

Karakterizacija uloge proteina IggC u adheziji stanica kod amebe *Dictyostelium discoideum*

Mimica, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:105957>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 29. rujna, 2023.

Lucija Mimica

KARAKTERIZACIJA ULOGE
PROTEINA IqgC U ADHEZIJI
STANICA KOD AMEBE
Dictyostelium discoideum

Rad je izrađen pod mentorstvom prof. dr. sc. Igora Slivca (Prehrambeno-biotehnološki fakultet), u Laboratoriju za staničnu dinamiku Instituta Ruđer Bošković pod komentorstvom prof. dr. sc. Igora Webera te uz pomoć dr. sc. Lucije Mijanović.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za molekularnu biologiju, Institut Ruđer Bošković
Laboratorij za staničnu dinamiku

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

Karakterizacija uloge proteina IqgC u adheziji stanica kod amebe *Dictyostelium discoideum*

Lucija Mimica, univ. bacc. ing. biotechn. 0058205448

Sažetak:

Protein IqgC sličan je proteinima IQGAP, a ima svojstva i RasGAP proteina. Prethodno istraživanje je pokazalo da protein IqgC regulira fagocitozu i makropinocitozu deaktivacijom male GTPaze RasG. Cilj ovog rada bio je otkriti ima li protein IqgC ulogu u staničnoj adheziji i ostvaruje li interakciju s malom GTPazom RapA, koja ima ulogu u regulaciji stanične adhezije. Metodama *pull-down* i koimunoprecipitacije potvrđena je interakcija proteina IqgC s proteinom RapA divljeg tipa, konstitutivno negativnim mutantom S19N i konstitutivno aktivnom formom Q65E. Testom pojedinačnih stanica, u kojem su korištene stanice deficijentne za protein IqgC (*iqgC*), utvrđeno je da protein IqgC sudjeluje u adheziji osjetljivoj na EDTA.

Ključne riječi: *adhezija, Dictyostelium discoideum, IqgC, RapA, RasGAP*

Rad sadrži: 60 stranica, 15 slika, 5 tablica, 74 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Igor Slivac

Komentor: prof. dr. sc. Igor Weber, *znan. savj. tr. zv.*, IRB

Pomoć pri izradi: dr. sc. Lucija Mijanović

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Kristina Radošević (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Igor Slivac (mentor)
3. prof. dr. sc. Igor Weber, *znan. savj. tr. zv.*, IRB (član)
4. izv. prof. dr. sc. Igor Stuparević (zamjenski član)

Datum obrane: 29. rujna 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Molecular Biology, Ruder Bošković Institute
Laboratory of cell dynamics

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Molecular Biotechnology

A role of IqgC protein in cell adhesion in *Dictyostelium discoideum* amoeba

Lucija Mimica, univ. bacc. ing. biotechn. 0058205448

Abstract:

IqgC protein shares properties of both IQGAP and RasGAP proteins. It is already known that IqgC is involved in the regulation of macropinocytosis and phagocytosis by deactivating a small GTPase protein RasG. The goals of this paper were to investigate the potential role of IqgC in the regulation of cell adhesion and interaction with the small GTPase RapA. Interaction of the IqgC with wild type, constitutively inactive mutant (S19N) and constitutively active form (Q65E) of RapA was confirmed by using pull-down assay and coimmunoprecipitation assays. The results of the single-cell adhesion assay also implicate IqgC in the regulation of the EDTA-sensitive cell adhesion.

Keywords: *adhesion, Dictyostelium discoideum, IqgC, RapA, RasGAP*

Thesis contains: 60 pages, 15 figures, 5 tables, 74 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in: The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Igor Slivac, PhD, Full professor

Co-mentor: Igor Weber, PhD, *Scientific Adviser with tenure*, IRB

Technical support and assistance: *Lucija Mijanović*, PhD

Reviewers:

1. Kristina Radošević, PhD, Associate professor (president)
2. Igor Slivac, PhD, Full professor (mentor)
3. Igor Weber, PhD, *Scientific Adviser with tenure*, IRB (member)
4. Igor Stuparević, PhD, Associate professor (substitute)

Thesis defended: September 29th, 2023.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	3
2.1. Male GTPaze superobitelji Ras	3
2.1.1. Klasifikacija i uloge malih GTPaza	3
2.1.2. Građa malih GTPaza	4
2.1.3. Regulacija malih GTPaza	5
2.1.3.1. Proteini aktivatori GTPaza	6
2.1.4. GTPaza Rap1	6
2.2. Proteini IQGAP.....	8
2.3. Stanična adhezija	9
2.3.1. Molekule stanične adhezije	10
2.4. Modelni organizam <i>Dictyostelium discoideum</i>	11
2.4.1. Taksonomija	12
2.4.2. Životni ciklus i stanište.....	12
2.4.3. Genom amebe <i>Dictyostelium discoideum</i>	14
2.4.4. Male GTPaze i protein RapA u amebi <i>Dictyostelium discoideum</i>	14
2.4.5. Proteini srodni proteinima IQGAP u amebi <i>Dictyostelium discoideum</i>	15
2.4.6. Adhezija kod protista <i>Dictyostelium discoideum</i>	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	18
3.1. Materijali	18
3.1.1. Materijali korišteni za uzgoj stanica <i>Dictyostelium discoideum</i>	18
3.1.2. Materijali korišteni za uzgoj bakterijskih stanica <i>Escherichia coli</i>	18
3.1.3. Početnice	20
3.1.4. Plazmidi	20
3.1.5. Materijali korišteni za tehnike rekombinantne DNA	22
3.1.6. Materijali korišteni za proteinsku biokemiju	23
3.2. Metode.....	26
3.2.1. Manipulacija staničnom kulturom <i>Dictyostelium discoideum</i>	26
3.2.1.1. Transfekcija stanica	27
3.2.1.2. Brojanje stanica u hemocitometru	27
3.2.2. Manipulacija bakterijskom kulturom <i>E.coli</i>	28
3.2.2.1. Transformacija elektroporacijom	28
3.2.2.2. Transformacija kemijski kompetentnih stanica	28

3.2.3. Tehnike rekombinantne DNA.....	29
3.2.3.3. Lančana reakcija polimerazom	29
3.2.3.3.1. PCR na bakterijskom kolonijama (engl. <i>colony PCR</i>)	30
3.2.3.2. Izolacija plazmidne DNA iz <i>E.coli</i>	30
3.2.3.3. DNA elektroforeza na agaroznom gelu	31
3.2.3.4. Konstruiranje vektora za biokemijske metode.....	32
3.2.4. Metode proteinske biokemije.....	33
3.2.4.1. Testiranje proteinskih interakcija metodom GST-pull down	33
3.2.4.2. Testiranje proteinskih interakcija metodom koimunoprecipitacije	34
3.2.4.3. Natrij-dodecil-sulfat – poliakrilamid gel elektroforeza (SDS-PAGE)	36
3.2.4.4. Prijenos proteina na membranu i njihova imunodetekcija metodom Western blot	37
3.2.5. Test međustanične adhezije (engl. <i>cell-cell adhesion</i>).....	38
3.2.5.1. Mjerenje međustanične adhezije	38
3.2.5.2. Mjerenje stanične adhezivnosti testom pojedinačnih stanica (engl. <i>single-cell assay</i>).....	39
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	41
4.1. Protein IqgC vjerojatno sudjeluje u regulaciji adhezije stanica.....	42
4.2. Protein IqgC ostvaruje interakciju s proteinom RapA	47
4.2.1. Rekombinantni protein IqgC veže protein RapA iz staničnog lizata	47
4.2.2. Endogeni protein IqgC veže protein RapA iz staničnog lizata	49
5. ZAKLJUČCI	52
6. LITERATURA	53

1. UVOD

Protist *Dictyostelium discoideum* je ameba koja se koristi kao modelni organizam u različitim istraživanjima. Zbog životnog ciklusa tijekom kojeg se izmjenjuju jednostanični i višestanični stadij, pogodna je za istraživanje stanične adhezije. Adhezija stanica važan je proces za razvoj i održavanje tkiva te ima ulogu u komunikaciji stanica, kao i u regulaciji diferencijacije stanica, migracije stanica, staničnog ciklusa i preživljavanja (Huang i Ingber, 1999). Promjene u staničnoj adheziji mogu utjecati na razvoj različitih bolesti, a narušavanje stanične adhezije dovodi do rasta tumorskih stanica i posljedično do uništavanja strukture tkiva, zbog čega je od iznimne važnosti detaljno istražiti molekule koje sudjeluju u procesu adhezije i regulaciji iste (Hirohashi i Kanai, 2003). Proteini koji se nalaze na površini stanica i posreduju u vezanju stanica nazivaju se molekulama stanične adhezije.

Protist *D. discoideum* ne sadrži integrine koji posreduju u adheziji stanica za izvanstanični matriks u višestaničnim životinjama, zbog čega je važno odrediti koji proteini sudjeluju u adheziji stanica na podlogu. U višestaničnom ciklusu *D. discoideum* do izražaja dolazi međustanična adhezija, gdje su eksprimirani specifični kontaktni proteini koji sudjeluju u dvjema vrstama međustanične adhezije, ovisno o osjetljivosti na EDTA (etilendiamin tetraoctena kiselina) (Gerisch, 1980). Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se ustanovilo koji dodatni proteini sudjeluju u regulaciji adhezije stanica i razjasnio točan mehanizam djelovanja istih.

S obzirom na to da je poznato da proteini IQGAP (engl. *IQ motif containing GTPase Activating Protein*) sudjeluju u regulaciji različitih procesa u stanici kao što su adhezija, prijenos signala, gibanje stanica, egzocitoza i citokineza (Shannon, 2012), odlučeno je da se u ovom istraživanju objasni uloga proteina IqgC u adheziji stanica. Protein IqgC srodan je humanim proteinima IQGAP, a *D. discoideum* posjeduje četiri IQGAP-slična proteina. Već je potvrđena uloga proteina IqgC kao negativnog regulatora makropinocitoze i fagocitoze, a uključen je i u kontrolu polarnosti stanice tijekom kemotaksije prema cAMP-u (ciklički adenzin monofosfat) (Marinović i sur., 2019; Lee i sur., 2010). Također, veže malu GTPazu RasG. Protein IqgC sadrži evolucijski očuvane ostatke arginina unutar specifične regije ključne za stimulaciju GTPazne aktivnosti proteina Ras, odnosno RasGAP katalitičku aktivnost. Upravo je promjena tih motiva dovela je do gubitka aktivnosti RasGAP proteina IQGAP u sisavaca (Kurella i sur., 2009). S obzirom na to da je već potvrđena interakcija proteina IqgC s proteinom RasG, cilj je bio istražiti stvara li protein IqgC interakciju s još jednom malom GTPazom, proteinom RapA. GTPaza RapA pripada proteinima superobitelji Ras, koji se

nazivaju molekularnim prekidačima jer kruže između GTP i GDP vezanog oblika. Kad vežu molekulu GTP-a, aktivni su te mogu prenositi signal nizvodno. Poznato je da protein RapA sudjeluje u regulaciji nekoliko signalnih puteva koji su uključeni u migraciju stanica, odgovor na osmotski stres, fagocitozu, a ima i funkciju regulacije reorganizacije citoskeleta tijekom migracije stanica. Također sudjeluje u regulaciji adhezije stanica za podlogu te međustanične adhezije (Park i sur., 2018), što ga čini dobrim kandidatom za ovo istraživanje.

Cilj ovog rada bio je istražiti sudjeluje li protein IqgC u regulaciji adhezije stanica korištenjem testa adhezije pojedinačnih stanica. Ukoliko sudjeluje u adheziji stanica, zanimalo nas je ima li ulogu u adheziji osjetljivoj na EDTA ili u adheziji rezistentnoj na EDTA. Također, cilj je bio istražiti ostvaruje li protein IqgC interakciju s proteinom RapA. Korišten je test *pull-down* kako bi se utvrdilo veže li rekombinantni protein IqgC protein RapA iz staničnog lizata. Metoda koimunoprecipitacije korištena je kako bi se istražilo veže li endogeni protein IqgC protein RapA iz staničnog lizata. Za potrebe istraživanja interakcija, korišten je protein RapA divljeg tipa (wt) i dva mutanta, S19N i Q65E. S19N je konstitutivno negativni mutant u kojem serin na poziciji 19 zamijenjen asparaginom, što smanjuje afinitet proteina za gvanin-nukleotide, a time i za GTP, zbog čega se ovaj protein nalazi u dominantno neaktivnom, GDP-vezanom obliku. Q65E je konstitutivno aktivna forma proteina RapA kod kojeg se umjesto glutamina na poziciji 65 nalazi glutamat, čime se povećava afinitet proteina za vezanje GTP-a (dictybase.org).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. MALE GTPAZE SUPEROBITELJI RAS

Male GTPaze su klasa proteina koji se nazivaju molekularnim prekidačima. Ti proteini vežu gvanozin-trifosfat (GTP), što ih aktivira, te su tad sposobni prenositi signal na nizvodne efektorske molekule, a hidrolizom GTP-a u gvanozin-difosfat (GDP) se deaktiviraju (Scheffzek i Ahmadian, 2005). Male GTPaze se još nazivaju i mali G proteini, eksprimiraju se u svim eukariotskim stanicama i sudjeluju u gotovo svim staničnim procesima (Bourne i sur., 1990). Superobitelj Ras broji više od 150 malih G proteina kod ljudi, a očuvani ortolozi nalaze se i u drugim modelnim organizmima kao što su *Dictyostelium discoideum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana* i *Cernohabditis elegans* (Johnson i Chen, 2012).

2.1.1. Klasifikacija i uloge malih GTPaza

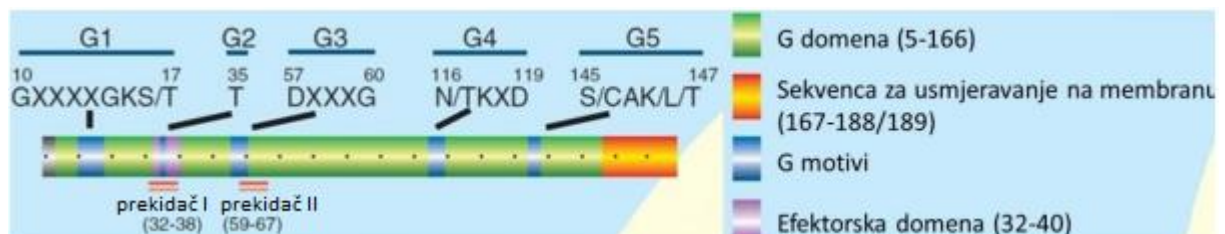
Mali G proteini se prema slijedu, strukturi i funkciji dijele na pet obitelji: Ras, Rho, Rab, Arf i Ran (Kahn i sur., 1992). Ovi proteini imaju razne uloge u stanici, na primjer, proteini obitelji Ras i Rho sudjeluju ekspresiji gena, proteini obitelji Rho koordiniraju reorganizaciju citoskeleta, obitelji Rab i Arf utječu na transport vezikula, a protein Ran regulira transport molekula u jezgu i stanični ciklus (Paduch i sur., 2001).

Proteini obitelji Ras prvi su otkriveni proteini ove superobitelji, stoga se cijela skupina naziva Ras superobitelj. Obitelj Ras je i najraznovrsnija obitelj malih GTPaza i posreduje u odgovorima na različite izvanstanične podražaje te regulira staničnu proliferaciju, diferencijaciju, morfologiju i apoptozu. Obitelj proteina Ras prisutna je u svim eukariotskim organizmima, uključujući kralježnjake, beskralježnjake i kvasce (Goitre i sur., 2014). Geni *ras* prvo su identificirani kao onkogeni, a ime su dobili po tome što uzrokuju sarkome kod štakora (engl. *rat sarcoma gene*) (Cox i Der, 2010). Prema evolucijskoj očuvanosti u strukturi, funkciji i biokemiji, Ras obitelj se sastoji od 36 članova među 6 podobitelji, Ras, Ral, Rap, Rad, Rheb i Rit (Goitre i sur., 2014). Osim regulacije različitih procesa u stanici, ova obitelj ima i važnu ulogu u patološkim procesima. Tako su signalni putevi kontrolirani proteinima Ras najčešće deregulirani putevi u ljudskim tumorima, a mutacije u genima *ras* se pojavljuju u oko 30 % malignih tumora (Maertens i Cichowski, 2014). Izoforme proteina Ras, od kojih su najbolje istražene H-, K- i N-Ras, razlikuju se gotovo isključivo u C-terminalnim domenama koje su odgovorne za lokalizaciju proteina na membranu, vezanje lipida i biološku aktivnost (Cox i Der, 2010).

Obitelj Rho broji više od 20 članova od kojih su najistaknutiji proteini Rac1, RhoA i Cdc42, a sudjeluju u moduliranju dinamike aktinskog citoskeleta, polarnosti i staničnoj mobilnosti (Sahai i Marshall, 2002). Najveća obitelj u skupini malih GTPaza je obitelj Rab, koja se sastoji od oko 70 proteina Rab uključenih u promet vezikula i transport proteina preko regulacije vezikularnog transporta i aktivnosti sustava mikrotubula (Wandinger-Ness i Zerial, 2014). Slično proteinima Rab, proteini obitelji Arf sudjeluju u regulaciji biosinteze transportnih vezikula u stanicama (Wennerberg i sur., 2005). GTPaza Ran može modulirati nastanak staničnog vretena, napredovanje staničnog ciklusa, transport proteina između jezgre i citoplazme, nuklearni izvoz RNA, sintezu i procesiranje RNA te mnoge druge procese (Kim i sur., 2001).

2.1.2. Građa malih GTPaza

Svi proteini ove superobitelji sadrže GTP-vezujuću domenu veličine od oko 20 kDa, koja se naziva i G-domena. G-domena se sastoji od pet α uzvojnica (A1–A5), šest β -ploča (B1–B6) i pet polipeptidnih omči (G1–G5). Najočuvaniji elementi G-domene su omče. Dvije funkcionalne regije, prekidač I i prekidač II, okružuju γ - fosfatnu skupinu vezanog GTP-a. Prekidač I nalazi se unutar omče G2 koja se naziva efektorskom omčom jer je to mjesto vezanja efektora i proteina GAP (engl. *GTPase-activating proteins*, GAPs). Prekidač II se djelomično preklapa s omčom G3 i dio uzvojnice A2 i to je strukturno najfleksibilniji element katalitičke domene (Paduch i sur., 2001). Vezanje i hidroliza GTP-a uzrokuje značajne konformacijske promjene u regijama prekidač I i II katalitičke domene G proteina koje se mogu vidjeti na slici 1. Domenu G čine evolucijski očuvane regije GDP/GTP-vezujućih motiva: G1, HXXXXGKS/T; G2, T; G3, DXXXG; G4, N/TKXD; G5, S/CAK/L/T, koje kreću s N-terminalnog kraja. Na C-terminalnom kraju nalazi se sekvenca za usmjeravanje na membranu koja je odgovorna za interakcije s različitim membranskim odjeljcima, a uključuje i motiv CAAX.



Slika 1. Funkcionalne domene proteina Ras. (prema Wennerberg i sur., 2005).

Uspoređujući strukturu različitih GTPaza, pokazano je da su najočuvanije omče omča G1,

zadužena za vezanje α - i β -fosfatnih skupina gvanozin-nukleotida te omča G4, koja sadrži ostatke lizina i aspartata koji direktno sudjeluju u interakciji s nukleotidom. Omče G3 i G2 razlikuju se među različitim skupinama proteina. Omča G3 sadrži aminokiselinske ostatke potrebne za vezanje iona Mg^{2+} i γ -fosfata, dok omča G2 veže ione Mg^{2+} koji je važan za pravilno GTP/GDP vezanje jer koordinira atome kisika β - i γ -fosfatnih grupa. Dio omče G5 ima ulogu mjesta za prepoznavanje gvaninske baze. Mogućnost vezanja različitih proteina ove superobitelji na široki raspon efektora, moguća je zahvaljujući konformacijskim razlikama omči (Paduch i sur., 2001).

Izoforme proteina Ras najčešće se razlikuju u varijabilnim C-terminalnim domenama koje su odgovorne za membransku lokalizaciju proteina, vezanje lipida i biološku aktivnost (Cox i Der, 2010). Na C-terminalnom kraju većine proteina nalazi se motiv CAAX (C=cistein, A=alifatska aminokiselina, X=bilo koja aminokiselina). Taj motiv prolazi posttranslacijske modifikacije, kovalentno vezanje izoprenoida na cisteinski ostatak unutar motiva CAAX, koje kataliziraju enzimi farnezil-transferaza ili geranilgeranil-transferaza I (Wennerberg i sur., 2005). Osim ove modifikacije, za lokalizaciju proteina na staničnu membranu važna je i palmitoilacija cisteina za koju je odgovorna hipervarijabilna domena koja se nalazi uzvodno od motiva CAAX. Ukoliko je prisutna mutacija na cisteinskom ostatku unutar motiva CAAX, farnezilacija neće biti moguća, a protein Ras ostaje topljiv u citosolu, dok se farnezilirani protein, koji nije aciliran, lokalizira na endomembrane (Choy i sur., 1999).

2.1.3. Regulacija malih GTPaza

Proteini male GTPaze vežu gvanin-nukleotide visokim afinitetom te hidroliziraju vezani GTP u GDP i anorganski fosfat. S obzirom na to da je proces aktivacije i deaktivacije malih GTPaza spore kinetike, postoji nekoliko različitih skupina proteina koje reguliraju aktivnost malih GTPaza. U izmjeni vezanog GDP-a za GTP sudjeluju proteini GEF (engl. *guanine nucleotide exchange factors*) i na taj način aktiviraju GTPaze. Vežu se na male GTPaze u GDP-vezanom obliku i uzrokuju disocijaciju GDP-a. U tom prijelaznom stanju bez vezanog nukleotida, formira se stabilan kompleks s GEF-om, koji omogućuje vezanje GTP-a na mjesto vezanja nukleotida, s obzirom na to da je u većini stanica koncentracija GTP-a 10 do 50 puta veća od koncentracije GDP-a. Posljedično, vezanje GTP-a omogućuje disocijaciju GEF-a. (Hennig i sur., 2015). U ovom obliku, kada je GTP vezan na GTPazu, protein je sposoban za interakciju s efektorskim molekulama. S obzirom na to da je brzina intrinzične hidrolize GTP-a od strane male GTPaze jako spora ($k_{cat} \approx 2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$), ovaj korak reguliraju proteini aktivatori malih GTPaza, proteini GAP (engl. *GTPase-activating proteins*, GAPs). Ovi proteini sudjeluju

u hidrolizi GTP-a u GDP na način da stimuliraju, odnosno ubrzavaju GTPaznu aktivnost do 10^5 puta i tako deaktiviraju protein nakon prijenosa signala nizvodno. Obitelji Rho i Rab GTPaza regulirane su i proteinima GDI (engl. *guanine nucleotide dissociation inhibitors*), koji sekvestriraju neaktivne GTPaze u citosolu (Wennerberg i sur., 2005).

2.1.3.1. Proteini aktivatori GTPaza

Proteini GAP, odnosno proteini aktivatori GTPaza, su veliki proteini koji interakcijom s malim GTPazama ubrzavaju njihovu intrinzičnu GTPaznu aktivnost i na taj način negativno reguliraju biološku aktivnost proteina Ras. S obzirom na to da postoji velik broj malih GTPaza, proteini GAP su također raznoliki, kako bi omogućili specifičnost regulacije. Među njima se razlikuje nekoliko obitelji proteina GAP koje su različito specifične za male GTPaze, a nisu ni strukturno povezane. Proteini RasGAP i RapGAP djeluju na obitelj Ras, dok proteini RhoGAP, RanGAP i RabGAP imaju djelovanje na specifične obitelji (Bos i sur., 2007). Proteini RasGAP različite su veličine, od 100 do 300 kDa. Pokazuju modularnu građu, gdje im je katalitička domena RasGAP zajednička, dok se funkcionalne domene razlikuju i zadužene su za interakciju s proteinima ili lipidima te na taj način služe kao signali za lokalizaciju i kao kosturi za nastanak proteinskih kompleksa (Scheffzek i Shivalingaiah, 2019).

Argininski ostatak, nazvan argininski prst (engl. *arginine finger*), na poziciji 789 humanog proteina RasGAP p120GAP/RASA1, stabilizira evolucijski očuvani glutamin na poziciji 61 proteina Ras, koji omogućuje koordinaciju molekule vode koja vrši nukleofilni napad na γ -fosfat GTP-a (Scheffzek i sur., 1997). Iako su proteini Rap bliski homologni proteina Ras, mehanizam stimulacije GTPazne aktivnosti razlikuje se između proteina RasGAP i proteina RapGAP. Umjesto argininskog prsta, katalitička domena proteina RapGAP sadrži asparaginski ostatak, takozvani asparaginski „palac“ (engl. *thumb*), čija je uloga da zamijeni očuvani glutamin na poziciji 61 koji strukturno odgovara nekatalitičkom treoninu (Thr61) kod proteina Rap (Daumke i sur., 2004).

2.1.4. GTPaza Rap1

Proteini Rap (engl. *Ras-associated protein*) su oko 50 % homologni proteinima Ras, te imaju identičnu aminokiselinsku sekvencu u efektorskim omčama. Podobitelj Rap sastoji se od pet proteina, Rap1 (A i B) te Rap2 (A, B i C) (Johnson i Chen, 2012). Protein Rap1 pojavljuje se u dvije izoforme, Rap1A i Rap1B, koje su 95 % identične te je njihova aktivnost kontrolirana prisutnošću vezanog GTP-a (Jaśkiewicz i sur., 2018). Protein Rap1 mala je GTPaza koja

kontrolira različite procese, kao što su stanična adhezija, formiranje međustaničnog spoja i polaritet stanice. Protein Rap1 ima dominantnu ulogu u kontroli interakcija stanica-stanica i stanica-matriks reguliranjem funkcije integrina i drugih adhezijskih molekula u različitim tipovima stanica (Boettner i Van Aelst, 2009).

Protein Rap1 je topljivi citosolni protein koji prolazi posttranslacijsku modifikaciju izoprenilacije kako bi se mogao vezati na odgovarajuće lipidne membrane. Ovisno o tipu stanice, protein Rap1 se može aktivirati na više načina, na primjer stimulacijom receptora povezanih s proteinima G (engl. *G protein-coupled receptors*, GPCRs) ili receptora povezanih s tirozin kinazama. Različite posttranslacijske modifikacije, koje uključuju i fosforilaciju ove GTPaze, vode do različite aktivnosti proteina Rap1 i aktivacije različitih signalnih puteva. Tako protein Rap1 kontrolira stanični rast i diferencijaciju preko PKA (engl. *protein kinase A*) i signalnog puta MAPK (engl. *mitogen-activated protein kinase*), a fosforilacija je potrebna i za lokalizaciju proteina Rap1 na membranu i migraciju stanica (Jaškiewicz i sur., 2018). Također, postoje i najmanje tri različita sekundarna glasnika uključena u aktivaciju proteina Rap1: ciklički adenosin monofosfat (engl. *cyclic adenosine monophosphat*, cAMP), kalcijevi ioni Ca^{2+} i diacilglicerol (engl. *diacylglycerol*, DAG) (De Rooij, 1998).

Protein Rap1 važan je regulator stanične adhezije i kretanja stanica. Zanimljivo je da protein Rap1 sudjeluje u međustaničnoj adheziji posredovanoj kadherinima i u adheziji stanica za izvanstanični matriks koja je posredovana integrinima (Jaškiewicz i sur., 2018). Protein Rap1 regulira podjedinice integrina $\beta 1$, $\beta 2$ i $\beta 3$ i tako utječe na afinitet i grupiranje integrina. Jedan od proteina efektor proteina Rap1 je i protein RIAM (engl. *Rap1-GTP-interacting adaptor molecule*), koji je prvotno karakteriziran kao molekula koja potiče aktivaciju integrina $\beta 1$ i $\beta 2$, ovisnu o proteinu Rap1 u T limfocitima. Također, protein RIAM veže protein talin i tako doprinosi aktivaciji integrina (Hernández-Varas i sur., 2011).

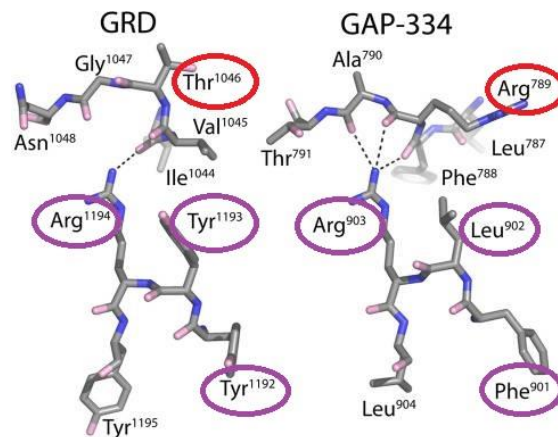
Regije novonastalih međustaničnih kontakata obogaćene su proteinom Rap1 koji jača spojeve E-kadherina, sugerirajući ulogu u nastanku kontakata među stanicama. S obzirom na to da kadherini posreduju vezanje ovisno o ionima kalcija, iscrpljivanjem kalcijevih iona u stanicama dolazi do poremećaja međustaničnih kontakata, a u stanicama koje prekomjerno eksprimiraju protein Rap1 primijećeno je osnaživanje kontakata među stanicama. Takvo isključivanje E-kadherina koje je izazvano nedostatkom kalcijevih iona, aktiviralo je protein Rap1 što je u korelaciji s povezanošću E-kadherina s proteinima RapGEF: C3G i PDZ-GEF I. U stanicama u kojima nema proteina PDZ-GEF I, smanjena je aktivnost proteina Rap1 što posljedično dovodi do poremećaja kontakata E-kadherina, što upućuje na ulogu proteina Rap1 u održavanju i popravljanju spojeva s E-kadherinom (Asuri i sur., 2009).

2.2. PROTEINI IQGAP

Obitelj proteina IQGAP čine veliki proteini s više različitih domena, koji su evolucijski očuvani u svim eukariotskim stanicama, od kvasca do čovjeka. S obzirom na to da proteini ove obitelji vežu veliki broj različitih liganada, sudjeluju u regulaciji mnogih procesa u stanici uključujući adheziju, prijenos signala, gibanje stanica, egzocitozu i citokinezu (Shannon, 2012). U većini kralježnjaka postoje tri proteina obitelji IQGAP, IQGAP1, IQGAP2 i IQGAP3, a ime nose prema motivima IQ i domeni srodnoj domeni GAP (engl. *GAP-related domain*, GRD) koja je većinom homologna katalitičkoj domeni proteina RasGAP (Weissbach i sur., 1994). Unatoč tome što proteini IQGAP posjeduju domenu GRD, koja dijeli barem 25% sekvence s katalitičkom domenom RasGAP, ne posjeduju aktivnost GAP, odnosno ne reguliraju aktivnost proteina Ras. Uz domenu GRD, domenu IQ koja sadrži motiv IQ - motive izoleucin-glutamin koji integriraju s proteinima koji vežu ione Ca^{2+} , humani proteini sadrže još domenu CHD (engl. *calponin homology domain*) koja veže F-aktin (filamentozni), domenu IR (engl. *internal repeats*) odgovornu za dimerizaciju proteina, domenu WW (engl. *tryptophan repeat motif*) koja integrira s ERK1 i ERK2 te domenu RGCT (engl. *Ras-GAP C-terminus*) koja veže β -katenin, E-kadherin i formin Dia1 (Shannon, 2012).

Aktivnost RasGAP proteina IQGAP najvjerojatnije je izgubljena tijekom evolucije zbog mutacija unutar domene GRD. Motiv FLR koji je karakterističan za funkcionalne domene RasGAP, ima očuvanu sekvencu FLRXXXPAXXP (F=fenilalanin, R=arginin, P=prolin). U domeni GRD aminokiseline fenilalanin i leucin zamijenjene su s dva tirozina, dok je argininski prst u domeni GRD na C-terminalnom dijelu heliksa $\alpha 2a_c$ zamijenjen treoninom (Brownbridge i sur., 1993). Usporedbom kristalografske strukture domene GRD humanog proteina IQGAP1 i njegovih aminokiselina s onima na ekvivalentnim pozicijama u domeni GAP humanog proteina GAP-344 (slika 2), ustanovljeno je kako su određene mutacije uzrokovale gubitak aktivnosti GAP (van Dam i sur., 2011). Zamjena argininskog ostatka treoninom uzrokuje smanjenje brzine hidrolize GTP-a do 2000 puta, pri čemu afinitet proteina GAP za vezanje GTPaze Ras ostaje nepromijenjen. Spomenuti motiv FLR je također važan za katalitičku aktivnost domene RasGAP. Supstitucija leucina glutaminom vodi gubitku GAP aktivnosti. Arginin na poziciji 903 unutar motiva FLR proteina GAP-344 stabilizira konformaciju petlje argininskog prsta stvaranjem vodikovih veza s atomima kisika fenilalanina na poziciji 788, arginina na poziciji 789 i alanina na poziciji 790 (Scheffzek i sur., 1997). Dok arginin na poziciji 1194 mutiranog motiva YYR, koji se nalazi unutar domene GRD proteina IQGAP1, stvara samo jednu vodikovu vezu s atomom kisika izoleucina na poziciji 1044. Umjesto

argininskog prsta (označen crvenom bojom) u katalitičkom mjestu domene GAP-334, domena GRD ima očuvan treoninski ostatak. Aminokiseline motiva FLR i YYR označene su ljubičastom bojom. Zbog steričkih smetnji treonina za vezanje fosfata, koje su uzrokovane mijenjanjem konformacije aktivnog mjesta navedenim mutacijama, onemogućeno je stvaranje pravilne geometrije koja je potrebna za hidrolizu GTP-a (Kurella i sur., 2009).



Slika 2. Usporedba vodikovih veza koje stvara arginin iz motiva YYR, odnosno FLR prisutnih u domeni GRD proteina IQGAP1 to jest domeni GAP-334 proteina p120 RasGAP (prema Kurella i sur., 2009).

2.3. STANIČNA ADHEZIJA

Stanična adhezija ima važnu ulogu u komunikaciji između stanica te je bitna za razvoj i održavanje tkiva. Stanična adhezija se dijeli na dvije glavne vrste: međustanična adhezija i adhezija stanica na izvanstanični matriks (engl. *extracellular matrix*, ECM). Stanična adhezija ima ulogu u regulaciji diferencijacije stanica, migracije stanica, staničnog ciklusa i preživljavanja (Huang i Ingber, 1999). Promjene u staničnoj adheziji mogu utjecati na razvoj različitih bolesti, kao što su artritis, različite vrste tumora, osteoporozna i ateroskleroza. Narušavanje stanične adhezije dovodi do metastaziranja i invazije tumorskih stanica i posljedično do uništavanja strukture tkiva, što je i morfološko obilježje malignih tumora (Hirohashi i Kanai, 2003).

Stanična adhezija posredovana je proteinima na površini stanica koji se nazivaju molekulama stanične adhezije (engl. *cell adhesion molecules*, CAM). To su transmembranski proteini koji se sastoje od citoplazmatske, transmembranske i izvanstanične domene. Citoplazmatske domene odgovorne su za interakciju s proteinima citoskeleta, a izvanstanične

domene vežu ligande koji se nalaze ili na drugim stanicama ili na izvanstaničnom matriksu. Adhezijske molekule mogu se podijeliti u pet skupina: integrini, selektini, kadherini, članovi imunoglobulinske superobitelji (engl. *immunoglobulin superfamily*, IgSF) koji uključuju nektine, i drugi, kao što su mucini. Osim što se razlikuju strukturno, ove molekule vežu i različite ligande, pa se kadherini, selektini i pripadnici IgSF povezuju sa međustaničnom adhezijom, dok se integrini vežu na izvanstanični matriks (Samanta i Almo, 2015). Ovisno o vrstama molekula koje sudjeluju u adheziji, razlikujemo homofilno vezanje, odnosno interakciju dviju istih adhezijskih molekula, zatim heterofilno vezanje između različitih adhezijskih molekula, te vezanje koje je posredovano pomoćnom molekulom koja veže adhezijske molekule (Preedy, 2016).

2.3.1. Molekule stanične adhezije

Molekule stanične adhezije povezane su na aktinski citoskelet preko raznih proteina i povezuju stanični okoliš, odnosno druge stanice s citoskeletom. Adhezija stanica posredovana transmembranskim proteinima integrinima regulira migraciju, prianjanje stanica za podlogu, proliferaciju i preživljenje stanica (Schwartz, 2001). Integrini su heterodimerni glikoproteini koji se sastoje od nekovalentno vezanih podjedinica α i β koje sadrže izvanstanične domene koje imaju regije ovisne o dvovalentnim kationima, zbog čega je adhezija posredovana integrinima ovisna o ionima Ca^{2+} i Mg^{2+} . Preko kompleksa fokalne adhezije (engl. *focal adhesion*, FA), integrini su povezani s aktinskim filamentima koji su dio citoskeleta te imaju ulogu u očuvanju staničnog oblika (Khalili i Ahmad, 2015).

Kao i integrini, kadherini preko svojih citoplazmatskih domena stvaraju velike unutarstanične multiproteinske komplekse čija je uloga višestruka. Preko adapterskih proteina povezuju se s citoskeletom, a moduliranjem signalnih mreža sudjeluju u regulaciji ponašanja stanica (Goodwin i sur., 2017). Vezanje posredovano kadherinima je ovisno o ionima Ca^{2+} . Vezanje kalcijevih iona uzrokuje promjenu konformacije izvanstanične domene, što stanicima omogućuje vezanje na susjednu stanicu.

Za kratkotrajnu međustaničnu adheziju ovisnu o kalcijevim ionima odgovorni su selektini koji, za razliku od kadherina koji formiraju homodimere, djeluju kao monomeri. Svaki selektin sadrži lektinsku domenu koja se veže na specifični oligosaharid na drugoj stanici, tako da selektini sudjeluju u heterofilnoj adheziji. Omogućavaju migraciju bijelih krvnih stanica iz krvotoka u ciljno tkivo (Mcever i Zu, 2010).

Međustanična adhezija može biti i neovisna o ionima Ca^{2+} , a za nju su zaslužni članovi imunoglobulinske superobitelji. Ti proteini sadrže regije slične imunoglobulinima koje su

karakteristične za molekule antitijela. IgSF najčešće veže stanice homofilnim mehanizmom, kao na primjer kod većine živčanih stanica, no postoje molekule koji koriste i heterofilni mehanizam (Wai Wong i sur., 2012).

2.4. MODELNI ORGANIZAM *DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM*

Modelni organizmi koriste se u biološkim istraživanjima zbog svoje jednostavnosti i pogodnosti za istraživanje raznih procesa. Glavna obilježja modelnih organizama su sekvencionirani genom, jednostavnija manipulacija u odnosu na više eukariote, brzi razvoj i kratko generacijsko vrijeme. Protist *Dictyostelium discoideum*, ili „društvena“ ameba, već se dugi niz godina koristi kao modelni organizam za istraživanje procesa kao što su razvoj višestaničnosti, diferencijacija stanica, kretanje i kemotaksija, adhezija, endocitoza, fagocitoza, citokineza i prijenos signala. Tijekom životnog ciklusa *D. discoideum* izmjenjuju se jednostaničnost i višestaničnost (Bozzaro, 2019).

D. discoideum se brzo, jednostavno i relativno jeftino uzgaja u laboratorijskim uvjetima na sobnoj temperaturi u kemijski definiranom mediju, zbog čega je pogodna za različite eksperimente. Sve poznate vrste razreda *Dictyostelia* moguće je uzgojiti na bakterijskoj livadi na agaru, dok se neke vrste mogu uzgojiti i u tekućem mediju odgovarajućeg sastava aminokiselina i vitamina, odnosno aksenično (Schaap, 2011). Za laboratorijska istraživanja se većinom koriste aksenični sojevi (AX, engl. *axenic*) koji su radi načina uzgoja nazvani sojevima AX2, AX3 i AX4. Životni ciklus *D. discoideum* je kratak i traje oko 24 sata, a generacijsko vrijeme 4 do 12 sati, što ovisi o uvjetima uzgoja i korištenom soju (dictybase.org).

Ekspresija gena i stanično gibanje može se pratiti vizualizacijom pomoću fluorescencije, enzimatski, korištenjem proteinskih oznaka ili *in situ* hibridizacijom (Bozzaro, 2019). Stanice je lako transfecirati plazmidnim vektorima, a homologna rekombinacija se koristi za deaktivaciju gena od interesa ili za njegovu izmjenu (Faix i sur., 2004). Na mrežnoj stranici *Dictybase* omogućen je pregled genoma sa genima od interesa (dictybase.org).

Veliki potencijal ovog organizma leži u tome što sadrži ortologe mnogih gena koji su uključeni u razvoj bolesti kod ljudi, zbog čega su koristan model u biomedicinskim istraživanjima (Williams i sur., 2006). Uz to, zbog osobitog životnog ciklusa, pomažu u razumijevanju višestaničnog razvoja, odnosno kako kontrolirano kretanje stanice u suradnji s reguliranom staničnom diferencijacijom pomaže u stvaranju oblika i uzorka tijekom višestaničnog razvoja (Weijer 2009; Kimmel i Firtel, 2004). Stanice *D. discoideum* prikladne su i za biofizička ispitivanja međustanične adhezije i adhezije stanica za podlogu jer koriste oba mehanizma, ovisno o dijelu životnog ciklusa u kojem se nalaze. Tako je međustanična adhezija

važna tijekom višestaničnog razvoja, a adhezija stanica za podlogu tijekom vegetativnog dijela životnog ciklusa (Kamprad i sur., 2018; Tarantola i sur., 2014).

2.4.1. Taksonomija

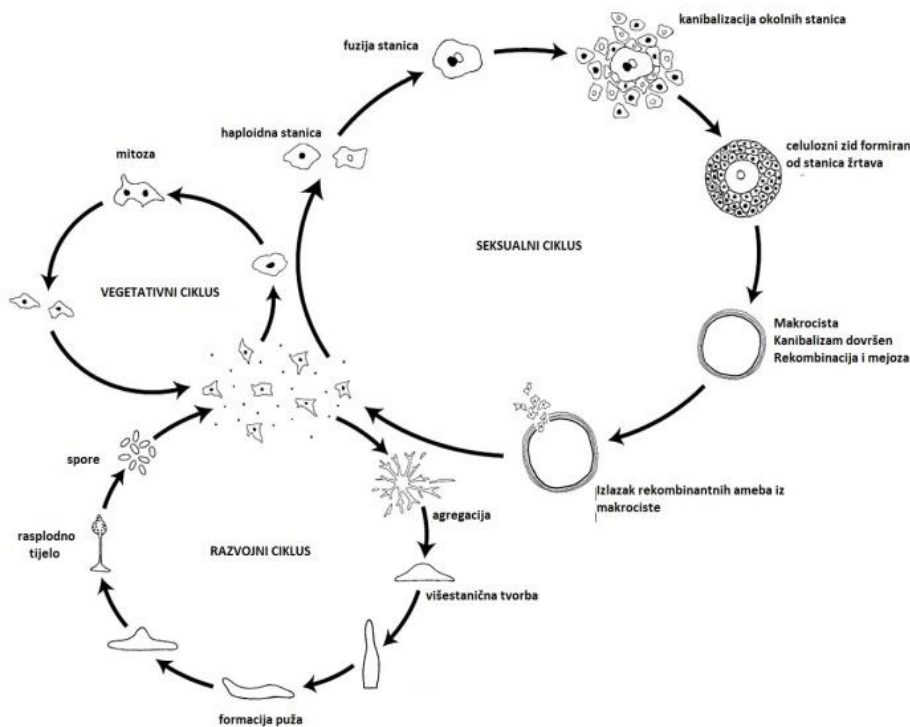
Dictyostelia je razred eukariotskih organizama koji spadaju u koljeno *Amoebozoa*, koje se većinom sastoji od jednostaničnih amebama sličnih organizama s jednostavnim životnim ciklusom. Kada se amebe suoče s uvjetima gladovanja ili stresnim okolnostima, tvore cistu (Cavalier-Smith i sur., 2004). Postoji i nekoliko razreda *Amoebozoa* koje formiraju jednostavno plodno tijelo koje se sastoji od drška i jedne ili nekoliko spora, dok je *Dictyostelia* sposobna formirati mnogostanično plodno tijelo koje se sastoji od velikog broja stanica (Shadwick i sur., 2009).

Oko 120 poznatih vrsta razreda *Dictyostelia* podijeljeno je u četiri glavne skupine, a *Dictyostelium discoideum* spada u skupinu 4. Vrste iz skupina 1-3 uglavnom u nepovoljnim uvjetima encistiraju kao samostalna stanica, dok su vrste iz skupine 4 izgubile tu sposobnost. Također, vrste skupine 4 koriste ciklički adenozin monofosfat (cAMP) kao kemoatraktant za agregaciju, dok ostale skupine koriste gloriin, modificirani peptid glutamata i ornitina, pterin, folnu kiselinu i drugo (Schaap i sur., 2006).

2.4.2. Životni ciklus i stanište

Divlji tip stanica *D. discoideum* su amebe koje žive u tlu, i to u širokom rasponu staništa, od arktika do tropskih regija, uključujući i pustinje i prašume. Najčešće ih možemo naći na nakupinama lišća tropskih i umjerenih šuma, koje obiluju bakterijama koje amebama služe kao izvor hrane (Swanson i sur., 1999). Na slici 3 prikazan je životni ciklus ove amebe. Veći dio životnog ciklusa ameba provodi u haploidnom obliku. Društvene amebe, kako ih nazivamo zbog ispoljavanja uvjetovane višestaničnosti, imaju sposobnost agregirati u višestanični organizam unutar kojeg stanice diferenciraju i u konačnici se formira plodno tijelo u kojem se dio stanica žrtvuje kako bi formirale držak, a ostatak diferencira u spore otporne na nepovoljne uvjete (Schaap, 2011). Takav razvojni ciklus uključuje kontrolu stanične diferencijacije i koordinirano kretanje stanica, a dolazi kao odgovor na gladovanje. Višestanični ciklus je aseksualan, a osim njega, stanice nekih sojeva u nepovoljnim uvjetima mogu ući i u seksualni ciklus. Kod seksualnog ciklusa dolazi do fuzije dviju stanica obrnutog tipa parenja. Slijedi kanibalizam okolnih stanica, stvaranje celuloznog omotača od stanica koje su plijen te se u konačnici razvija divovska diploidna stanica ili makrocista koja prolazi rekombinaciju i mejozu

(Bloomfield i sur., 2019).



Slika 3. Životni ciklus amebe *Dictyostelium discoideum* (prema Flowers i sur., 2010).

Stanice amebe tijekom rasta izlučuju glikoprotein PSF (engl. *prestarvation factor*) te na taj način prate gustoću stanica u odnosu na bakterijski izvor hrane. Kada omjer PSF-a i bakterija prijeđe određeni prag, prestaje proliferacija stanica i počinje ekspresija gena koji su potrebni za njihovu agregaciju (Clarke i Gomer, 1995). Tijekom gladovanja izlučuje se drugi glikoprotein CMF (engl. *conditioned medium factor*), koji paralelno s glikoproteinom PSF stimulira ekspresiju gena za agregaciju stanica. Zajedno, ovi faktori induciraju ekspresiju gena uključenih u sintezu i detekciju cAMP-a (Clarke i Gomer, 1995; Deery i Gomer, 1999). Stanice u gladovanju sintetiziraju i izlučuju cAMP, što je drugim stanicama signal za agregaciju stanica kemotaksijom i formiranje višestanične tvorbe (Schaap, 2011). Do 10^5 pojedinačnih stanica agregira, što dovodi do stvaranja plodnog tijela sa sporama, koje se nalazi na vrhu stalka. Spore čekaju raspršivanje i klijanje dok uvjeti ne postanu povoljni za rast vegetativnih stanica. U ovoj kooperativnoj aseksualnoj strukturi, stanice stalka propadaju, ponašaju se altruistično, uzdižući spore kako bi se povećala vjerojatnost njihovog raspršivanja u okolišu te kasnijeg klijanja (Flower i sur., 2010).

2.4.3. Genom amebe *Dictyostelium discoideum*

Genom amebe *Dictyostelium discoideum* je haploidan i potpuno sekvenciran, što omogućuje korištenje ovog organizma kao modela u raznim istraživanjima. Godine 2005. sekvenciran je genom soja AX4 - veličine 34 Mb, sastoji se od 6 kromosoma i oko 12 500 gena. Genom sadrži kratke intergenske regije koje su neuobičajeno bogate adeninom i timidinom čiji sadržaj čini oko 77 % ukupnih nukleotida u genomu (Eichinger i sur., 2005).

2.4.4. Male GTPaze i protein RapA u amebi *Dictyostelium discoideum*

Kao što je već spomenuto, obitelj proteina Ras ima važnu ulogu u različitim signalnim procesima u stanici koji reguliraju morfologije stanice, kretanja, preživljenja stanice, regulaciju staničnog ciklusa i endocitozu. Genom amebe *D. discoideum* kodira za 15 proteina obitelji Ras, uključujući 11 proteina Ras (RasB, RasC, RasD, RasG, RasS, RasU, RasV, RasW, RasX, RasY, RasZ), tri proteina Rap (RapA, RapB, RapC) i jedan protein Rheb (Kortholt i van Haastert, 2008). Zanimljivo je da su proteini RapA i RapC visoko homologni te su aminokiselinske sekvence 51% identične, a pokazano je da imaju oprečne uloge u nekoliko staničnih procesa kao što su regulacija stanične adhezije, morfologije i migracije stanica. Tako protein RapA smanjuje brzinu migracije stanica i pozitivno regulira adheziju, dok protein RapC povećava brzinu migracije stanica i negativno regulira adheziju (Park i sur., 2018).

Protein RapA ključan je u regulaciji stanične adhezije i reorganizaciji citoskeleta. Nakon što se stanice stimuliraju kemoatraktantom cAMP, dolazi do brze i prolazne aktivacije proteina RapA koji potom lokalizira na rub stanice. Aktivirani protein RapA potiče adheziju stanica za podlogu i širenje stanica po podlozi putem serin/treonin kinaze Phg2 (Jeon i sur., 2009). Protein RapA sudjeluje u regulaciji adhezije stanica za podlogu te međustanične adhezije. Protein RapA sudjeluje u regulaciji nekoliko signalnih puteva koji su uključeni u migraciju stanica, odgovor na osmotski stres, fagocitozu, a ima i funkciju regulacije reorganizacije citoskeleta tijekom migracije stanica (Park i sur., 2018). U vegetativnim stanicama, adhezija posredovana proteinom RapA ovisi o prisustvu proteina talin A ili proteina talin B. Protein RapA veže protein talin B preko domene RA proteina talin B i inducira pojačanu staničnu adheziju u višestaničnom razvoju. Vežanje proteina talin A je vjerojatno neizravno; predloženo je da se protein RapA najvjerojatnije veže na domenu RA proteina Phg2 i na taj način inducira bazalnu adheziju u vegetativnim stanicama (Plak i sur., 2016).

2.4.5. Proteini srodni proteinima IQGAP u amebi *Dictyostelium discoideum*

D. discoideum sadrži četiri proteina srodna proteinima IQGAP: DGAP1/DdIQGAP1, GAPA/DdIQGAP2, IqgC/DdIQGAP3 i IqgD/DdIQGAP4. Sva četiri proteina sadrže domene GRD i RGCT, a nedostaje je im N-terminalna domena koja se nalazi u IQGAP proteinima u sisavaca (Vlahou i Rivero, 2006). Na N-terminalnom kraju proteina nalaze se evolucijski očuvani ostatci IQ i LQ, no nedostaje im konsenzusna sekvenca L/IQXXXXRXXXXR stoga nije poznato jesu li to funkcionalni motivi (Li i sur., 2008). Protein IqgD posjeduje N-terminalnu domenu za vezanje aktina sastavljenu od dvije CHD domene fimbrinskog tipa (Friedberg i Rivero, 2010). Proteini DGAP1 i GAPA su 49 % identični u aminokiselinskom slijedu, dok je protein IqgC 29 % aminokiselina identičnih s DGAP1, a 27 % s proteinom GAPA (Shannon, 2012). Iako proteini DGAP1 i GAPA nemaju domenu CHD potrebnu za izravno vezanje F-aktina, poznato je da sudjeluju u regulaciji organizacije aktinskih filamenata. Kao i njihovi srodnici u sisavaca, proteini srodni proteinima IQGAP, nemaju aktivnost GAP, sudjeluju u regulaciji citoskeleta i nužni su za efikasnu citokinezu (Faix i sur., 2001).

U usporedbi s proteinima DGAP1 i GAPA, protein IqgC ima drugačiju ulogu. Protein IqgC je lokaliziran na dijelove stanične membrane koji se razvijaju u endocitne čašice i tamo ostaje do zatvaranja čašice. Za razliku od proteina DGAP1 i GAPA, protein IqgC ne pokazuje interakciju s GTPazama obitelji Rho, ali zato veže protein RasG. Test aktivnosti GAP *in vitro* otkrio je da protein IqgC djeluje kao protein GAP za malu GTPazu RasG. Domena GRD proteina IqgC sadrži očuvane aminokiseline odgovorne za aktivnost domene GAP kod proteina RasGAP, kao što su katalitički arginin i motiv FLR. Protein IqgC negativno regulira procese makropinocitoze i fagocitoze, a uključen je i u kontrolu polarnosti stanice tijekom kemotaksije prema cAMP-u (Marinović i sur., 2019; Lee i sur., 2010).

2.4.6. Adhezija kod protista *Dictyostelium discoideum*

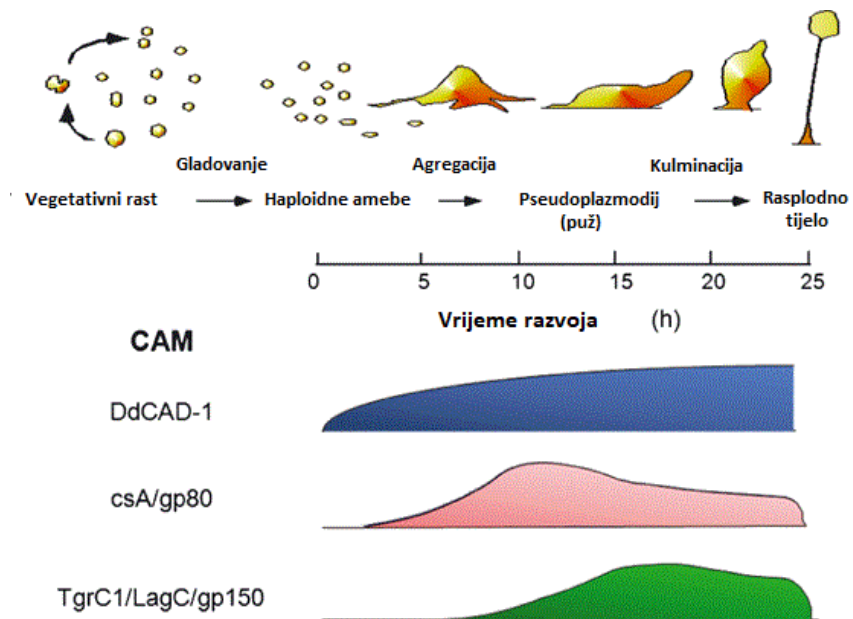
Kod protista *D. discoideum*, adhezija stanica je povezana sa staničnim ciklusom. U vegetativnoj fazi rasta, stanice se pričvršćuju za podlogu prilikom kretanja. Vegetativne stanice se hrane bakterijama fagocitozom, i u tom procesu adhezija citoplazmatske membrane izravno utječe na sposobnost fagocitoze. U višestaničnom ciklusu eksprimiraju se specifični kontaktni proteini i do izražaja dolazi međustanična adhezija (Bozzaro i Ponte, 1995).

Iako je *D. discoideum* mnogo jednostavniji organizam od sisavaca, više se zna o strukturi, regulaciji i funkciji kompleksa fokalne adhezije sisavaca nego ove amebe. Krhki i kratkotrajni adhezijski kontakti stanica otežavaju njihovu karakterizaciju. *D. discoideum* ne sadrže integrine koji posreduju u adheziji stanica za ECM u višestaničnim životinjama, no poznati su neki

proteini koji sudjeluju u adheziji stanica za podlogu: talin A, talin B, SadA, SibA, Phg1A, Phg1B, Phg2, RapA, itd. Protein talin A je ključan za adheziju stanica za podlogu i adheziju osjetljivu na EDTA. Protein SibA (engl. *similar to integrin beta A*) je jedini od identificiranih proteina koji sudjeluju u regulaciji adhezije pokazao djelomičnu sličnost s β podjedinicom integrina (Mijanović i Weber, 2022).

Adhezijske molekule su važne i u višestaničnom ciklusu društvene amebe. Identificirane su dvije vrste međustanične adhezije, ovisno o osjetljivosti na EDTA, a smatra se da postoje četiri adhezijska sustava (Gerisch, 1980). Na početku višestaničnog razvojnog ciklusa, stanice su jedva kohezivne. Tijekom inkubacije na čvrstoj podlozi stanice ostvaruju samo privremene kontakte, dok u suspenziji formiraju rahle, male agregate koji lako disociraju u prisustvu etilendiamin tetraoctene kiseline (EDTA). Skupina adhezijskih molekula koje su zaslužne za adheziju osjetljivu na EDTA nazivaju se kontaktna mjesta B (engl. *contact sites B*, csB) i eksprimiraju se rano u razvojnem ciklusu (Beug i sur., 1973). Adhezija osjetljiva na EDTA može se podijeliti na dva podtipa, adheziju ovisnu o ionima Ca^{2+} i ovisnu o ionima Mg^{2+} . Oba sustava su važna u ranom višestaničnom ciklusu tijekom kemotaksije i agregacije te omogućuju ostvarivanje inicijalnih kontakata među stanicama. Adheziju ovisnu o kalcijevim ionima posreduje molekula DdCAD-1 (engl. *Dictyostelium discoideum cell adhesion molecule*) koju kodira gen *cadA*, dok je molekularni identitet mjesta ovisnih o magnezijevim ionima nepoznat (Wong i sur., 2002).

U kasnijim fazama višestaničnog razvoja nakon 2-3 sata, adhezija osjetljiva na EDTA gubi na važnosti jer stanice počinju eksprimirati novu skupinu adhezijskih molekula, kontaktna mjesta A (engl. *contact site A*, csA), odnosno gp80 (engl. *glycoprotein 80*). Ekspresija ovog glikoproteina omogućuje stanicama snažnu adheziju i nastanak velikih agregata otpornih na disocijaciju s otopinom EDTA. Drugi sustav adhezije rezistentne na EDTA posreduje CAM koji nije ovisan o ionima Ca^{2+} i Mg^{2+} , LagC/gp150, za koji kodira gen *tgrC1*. Protein LagC/gp150 posreduje heterofilnu međustaničnu adheziju vežući se na receptore na površini stanice. LagC/gp150 posredovana adhezija pokreće signalne događaje koji reguliraju diferencijaciju stanica i njihovu specifikaciju, a u to je uključen i protein LagD. Transkripcija gena *tgrC1* inducira se između 8 i 10 sati razvojnog ciklusa. Vremenska i prostorna ekspresija ovih molekula strogo je kontrolirana, što je prikazano na slici 4 (Siu i sur., 2011).



Slika 4. Životni ciklus *Dictyostelium discoideum* i ekspresija molekula stanične adhezije (preuzeto i prilagođena prema Siu i sur., 2011).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Materijali korišteni za uzgoj stanica *Dictyostelium discoideum*

hranjivi mediji i podloge

HL5 hranjivi medij

22 g/L HL5 medija bez glukoze (Formedium)

18 g/L maltoze (Sigma Aldrich)

fosfatni agar

12 g/L agara dodati u Sørensen fosfatni pufer

otopine i puferi

Sørensen fosfatni pufer, pH 6,0

0,897 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$

1,99 g/L KH_2PO_4

pufer za elektroporaciju

10 mM K-fosfatni pufer, pH 6,1

50 mM glukoza (Roth)

otopina za oporavak stanica 50×

0,1 M CaCl_2

0,1 M MgCl_2

antibiotici

ampicilin, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Sigma)

streptomycin, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fluka)

geneticin G-418, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Gibco)

3.1.2. Materijali korišteni za uzgoj bakterijskih stanica *Escherichia coli*

hranjivi mediji i podloge

LB (Luria-Bertani) medij

5 g/L ekstrakta kvasca (Biolife)

10 g/L triptona (Biolife)

5 g/L NaCl

za krutu podlogu i 15 g/L agara (Roth)

NZY+ kompletni medij

10 g/L NZ amina (Fluka)

5 g/L ekstrakta kvasca

5 g/L NaCl

12,5 mM MgCl₂

12,5 mM MgSO₄

20 mM glukoza

SOC medij za oporavak stanica

0,5 % ekstrakta kvasca

2 % triptona

10 mM NaCl

10 mM MgCl₂

2,5 mM KCl

20 mM MgSO₄

20 mM glukoza

antibiotici

ampicilin (Sigma) 100 µg/mL

kloramfenikol (Sigma) 35 µg/mL

sojevi *E.coli*

DH5α

Kemijski kompetentan soj ranije napravljen u laboratoriju koji ima visoku efikasnost transformacije. Stabilnost plazmida i poboljšana kvaliteta DNA osigurane su mutacijama gena *recA1* i *endA1* zbog kojih nema homologne mutacije ni nespecifične nukleazne aktivnosti endonukleaze I.

XL10-Gold (Agilent Technologies)

Ultrakompetentne stanice s najvećom mogućom efikasnošću transformacije. Posjeduju Hte fenotip (engl. *high transformation phenotype*) zbog čega se koriste za kloniranje velikih plazmida i ligiranih DNA.

10-beta (NEB)

Kemijski kompetentne stanice s visokom efikasnošću transformacije i sa širokom primjenom.

Koriste se za velike plazmide i BAC-ove (engl. *bacterial artificial chromosome*). Korištene za *heat shock* transformaciju.

3.1.3. Početnice

početnice korištene za sekvenciranje:

koriste se kako bi se provjerili konstrukti pripremljeni tehnikama rekombinantne DNA

UP1_seq

5' - TTCTTATTTCTTAAAACAAATAAA - 3'

DP1_seq

5' - TATAATCTAATAATGTTGTAAACAA - 3'

početnice korištene za lančanu reakciju polimerazom (engl. *polmerase chain reaction, PCR*)

primeri za umnožavanje RapA_dCAAX s kalupa gdje su FL proteini

Rap1_BamHI_F1

5' – attGGATCCATGCCTCTTAGAGAATTCAAATC – 3'

Rap1_SpeI_dCAAX_R1

5' – ATTACTAGTTTATTTTGATTTAGCTTTGCTTGGTG – 3'

početnice korištene za colony PCR:

korištene za provjeru prisutnosti inserts efaA

efaAI_Y2H_BamHI_F1

aatGGATCCaaATGGGTAAAGAGAAAACCTC

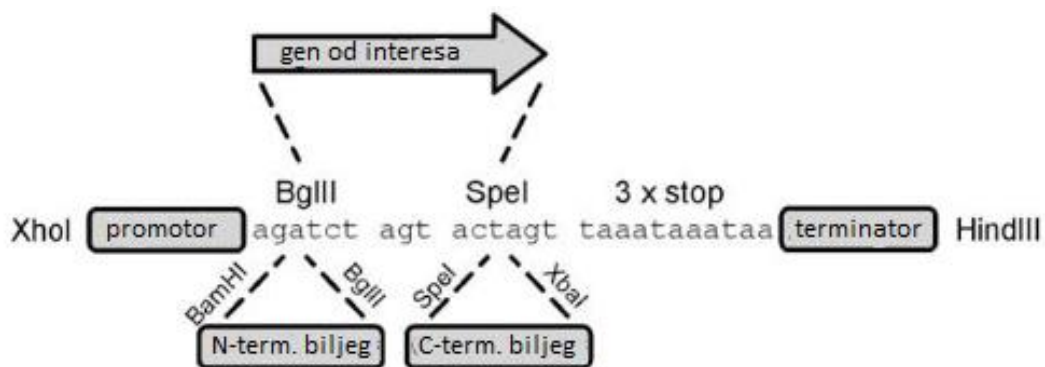
efaAI_Y2H_PstI-R1

aatCTGCAGTTATTTCTTTTTTGATGGGG

3.1.4. Plazmidi

Ekstrakromosomalni ekspresijski vektor sadrži četiri regije odvojene restrikcijским

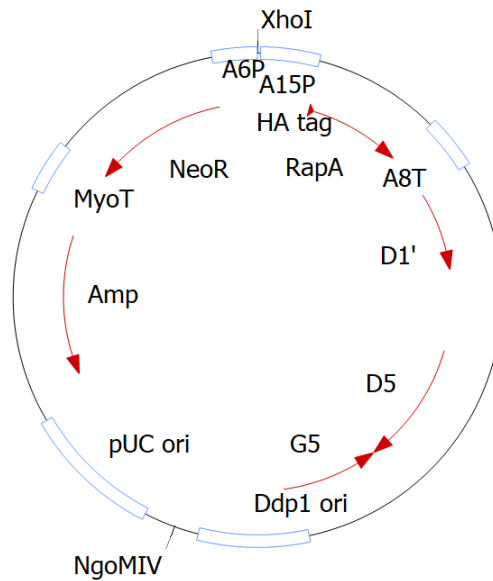
mjestima, kako bi se mogao modificirati po potrebama eksperimenata. To su ishodište replikacije u *E.coli* i *D. discoideum* te regije koje nose rezistenciju na antibiotike i ekspresijsku kazetu (slika 5) u koju tehnikom rekombinantne DNA unosimo sekvence od interesa za ekspresiju u stanicama *D. discoideum*. Gen od interesa se klonira između restrikcijskih mjesta BglII i SpeI. N-terminalni biljeg se insertira uzvodno od regije MCS (engl. *multiple cloning site*) na mjesto kojeg prepoznaju restrikcijski enzimi BamHI i BglII, dok se C-terminalni biljeg inserira nizvodno od regije MCS na mjesto koje prepoznaju restrikcijski enzimi SpeI i XbaI (Veltman i sur., 2009).



Slika 5. Ekspresijska kazeta koja sadrži MCS (prema Veltman i sur. 2009).

U eksperimentima je korišten ekstrakromosomalni vektor pDM304 koji sadrži jedinstvena restrikcijska mjesta koja prepoznaju enzimi BglII i SpeI. Navedena mjesta koja cijepaju enzimi BglII i SpeI služe kako bi se u vektor unijela sekvenca koja kodira za gen od interesa, čija je transkripcija kontrolirana promotorom *act15* te terminatorom *act8*. Ovaj vektor sadrži gene koji su odgovorni za rezistenciju na geniticin i ampicilin, omogućava istovremenu ekspresiju dva rekombinantna proteina pod kontrolom identičnih promotora, a ima i dva ishodišta replikacije, *pUC* za replikaciju u *E. coli* i *Ddpl ori* za replikaciju u *D. discoideum*.

Za biokemijske metode korišteni su derivati plazmida pDM304 koji imaju ukloniran biljeg HA uzvodno od mjesta prepoznavanja enzima BglII te kodirajuće sekvence RapA varijanti uklonirane u BglII i SpeI restrikcijska mjesta (slika 6). Proteini su ekspimirani kao fuzijski konstrukti s HA biljegom, kako bi se kasnijom analizom Western blot i korištenjem anti-HA antitijela, mogla potvrditi interakcija proteina.



Slika 6. pDM304_HA_RapA (slika preuzeta iz laboratorija)

3.1.5. Materijali korišteni za tehnike rekombinantne DNA

enzimi

Phusion polimeraza (NEB)

GoTaq polimeraza (Promega)

restriksijske endonukleaze : BamHI-HF, SpeI-HF, HindIII, NgoMIV, BglII, EcoRI-HF, BstUI, XhoI (NEB)

alkalna fosfataza (CIAP, Invitrogen)

T4 DNA ligaza (Thermo Scientific)

DNA standardi

DNA bakteriofaga λ (Fermentas) porezana restriksijskim enzimima EcoRI i HindIII

λ DNA porezana restriksijskim enzimom HindIII

1 kb DNA Ladder (NEB)

100 bp Ladder (NEB)

komercijalni kompleti

komplet za izolaciju plazmidne DNA, *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen)

komplet za pročišćavanje PCR-produkta, *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen)

komplet za pročišćavanje DNA iz agaroznog gela, *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen)

boja i pufer za elektroforezu u agaroznom gelu

boja za nanošenje DNA na gel, 10×

1,25 % (W/V) ksilen-cijanol

1,25 % (W/V) bromfenol plavo

0,625 % (V/V) SDS

62,5 % (V/V) glicerol

TAE pufer pH 8,5, 50×

50 mM EDTA

242 g/L Tris-baza

57,1 mL/L octene kiseline

otopine za izolaciju plazmidne DNA:

otopina 1

50 mM Tris-Cl, pH 8,0

10 mM EDTA

100 µg/mL Rnaze A (Qiagen)

otopina 2

200 mM NaOH

1 % SDS

otopina 3

3 M kalij acetata pH 5,5

5,75 mL octene kiseline (99,5 %)

3.1.6. Materijali korišteni za proteinsku biokemiju

proteinski standardi

PageRulerUnstained Protein Ladder (Fermentas)

PageRuler Plus Prestained (Thermo Scientific)

proteini

IqgC (ranije pročišćen u laboratoriju)

GST (ranije pročišćen u laboratoriju)

antitijela

primarna antitijela

monoklonalno anti-CI (anti-korteksilin I)

monoklonalno anti-HA proizvedeno u mišu (komercijalno, Sigma)

anti-IqgC poliklonalno antitijelo proizvedeno imunizacijom zečeva (ljubazni poklon prof. Jan Faixa)

sekundarna antitijela

na zečja IgG antitijela, proizvedeno u kozi, konjugirano s peroksidazom iz hrena (HRP)(BioRad)

na mišja IgG, proizvedeno u kozi, konjugirano s peroksidazom iz hrena (BioRad)

pufer korišten za metode *pull-down* i koimunoprecipitaciju

pufer za lizu stanica

30 mM Tris, pH 7,5

complete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche)

2 mM DTT (Roth)

1 mM EGTA (Sigma)

0,5 % n-oktil-polioksi-etilen (Serva)

40 mM NaCl

otopine korištene za Western blot

SDS pufer za nanošenje uzoraka, 3×

150 mM Tris/0,4 % SDS, pH 6,8

30 % glicerol

2,9 % SDS (Roth)

3 % β-merkaptetanol (Fluka)

0,3 % bromfenol plavo

SDS pufer za elektroforezu pH 8,8, 10×

30,25 g/L Tris (Roth)

142,5 g/L glicina (Roth)

1 % SDS

pufer za *semi-dry* prijenos, 10×

2,93 g/L glicina

5,81 g/L Tris

0,0375 % SDS

20 % metanol

pufer za ispiranje 1× PBS + 0,05 % Tween 20, pH 6,8, 10×

1,37 M NaCl

27 mM KCl

100 mM Na₂HPO₄

18 mM KH₂HPO

0,5 % Tween 20 (Sigma)

pufer za blokiranje membrane:

5 % BSA u 1× PBS puferu + 0,05 % Tween 20

komercijalni kompleti

komplet za kemiluminiscenciju *Clarity™ Western ECL Substrate* (BioRad)

12 % SDS-poliakrilamidni gelovi

gel za razdvajanje

11 mL akrilamid/bisakrilamida 30 %/0,8 % (Roth)

6,68 mL 1,5 M Tris/0,8 % SDS, pH 8,8

8,43 mL dH₂O

135 μL 200 mM EDTA, pH 7,2

6,68 μL TEMED (Fluka)

300 μL 20 % APS (Roth)

gel za sabijanje

1,125 mL akrilamid/bisakrilamida 30 %/0,8 %

2,5 mL 0,5 M Tris/0,8 % SDS, pH 6,8

6,3 mL dH₂O

50 μL 200 mM EDTA, pH 7,2

5 μL TEMED

150 μL 20 % APS

otopine za test adhezije stanica:

Sørensen fosfatni pufer, pH 6,0

Otopina EDTA , pH 6,1

10 mM EDTA u Sørensen puferu

20 mM EDTA u Sørensen puferu

10 % otopina glutaraldehida u vodi

3.2. METODE

3.2.1. Manipulacija staničnom kulturom *Dictyostelium discoideum*

U ovom radu korištene su stanice *D. discoideum* soja AX2 (aksenični soj) koje su se uzgajale u hranjivom mediju HL5 s dodatkom maltoze. Za potrebe eksperimenata, korišten je i AX2 soj koji je genetički deficijentan za protein IqgC, stanice mutanta *iqgC*⁻. Kako bi se spriječila kontaminacija bakterijama, u medij HL5 dodaju se antibiotici ampicilin i streptomycin u koncentracijama 100 i 300 µg/mL, dok je za selekciju transformiranih stanica korišten antibiotik G418, u koncentracijama 10 µg/mL. Sterilni uvjeti za rad sa staničnom kulturom osigurani su upotrebom laminara (Bio-II-A, Telstar).

Stanice su uzgajane pričvršćene za podlogu u Petrijevim posudama u inkubatoru (Innova 4230R, New Brunswick) pri temperaturi od 22 °C uz svjetlo. Ukoliko je bilo potrebno uzgojiti veći broj stanica, stanice su uzgajanje u suspenziji u Erlenmayerovim tikvicama pri već navedenim uvjetima te brzinu trešnje od 150 rpm.

Tijekom uzgoja stanica na Petrijevim zdjelicama, važno je da stanice ne postanu konfluentne, zato što tada stanice počnu prerastati i dolazi do ulaska u stanje gladovanja. Pri uzgoju stanica u suspenziji, pazi se da stanice ne prerastu gustoću 1×10^6 st/mL. Ako stanice dostignu veću gustoću od navedene, zbog nedovoljne količine hranjivih tvari i kisika dolazi do promjena ekspresije gena i fiziologije. Kako ne bi došlo do nakupljanja spontanijih mutacija, stanice su nakon pokretanja iz spora korištene najviše 3 do 4 tjedna, nakon čega su se bacale, a nove su pokretane iz prethodno spremljenih spora.

Stanice se dugoročno mogu čuvati na -80 °C u obliku spora u fosfatnom puferu. Kako bi se pokrenula sporulacija, prikupljaju se konfluentne stanice. Stanice se centrifugiraju 3 minute na 700 g pri +4 °C, zatim se ispiru s 30 mL hladnog fosfatnog pufera kako bi se uklonili ostaci medija. Nakon što se stanice ponovno centrifugiraju, resuspendiraju se u 1 mL hladnog fosfatnog pufera te se nasade na ploče s fosfatnim agarom i pohrane na 22 °C. Potaknute nedostatkom hranjivih tvari u fosfatnom agaru, stanice ulaze u razvojni ciklus te tijekom iduća 24 h diferenciraju u višestanična rasplodna tijela s drškom i sporama. Slijedi ispiranje rasplodnih tijela s par mililitara fosfatnog pufera, nakon čega se uzorci razdijele u kriotubice i naglo zamrznu u tekućem dušiku te se pohrane na -80 °C. Kod ponovnog pokretanja stanične kulture iz spora, u Petrijevu posudu koja sadrži 10 mL HL5 medija s odgovarajućim antibioticima doda se 200 – 500 µL rasplodnih tijela zamrznutih u fosfatnom puferu.

3.2.1.1. Transfekcija stanica

Potrebna količina stanica za transfekciju je 1×10^7 stanica. Stanice se skupljaju centrifugiranjem 3 minute na 700 g pri 4 °C, nakon čega se supernatant odlije, a stanice se isperu s 30 mL hladnog fosfatnog pufera a zatim s 30 mL hladnog pufera za elektroporaciju. Nakon što su stanice isprane u hladnom puferu za elektroporaciju, talog stanica se resuspendira u 700 µL istog pufera.

Oko 1 µg plazmidne DNA stavi se na dno kivete i na led. Zatim se 700 µL stanica resuspendiranih u puferu doda u kivetu te resuspendira. Slijedi elektroporacija pomoću elektroporatora *Xcell gene pulser* (Biorad), pri čemu se koristi protokol za *Dictyostelium* koji je već unesen. Uvjeti elektroporacije su pravokutni valovi, napon 1000 V, kapacitet 10 µF, dva pulsa u trajanju od 1 milisekunde s intervalom od 5 sekundi između. Po završetku elektroporacije, sadržaj se vraća na led, te se prebacuje u Petrijevu posudu koja se inkubira 15 minuta na rotacijskoj tresilici (Unimax 1010, Heidolph), uz brzinu trešnje 100 rpm i na 22 °C. Zatim se doda odgovarajući volumen otopine za oporavak, tako da konačna koncentracija CaCl₂ i MgCl₂ bude 2 mM. Potrebni volumen otopine za oporavak izračunat je prema formuli:

$$V = \frac{700 \mu\text{L} + \text{volumen plazmida}}{49}$$

Stanice se ostave na tresilici još 15 minuta u istim uvjetima. Za kraj im se doda 10 mL medija HL5, nakon čega se inkubiraju preko noći na 22 °C. Nakon inkubacije im se doda antibiotik G418 za selekciju transfeciranih stanica.

3.2.1.2. Brojanje stanica u hemocitometru

Hemocitometar je uređaj za brojanje stanica koji se sastoji od debelog mikroskopskog stakalca izrađenog od stakla s pravokutnim udubljenjem što stvara komoru koja ima laserski ugraviranu mrežu s okomitim linijama. Korištena je *Neubauer* komorica u kojoj su četiri vanjska kvadrata podijeljena na 16 manjih kvadratića. Pokrovno stakalce namjesti se na komoricu na koju se oprezno pipetom nanese uzorak. Nakon nanošenja uzorka na komoricu, prebroji se broj stanica u četiri vanjska kvadrata i za daljnji izračun se koristi srednja vrijednost broja stanica po kvadratu. Uzorak se najčešće razrijedi nekoliko puta, jer bi inače bilo previše stanica koje se ne bi mogle točno prebrojiti.

Broj stanica računa se prema formuli:

$$\frac{\text{broj stanica}}{4} \times 10^4 \times \text{broj razrjeđenja} = \text{koncentracija stanica}$$

3.2.2. Manipulacija bakterijskom kulturom *E.coli*

3.2.2.1. Transformacija elektroporacijom

Za transformaciju stanica elektroporacijom, korišten je soj DH5 α , koji se koristi za manje vektore i inserte. Bakterije se čuvaju pohranjene na -80 °C pa ih je potrebno prvo otopiti na ledu. Zatim se 2 μ L ligacijske smjese se doda u 50 μ L bakterijske kulture, resuspendira se te prebaci u kivetu, nakon čega slijedi par minuta inkubacije na ledu. Zatim slijedi elektroporacija na uređaju *Xcell gene pulser* pri čemu se koristi već unešeni protokol za *E. coli* koji odgovara upotrebi kiveta s razmakom od 2 mm. Uvjeti elektroporacije su pravokutni valovi, napon 2,5 kV, kapacitet 25 μ F, jedan puls u trajanju od 2,6 milisekunde. Nakon pulsa doda se 1 mL medija SOC i sadržaj se prelije u 1,5 mililitarsku mikrotubicu za centrifugiranje. Potom slijedi inkubacija na 37 °C, 1 h na rotacijskoj tresilici uz brzinu trešnje 300 rpm. Nakon inkubacije potrebno je centrifugirati bakterije 2 minute na 12000 g, zatim se odlije dio supernatanta (medija), a bakterije se resuspendiraju i nasade na prethodno sterilizirane LB selekcijske ploče koje sadrže ampicilin 100 μ g/mL. Inkubiraju se preko noći na 37 °C .

3.2.2.2. Transformacija kemijski kompetentnih stanica

Komercijalni soj *E.coli*, 10-beta (NEB), koristi se za transformaciju stanica velikim plazmidima. Bakterije se čuvaju na -80 °C te ih je prvo potrebno otopiti na ledu. Bakterije su transformirane izlaganjem temperaturnom šoku prema uputama proizvođača. 25 μ L bakterija prebaci se u eppendorf tubu i doda se 2 μ L ligacijske smjese. Sadržaj eppendorf tube se izmiješa i inkubira se na ledu 30 minuta. Nakon toga, uzorak s izloži temperaturnom šoku u termobloku na 42 °C tijekom 30 sekundi, nakon čega se opet vrati na led 5 minuta. Transformiranim bakterijama se doda 425 μ L medija za oporavak sobne temperature te inkubiraju u tresilici na 37 °C, 1 h pri 300 rpm. Potom slijedi centrifuga 2 min na 12 000 g kako bi se stanice peletirale. Dio medija se odlije, a u ostatku se resuspendira bakterijski pelet i nasadi na LB ploču s ampicilinom. Ploče s nasadenim bakterijama se inkubiraju na 37 °C preko noći.

Osim već spomenutog soja, korištene su i ultrakompetentne XL10-Gold stanice (Agilent) koje omogućavaju uspješnu transformaciju s velikim plazmidima. Transformacija bakterija napravljena je prema uputama proizvođača izlaganjem temperaturnom šoku. Bakterije

su pohranjene na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ te ih je prvo potrebno otopiti na ledu. U $50\text{ }\mu\text{L}$ stanica doda se $2\text{ }\mu\text{L}$ β -merkaptoetanol. Nakon miješanja, smjesa se inkubira 10 min na ledu. U bakterijsku kulturu se doda $2\text{ }\mu\text{L}$ ligacijske smjese, izmiješa se te inkubira 30 minuta na ledu. Zatim se smjesa stavi 30 sekundi na termoblok na $42\text{ }^{\circ}\text{C}$. Potom se bakterije inkubiraju 2 minute na ledu, nakon čega se u smjesu doda $0,9\text{ mL}$ medija NZY⁺ te slijedi inkubacija od 1 h na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ na tresilici pri 250 rpm. Bakterije se nasade na krutu LB podlogu s ampicilonom koncentracije $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ te se inkubiraju preko noći na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.3. Tehnike rekombinantne DNA

3.2.3.3. Lančana reakcija polimerazom

Metodom lančane reakcije polimerazom - PCR (engl. *polymerase chain reaction*) umnožene su kodirajuće sekvence za tri varijante proteina RapA: divlji tip proteina, koji kruži između aktivnog i neaktivnog stanja (wt), konstitutivno neaktivnog mutanta (S19N) i konstitutivno aktivnog mutanta (Q65E), pri čemu je korištena polimeraza *Phusion* (NEB) prema protokolu proizvođača. Mutirane varijante proteina prethodno su bile konstruirane u laboratoriju, stoga nije bila potrebna mutagenaza sekvenci već samo njihovo umnažanje. S obzirom na to da su za eksperiment potrebni proteini bez motiva CAAX, zato što se protein pune duljine ne eksprimira stabilno u stanicama, korištene su početnice koje umnažaju dio nukleinske kiseline bez dijela koji kodira za motiv CAAX. Uvjeti lančane reakcije polimerazom, koja se provodi u uređaju za PCR (Mastercycler personal, Eppendorf), isti su za sva tri PCR produkta. Postavljeni uvjeti PCR reakcije prikazani su u tablici 1.

Nakon reakcije PCR, uspješnost je provjerena gel elektroforezom, a dobivena DNA je pročišćena korištenjem *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) prema protokolu proizvođača.

Tablica 1. Uvjeti provođenja lančane reakcije polimerazom

PCR programi	Temperatura	Vrijeme	
Inicijalna denaturacija	$98\text{ }^{\circ}\text{C}$	30 sec	
Denaturacija	$98\text{ }^{\circ}\text{C}$	10sec	32
Vežanje početnica	$60\text{ }^{\circ}\text{C}$	20 sec	ciklusa
Elongacija	$72\text{ }^{\circ}\text{C}$	20 sec	
Završna elongacija	$72\text{ }^{\circ}\text{C}$	7 min	
Hlađenje	$16\text{ }^{\circ}\text{C}$		

3.2.3.3.1. PCR na bakterijskom kolonijama (engl. *colony PCR*)

Metoda PCR na bakterijskim kolonijama korištena je kako bi se utvrdila prisutnost inserta *efaAI* u testiranim klonovima. Početni plazmid koji je korišten za eksperimentalne potrebne je pDM304_HA_EfaAI, kojeg je bilo potrebno izrezati restriksijskim enzimima BglII i SpeI kako bi se uklonio insert koji kodira za protein EfaAI te na njegovo mjesto uligirao insert od interesa, u ovom slučaju RapA_ΔCAAX. Nakon što je plazmid porezan restriksijskim enzimima kako bi se izrezao insert *efaAI*, napravljena je ligacijska smjesa u kojoj su se vektor pDM304_HA i insert RapA_ΔCAAX povezali, a potom se plazmid pDM304_HA_RapA_ΔCAAX provjeravao sekvenciranjem. Rezultati sekvenciranja upućivali su na to da su u plazmidu prisutni ostaci inserta *efaAI* koji je trebao biti izrezan. Kako bi se utvrdilo je li navedeni insert prisutan u plazmidu, upotrijebila se metoda *colony PCR* koja se provodi u uređaju za PCR (Mastercycler personal, Eppendorf). Korištene su početnice za *efaAI* kodirajuću sekvencu. Za ovu metodu korištena je polimeraza GoTaq (NEB) prema uputama proizvođača i uvjetima koji su prikazani u tablici 2.

Tablica 2. Uvjeti provođenja reakcije PCR na bakterijskim kolonijama

PCR programi	Temperatura	Vrijeme	
Inicijalna denaturacija	95 °C	2 min	
Denaturacija	95 °C	30 sec	28 ciklusa
Vežanje početnica	50 °C	30 sec	
Elongacija	72 °C	1 min 30 sec	
Završna elongacija	72 °C	5 min	
Hlađenje	16 °C		

3.2.3.2. Izolacija plazmidne DNA iz *E.coli*

Ovisno o kasnijoj upotrebi, plazmidi su izolirani na dva načina. Ukoliko je izolirana DNA korištena za sekvenciranje, koristio se komercijalni komplet za izolaciju plazmidne DNA iz bakterija, *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen). Za druge potrebe koristio se protokol za izolaciju DNA metodom alkalne lize.

Izolacija komercijalnim kompletom se bazira na prisutnosti pufera visoke koncentracije kaotropnih soli, što omogućuje vežanje DNA na silika-membranu u koloni, nakon čega slijedi elucija puferom niske koncentracije soli ili vodom. Izolacija se izvodi prema uputama

proizvođača.

Protokol korišten za izolaciju DNA alkalnom lizom je sljedeći. 4 mL prekonočne bakterijske kulture prebaci se u mikrotubice za centrifugiranje od 2 mL i centrifugira se 2 min na 12 000g. Supernatant se izlije, a zaostali bakterijski talog se resuspendira u 200 μ L otopine 1. Zatim se doda 200 μ L otopine 2, dobro pomiješa i ostavi 5 minuta na sobnoj temperaturi kako bi došlo do lize bakterijskih stanica te denaturacije DNA i proteina. 200 μ L otopine 3 se doda kako bi se alkalna smjesa cirkularne plazmidne DNA renaturirala. Centrifugom na 17 900 g u trajanju od 10 min, genomska se DNA zajedno s proteinima i staničnim ostacima taloži. U čistu mikrotubicu za centrifugiranje se prebaci supernatant u kojem se nalazi čista plazmidna DNA koja se dodatkom 400 μ L izopropanola istaloži. Zatim slijedi centrifugiranje na 17900 g u trajanju od 5 minuta. Ispere se talog s 500 μ L 70%-tnog etanola i ponovi se centrifuga, nakon koje se etanol ukloni pipetom. Kako bi se potpuno uklonio etanol, talog se suši 10 minuta u uređaju za ugušćivanje uzoraka *Savant SpeedVac* (Thermo Scientific) te se konačno resuspendira u 20 μ L redestilirane vode. Agaroznom elektroforezom određena je izolirana DNA pomoću korištenih standarda. Izolirana plazmidna DNA pohranjena je na -20 °C.

3.2.3.3. DNA elektroforeza na agaroznom gelu

Kako bi se provjerio svaki korak procesa kloniranja, korištena je elektroforeza DNA na agaroznom gelu. Korišteni su 1% (w/v) agarozni gelovi pripremljeni tako da se u 1 \times TAE pufer doda 0,5 μ g/mL etidij-bromida, koji se koristi za vizualizaciju DNA, a potom se u puferu otopi agaroz. Korištena je kadica za horizontalnu elektroforezu pri naponu od 5 V/cm, u kojoj se nalazio 1 \times TAE pufer. Prije nanošenja uzoraka u jažice gela, isti su pomiješani s bojom za nanošenje uzoraka, a osim uzoraka, na gel se nanosi i DNA standard, koji služi za kasniju procjenu veličine i koncentracije fragmenata DNA. Nakon elektroforeze, DNA je vizualizirana pod UV svjetlom pomoću transiluminatora (G:box, Syngene), dok se slika gela dokumentirala kamerom koja je spojena s računalom.

Preparativna gel elektroforeza koristi se u svrhu izolacije i pročišćavanja produkta reakcije PCR iz agaroznog gela, pri čemu su korišteni standardni uvjeti elektroforeze. Molekula DNA vizualizirana je pod UV svjetlom transiluminatora. Usporedbom s DNA standardom na gelu, identificirani su željeni fragmenti DNA koji su precizno izrezani skalpelom i pohranjeni u tubice za centrifugiranje od 2 mL. Za pročišćavanje željene DNA iz gela korišten je komercijalni komplet *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) prema uputama proizvođača.

3.2.3.4. Konstruiranje vektora za biokemijske metode

Plazmid pDM304_HA_EfaAI, već prethodno konstruiran u našem laboratoriju, digestiran je s restrikcijским enzimima BglIII i SpeI, kako bi se uklonio insert efaAI, a vektor se pripremio za ligaciju s umnoženim insertima RapA, čija je kodirajuća sekvenca omeđena mjestima koje navedeni restrikcijški enzimi prepoznaju. U ovom slučaju bilo je potrebno napraviti uzastopnu digestiju, s obzirom na to da enzim SpeI-HF ima optimalnu aktivnost u puferu CutSmart, a enzima BglIII u puferu 3.1. Kako bi se uklonio enzim i pufer od prve digestije, uzorak se pročistio korištenjem kompleta za pročišćavanje DNA iz enzimatskih reakcija, *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen), prema protokolu proizvođača. Potrebna količina restrikcijških enzima određena je prema koncentraciji korištene DNA i koncentraciji restrikcijških enzima. Koncentracija enzima BglIII iznosi 10000 U/mL, a SpeI-HF 20000 U/mL. Oznaka U (engl. *unit*) predstavlja jedinicu enzimske aktivnosti koja je definirana kao količina enzima potrebna za digestiju 1 µg DNA bakteriofaga λ u ukupnom volumenu reakcije 50 µL na 37 °C u vremenu od 1 h.

Nakon digestije, potrebno je defosforilirati vektor, dodatkom 1 µL CIAP-a i 1× defosforilacijskog pufera na 37 °C na 1 h. Potom su fragmenti DNA razdvojeni agaroznom gel elektroforezom, a potrebni vektor je izrezan i pročišćen iz gela pomoću kompleta za purifikaciju *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen).

Za ligaciju vektora pDM304_HA i inserta RapA_ΔCAAX, ligacijska smjesa sadrži oko 100 ng vektora pDM304_HA, oko 83 ng inserata RapA(wt/S19N/Q65E)_ΔCAAX, 0,2 µL T4 DNA ligaze, 10x pufer za ligaciju i 2 µL 50 % PEG 4000, što čini ukupan volumen od 20 µL. Potreban volumen inserta izračunat je po sljedećoj formuli:

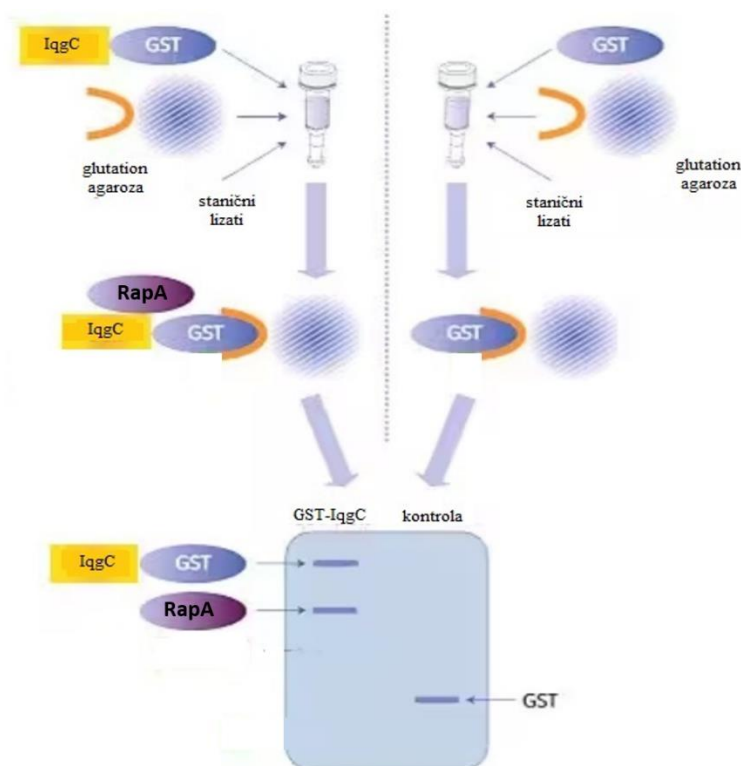
$$\frac{\text{masa vektora (ng)} \times \text{veličina inserta (kb)}}{\text{veličina vektora (kb)}} \times \text{molarni omjer inserta i vektora} = \text{masa inserta (ng)}$$

Reakcije ligacije su se odvijale na 16 °C preko noći. Dio ligacijske smjese korišten je za transformaciju kompetentnih bakterija *E.coli* 10-beta (NEB), dok je ostatak spremljen na -20 °C. Klonovi transformiranih bakterija nasađeni su u tekući LB medij, a potom je komercijalnim kompletom izolirana plazmidna DNA. Koristeći restrikcijški enzim HindIII-HF u CutSmart puferu, napravljene su testne digestije, kako bi se plazmidi linearizirali. Na gel elektroforezi izabrani su odgovarajući klonovi koji su potom poslani na sekvencioniranje.

3.2.4. Metode proteinske biokemije

3.2.4.1. Testiranje proteinskih interakcija metodom GST-pull down

GST-pull-down je biokemijska metoda koja služi za povlačenje proteina interaktora rekombinantnog proteina s GST biljekom koji je vezan na kolonu glutation-agaroze. Ovom metodom može se testirati interakcija s određenim proteinom iz staničnog lizata, koja se potvrđuje vezanjem specifičnog protutijela. U ovu svrhu koristi se biljeg glutation-S-transferaza (GST), eksprimirana s proteinom IqgC kao fuzijski protein. GST se veže na glutation-agarozu. Ukoliko glutation-agarozu s vezanim proteinom GST-IqgC dodamo stanični lizat, proteini interaktori proteina IqgC će ostati imobilizirani na koloni. Kako bi se detektirala moguća interakcija proteina IqgC s proteinom RapA, konstruirani plazmidi sadrže gen *rapA* fuzioniran s biljekom HA, što omogućuje da se u metodi Western blot koristi antitijelo anti-HA. Pročišćeni rekombinantni protein s GST biljekom, GST-IqgC, prethodno je pripremljen u laboratoriju. GST-IqgC se navezuje na agarozne kuglice te prilikom inkubacije sa staničnim lizatom veže proteine interaktore. Kako bi se uklonili svi nevezani proteini iz staničnog lizata, kolona glutation-agaroze ispiri se s puferom za kolonu. Na slici 7 prikazan je pregled metode *pull-down*. Na desnoj strani slike prikazan je kontrolni eksperiment. Na lijevoj strani, protein RapA (ljubičasti) identificiran je pomoću SDS-PAGE elektroforeze kao interaktor proteina mamca (protein IqgC).



Slika 7. Pregled metode GST-pull down.

Agarozne kuglice pripremaju se tako da se ispiru s puferom za kolonu, kako bi se uklonio etanol u kojem se čuvaju. 400 μL glutation-agaroze doda se u tubicu za centrifugiranje od 2 mL i ispiru se 5 puta s 1 mL pufera za kolonu. Zatim se u tubicu za centrifugiranje s ispranom agarozom doda 1 mL pufera za kolonu i 350 μL proteina GST-IqgC te proteina GST koji služi kao negativna kontrola. Vezanje proteina GST provodi se na rotatoru na brzini 3 rpm, na temperaturi od 8 °C u trajanju od 2 sata. Nakon navezivanja, ispiru se s puferom za kolonu pet puta po 1 mL, a potom i pet puta s 1 mL pufera za lizu stanica *D. discoideum*.

Za to vrijeme se pripreme stanice. Korištene su stanice AX2 transfecirane plazmidom s kojeg se eksprimira protein RapA (wt/S19N/Q65E). Stanice se prethodno pokrenu i pripreme tako da na dan eksperimenta koncentracija bude do 4×10^6 st/mL. Odvoji se po $1,2 \times 10^8$ stanica iz prethodno nasadenih staničnih kultura. Stanice se centrifugiraju 3 minute na 800 g pri temperaturi od 4 °C. Ispiru se u 30 mL hladnog fosfatnog pufera i ponovno se centrifugiraju u istim uvjetima, nakon čega se resuspendiraju u 2 mL pufera za lizu stanica te inkubiraju na ledu 3 minute. Nakon toga se centrifugiraju 8 minuta na 7197 g. Supernatant (700 μL) se zatim podijeli u tubice za centrifugiranje s prethodno ispranom agarozom prema tablici 3. Po 60 μL lizata se odvoji i skuha pet minuta sa 60 μL 2x SDS pufera i spremi na -20 °C za metodu Western blot. Uzorci se potom miješaju na rotatoru na 8 °C u trajanju od 2 sata nakon čega se 5 puta ispiru puferom za lizu stanica. Slijedi denaturacija proteina koji su se vezali na glutation-agarozu kuhanjem u 1x SDS puferu za uzorke, nakon čega su uzorci spremni za analizu metodom Western blot s antitijelom anti-HA.

Tablica 3. Kombinacije staničnih lizata i agaroznih kuglica s vezanim proteinom GST-IqgC ili proteinom GST, korištene za test *pull-down*

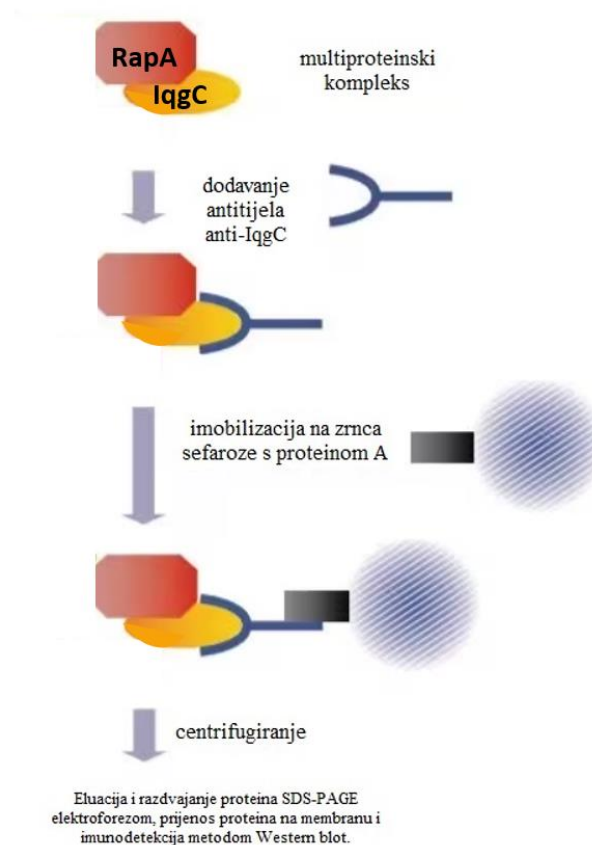
Tipovi stanica	GST-IqgC pull-down	GST pull-down
AX2 stanice		
AX2 s RapA(wt)	100 μL GST-IqgC agaroze +	100 μL GST agaroze + 700
AX2 s RapA(S19N)	700 μL lizata stanica	μL lizata stanica
AX2 s RapA(Q65E)		
Prazna proba	100 μL GST-IqgC agaroze	100 μL GST agaroze

3.2.4.2. Testiranje proteinskih interakcija metodom koimunoprecipitacije

Koimunoprecipitacija je metoda za istraživanje interakcija među proteinima koja se

bazira na principu reakcije antigena i antitijela. Određeni antigen precipitira se iz smjese proteina pomoću specifičnog antitijela. Antitijelo se imobilizira na zrnca sefaroze s proteinom A (GE Healthcare) koja se koriste za imunološko izdvajanje specifičnog proteina iz staničnog lizata. Koimunoprecipitacijom pomoću protutijela koje je specifično za protein od interesa, utvrđujemo je li protein od interesa koprecipitiran iz smjese proteina zbog toga što tvori kompleks s primarno imunoprecipitiranim proteinom.

Antitijelo za protein IqgC imobilizirano je na zrnca sefaroze s proteinom A. Protein A se imunoprecipitira iz smjese, zajedno s antitijelom specifičnim za protein IqgC (slika 8). S obzirom na to da se na taj način koimunoprecipitira protein IqgC, ukoliko protein IqgC veže protein RapA, iz lizata stanica će se izdvojiti i protein RapA, kojeg možemo detektirati metodom Western blot. U tu svrhu koristimo antitijelo anti-HA i na taj način potvrditi interakciju proteina.



Slika 8. Pregled metode koimunoprecipitacija.

Korištene su stanice AX2 transfecirane plazmidom s kojeg se ekspirira protein RapA (wt/S19N/Q65E). Stanice se pokrenu i pripreme tako da na dan eksperimenta koncentracija

bude do 4×10^6 st/mL.

Prvo se pripremi pufer za lizu stanica. Nakon toga se 600 μ L sefaroze s proteinom A ispere tri puta s po 1 mL pufera za lizu te se po 90 μ L sefaroze alikvotira u tubice za centrifugiranje. Zatim se uzme $1,6 \times 10^8$ stanica, centrifugiraju se 3 minute na 800 g na temperaturi od 4 °C. Stanice se isperu hladnim fosfatnim puferom, centrifugiraju se u istim uvjetima te resuspendiraju u 3 mL pufera za lizu stanica. Nakon toga se stanični lizat doda u tubice sa sefarozom i anti-IqgC anti-serumom prema tablici 4. Po 60 μ L lizata se odvoji i skuha pet minuta sa 60 μ L $2 \times$ SDS pufera i spremi na -20 °C za Western blot. Pripremljeni uzorci miješani su na rotacijskoj miješalici na +8 °C preko noći.

Tablica 4. Kombinacije lizata stanica, sefaroze s proteinom A i anti-IqgC anti-seruma, korištene za koimunoprecipitaciju

Tip stanica	Co-IP	Co-IP bez antitijela
AX2 RapA (wt)		
AX2 s RapA (S19N)	90 μ L protein A-sefaroze +	90 μ L protein A-sefaroze +
AX2 s RapA (Q65E)	120 μ L anti-IqgC anti-seruma + 1200 μ L lizata stanica	1200 μ L lizata stanica

Uzorci su isprani pet puta s po 1 mL pufera za lizu stanica, nakon čega su skuhani 5 minuta uz dodatak $1 \times$ SDS pufera za uzorke kako bi se denaturirali proteini vezani na sefarozu preko proteina A. Nakon kuhanja, lizati se kratko centrifugiraju kako bi se zrnca spustila, a supernatant se premjesti u čiste tubice za centrifugiranje i spreman je za kasniju analizu Western blot metodom s antitijelom anti-HA.

3.2.4.3. Natrij-dodecil-sulfat – poliakrilamid gel elektroforeza (SDS-PAGE)

Elektroforeza u denaturirajućim uvjetima korištena je za analizu proteina metodom Western blot. U vertikalnom sustavu za elektroforezu *Mini-PROTEAN Tetra System* (Biorad) u prisutnosti SDS-a rađena je elektroforeza u poliakrilamidnom gelu. Prvo su pripremljeni 12 % gelovi s 4 % gelom za sabijanje debljine 1 mm. Gelovi su rađeni u tikvicama na ledu, gdje su kao posljednje komponente dodani APS, koji inicira polimerizaciju akrilamida i bisakrilamida, te TEMED, koji je katalizator reakcije. U prethodno pripremljena stakalca na

stalku za izlivanje gelova (Biorad) izliven je gel za razdvajanje na koji je dodan izopropanol, koji sprječava oksidaciju koja inhibira polimerizaciju gela. Nakon što je gel za razdvajanje polimeriziran, pripremljen je gel za sabijanje te izliven na gel za razdvajanje s kojeg je uklonjen izopropanol. Stavljani su češljevi za jažice i gelovi su ostavljeni tako još dva sata kako bi se gel za sabijanje polimerizirao.

Nakon pripreme i polimerizacije gelova, stakalca se postave u kadu za elektroforezu. U jažice se doda po 10 μ L uzorka i 10 μ L obojanog proteinskog standarda *PageRuler Plus Prestained*. Elektroforeza se provodi u 1 \times SDS puferu za elektroforezu ito prvo pri naponu od 120 V, dok se uzorci ne sabiju, a potom pri 150 V. Trajanje elektroforeze je oko 1,5 sat.

3.2.4.4. Prijenos proteina na membranu i njihova imunodetekcija metodom Western blot

Western blot je metoda koja služi za prijenos proteina s gela na membranu. Nakon razdvajanja na elektroforezi u poliakrilamidnom gelu, proteini iz gela se prenose na poliviniliden difluorid (PVDF) membranu polusuhim prijenosom.

Priprema za prijenos proteina ide tako da se u uređaj za prijenos stavi filter papir koji je namočen puferom za prijenos. Na filter papir ide PVDF membrana koja je prvo aktivirana 20 sekundi u metanolu, zatim isprana redestiliranom vodom, a potom i puferom za prijenos. Na membranu se postavi gel s proteinima, a potom još jedan filter papir namočen u puferu za prijenos. Prijenos proteina provodi se 1 h pri naponu od 12 V. Kad je prijenos završen, membrana s prenesenim proteinima je blokirana 1 sat u puferu za blokiranje (5 % BSA pripremljen u 1x PBS puferu) na tresilici, kako bi se spriječilo nespecifično vezanje antitijela. Zatim se membrana ispire 3 puta po 5 minuta u 1x PBS puferu te se inkubira jedan sat na sobnoj temperaturi uz trešnju s primarnim antitijelom koje je pripremljeno u 1 \times PBS puferu.

Idući dan se primarno antitijelo ukloni, a membrana se ispire 5 puta po 5 minuta u 1 \times PBS puferu, zatim se inkubira s odgovarajućim sekundarnim antitijelom, pripremljenim u puferu za ispiranje, oko 40 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga slijedi ispiranje, 6 puta po 5 minuta u 1 \times PBS puferu. Za vizualizaciju se koristi metoda kemiluminiscencije, zbog čega je sekundarno antitijelo konjugirano s peroksidazom, što omogućuje proizvodnju svjetlosnog signala nakon dodatka supstrata za peroksidazu, vodikovog peroksida. Koristi se i pojačivač, koji pojačava i produljuje nastali signal. Supstrat za kemiluminiscenciju se pomiješa s pojačivačem (Biorad) u omjeru 1:1. Zatim se membrana postavi na čistu podlogu (korištena je prozirna košuljica za papire, jer je prikladna za slikanje). Supstrat se ravnomjerno nakapa po membrani te se inkubira 5 minuta. Višak supstrata se ukloni, a membrana se slika *Uvitec* uređajem. PVDF membrane su prikladne za višekratno korištenje. Nakon kemiluminiscentne

detekcije, membrana se ispiru u vodi kako bi se uklonio višak supstrata, nakon čega slijedi inkubacija u puferu za uklanjanje antitijela 10-20 minuta. Potom se membrana ispiru 3 puta po 5 minuta u puferu za ispiranje, nakon čega je membrana spremna za ponovno korištenje s drugim primarnim antitijelima, te se protokol provodi od koraka blokiranja.

Tablica 5. Razrjeđenja korištenih primarnih i sekundarnih antitijela

Antitijelo	Omjer
anti-HA monoklonalno	1:1500
anti-CI monoklonalno	1:1500
anti-IqgC poliklonalno	1:1000
GAR HRP	1:3000
GAM HRP	1:3000

3.2.5. Test međustanične adhezije (engl. *cell-cell adhesion*)

Tijekom staničnog razvoja, *Dictyostelium* stanice pokazuju promjene u staničnoj adhezivnosti. Tijekom prvih sati razvoja, stanice postepeno postaju kohezivnije, a nakon 4-6 sati gladovanja, pokazuju adheziju rezistentnu na EDTA, dok je adhezija osjetljiva na EDTA prisutna širom razvoja. Za testiranje međustanične adhezije većinom se primjenjuju dvije metode. Prva metoda koristi promjene u raspršivanju svjetla koristeći aglutinometar koji mjeri staničnu agregaciju u malim volumenima i u jednakim uvjetima. Metoda je jako pouzdana, kvantitativna, osjetljiva i reproducibilna, ali zahtjeva opremu koja nije komercijalno dostupna. Druga metoda je test pojedinačnih stanica, odnosno brojanje stanica koje ne sudjeluju u formiranju agregata. Ne zahtjeva posebnu opremu, ali nije tako osjetljiva (Bozzaro, 2019).

U ovom eksperimentu karakterizira se soj mutanta *iqgC* u kontekstu međustanične adhezije. Kvantifikacijom postotka stanica koje ostanu izvan agregata tijekom prvih šest sati agregacije i usporedbom sa stanicama divljeg tipa mjeri se međustanična adhezija. Ovaj test omogućuje razlikovanje adhezije osjetljive na EDTA, posredovane proteinom gp24, i adhezije otporne na EDTA, posredovane proteinom gp80.

3.2.5.1. Mjerenje međustanične adhezije

S obzirom na to da laboratorij ne posjeduje aglutinometar, uređaj kojim se uobičajeno utvrđuje formiranje agregata mjerenjem apsorbirane svjetlosti koja je proporcionalna broju pojedinačnih stanica, pokušalo se razviti ekvivalentan eksperiment korištenjem rotatora.

Stanice iz suspenzije se prebroje u hemocitometru. Izračuna se volumen stanica koji je potreban za eksperiment, tako da koncentracija stanica iznosi 1×10^7 st/mL. Izračunati volumen se odlije u Falcon epruvetu i centrifugira se tri minute na 700 g na temperaturi od 4 °C. Stanice se dva puta ispiru hladnim fosfatnim puferom. Nakon ispiranja, stanice se resuspendiraju u 15 mL hladnog fosfatnog pufera. Prije toga je pripremljeno 28 tubica koje su ohlađene na ledu. U polovinu od njih je dodano 20 µL 0,5 M EDTA, tako da konačna koncentracija EDTA bude 10 mM, jer je ukupni volumen uzorka 1 mL. Zatim se u tubice otpipetira po 1 mL stanica koje se prije stavljanja na rotator malo izmješaju. Rotator se namjesti na 5 rpm u prostoriji u kojoj je temperatura između 20 i 22 °C. Napravi se i slijepa proba koja sadrži 1 mL fosfatnog pufera. Zatim se svi uzorci stave se na rotator. Odmah se uzmu početni uzorci t_0 koji se oprezno otpipetiraju u kivetu i mjeri im se optička gustoća (OD) na spektrofotometru na 600 nm. Postupak se ponavlja svako sat vremena kroz razdoblje od 6 sati.

3.2.5.2. Mjerenje stanične adhezivnosti testom pojedinačnih stanica (*engl. single-cell assay*)

Obzirom da eksperiment u kojem se koristio rotator umjesto aglutinometra nije davao rezultate, jer se nedostatak aglutinometra ipak nije mogao nadomjestiti, napravljen je test gdje se adhezivnost stanica mjerila brojanjem pojedinačnih stanica, odnosno onih stanica koje su izvan agregata. Nastanak agregata stanica u uzorku rezultira smanjenjem broja pojedinačnih stanica u toj suspenziji, te se na taj način indirektno mjeri agregacija. Ovom metodom nije moguće dobiti podatke o veličini formiranih agregata.

Staklene epruvete se pripremi tako da im se doda 400 µL fosfatnog pufera, odnosno 400 µL fosfatnog pufera s EDTA. Potrebna koncentracija EDTA je 20 mM, tako da je dodano 1 mL 0,5 M EDTA u 24 mL pufera koji je otpipetiran. Na dan eksperimenta, stanice iz suspenzije se prebroje i namjeste na 1×10^7 st/mL da se inducira gladovanje. Određeni volumen stanica se centrifugira tri minute na 700 g pri temperaturi od 4 °C. Stanice se ispiru dva puta s 30 mL fosfatnog pufera i konačno resuspendiraju u 25 mL u tikvici od 100 mL. Stanice se zatim stave na tresilicu na brzinu od 150 rpm na temperaturu od 22 °C.

Prvi uzorak se uzima odmah po inicijaciji gladovanja (t_0). Uzima se po 2 mL divljeg tipa i stanica deficitarnih za IqgC te se otpipetiraju u Falcon tube od 10 mL te se centrifugira po prethodno navedenim uvjetima. Talog stanica ispire se s 2 mL fosfatnog pufera, a potom resuspendira u 1 mL fosfatnog pufera. Po 400 µL stanica resuspendiranih u fosfatnom puferu se otpipetira u epruvete (sa i bez EDTA) i stavi na tresilicu na brzinu od 268 rpm, koja se nalazi u sobi čija je temperatura između 20 i 22 °C. Nakon 30 minuta trešnje, doda se 200 µL glutaraldehida i stanice se vrata na trešnju još 10 minuta. Glutaraldehyd fiksira agregate i

sprječava daljnju međustaničnu adheziju. Na kraju se uzorcima doda još 3 mL hladnog fosfatnog pufera, epruvete se pokriju parafilmom i nježno invertno resuspendiraju. Mala količina stanica se otpipetira u komoricu za brojanje i pojedinačne stanice se izbroje pod mikroskopom. Postupak se ponavlja svako sat vremena tijekom šest sati.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Adhezija stanica je proces koji je važan za komunikaciju među stanicama, regulaciju različitih procesa kao što su diferencijacija, migracija stanica, preživljavanje i životni ciklus te razvoj i održavanje tkiva (Huang i Inger, 1999). Jedan od modelnih organizama korišten za istraživanje ovog procesa je i protist *Dictyostelium discoideum*, kod kojeg je pravilna međustanična adhezija neophodna za višestanični razvoj organizma (Bozzaro i Ponte, 1995). Mehanizmi regulacije i proteini koji sudjeluju u ovom procesu nisu u potpunosti istraženi. Protein IqgC ima više uloga kod ove društvene amebe, te sudjeluje u regulaciji makropinocitoze i fagocitoze, kao i citokineze te kemotaksije stanica (Lee i sur., 2010; Marinović i sur., 2019). U svakodnevnom laboratorijskom radu s ovom amebom je primijećeno kako bi protein IqgC mogao imati ulogu u regulaciji adhezije, što smo provjerili testovima međustanične adhezije. Poznato je da protein IqgC veže malu GTPazu RasG. IqgC posjeduje aktivnost RasGAP, odnosno stimulira GTP-hidrolaznu aktivnost GTPaze RasG iz *D. discoideum* i ljudske GTPaze H-Ras, što ga svrstava u netipične predstavnike proteina srodnih proteinima IQGAP. Budući da je u prethodno objavljenom interaktomu proteina IqgC identificirana nekolicina malih GTPaza kao mogućih interaktora (Marinović i sur. 2019), interesantno je istražiti koja od tih GTPaza uistinu veže protein IqgC.

Kako bi se ispitala uloga proteina IqgC u regulaciji međustanične adhezije, testirane su stanice divljeg tipa i stanice deficitarne za protein IqgC. Stanice u fazi rasta su jedva kohezivne, na agaru ili staklu prolazno prijanjaju jedna uz drugu, dok pri rastu u suspenziji uz trešnju formiraju slabe agregate koji lako disociraju dodatkom EDTA. Tijekom višestaničnog razvoja *D. discoideum* razlikuju se dva tipa adhezije obzirom na osjetljivost na EDTA (vidi poglavlje 2.4.7.), za oba soja je rađen eksperiment u prisutnosti i odsutnosti EDTA, čiji su rezultati prikazani pomoću grafa na slici 9, a time se može razaznati razlika između uloge proteina u EDTA-rezistentnoj i EDTA-osjetljivoj adhezivnosti. Tijekom prvih sati razvoja, stanice postepeno postaju kohezivnije te nakon 4-6 sati gladovanja eksprimiraju molekule koje omogućuju adheziju u prisutnosti EDTA, dok je adhezija osjetljiva na EDTA prisutna tijekom cijelog ranog razvojnog ciklusa. Na slici 11 prikazana je promjena u broju i veličini agregata tijekom eksperimenta.

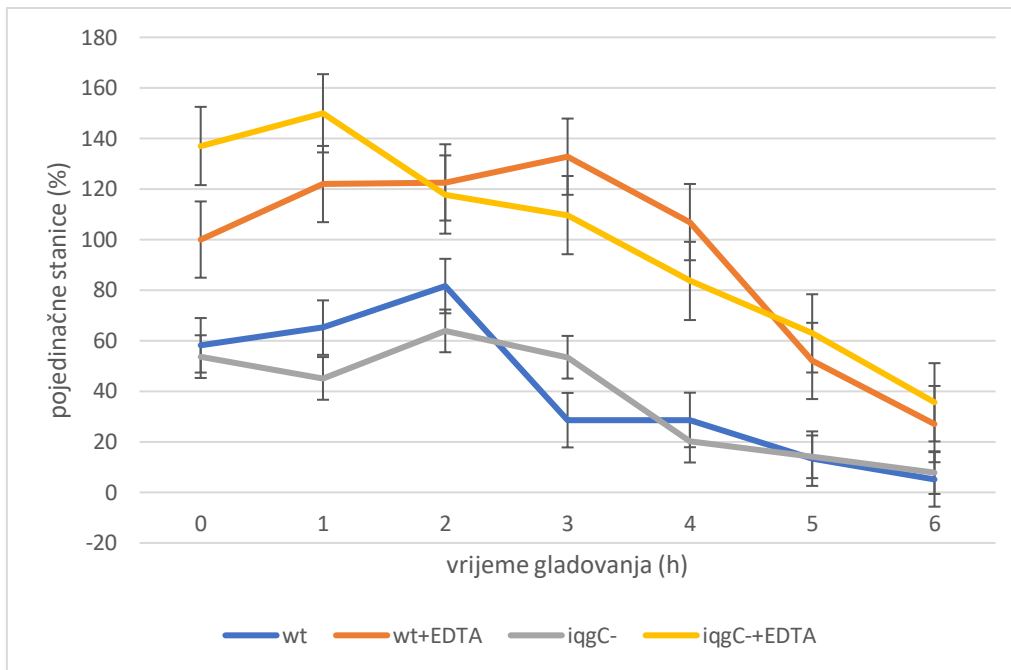
U drugom dijelu istraživanja željeli smo provjeriti je li IqgC interaktor proteina RapA, budući da je ta mala GTPaza pronađena u interaktomu proteina IqgC (Marinović i sur., 2019). Kako bi se testirala interakcija između ova dva proteina, korištene su biokemijske metode. Rezultati eseja *pull-down* prikazani su na slici 11, dok je rezultate koimunoprecipitacije moguće

vidjeti na slici 15. Protein RapA u stanicama *D. discoideum* ključni je regulator stanične adhezije, povezan je s nekoliko signalnih puteva uključujući migraciju stanica, odgovore na osmotski stres i fagocitozu, a djeluje kao regulator preustroja citoskeleta tijekom migracije stanica (Jeon i sur., 2021). Za testiranje interakcije proteina RapA s IqgC korištena su tri različita oblika ovog proteina: divlji tip proteina, koji kruži između aktivnog i neaktivnog stanja, konstitutivno neaktivnog mutanta (S19N) i konstitutivno aktivnog mutanta (Q65E). Ovi proteini su eksprimirani bez motiva CAAX, zato što se protein pune duljine ne eksprimira stabilno u stanicama. Proteini su eksprimirani kao fuzijski konstrukti s HA biljegom, kako bi se kasnijom analizom Western blot i korištenjem anti-HA antitijela, mogla potvrditi interakcija proteina.

4.1. PROTEIN IqgC VJEROJATNO SUDJELUJE U REGULACIJI ADHEZIJE STANICA

Međustanična adhezija određena je testom pojedinačnih stanica, u kojem se adhezija stanica, odnosno stvaranje agregata, određivala brojanjem pojedinačnih stanica koje ne sudjeluju u stvaranju agregata. Kako je vrijeme od inicijacije gladovanja prolazilo, u uzorku stanica se povećavao broj agregata, a broj pojedinačnih stanica se smanjivao te postotak pojedinačnih stanica u uzorku određuje napredak stanica u višestaničnom razvoju. Kako bi se agregacija stanica tijekom prvih šest sati gladovanja prikazala i vizualno, uzorci su dokumentirani mikroskopijom tamnog polja.

Na slici 9 prikazan je graf koji prikazuje postotak pojedinačnih stanica tijekom 6 sati gladovanja za sojeve divljeg tipa (AX2) i soj mutanta *iqgC*, sa i bez EDTA, kako bi se detektirala i ukupna adhezija i adhezija otporna na EDTA. Broj pojedinačnih stanica prikazan je kao postotak od broja pojedinačnih stanica divljeg tipa AX2 stanica kojem je dodan EDTA, u točki inicijacije gladovanja (t_0).

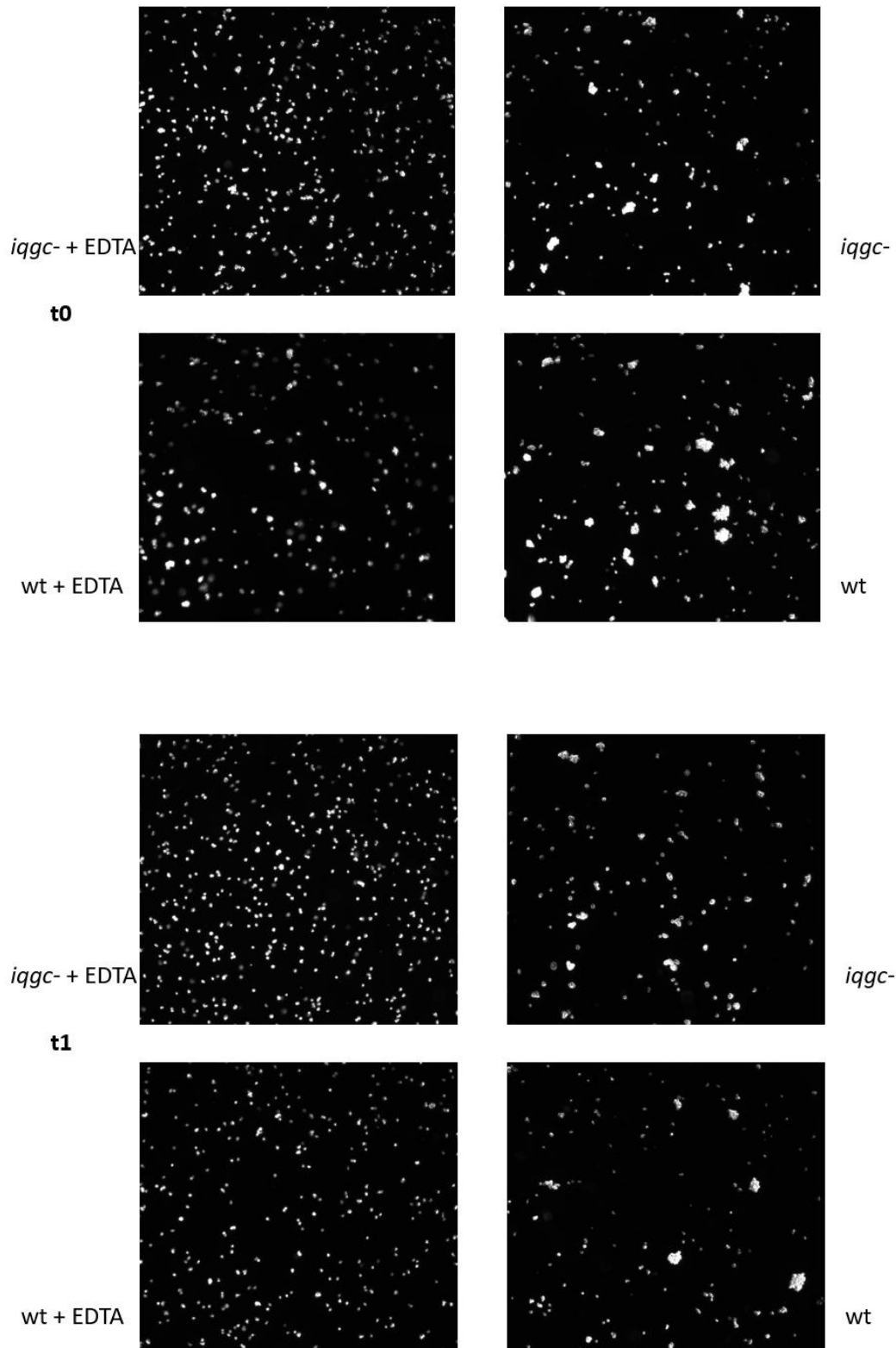


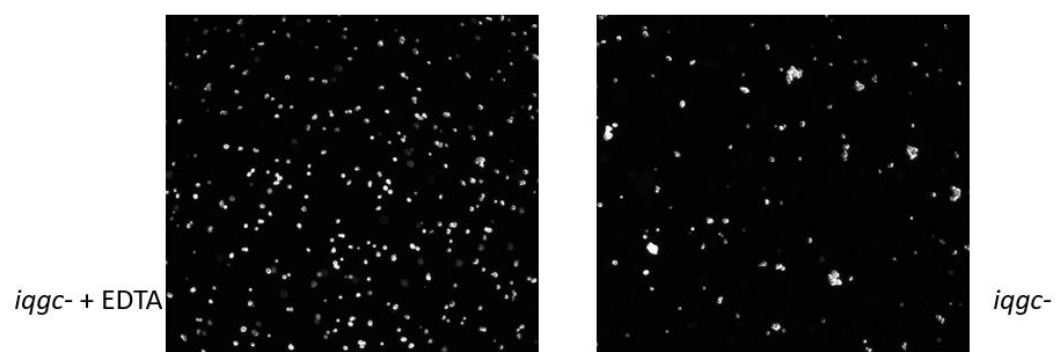
Slika 9. Određivanje međustanične adhezije testom pojedinačnih stanica. Graf prikazuje broj pojedinačnih stanica izraženih kao postotak kontrole, gdje je kontrola broj pojedinačnih stanica divljeg tipa s dodatkom EDTA (wt+EDTA) na početku gladovanja ($t=0$), u vremenu gladovanja od 6 sati.

U početnim satima gladovanja, vidljiva je velika razlika između stanica s dodanim EDTA i onih bez, zato što stanice lako disociraju uz prisutnost EDTA, odnosno prisutna je adhezija osjetljiva na EDTA koja je posredovana proteinom gp24. Nakon otprilike 3-4 sata, naglo se smanjuje broj pojedinačnih stanica u suspenziji s EDTA, jer dolazi do ekspresije proteina gp80 koji sudjeluje u adheziji rezistentnoj na EDTA. Ako usporedimo stanice mutanta kojima je dodan EDTA sa stanicama divljeg tipa koje sadrže EDTA, vidljivo je da je broj pojedinačnih stanica mutanta u prvim satima veći od broja stanica divljeg tipa, čime zaključujemo da bi protein IqgC mogao imati ulogu u adheziji osjetljivoj na EDTA, obzirom da takve stanice tvore manje agregata u odnosu na divlji tip stanica. Također možemo zaključiti kako se protein IqgC eksprimira u ranim fazama razvoja, što je i pokazano ranije (Marinović i sur 2019). Usporedbom stanica divljeg tipa i stanica mutanta kojima nije dodan EDTA, ne zamjećuje se veća razlika u agregaciji stanica, stoga je pretpostavka da protein IqgC nema ulogu u adheziji rezistentnoj na EDTA.

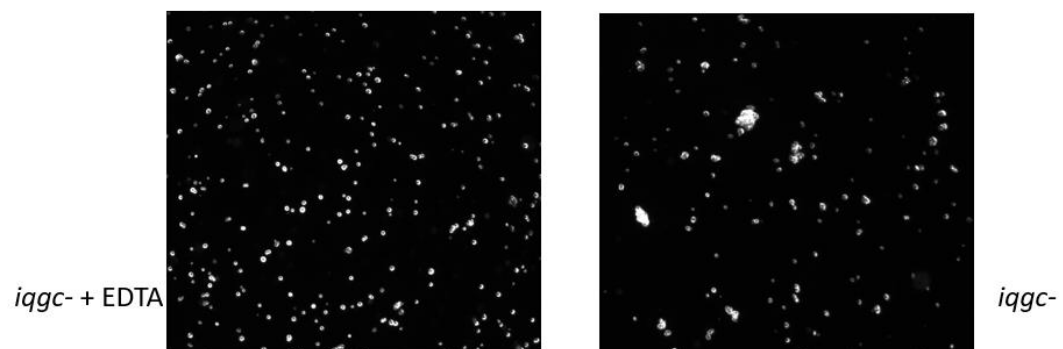
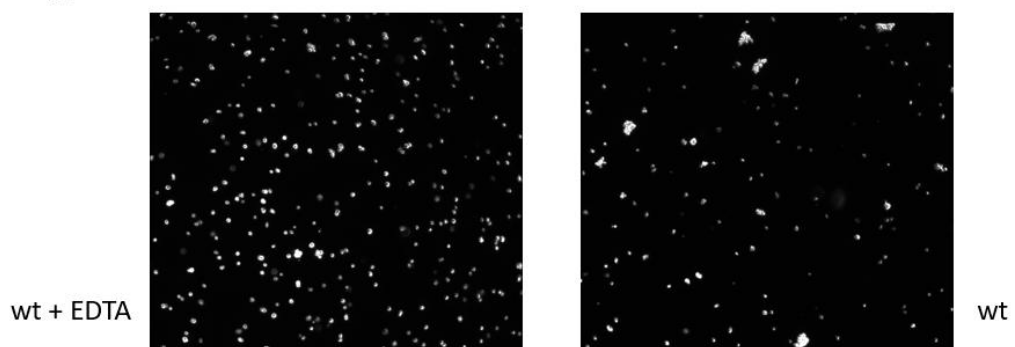
Kao što je već spomenuto, test pojedinačnih stanica ne daje uvid u veličinu i broj agregata. Dio uzorka stanica se koristio za brojanje u hemocitometru, a dio se koristio za slikanje na svjetlosnom mikroskopu. Na slici 10 mogu se vidjeti stanice iz čega možemo zaključiti da

nema veće razlike u veličini i broju agregata stanica divljih tipa i stanica mutanata te da se u kasnijim satima gladovanja broj agregata općenito smanjuje, dok njihova veličina raste. Vidljivo je kako se s vremenom smanjuje broj pojedinačnih stanica dok raste broj agregata, a vidljivo je i povećanje veličine agregata s vremenom.

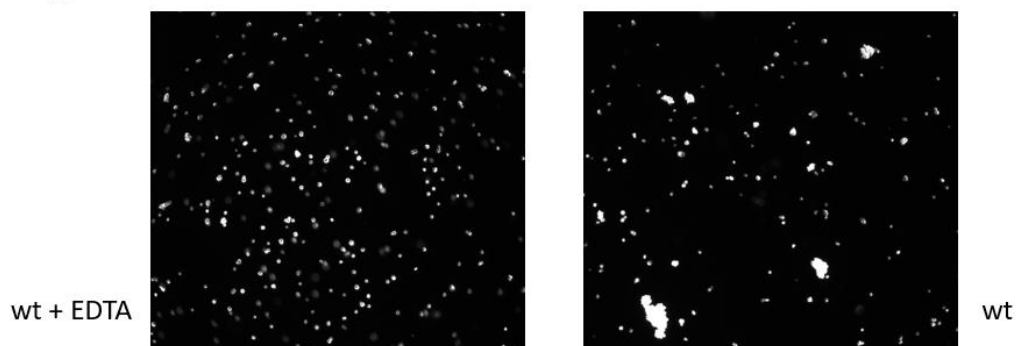


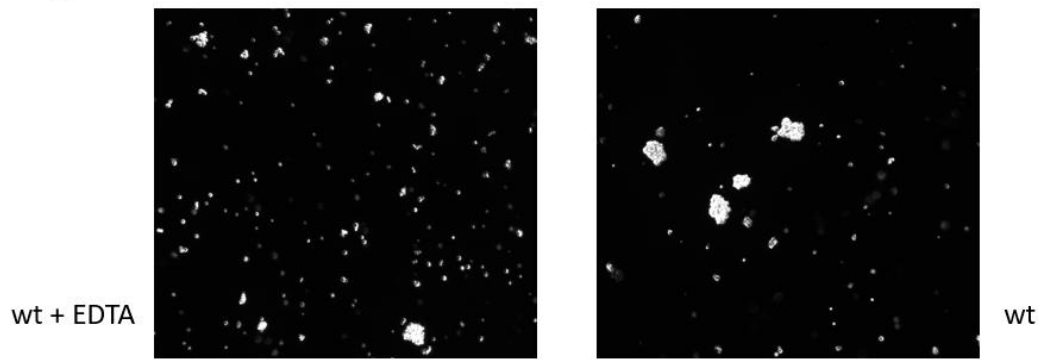
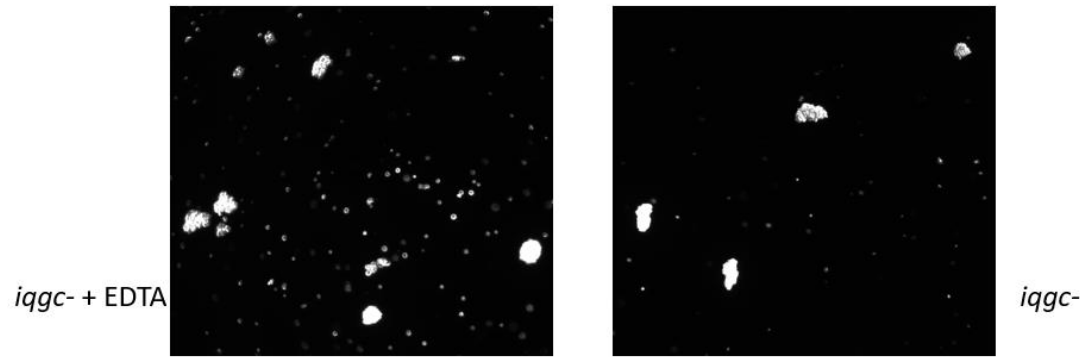
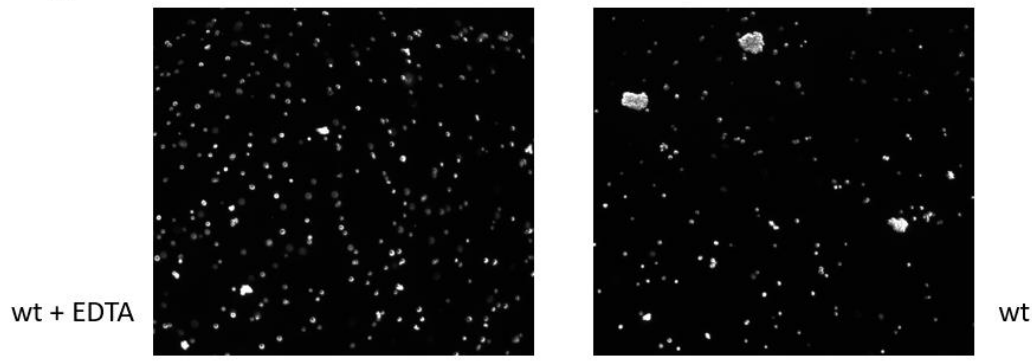
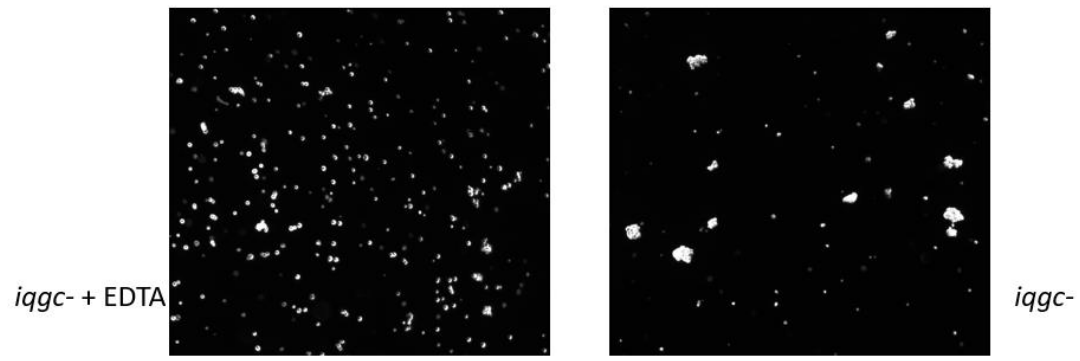


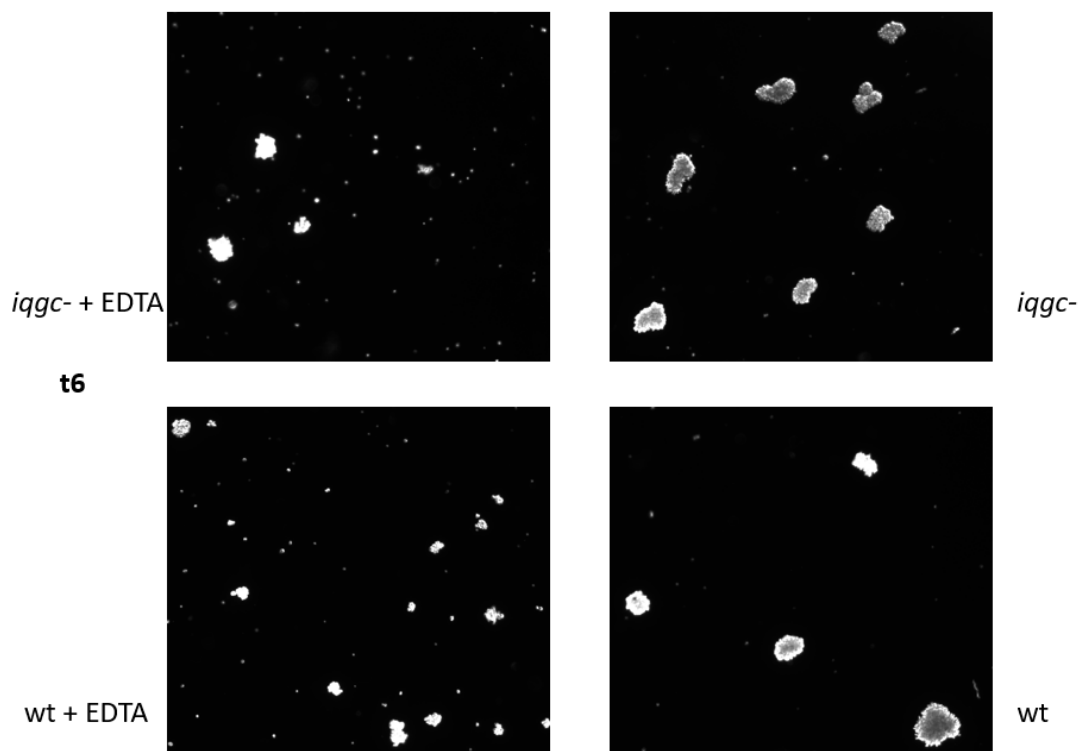
t2



t3







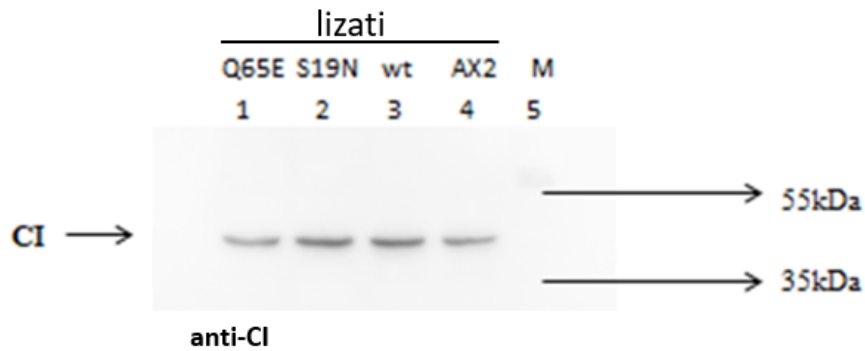
Slika 10. Mikroskopska slika testa adhezije stanica.

S obzirom na to da protein IqgC vjerojatno sudjeluje u regulaciji adhezije osjetljive na EDTA, bilo bi dobro rezultate eksperimenta potvrditi korištenjem aglutinometra. Metoda mjerenja stanične adhezije aglutinometrom je pouzdana, reproducibilna, kvantitativna i dovoljno osjetljiva da detektira što utječe na promjenu adhezije, a istodobno može mjeriti agregaciju stanica u 24 uzorka pri istim uvjetima (Bozzaro, 2019).

4.2. PROTEIN IqgC OSTVARUJE INTERAKCIJU S PROTEINOM RapA

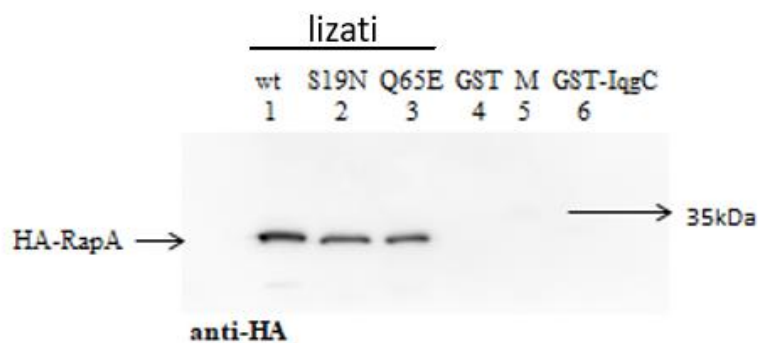
4.2.1. Rekombinantni protein IqgC veže protein RapA iz staničnog lizata

Prije samog pokusa, metodom Western blot detektirana je količina uzoraka i količina rekombinantnih proteina HA-RapA u korištenim staničnim sojevima, odnosno, testirani su stanični lizati s divljim tipom proteina RapA (wt), S19N (konstitutivno negativni mutant proteina RapA u kojem serin na poziciji 19 zamijenjen asparaginom) i Q65E (konstitutivno aktivna forma proteina RapA kod kojeg se umjesto glutamina na poziciji 65 nalazi glutamat). Slika 11 prikazuje membranu inkubiranu s anti-CI antitijelom (anti-korteksilin I), odnosno pokazuje ekspresiju proteina korteksilina u svim uzorcima i korištena je kao kontrola količine uzoraka.



Slika 11. Analiza ekspresije proteina korteksilina u staničnim lizatima.

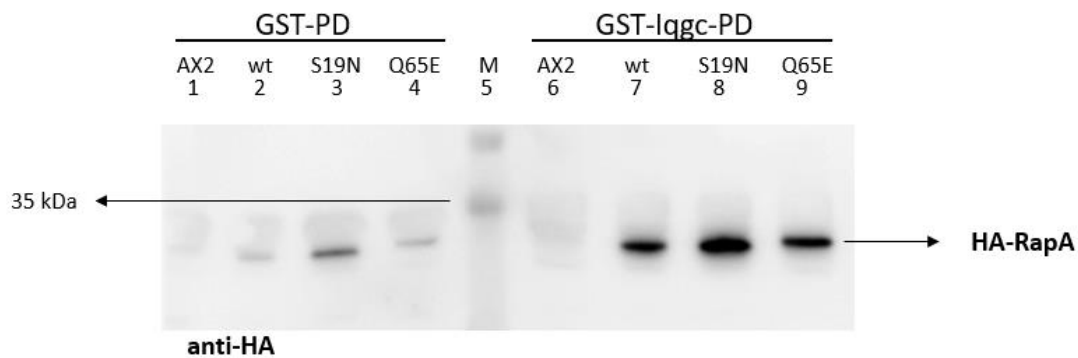
Stanični lizati testirani su i s antitijelom anti-HA, čime je utvrđeno da je ekspresija rekombinantnih proteina u stanicama zadaovoljavajuća, što je vidljivo na slici 12. Lizati stanica *D. discoideum* AX2 transformiranih s vektorima s kojih se ekspimiraju wt, Q65E i S19N varijante proteina RapA prikupljeni su i razina ekspresije proteina RapA obilježenih s biljekom HA je određena metodom Western blot s monoklonskim anti-HA antitijelom (jažice 1, 2 i 3). U jažicama 4 i 6 prikazan je rezultat testa *pull-down* s obje agaroze (s vezanim proteinima GST i GST-IqgC) inkubirane sa čistim puferom za lizu stanica kako bi se pokazalo da se antitijelo ne veže nespecifično za neku od komponenata. Također, testirana je inkubacija agaroze s proteinima GST i GST-IqgC bez staničnih lizata, kako bi se pokazalo da se antitijelo ne veže nespecifično na neku od komponenti.



Slika 12. Analiza ekspresije varijanti rekombinantnog proteina HA-RapA u staničnim lizatima.

Na slici 13, prikazana je reprezentativna slika tri neovisna testa *pull-down*. Lizati stanica *D. discoideum* AX2 transformiranih s vektorima s kojih se ekspimiraju wt, S19N i Q65E varijante proteina RapA inkubirani su s pročišćenim proteinom GST-IqgC navezanim na

glutination-agarozne kuglice. U jažicama 2, 3 i 4, prikazan je kontrolni test pull-down u kojem su lizati stanica inkubirani s glutation-agarozom na koju je vezan GST, koji služi kao negativna kontrola, kako bi se pokazalo da se protein RapA ne veže na GST ili agarozu, međutim, vidljive su blage proteinske vrpce. Moguće je da je riječ o lažno pozitivnoj negativnoj kontroli. S obzirom na to da se radi o vrpčama slabog intenziteta, postoji vjerojatnost da kuglice glutation-agaroze, koje sadrže GST sa staničnim lizatima, nisu dobro isprane. Dodatno ispiranje s puferom za kolonu, moglo bi eliminirati nespecifično vezanje. Jažice 6, 7, 8 i 9 prikazuju test pull-down u kojem su lizati stanica inkubirani s glutation-agarozom na koju je vezan GST-IqgC za testiranje interakcije RapA s proteinom IqgC, te su detektirane proteinske vrpce. Pokazuju kako postoji interakcija proteina RapA s proteinom IqgC, te da sve varijante proteina RapA vežu protein IqgC jednakim afinitetom.

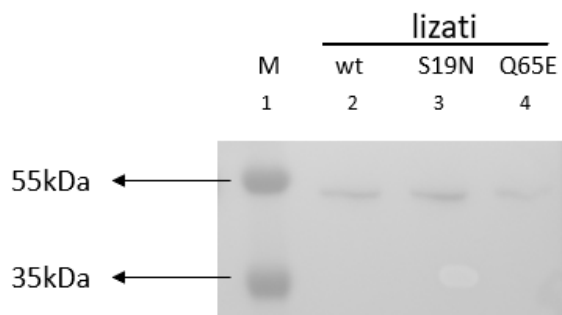


Slika 13. Analiza interakcije proteina IqgC i varijanti RapA metodom *pull-down* i zatim metodom Western blot s monoklonskim anti-HA antitijelom.

4.2.2. Endogeni protein IqgC veže protein RapA iz staničnog lizata

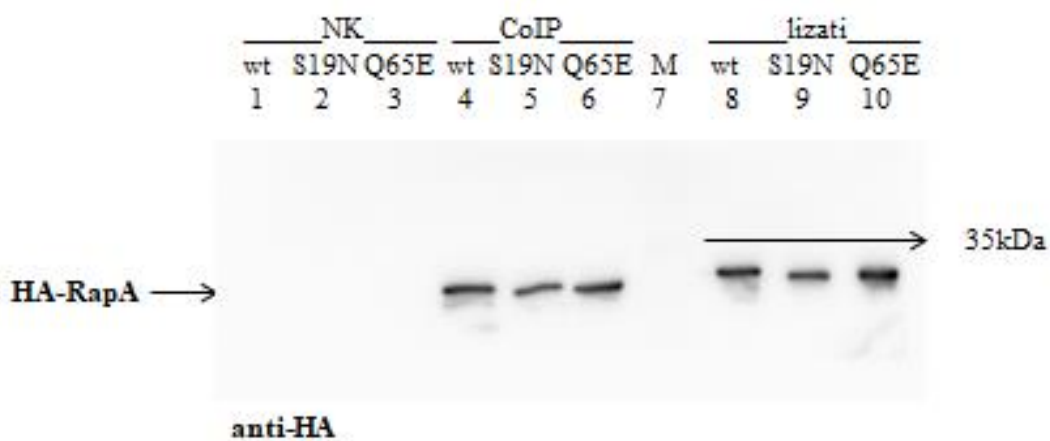
Nakon što je pokazano da rekombinantni protein IqgC uspješno povlači protein RapA iz staničnog lizata, korištena je metoda koimunoprecipitacije kako bi se interakcija potvrdila te kako bi se vidjelo stvara li endogeni protein IqgC kompleks s proteinom RapA. Zrnca s proteinom A su inkubirana s anti-IqgC anti-serumom i s lizatima stanica koje eksprimiraju Δ CAAX varijante wt, S19N i Q65E proteina RapA obilježenog s HA biljegom, isto kao i u testu *pull-down*.

Prikupljeno je $1,6 \times 10^8$ stanica po soju čiji su lizati inkubirani sa zncima proteina A i anti-IqgC anti-serumom, a stanični lizati inkubirani s proteinom A bez anti-seruma korišteni su kao negativna kontrola. Stanični lizati testirani su s antitijelom anti-CI kako bi se usporedila količina stanica korištenih u eksperimentu, što se može vidjeti na slici 14.



Slika 14. Analiza ekspresije proteina korteksilina u staničnim lizatima.

Za analizu interakcije proteina IqgC s rekombinantnim proteinom HA-RapA, korišteno je anti-HA monoklonsko antitijelo. Rezultati dobiveni testom *pull-down* potvrđeni su metodom koimunoprecipitacije (slika 15). Lizati stanica ekspimiraju Δ CAAX varijante wt, S19N i Q65E proteina RapA obilježenih s biljekom HA. Membrana je inkubirana s anti-HA antitijelom. Jažice 1, 2 i 3 prikazuju negativne kontrole (NK) u kojima su lizati stanica inkubirani samo s proteinom A te pokazuju da se anti-HA antitijelo ne veže nespecifično na zrnca s proteinom A. U jažicama 4, 5 i 6 detektirane su wt, S19N i Q65E varijante proteina RapA iz uzorka lizata inkubiranih s proteinom A i anti-IqgC anti-serumom (CoIP). Sve tri forme proteina RapA vežu protein IqgC podjednakom jačinom, sudeći prema proteinskim vrpčama sličnog intenziteta. U jažici 7 nalazi se marker, odnosno proteinski standard. U jažicama 8, 9 i 10 vide se vrpce koje pokazuju detekciju wt, S19N i Q65E varijanti proteina RapA u lizatu stanica.



Slika 15. Analiza interakcije proteina IqgC i varijanti proteina RapA metodom koimunoprecipitacije i zatim Western blot.

Obje metode ispitivanja interakcija potvrđuju interakcije proteina IqgC sa sve tri

varijante proteina RapA. Prilikom testiranja interakcije proteina IqgC s malom GTPazom RapA, koriste se mutirani oblici GTPaze. Testiranjem samo divljeg tipa proteina RapA, ne može se odrediti veže li protein IqgC samo aktivni, samo neaktivni ili oba oblika GTPaze. Konstitutivno negativni mutant proteina RapA, S19N, umjesto serina na mjestu 19 sadrži asparagin zbog čega u aktivnom mjestu ima zarobljen GDP. Konstitutivno aktivna forma proteina RapA, Q65E, umjesto glutamina na poziciji 65 sadrži glutamat te u aktivnom mjestu ima zarobljen GTP. Ispitivanjem interakcije proteina IqgC i mutiranih oblika proteina RapA, pokušala se odrediti funkcija proteina IqgC. Dok proteini GEF vežu samo neaktivni oblik GTPaza, a proteini GAP vežu aktivni oblik GTPaza, proteini IQGAP mogu vezati više oblika GTPaza. Tako protein IqgC veže i aktivni (Q65E) i neaktivni (S19N) oblik proteina RapA. Interakciju proteina IqgC i proteina RapA bilo bi dobro provjeriti i metodama za dokazivanje interakcija proteina u živim stanicama. A s obzirom na to da je pokazano da protein IqgC ima aktivnost RasGAP prema proteinu RasG (Marinović i sur., 2019), zanimljivo bi bilo ispitati ima li protein IqgC aktivnost RasGAP prema proteinu RapA.

5. ZAKLJUČCI

1. *Dicityostelium* protein IqgC vjerojatno sudjeluje u regulaciji adhezije stanica.
2. Protein IqgC sudjeluje u adheziji stanica osjetljivoj na EDTA.
3. Protein IqgC nema značajniju ulogu u adheziji stanica rezistentnoj na EDTA.
4. Protein IqgC eksprimira se u ranijim fazama staničnog ciklusa.
5. Metode za dokazivanje interakcija proteina *in vitro*, *pull-down* i koimunoprecipitacija, pokazale su interakciju proteina IqgC s tri forme proteina RapA: divljim tipom, konstitutivno neaktivnim mutantom (S19N) i konstitutivno aktivnim mutantom (Q65E).

6. LITERATURA

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002) *Molecular Biology of the Cell*, 4. izd., Garland Science, New York.

Asuri S, Yan J, Parnavitana NC, Quilliam LA (2008) E-cadherin dis-engagement activates the Rap1 GTPase. *J Cell Biochem* **105**, 1027-37. <https://doi.org/10.1002/jcb.21902>

Beug H, Katz FE, Stein A, Gerisch G (1973) Quantitation of membrane sites in aggregating Dictyostelium cells by use of tritiated univalent antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **70**, 3150–3154. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.11.3150>

Bloomfield G, Paschke P, Okamoto M, Stevens TJ, Urushihara H. (2019) Triparental inheritance in Dictyostelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**, 2187-2192. <https://doi.org/10.1073/pnas.1814425116>

Boettner B, Van Aelst L (2009) Control of cell adhesion dynamics by Rap1 signaling. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 684-93. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.06.004>

Bourne HR, Sanders DA, McCormick F (1990) The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* **348**, 125-132.

Bos JL, Rehmann H, Wittinghofer A (2007) GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* **129**, 865-77. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.018>

Bozzaro S (2019): The past, present and future of Dictyostelium as a model system. *Int J Dev Biol* **63**, 321–331. <https://dx.doi.org/10.1387/ijdb.190128sb>

Bozzaro S, Ponte E (1995) Cell adhesion in the life cycle of Dictyostelium. *Experientia* **51**, 1175-1188. <https://doi.org/10.1007/BF01944735>

Brownbridge GG, Lowe PN, Moore KJM, Skinner RH, Webb MR (1993) Interaction of GTPase activating proteins (GAPs) with p21(ras) measured by a novel fluorescence anisotropy

method. Essential role of Arg-903 of GAP in activation of GTP hydrolysis on p21(ras). *J Biol Chem* **268**, 10914–10919. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)82072-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)82072-5)

Cavalier-Smith T, Chao EEY, Oates B (2004) Molecular phylogeny of Amoebozoa and the evolutionary significance of the unikont Phalansterium. *Eur J Protistol* **40**, 21-48. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2003.10.001>

Choy E, Chiu VK, Silletti J, Feoktistov M, Morimoto T, Michaelson D i sur. (1999) Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell* **98**, 69–80. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80607-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80607-8)

Clarke M i Gomer RH (1995) PSF and Cmf, autocrine factors that regulate gene expression during growth and early development of Dictyostelium. *Experientia* **51**, 1124-1134. <https://doi.org/10.1007/BF01944730>

Cox AD, Der CJ (2010) Ras history: The saga continues. *Small GTPases* **1**, 2–27. <https://doi.org/10.4161/sgtp.1.1.12178>

Daumke O, Weyand M, Chakrabarti PP, Vetter IR, Wittinghofer A (2004) The GTPase-activating protein Rap1GAP uses a catalytic asparagine. *Nature* **429**, 197-201. <https://doi.org/10.1038/nature02505>

De Rooij J, Zwartkruis FJT, Verheijen MHG, Cool RH, Nijman SMB, Wittinghofer A i sur. (1998) Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* **396**, 474–477. <https://doi.org/10.1038/24884>

Deery WJ i Gomer RH (1999) A putative receptor mediating cell-density sensing in Dictyostelium. *J Biol Chem* **274**, 34476-34482. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.48.34476>

Eichinger L, Pachebat JA, Glöckner G, Rajandream MA, Sucgang R., Berriman M i sur. (2005) The genome of the social amoeba Dictyostelium discoideum. *Nature* **435**, 43–57. <https://doi.org/10.1038/nature03481>

Faix J, Kreppel L, Shaulsky G, Schleicher M, Kimmel AR (2004) A rapid and efficient method

to generate multiple gene disruptions in *Dictyostelium discoideum* using a single selectable marker and the Cre-loxP system. *Nucleic Acid Research* **32**, 143. <https://doi.org/10.1093/nar/gnh136>

Faix J, Weber I, Mintert U, Köhler J, Lottspeich F, Marriott G. (2001) Recruitment of cortexillin into the cleavage furrow is controlled by Rac1 and IQGAP-related proteins. *EMBO J* **20**, 3705–3715. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.14.3705>

Flowers JM, Li SI, Stathos A, Saxxer G, Ostrowski EA, Queller DC i sur. (2010): Variation, Sex, and Social Cooperation: Molecular Population Genetics of the Social Amoeba *Dictyostelium discoideum*. *PloS Gen* **6**, 1-14. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001013>

Friedberg F, Rivero F (2010) Single and multiple CH (calponin homology) domain containing multidomain proteins in *Dictyostelium discoideum*: An inventory. *Mol Biol Rep* **37**, 2853–2862. <https://doi.org/10.1007/s11033-009-9839-1>

Gerisch G (1980) Univalent antibody fragments as tools for the analysis of cell interactions in dictyostelium. *Curr Top Dev Biol* **14**, 243–270. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(08\)60197-0](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(08)60197-0)

Goitre L, Trapani E, Trabalzini L, Retta SF (2014) The Ras superfamily of small GTPases: the unlocked secrets. *Methods Mol Biol* **1120**, 1-18.

Goodwin K, Lostchuck EE, Cramb KML, Zulueta-Coarasa T, FernandezGonzalez R, Tanentzapf G (2017) Cell-cell and cell-extracellular matrix adhesions cooperate to organize actomyosin networks and maintain force transmission during dorsal closure. *Mol Biol Cell* **28**, 1301–1310. <https://doi.org/10.1091/mbc.e17-01-0033>

Hennig A, Markwart R, Esparza-Franco MA, Ladds G, Rubio I. (2015) Ras activation revisited: role of GEF and GAP systems. *Biol Chem* **396**, 831-48. <https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0257>.

Hernández-Varas P, Coló GP, Bartolomé RA, Paterson A, Medraño-Fernández I i sur. (2011) Rap1-GTP-interacting adaptor molecule (RIAM) protein controls invasion and growth of melanoma cells. *J Biol Chem* **286**, 18492-504. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.189811>

Hirohashi S, Kanai Y (2003) Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci.* **94**, 575–581. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2003.tb01485.x>

Huang S, Ingber DE (1999) The structural and mechanical complexity of cell-growth control. *Nat Cell Biol* **1**, 131-138. <https://doi.org/10.1038/13043>

Jaśkiewicz A, Pająk B, Orzechowski A (2018) The Many Faces of Rap1 GTPase. *Int J Mol Sci* **19**, 2848. <https://doi.org/10.3390/ijms19102848>

Jeon J, Kim D, Jeon TJ (2021) Opposite functions of RapA and RapC in cell adhesion and migration in Dictyostelium. *Anim Cells Syst* **25**, 203-210. <https://doi.org/10.1080/19768354.2021.1947372>

Jeon TJ, Lee S, Weeks G, Firtel RA (2009) Regulation of Dictyostelium morphogenesis by RapGAP3. *Dev Biol* **328**, 210–220. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.01.016>

Johnson DS, Chen YH (2012) Ras family of small GTPases in immunity and inflammation. *Curr Opin Pharmacol* **12**, 458-63. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2012.02.003>

Kahn RA, Der CJ, Bokoch GM (1992) The ras superfamily of GTP-binding proteins: guidelines on nomenclature. *FASEB J* **6**, 2512-2513. <https://doi.org/10.1096/fasebj.6.8.1592203>

Kamprad N, Witt H, Schröder M, Kreis C, Bäumchen O, Janshoff A i sur. (2018) Adhesion strategies of Dictyostelium discoideum -a force spectroscopy study. *Nanoscale* **10**, 22504-22519. <https://doi.org/10.1039/C8NR07107A>

Khalili AA, Ahmad MR (2015) A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications. *Int J Mol Sci* **16**, 18149-18184. <https://doi.org/10.3390/ijms160818149>

Kim SH, Arnold D, Lloyd A, Roux SJ (2001) Antisense expression of an Arabidopsis ran binding protein renders transgenic roots hypersensitive to auxin and alters auxin-induced root growth and development by arresting mitotic progress. *Plant Cell* **13**, 2619-2630. <https://doi.org/10.1105/tpc.010214>

Kimmel AR, Firtel RA (2004) Breaking symmetries: regulation of Dictyostelium development through chemoattractant and morphogen signal-response. *Curr Opin Genet Dev* **14**, 540-549. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2004.08.001>

Kortholt A, van Haastert PJ (2008) Highlighting the role of Ras and Rap during Dictyostelium chemotaxis. *Cell Signal* **20**, 1415-1422. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2008.02.006>

Kurella VB, Richard JM, Parke CL, LeCour LF, Bellamy HD, Worthylake DK (2009) Crystal Structure of the GTPase-activating Protein-related Domain from IQGAP1. *J Biol Chem* **284**, 14857–14865. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808974200>

Lee, S., Shen, Z., Robinson, D.N., Briggs, S., Firtel, R.A. (2010): Involvement of the cytoskeleton in controlling leading-edge function during chemotaxis. *Mol. Biol. Cell.* **21**: 1810–1824. <https://doi.org/10.1091/mbc.e10-01-0009>

Li CR, Wang YM, Wang Y (2008) The IQGAP Iqg1 is a regulatory target of CDK for cytokinesis in *Candida albicans*. *EMBO J* **27**, 2998–3010. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.219>

Maertens O, Cichowski K (2014) An expanding role for RAS GTPase-activating proteins (RAS GAPs) in cancer. *Adv Biol Regul* **55**, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2014.04.002>

Marinović M, Mijanovic L, So Star M, Vizovisek M, Junemann A, Fonovic M i sur. (2019) IQGAP-related protein IqgC suppresses Ras signaling during large-scale endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **116**, 1289–1298. <https://doi.org/10.1073/pnas.1810268116>

Mcever RP, Zu C (2010) Rolling cell adhesion. *Annu Rev Cell Dev Biol* **26**, 363–96. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113238>

Mijanović L, Weber I (2022) Adhesion of Dictyostelium Amoebae to Surfaces: A Brief History of Attachments. *Front Cell Dev Bio* **10**. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.910736>

Morgan CJ, Hedman AC, Li Z i sur. (2019) Endogenous IQGAP1 and IQGAP3 do not

functionally interact with Ras. *Sci Rep* **9**, 11057. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46677-9>

Paduch M, Jeleń F, Otlewski J (2001) Structure of small G proteins and their regulators. *Acta Biochim Pol* **48**: 829–850. https://doi.org/10.18388/abp.2001_3850

Park B, Kim H, Jeon TJ (2018) Loss of RapC causes defects in cytokinesis, cell migration, and multicellular development of Dictyostelium. *Biochem Biophys Res Commun* **499**, 783–789. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.03.223>

Plak K, Pots H, Van Haastert PJ, Kortholt A (2016) Direct interaction between TalinB and Rap1 is necessary for adhesion of Dictyostelium cells. *BMC Cell Biol* **17**. <https://doi.org/10.1186/s12860-015-0078-0>

Preedy VR (2016) Adhesion molecules, 1. izd, CRC Press, New York

Sahai E, Marshall CJ (2002) RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer* **2**, 133–142. <https://doi.org/10.1038/nrc725>

Samanta D, Almo SC (2015) Nectin family of cell-adhesion molecules: structural and molecular aspects of function and specificity. *Cell Mol Life Sci* **72**, 645–658. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1763-4>

Schaap P (2011) Evolutionary crossroads in developmental biology: Dictyostelium discoideum. *Dev Camb Engl* **138**, 387–396. <https://doi.org/10.1242/dev.048934>

Schaap P, Winckler T, Nelson M, Alvarez-Curto E, Elgie B, Hagiwara H i sur. (2006) Molecular phylogeny and evolution of morphology in the social amoebas. *Science* **314**, 661–663. <https://doi.org/10.1126/science.1130670>

Scheffzek K, Ahmadian MR (2005) GTPase activating proteins: structural and functional insights 18 years after discovery. *Cell Mol Life Sci* **62**, 3014–38. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5136-x>

Scheffzek K, Ahmadian MR, Kabsch W, Wiesmüller L, Lautwein A, Schmitz F i sur. (1997)

The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* **277**, 333-338. <https://doi.org/10.1126/science.277.5324.333>

Scheffzek K, Shivalingaiah G (2019) Ras-Specific GTPase-Activating Proteins—Structures, Mechanisms, and Interactions. *CSH Perspect* **9**. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031500>

Schwartz MA (2001) Integrin signaling revisited. *Trends Cell Biol* **11**, 466-470. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(01\)02152-3](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(01)02152-3).

Shadwick LL, Spiegel FW, Shadwick JDL, Brown MW, Silberman JD (2009) Eumycetozoa = Amoebozoa?: SSUrDNA Phylogeny of Protosteloid Slime Molds and Its Significance for the Amoebozoan Supergroup. *PLoS ONE* **4**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006754>

Shannon KB (2012) IQGAP Family Members in Yeast, Dictyostelium, and Mammalian Cells. *Int J Cell Biol* **2012**, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2012/894817>

Siu CH, Sriskanthadevan S, Wang J, Hou L, Chen G i sur. (2011) Regulation of spatiotemporal expression of cell-cell adhesion molecules during development of Dictyostelium discoideum. *Dev Growth Differ* **53**, 518-27. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2011.01267.x>

Swanson AR, Vadell EM, Cavender JC (1999) Global distribution of forest soil dictyostelids. *J Biogeography* **26**, 133-148. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.1999.00250.x>

Tarantola M, Bae A, Fuller D, Bodenschatz E, Rappel W-J, Loomis WF (2014) Cell substratum adhesion during early development of Dictyostelium discoideum. *PLoS ONE* **9**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106574>

van Dam TJP, Bos JL, Snel B (2011) Evolution of the Ras-like small GTPases and their regulators. *Small GTPases* **2**,4–16. <https://doi.org/10.4161/sgtp.2.1.15113>

Veltman DM, Akar G, Bosgraaf L, Van Haastert PJM (2009) A new set of small, extrachromosomal expression vectors for Dictyostelium discoideum. *Plasmid* **61**, 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2008.11.003>

Vlahou G, Rivero F (2006) Rho GTPase signaling in Dictyostelium discoideum: insights from the genome. *Eur J Cell Biol* **85**, 947–959. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2006.04.011>

Wai Wong C, Dye DE, Coombe DR (2012) The role of immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules in cancer metastasis. *J Int J Cell Biol* **2012**, 340296. <https://doi.org/10.1155/2012/340296>

Wandinger-Ness JA, Zerial M (2014) Rab Proteins and the Compartmentalization of the Endosomal System. *Cold Spring Harbor Perspect Biol* **6**, 22616. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022616>

Weijer CJ (2009) Collective cell migration in development. *J Cell Sci* **122**, 3215–3223. <https://doi.org/10.1242/jcs.036517>

Weissbach L, Settleman J, Kalady MF, Snijders AJ, Murthy AE, Yan YX i sur. (1994) Identification of a human rasGAP-related protein containing calmodulin-binding motifs. *J Biol Chem* **269**, 20517–20521. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)32023-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)32023-9)

Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ (2005) The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* **118**, 843–846. <https://doi.org/10.1242/jcs.01660>

Williams RSB, Boeckeler K, Gräf R, Müller-Taubenberger A, Li Z, Isberg RR i sur. (2006) Towards a molecular understanding of human diseases using Dictyostelium discoideum. *Trends Mol Med* **12**, 415–424. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2006.07.003>

Wong E, Yang C, Wang J, Fuller D, Loomis WF, Siu CC (2002) Disruption of the gene encoding the cell adhesion molecule DdCAD-1 leads to aberrant cell sorting and cell-type proportioning during Dictyostelium development. *Development* **129**, 3839–3850. <https://doi.org/10.1242/dev.129.16.3839>

Dictybase, URL <<http://dictybase.org/>> . Pristupljeno 17. veljače 2022.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, LUCIJA MIMICA, izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis