pročišćavanje proteina u nativnim uvjetima

Bakterijski pelet (dobiven tijekom ekspresije proteina) resuspendiramo u lysis puferu (5 ml pufera na 1 mg peleta). Zatim dodamo lizozim (konačna koncentracija 4 mg/ml), dobro resuspendiramo i ostavimo na ledu 30 min. Lizozim je aktivan na ledu, a zbog niske temperature ne dolazi do degradacije proteina. Uzorak se zatim sonificira (300 W, 0,3 amplituda, 6x 10 pulseva, pauza 10 sec između pulseva) i centrifugira (+4°C, 30 min, 14 000 g).

Za pročišćavanje proteina u nativnim uvjetima korištena je TALON kolona (BD Biosciences, SAD). 300 µl talon matriksa se ispere u 8-10 ml lysis pufera, zatim se 10 ml supernatanta pomješa s talon matriksom i rotira 1h pri +4°C i 12 rpm. Zatim slijedi ispiranje (2x) s 3 ml 20mM imidazola i elucija (5x) 300 µl 250 mM imidazola. Ispiranje i elucija se izvode na +4°C da bi se spriječila degradacija proteina, a „flow through“ se skuplja. 40 µl „flow through“ se pomješa s 20 µl loading pufera i provede se SDS elektroforeza.

Pročišćavanje proteina u nativnim uvjetima se zasniva na afinitetnoj kromatografiji na nosaču s vezanim ionima kobalta. Željeni protein se veže za ione kobalta u TALON koloni preko imidazolnog prstena histidinskih ostataka (proteinski biljeg, 6xHis tag). Kompeticija između imidazola iz pufera za eluciju i imidazolnog prstena histidinskih ostataka proteina za ione kobalta omogućuje odvajanje rekombinantnog proteina od afinitetnog nosača i dobivanje pročišćenog proteina.

**REZULTATI**

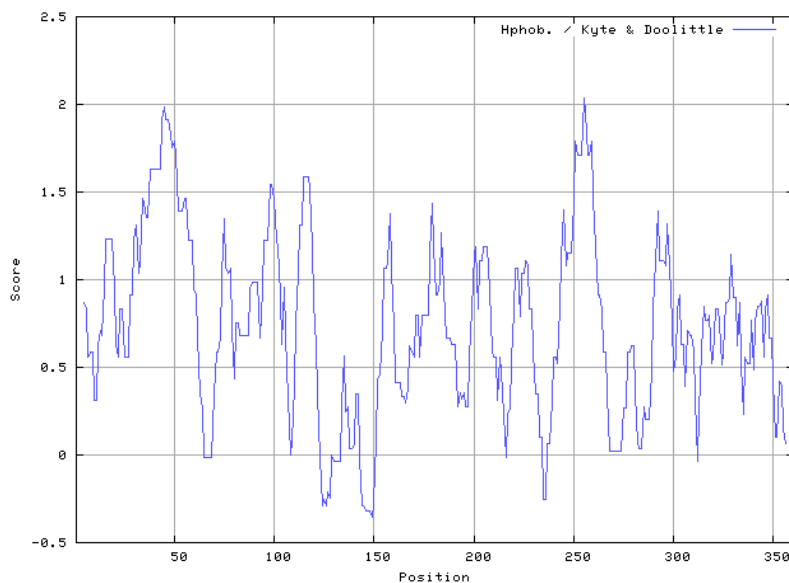
### 3. REZULTATI

#### 3.1. Analiza nukleotidnog slijeda gena At4g15590

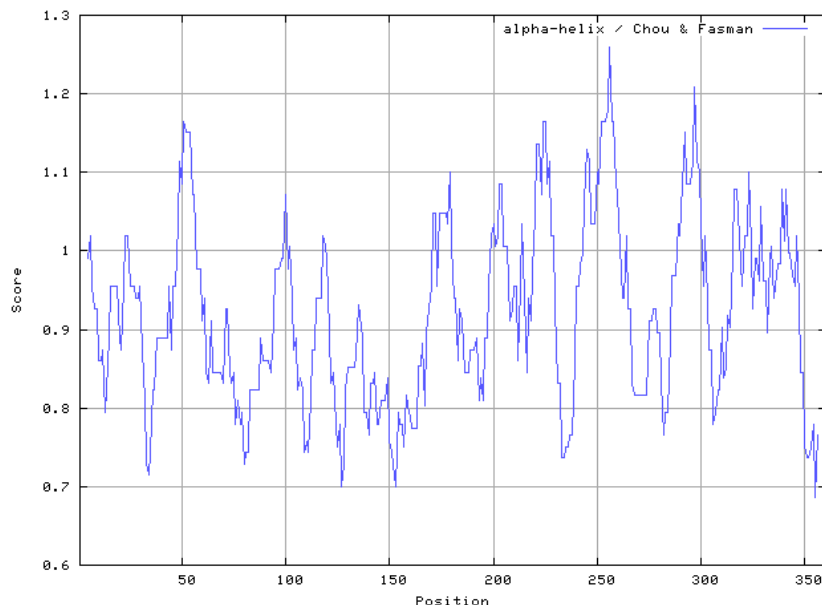
Iz divljeg tipa biljke *Arabidopsis thaliana* izolirana je genomska DNA, pomoću DNeasy Plant Mini Kit-a, a na čijem kalupu je metodom lančane reakcije polimerazom umnožen gen At4g15590 (Tablica 1 i 2). Gen je u nekoliko navrata sekvencioniran primjenom različitih početnica i ustanovljeno je da se sastoji od 5 eksona i 4 introna (srađivanjem nukleotidnog slijeda gena SWAP sa slijedom genomske DNA iz baze TAIR (The Arabidopsis Information Resource) primjenom odgovarajućih programa (ClustalW2)) te da se sekvenca od interesa tj. PELDESALV nalazi unutar posljednjeg eksona veličine 350 nukleotida (Slika 7). Napravljene su predikcije hidrofobnosti, prema Kyte i Doolittle, (Slika 8) i  $\alpha$ -helikalne strukture, prema Chou i Fasman, (Slika 9) posljednjeg eksona gena SWAP koje pokazuju da proteinski produkt ima dvije vrlo hidrofobne transmembranske domene.

GAT CAA GAG TTG CTA CCT AAG CTT GAA ATG CCT CCT CCT ACA CCT CCA CAA AAG AGA CCA GAG TTG  
 GAT GAG TCA GCC CTT GTT CCA CTT GAG CCA GAA GAC CAG TTT CTT GCC CAA CAT GAG GGT TTG TCT  
 ATT TTC AGG GTG ATT TGT GTT CCC GAC GGA GGG GAA GTC ATT AAG ATC ACA GTG CAG TCA TTG TCT  
 GAA AAC GTA GCA AGT TTG AAG GAG AAA ATA GCT GAG GTG GTT CAA ATT CAA GCA AAC AAA CAG ACG  
 TTA AGG GGG TTA AGA GCG GTT TTA AAG GAC AAT AAT AGG TCA CTT GCT TAT TAC AAT GTG AAA GCA  
 GGA GAT ATT CTA ATA CTG GAC GTG GTC TGA

Slika 7. Aminokiselinski slijed posljednjeg egzona gena At4g15590. Crvenom bojom je označena sekvenca PELDESALV.



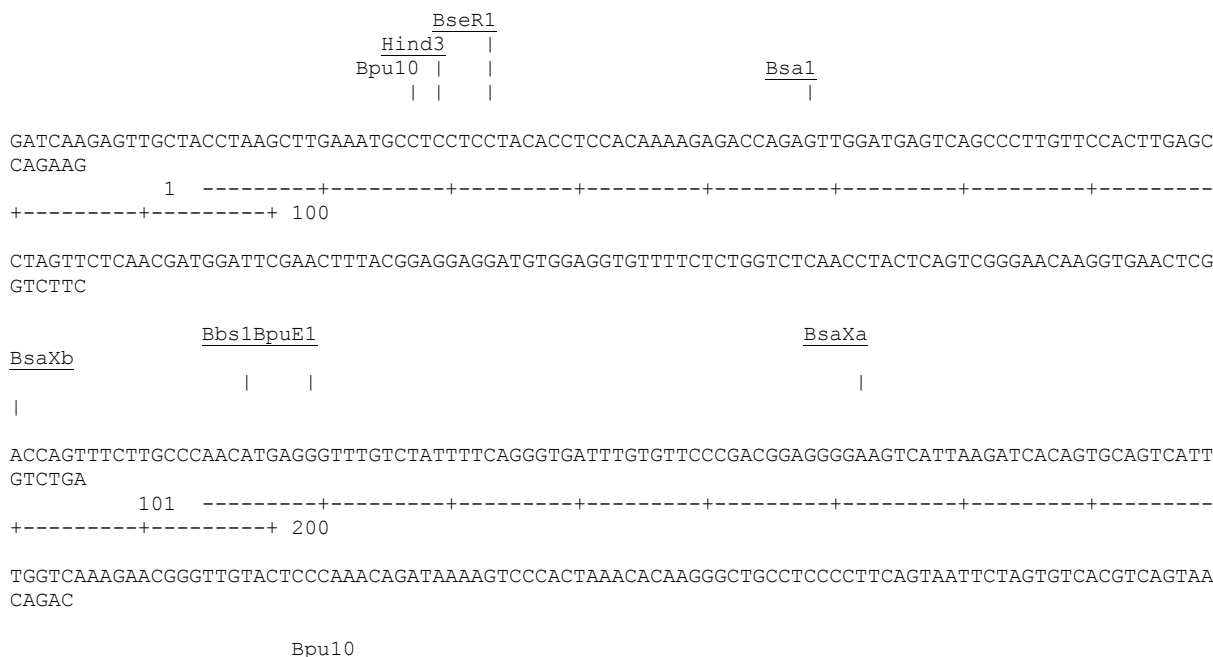
Slika 8. Predikcija hidrofobnosti (Kyte i Doolittle) posljednjeg egzona gena At4g15590. Između 38 – 51 i 250-260 nukleodita nalaze se dvije vrlo hidrofobne domene.



Slika 9. Predikcija  $\alpha$ -helikalne strukture (Chou i Fasman) posljednjeg egzona gena At4g15590.

### 3.2. Nukleotidni slijed odsječka gena At4g15590 s restrikcijom kartom

Tijekom utvrđivanja načina ugradnje odsječka gena At4g15590 koji kodira karboksiterminalni kraj proteina SWAP u odgovarajući vektor, najprije je na kalupu genomske DNA umnoženo 350 nt odgovarajućim početnicama, a koje su sadržavale pripadajuće restriksijske enzime *BamHI* i *EcoRI* za ugradnju u pRSET a vektor. Odsutnost mjesta prepoznavanja tih enzima unutar nukleotidnog slijeda odsječka gena At4g15590 potvrđena je izradom restriksijske karte pomoću programa Web Map Preferences (Slika 10).



```

      BsrB1   Dra1       Bsg1                               BbvC1
      |       |         |                                   |
AAACGTAGCAAGTTTGAAGGAGAAAATAGCTGAGGTGGTTCAAATTC AAGCAAACAACAGACGTTAAGGGGGTTAAGAGCGGTTTTAAAGGAC
AATAAT
      201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
+-----+-----+ 300
TTTGCATCGTTCAAACCTCCTCTTTTATCGACTCCACCAAGTTTAAGTTCGTTTGTGTTGCTGCAATTC CCCC AATTCTCGCCAAAATTCCTG
TTATTA

                               SpDon                               PflF1
                               |                                   BmgB1 |
                               |                                   ||
      301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
      TCCAGTGAACGAATAATGTTACACTTTCGTCCTCTATAAGATTATGACCTGCACCAGACT

```

**Slika 10.** Nukleotidni slijed odsječka gena *At4g15900* (350 pb) iz biljke *Arabidopsis thaliana* s restrikcijskom kartom, koja pokazuje odsutnost *BamHI* i *EcoRI* mjesta za prepoznavanje ([http://pga.mgh.harvard.edu/web\\_apps/web\\_map/start](http://pga.mgh.harvard.edu/web_apps/web_map/start)).

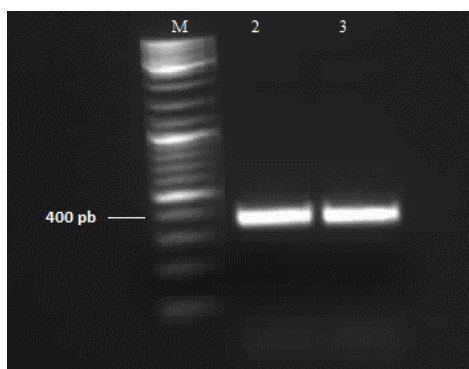
Pronađena restrikcijska mjesta (jedinствена restrikcijska mjesta su podvučena):

Bbs1   BbvC1   BmgB1   Bpu10   BpuE1   Bsa1   BsaXa   BsaXb  
BseR1   Bsg1   BsrB1   Dra1   Hind3   PflF1   SpDon



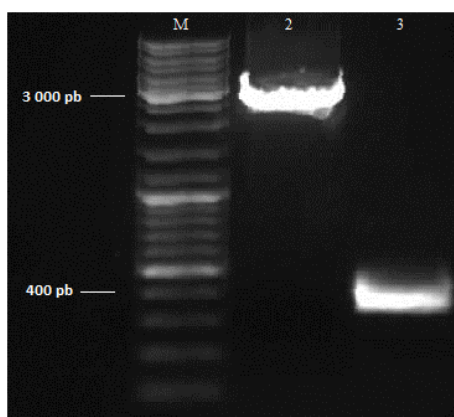
### 3.3. Konstrukcija vektora za gen At4g15590

Metodom lančane reakcije polimerazom na kalupu DNA divljeg tipa biljke *A. thaliana* umnožen je posljednji ekson gena At4g15590 (Slika 10). Slijed veličine 350 nukleotida, koji sadrži slijed PELDESALV, umnožen je odgovarajućim gen specifičnim početnicama SWAP-*BamHI* i SWAP-*EcoRI* koje sadrže slijed za ugradnju u pRSETa vektor.



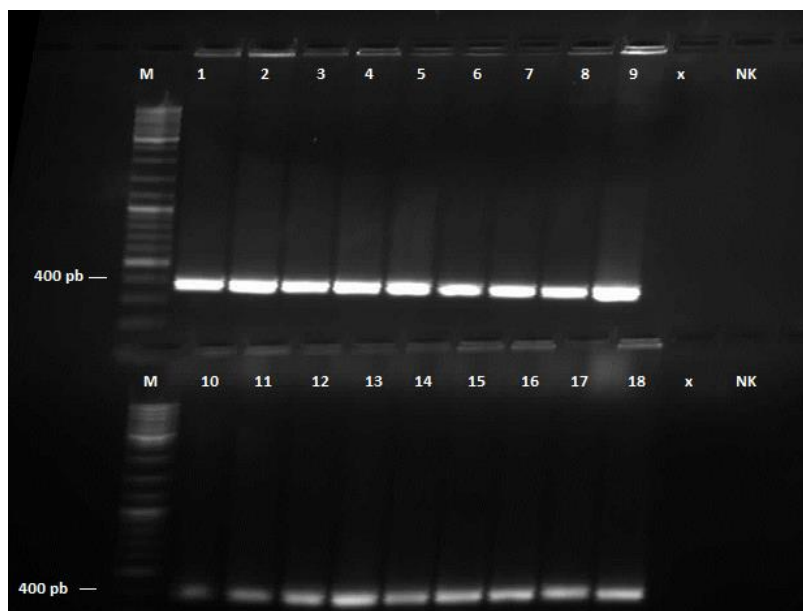
**Slika 10.** Elektroforeza PCR produkta u 1,2% agaroznom gelu. M: DNA standard, „1 kb DNA Ladder“. Vrpca u 2. i 3. jažici odgovara veličini umnoženog produkta gena At4g15590.

Zatim je provedena restrikcijska digestija plazmida (vektor pRSETa) i inserta (SWAP produkt) koristeći specifične restrikcijske enzime *EcoRI* i *BamHI* (Slika 11).



**Slika 11.** Elektroforeza PCR produkta u 1% agaroznom gelu. M: DNA standard, „1 kb DNA Ladder“. Vrpca u 2. jažici odgovara veličini umnoženog vektora pRSETa, a vrpca u jažici 3. odgovara veličini umnoženog produkta gena At4g15590.

Potom je provedena ligacija te je dobiven rekombinantni plazmid pRSETaSWAP, koji je unijet elektroporacijom u bakterijske stanice MC1061 ( $Str^{R+}$ ) u kojima je naknadno umnožen. Kako bi se potvrdilo da je ligacija bila uspješna proveden je „dirty“ PCR (Tablica 3 i 4) i elektroforeza u agaroznom gelu (Slika 12).



**Slika 12. Elektroforeza PCR produkta u 1% agaroznom gelu.** M: DNA standard, „1 kb DNA Ladder“. Vrpce u jažicama 1.-18. odgovaraju veličini umnoženog produkta gena At4g15590. x: prazna jažica, NK: negativna kontrola.

Nakon toga umnoženi rekombinantni plazmid pRSETaSWAP je pročišćen te sekvencioniran, da bi se potvrdilo da je gen pravilno orijentiran u plazmidu (Slika 13).

```

SWAP_372_nt -----
e1      ACCGGCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCA

SWAP_372_nt -----
e1      GTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCG

SWAP_372_nt -----
e1      ATTCATTAATGCAGGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCAC

SWAP_372_nt -----
e1      AACGGTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCGGG

SWAP_372_nt -----
e1      GTTCTCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGACAGCAAATGGGTC
    
```

```

SWAP_372_nt -----GATCAAGAGTTGCTACCTA
e1 GGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCGATGGGGATCCGAT-AAGAGTTGCTACCTA
      *** *****

SWAP_372_nt AGCTTGAAATGCCTCCTCCTACACCTCCACAAAAGAGACCAGAGTTGGATGAGTCAGCCC
e1 AGCTTGAAATGCCTCCTCCTACACCTCCACAAAAGAGACCAGAGTTGGATGAGTCAGCCC
      *****

SWAP_372_nt TTGTTCCACTTGAGCCAGAAGACCAGTTTCTTGCCCAACATGAGGGTTTGTCTATTTTCA
e1 TTGTTCCACTTGAGCCAGAAGACCAGTTTCTTGCCCAACATGAGGGTTTGTCTATTTTCA
      *****

SWAP_372_nt GGGTGATTTGTGTTCCTCCGACGGAGGGGAAGTCATTAAGATCACAGTGCAGTCATTGTCTG
e1 GGGTGATTTGTGTTCCTCCGACGGAGGGGAAGTCATTAAGATCACAGTGCAGTCATTGTCTG
      *****

SWAP_372_nt AAAACGTAGCAAGTTTGAAGGAGAAAATAGCTGAGGTGGTTCAAATTCAGCAAACAAAC
e1 AAAACGTAGCAAGTTTGAAGGAGAAAATAGCTGAGGTGGTTCAAATTCAGCAAACAAAC
      *****

SWAP_372_nt AGACGTTAAGGGGTTAAGAGCGGTTTTAAAGGACAATAATAGGTCACTTGCTTATTACA
e1 AGACGTTAAGGGGTTAAGAGCGGTTTT-AAAGGACAATAATAGGTCACT-GCTA--TACA
      *****

SWAP_372_nt ATGTGAAAGCAGGAGATATTCTAATACTGGACGTGGTCTGA
e1 ATGTGAAAGCAGGTAGTTTTTCTTC-----

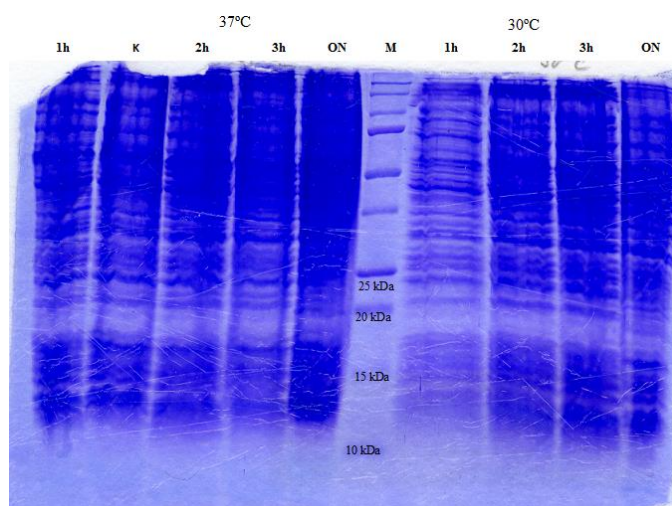
```

**Slika 13. Rezultat sekvenciranja rekombinantnog plazmida pRSETaSWAP.** SWAP protein je pravilno orijentiran u plazmidu, crvenom bojom je označena sekvenca PELDESALV. Poravnanje je napravljeno pomoću programa CLUSTAL W2 ([http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web\\_clustalw2/toolform.ebi](http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web_clustalw2/toolform.ebi)).

### 3.4. Ekspresija proteina SWAP

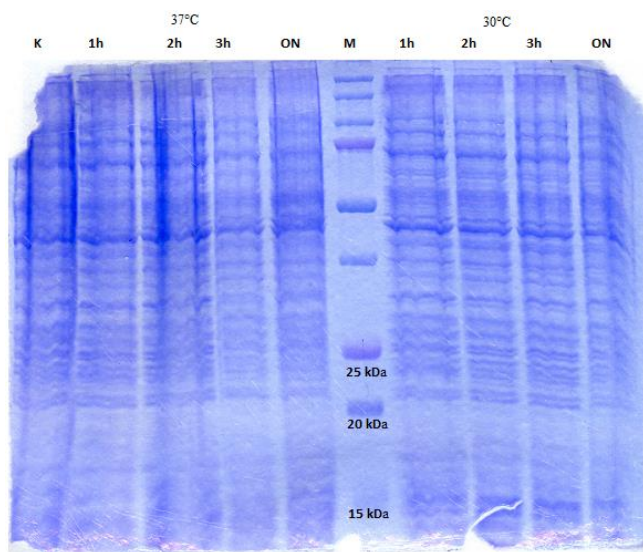
Nakon što je dobiven pročišćeni rekombinantni plazmid pRSETaSWAP, ispitivana je ekspresija proteina SWAPu različitim bakterijskim stanicama pri različitim uvjetima uzgoja i koncentracijama IPTG-a. Pretpostavljena veličina proteinskog produkta je između 16 i 18 kDa.

Ekspresija je prvo ispitana u bakterijskim stanicama BL21(DE3)plyss uz dodatak 1mM IPTG-a. Bakterijske stanice su inkubirane na temperaturama od 30°C i 37°C. Nije se dobio proteinski produkt (Slika 14).

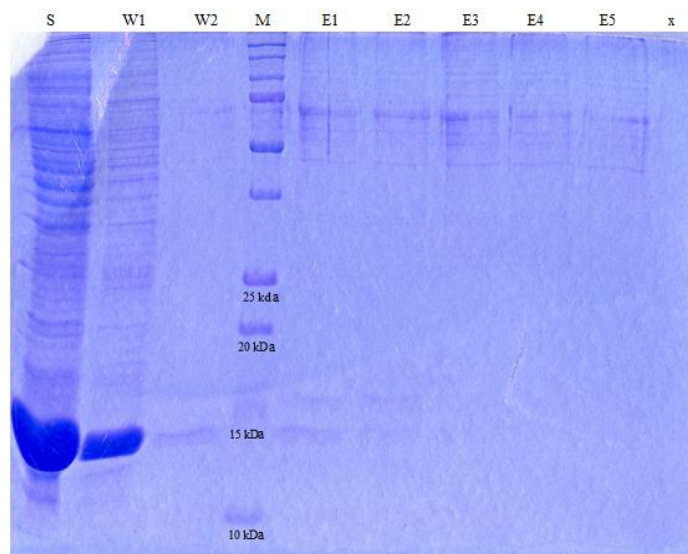


**Slika 14.** SDS-elektroforeza u poliakrilamidnom gelu. K: kontrola (non induced control), M: proteinski standard „Precision Plus“. Na lijevoj strani se nalaze uzorci koji su inkubirani na 37°C , a na desnoj strani uzorci inkubirani na 30°C.

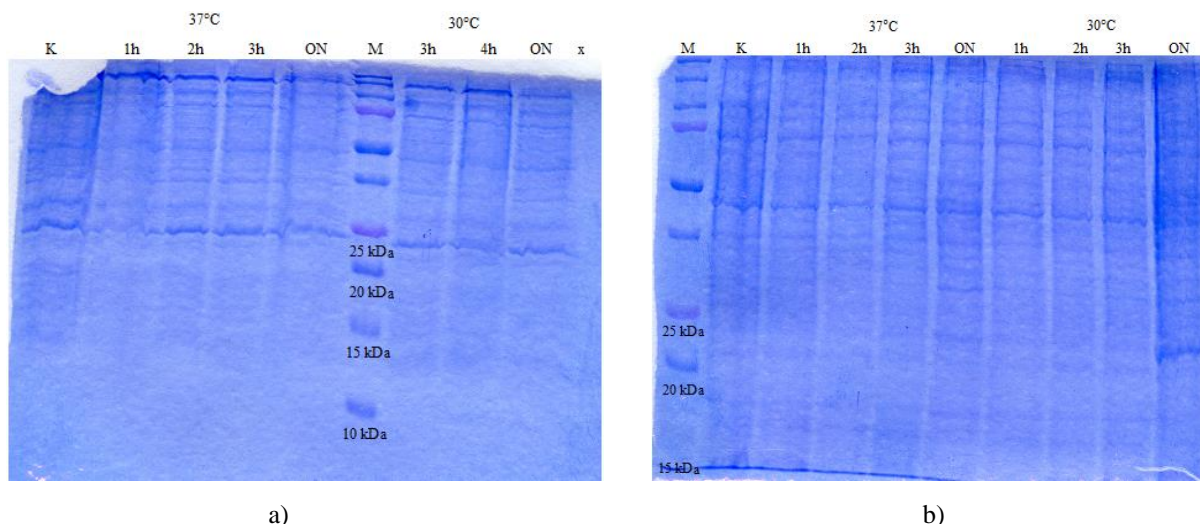
Zatim je ekspresija ispitana u bakterijskim stanicama BL21(DE3)pMICO uz dodatak 1mM IPTG-a. Bakterijske stanice su inkubirane na temperaturama od 30°C i 37°C (Slika 15). Također je napravljeno pročišćavanje proteina u nativnim uvjetima pomoću TALON kolone (Slika 16). Nije se dobio proteinski produkt te je ekspresija ponovno ispitana u istim bakterijskim stanicama, ali uz promjenu medija za uzgoj bakterija (Slika 17). Nije se dobio proteinski produkt.



**Slika 15.** SDS-elektroforeza u poliakrilamidnom gelu. K: kontrola, M: proteinski standard „Precision Plus“. Na lijevoj strani se nalaze uzorci koji su inkubirani na 37°C , a na desnoj strani uzorci inkubirani na 30°C.

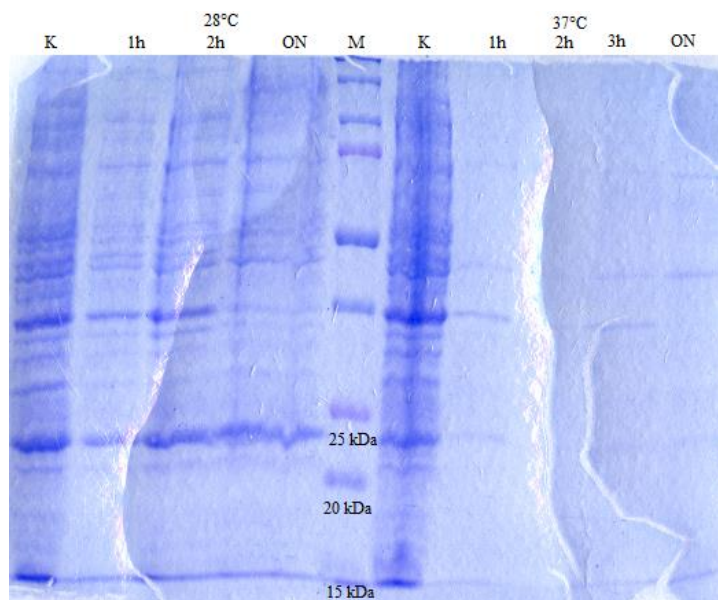


**Slika 16.** SDS-elektroforeza u poliakrilamidnom gelu. M: proteinski standard „Precision Plus“, S: supernatant, W1 i W2: ispiranje 1 i 2, E1 – E5: elucija 1-5, x: prazna jažica.



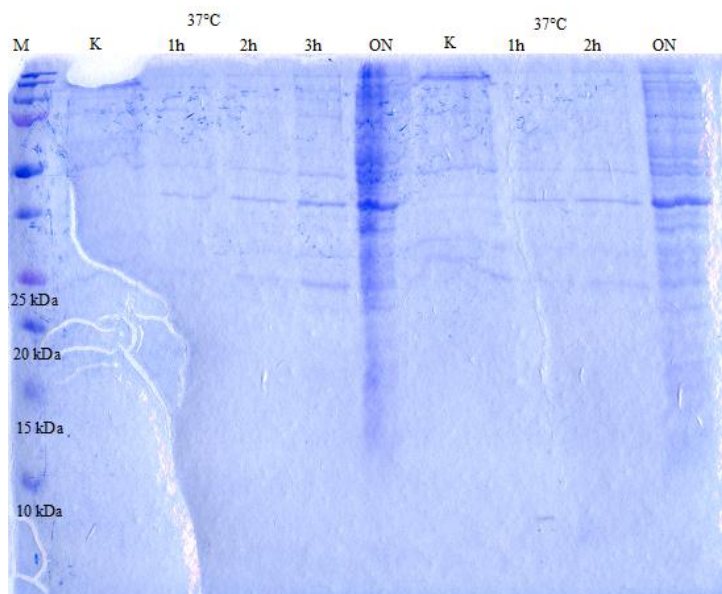
**Slika 17. SDS-elektroforeza u poliakrilamidnom gelu.** a) bakterijska kultura je uzgajana u M9 mediju, b) bakterijska kultura je uzgajana u LB mediju. K: kontrola, M: proteinski standard „Precision Plus“, x: prazna jažica. Na lijevoj strani se nalaze uzorci koji su inkubirani na 37°C , a na desnoj strani uzorci inkubirani na 30°C.

Zatim je ekspresija ispitana u bakterijskim stanicama ROSETTA(DE3)pRARE uz promjenu temperature inkubacije i koncentracije IPTG-a (Slika 18 i 19). Nije se dobio proteinski produkt.



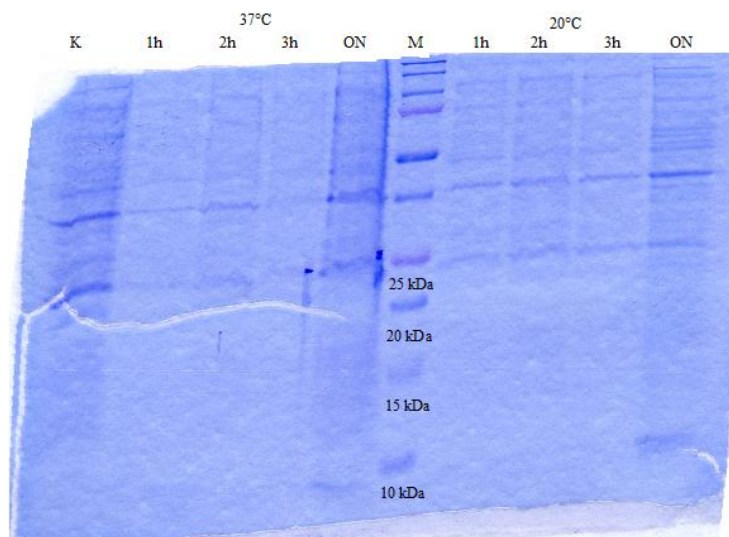
**Slika 18. SDS-elektroforeza u poliakrilamidnom gelu.** Ekspresija proteina je ispitana uz dodatak 1mM IPTG-a. K: kontrola, M: proteinski standard „Precision Plus. Na lijevoj strani se nalaze uzorci koji su inkubirani na 28°C , a na desnoj strani uzorci inkubirani na 37°C.



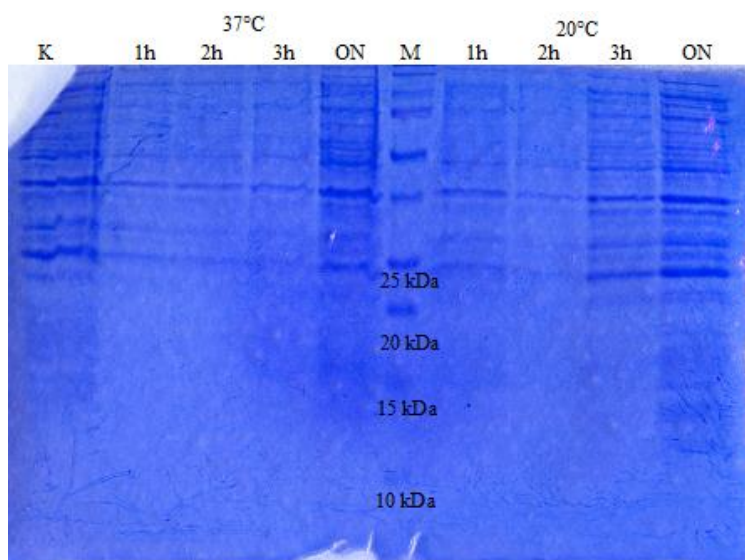


**Slika 19. SDS-elektroforeza u poliakrilamidnom gelu.** K: kontrola, M: proteinski standard „Precision Plus. Na lijevoj strani se nalaze uzorci inducirani sa 1mM IPTG-om, a na desnoj strani uzorci inducirani sa 0,75mM IPTG-om.

Posljednje bakterijske stanice u kojima je ispitana ekspresija bile su Codon Plus-RIL. Bacterije su inkubirane na temperaturama od 20°C i 37°C i različitim koncentracijama IPTG-a (Slika 20 i 21). Nije se dobio proteinski produkt.



**Slika 20. SDS-elektroforeza u poliakrilamidnom gelu.** Ekspresija proteina je ispitana uz dotatak 0,5mM IPTG-a. K: kontrola, M: proteinski standard „Precision Plus. Na lijevoj strani se nalaze uzorci koji su inkubirani na 37°C , a na desnoj strani uzorci inkubirani na 20°C.



**Slika 21. SDS-elektroforeza u poliakrilamidnom gelu.** Ekspresija proteina je ispitana uz dodatak 0,75mM IPTG. K: kontrola, M: proteinski standard „Precision Plus. Na lijevoj strani se nalaze uzorci koji su inkubirani na 37°C , a na desnoj strani uzorci inkubirani na 20°C.



**RASPRAVA**

## 4. Rasprava

### 4.1. SWAP protein

U genomu biljke *A. thaliana* L. Heynh identificiran je gen At4g15590 veličine 1677 pb. Gen je sekvencioniran i ustanovljeno je da se sastoji od 4 introna i 5 egzona te da kodira protein **s**uppressor of **w**hite **a**ppricot (SWAP). SWAP protein na svom posljednjem egzonu sadrži sekvencu PELDESALV koja pokazuje veliku homologiju sa sekvencom PELDSSALV koja je dobivena mikrosekvencioniranjem AM8 frakcije izolirane iz cytb<sub>6f</sub> kompleksa *S. oleracea*. Za SWAP protein karakteristična je prisutnost tri surp-domene na aminoterminalnom kraju, te jedna ubikvitin-domena na karboksiterminalnom kraju gena. Uloga surp-domena u proteinima nije u potpunosti poznata, ali se smatra da ima važnu ulogu u procesu pre-mRNA alternativnog prekrajanja i sastavljanja tjelešaca za prekrajanje (Nesic i Krämer, 2001). Ubikvitin-domena na svom karboksiterminalnom kraju ne sadrži diglicinski motiv koji je karakterističan za protein ubikvitin i njena funkcija, također, nije poznata.

Ovim radom započeto je istraživanje uloge SWAP proteina u biljci *A. thaliana*. Iz genoma divljeg tipa biljke *A. thaliana* metodom lančane reakcije polimerazom izoliran je posljednji egzon gena At4g15590, koji je zatim uspješno ukloniran u plazmidni vektor pRSETa. Dobiveni rekombinantni vektor pRSETaSWAP je ugrađen u bakterijske stanice u svrhu dobivanja pročišćenog sintetiziranog proteina. Na temelju predikcije hidrofobnosti (Kyte & Doolittle) i  $\alpha$ -helikalne strukture (Chou i Fasman) može se zaključiti kako je produkt transmembranski protein jer sadrži dvije vrlo hidrofobne domene koje ujedino imaju  $\alpha$ -helikalnu strukturu (Lodish i sur., 2000). Heterologna ekspresija gena ispitivana je u različitim bakterijskim stanicama, pri različitim temperaturama uzgoja i koncentracijama IPTG-a, ali se nije ekspimirao SWAP protein čak i u različitim bakterijskim stanicama. Vjerojatni razlog tome je prisutnost transmembranskih domena koje ponekad mogu imati toksični učinak na stanice *E. coli* (Sisk i sur., 1991) ili uzrokuju spontanu akumulaciju proteinskih produkata u oligometrične komplekse (Samuelson, 2011).

## 4.2. Prednosti pRSETa vektora

Visoka učinkovitost ekspresije kloniranih gena u vektoru pRSETa omogućena je prisutstvom snažnog fagnog T7 promotora. T7 polimeraza prepoznaje i veže se isključivo na T7 promotor i transkribira DNA nizvodno od promotora. Ekspresija T7 polimeraze je pod kontrolom *lac* operona. Da bi došlo do ekspresije kloniranog gena potrebno je inducirati ekspresiju polimeraze dodatkom izopropil- $\beta$ -D-galaktozida (IPTG). Za razliku od alolaktoze, IPTG se veže na *lac* represor preko atoma sumpora i tu vezu stanica nemože hidrolizirati, tako da koncentracija IPTG-a u stanici ostaje konstantna (Hansen i Sørensen, 1998). Iako je T7 polimeraza pod kontrolom *lac* operona, uvijek postoji mogućnost bazalne ekspresije i ako je klonirani gen toksičan može doći do smanjenog rasta bakterija, stanične smrti ili plazmidne nestabilnosti. Zbog toga vektor sadržava T7 lizozim koji se veže na T7 polimerazu i onemogućava bazalnu ekspresiju.

Vektor, također, sadrži niz od šest histidinskih ostataka (6xHis tag) koji se ugrađuju na aminoterminalni kraj kloniranog gena. Ovako sintetizirani proteini mogu se pročistiti u jednom koraku, uz pomoć afinitetne kromatografije na nosaču s vezanim ionima kobalta. Kompeticija između imidazola iz pufera za eluciju i imidazolnog prstena histidinskih ostataka proteina za ione kobalta omogućuje odvajanje rekombinantnog proteina od afinitetnog nosača. Na taj način rekombinanti proteini mogu biti učinkovito pročišćeni (Vugrek, 2007).

**ZAKLJUČAK**

## 5. Zaključak

S obzirom na rezultate dobivene u ovom radu došao sam do sljedećih zaključaka:

- Nukleotidni slijed DNA gena At4g15590 veličine 350 pb dobro se umnožava lančanom reakcijom polimeraze.
- Nukleotidni slijed DNA gena At4g15590 uspješno ugrađen u plazmidni vektor pRSETa.

Vjerojatni razlog nemogućnosti sinteze željenog proteina je prisutstvo dvije vrlo hidrofobne transmembranske domene između 38 – 51 i 250-260 nukleotida. Iz toga zaključujem da bi došlo do uspješne ekspresije proteina potrebno je ukloniti hidrofobne domene.

**LITERATURA**

---

## 6. Literatura

**Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.** (2002): *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing, Inc., New York

**Babour, A., Dargemont, C., Stutz, F.** (2012): Ubiquitin and assembly of export competent mRNP. *Biochim Biophys Acta*. 1819:521-30

**Bonet, R., Ramirez-Espain, X., Macias, M.J.** (2008): Solution structure of the yeast URN1 splicing factor FF domain: comparative analysis of charge distributions in FF domain structures-FFs and SURPs, two domains with a similar fold. *Proteins*. 73:1001-9

**Cooper, G.M., Hausman, R.E.** (2004): *The Cell: A Molecular Approach*, Medicinska Naklada, Zagreb, 2004

**Eberhard, S., Finazzi, G., Wollman, F. A.** (2008): The dynamics of Photosynthesis. *Annu. Rev. Genet* 42:463–515

**Jurica, M.S., Moore, M.J.** (2003): Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Mol Cell*. 12:5-14

**Kercher, M.A., Lu, P., Lewis, M.** (2002): *Lac* repressor—operator complex. *Current Opinion in Structural Biology* 7:76–85

**Kuo, J.T., Chang, Y.J., Tseng, C.P.** (2003): Growth rate regulation of *lac* operon expression in *Escherichia coli* is cyclic AMP dependent. *FEBS Letters* 553:397-402

**Kuwasako, K., He, F., Inoue M., Tanaka, A., Sugano, S., Güntert, P., Muto, Y., Yokoyama, S.** (2006): Solution structures of the SURP domains and the subunit-assembly mechanism within the splicing factor SF3a complex in 17S U2 snRNP. *Structure* 14:1677–1689

**Marbach, A., Bettenbrock, K.** (2011): *lac* operon induction in *Escherichia coli*: Systematic comparison of IPTG and TMG induction and influence of the transacetylase LacA. *Journal of Biotechnology* 157:82–88

**Mayer, J.R., Landon, M., Layfield, R.** (1998): Ubiquitin superfolds: intrinsic and attachable regulators of cellular activities? *Folding and Design* 3:R97–R99

**Nelson, N., Yocum, C. F.** (2006): Structure and Function of Photosystems I and II. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:521–65

**Pevalek-Kozlina B.** (2003): *Fiziologija bilja, Profil*, Zagreb

**Roderick, S.L.** (2009): The *lac* operon galactoside acetyltransferase. *Comptes Rendus Biologies* 328:568-575

**Schoepfer, R.** (1993): The pRSET family of T7 promoter expression vectors for *Escherichia coli*. *Gene* 124:183–85

**Spikes, D.A., Kramer, J., Bingham, P.M., Van Doren, K.** (1994): SWAP pre-mRNA splicing regulators are a novel, ancient protein family sharing a highly conserved sequence motif with the prp21 family of constitutive splicing proteins. *Nucleic Acids Res.* 22:4510-9

**Strieter E.R., Korasick D.A.** (2012): Unraveling the complexity of ubiquitin signaling. *ACS Chem Biol.* 7:52-63

**Vugrek, O.** (2007): Afinitetna kromatografija na nosaču s imobiliziranim metalom (IMAC), Institut Ruder Bošković, Zagreb

**Wang, G.X., Olsen, L.R., Roderick, S.L.** (2002): Structure of the *lac* Operon Galactoside Acetyltransferase. *Structure* 10:581–588