

# Kompatibilnost deset često korištenih fluorescentnih proteina s mikroskopom EVOS Flويد

---

**Stošić, Irin Antun**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2017**

*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:159:678393>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-11**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski studij**

**Biotehnologija**

**Irin Antun Stošić**

6985/BT

**KOMPATIBILNOST DESET ČESTO KORIŠTENIH  
FLUORESCENTNIH PROTEINA S MIKROSKOPOM EVOS  
FLOID**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet: Genetičko inženjerstvo**

**Mentor:** prof. dr. sc. Ivan Krešimir Svetec

**Zagreb, 2017.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija**

**Zavod za biokemijsko inženjerstvo**

**Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti**

**Znanstveno polje: Biotehnologija**

## **Kompatibilnost deset često korištenih fluorescentnih proteina s mikroskopom EVOS Flويد**

**Irin Antun Stošić, 0058205864**

**Sažetak:** Cilj ovog rada bio je istražiti kompatibilnost deset često korištenih fluorescentnih proteina s fluorescencijskim mikroskopom EVOS Flويد, odnosno koji su od 10 proteina (mTagBFP2, mTFP1, mEGFP, mCitrine, tdTomato, mTagRFP, mCherry, mKate, mPlum i E2Crimson) vidljivi te mogu li se međusobno razlikovati ovim mikroskopom koji kao izvor svjetlosti koristi plave, crvene i zelene svjetleće diode. Plazmidi koji nose gene za fluorescentne proteine nabavljeni su u bakteriji *E. coli*, soj DH5 $\alpha$ , izolirani su iz tog soja i njima je transformiran soj *E. coli* NEB Stable prikladniji za ekspresiju gena pod kontrolom promotora operona *araBAD*. Struktura plazmida potvrđena je restrikcijskom analizom, a mikroskopiranjem stanica *E. coli* s eksprimiranim fluorescentnim proteinima utvrđeno je da su EVOS Flويد mikroskopom vidljivi svi proteini osim mTagRFP te da je u istom uzorku međusobno moguće razlikovati do pet različitih fluorescentnih proteina.

**Ključne riječi:** *Escherichia coli*, fluorescentna mikroskopija, fluorescentni proteini, restrikcijska analiza, svjetleće diode

**Rad sadrži:** 32 stranice, 15 slika, 5 tablica, 26 literaturnih navoda, 3 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** prof. dr. sc. Ivan Krešimir Svetec

**Pomoć pri izradi:** mag. ing. Bojan Žunar

**Datum obrane:** 18. rujna 2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**University undergraduate study Biotechnology**

**Department of Biochemical Engineering**  
**Laboratory for Biology and Microbial Genetics**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific field: Biotechnology**

### **Compatibility of ten frequently used fluorescent proteins with EVOS Flouid microscope**

**Irin Antun Stošić, 0058205864**

**Abstract:** The aim of this paper was to determine the compatibility of ten commonly used fluorescent proteins with the EVOS Flouid fluorescence microscope. More specifically to determine which of the ten proteins (mTagBFP2, mTFP1, mEGFP, mCitrine, tdTomato, mTagRFP, mCherry, mKate, mPlum, and E2Crimson) are visible, and the way they differ from one another under this microscope that uses blue, red and green light emitting diodes as a light source. Plasmids carrying fluorescent protein genes were obtained in the DH5α *E. coli* strain, then isolated from this strain and the *E. coli* NEB Stable strain was transformed with them. The NEB Stable strain is more suitable for gene expression controlled by the *araBAD* promoter. The structure of plasmids was confirmed with restriction analysis. All proteins except for mTagRFP are visible with EVOS Flouid microscope, and it is possible to distinguish between up to five fluorescent proteins in the same sample.

**Keywords:** *Escherichia coli*, fluorescence microscopy, fluorescent protein, light emitting diode, restriction analysis

**Thesis contains:** 32 pages, 15 figures, 5 tables, 26 references, 3 supplements

**Original in:** Croatian

**Laboratory for Biology and Microbial Genetics**

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** Ivan Krešimir Svetec, PhD

**Technical support and assistance:** Bojan Žunar, mag. ing.

**Defence date:** 18 September 2017

# Sadržaj

|   |    |
|---|----|
| 1. Uvod .....   | 1  |
| 2. Teorijski dio .....  | 2  |
| 2.1. Heterologna ekspresija .....   | 2  |
| 2.2. Operon <i>araBAD</i> .....   | 3  |
| 2.3. Fluorescencija .....   | 5  |
| 2.4. Fluorescencijska mikroskopija .....  | 7  |
| 2.4.1. Izvori svjetlosti fluorescencijskih mikroskopa .....   | 7  |
| 2.5. Fluorescentni proteini .....   | 9  |
| 2.6. Primjena fluorescentnih proteina.....  | 12 |
| 3. Materijali i metode .....  | 13 |
| 3.1. Materijali .....   | 13 |
| 3.1.1. Plazmidi.....  | 13 |
| 3.1.2. Mikroorganizmi.....  | 13 |
| 3.1.3. Fluorescentni proteini .....   | 14 |
| 3.1.4. Restriksijski enzimi .....   | 14 |
| 3.1.5. Hranjive podloge .....   | 14 |
| 3.1.6. Otopine .....  | 15 |
| 3.1.7. Kemikalije i enzimi.....   | 16 |
| 3.2. Metode.....  | 18 |
| 3.2.1. Izolacija plazmidne DNA (MiniPrep) .....   | 18 |
| 3.2.2. Agarozna gel elektroforeza .....   | 18 |
| 3.2.3. Cijepanje DNA restriksijskim enzimima.....   | 19 |
| 3.2.4. Transformacija kemijski kompetentnih stanica bakterije <i>Escherichia coli</i> soj NEB Stable..... | 19 |
| 3.2.5. Indukcija ekspresije fluorescentnih proteina .....   | 19 |
| 3.2.6. Fluorescencijska mikroskopija .....  | 19 |
| 4. Rezultati i rasprava .....   | 21 |

|  |    |
|--|----|
| 4.1. Transformacija bakterije <i>E. coli</i> soj NEB Stable .....          | 21 |
| 4.2. Dodatna restrikcijska analiza plazmida .....                          | 23 |
| 4.3. Provjera transformiranih sojeva .....                                 | 24 |
| 4.4. Mikroskopiranje stanica koje ekspimiraju fluorescentne proteine ..... | 25 |
| 5. Zaključak .....   | 29 |
| 6. Literatura .....  | 30 |
| 7. Prilozi .....   | 33 |

## 1. Uvod

Fluorescentni proteini postali su nezamjenjiv alat u molekularnoj genetici i genetičkom inženjerstvu. Od 1960ih do danas, molekula prvog otkrivenog zelenog fluorescentnog proteina, GFP-a, izmijenjena je i prilagođena za ekspresiju u bakterijama, kvascima i stanicama viših organizama. Danas postoje fluorescentni proteini koji pokrivaju cijeli spektar vidljivog elektromagnetskog zračenja što omogućava označavanje različitih staničnih struktura i praćenje staničnih procesa.

Fluorescentni proteini vizualiziraju se fluorescencijskim mikroskopima koji su u konstantnom razvoju. Količina informacija koja se može prikupiti mikroskopijom sve je veća, a tehnike mikroskopiranja sve su jednostavnije. Jedan od napredaka u fluorescentnoj mikroskopiji korištenje je svjetlećih dioda kao izvora svjetlosti. Njihove prednosti su uniformno osvjetljenje, manje zagrijavanje preparata i iznimno dug radni vijek, a mana je da su limitirane na određene valne duljine. Cilj ovog rada je istražiti kompatibilnost deset često korištenih fluorescentnih proteina s fluorescencijskim mikroskopom EVOS Fluid Imaging Station, odnosno koji su od 10 proteina vidljivi te mogu li se međusobno razlikovati ovim mikroskopom koji kao izvor svjetlosti koristi plave, crvene i zelene svjetleće diode.

Odabrani su proteini koji pokrivaju cijeli vidljivi spektar: mTagBFP2, mTFP1, mEGFP, mCitrine, tdTomato, mTagRFP, mCherry, mKate, mPlum i E2Crimson. Geni koji kodiraju za fluorescentne proteine nabavljeni su od organizacije Addgene na plazmidima u bakteriji *Escherichia coli*, soj DH5 $\alpha$ . Navedeni plazmidi izolirani su iz soja DH5 $\alpha$ , njihova struktura potvrđena je restrikcijskom analizom te je njima transformiran soj *E. coli* NEB Stable. To je napravljeno jer soj DH5 $\alpha$  može metabolizirati arabinozu koja je induktor promotora operona *araBAD* pod čijom su regulacijom geni navedenih proteina. Soj NEB Stable može transportirati arabinozu, ali je ne metabolizira osiguravajući konstantnu razinu ekspresije. Prije mikroskopiranja odabrana je odgovarajuća koncentracija arabinoze za ekspresiju proteina i pronađeni najbolji uvjeti za mikroskopiranje stanica.

## 2. Teorijski dio

### 2.1. Heterologna ekspresija

Heterologna ekspresija pojam je koji označava sintezu proteina u stanici u kojoj nije prirodno prisutan. Kloniranjem gena iz izvorne stanice u stanicu domaćina uz uklanjanje introna, promjene sekvencije zbog pristranosti prema kodonima i promjene promotora konstruiraju se sojevi domaćina koji mogu sintetizirati proteine drugih organizama. Heterologna ekspresija primjenjuje se u istraživačke svrhe jer pruža mogućnost proučavanja metaboličkih puteva, membranskog transporta, interakcije i strukture proteina u modelnim organizmima. Osim u znanstvene svrhe, heterologna ekspresija se koristi i u industriji, gdje je donijela revoluciju u proizvodnji hormona, enzima, fuzijskih proteina, antitijela i cjepiva. (Van Dien, 2016.) Više nije potrebno pročišćavati proteine iz velike količine biomase organizama u kojima su prirodno prisutni u maloj količini, već je kontroliranom ekspresijom u brzorastućim domaćinima moguće ostvariti velike prinose željenih proteina.

Za heterolognu ekspresiju nekog proteina potreban je gen koji za njega kodira, vektor koji sadrži taj gen i domaćin u kojem će gen biti ekspimiran. Geni za željene proteine najčešće su dobiveni izradom i pretraživanjem banke gena. Cijeli genom organizma koji sintetizira željeni protein fragmentira se, ugrađuje u vektore i njima se transformiraju domaćini. Ako se radi o banki gena eukariotskih organizama banka se konstruira pomoću mRNA i reverzne transkriptaze što osigurava banku gena kodirajuće DNA (cDNA) koja ne sadrži introne i tako su geni spremni za ekspresiju u bakterijama i kvascu *Saccharomyces cerevisiae*. Banka gena pretražuje se, pronalazi se željena sekvencija, odnosno gen te se on ugrađuje u odgovarajući vektor.

Odabir vektora ovisi o domaćinu, iznimno dobro istražena bakterija *Escherichia coli* zbog brzog rasta, lakog unosa strane DNA, dostizanja velike gustoće kulture na jeftinim hranjivim podlogama, uvijek je prvi izbor (Ceccarelli i Rosano, 2014.). Međutim, ako protein zahtjeva post-translacijske promjene ili sadrži veći broj disulfidnih mostova, prokariotski organizmi nisu dobar odabir (Casali, 2003.). Tada se koriste kvasci, plijesni ili stanice sisavaca čiji je uzgoj zahtjevniji, ali omogućuju sintezu kompleksnijih proteina.

Za ekspresiju najčešće se koriste plazmidni vektori, a danas postoji širok spektar ekspresijskih plazmida koji se razlikuju po broju kopija u domaćinu, selekcijskom biljevu, dodatku aminokiselinskih oznaka („tagova“) koje omogućuju lakše pročišćavanje, bolju topljivost ili sekreciju proteina. Glavnu razliku čini promotor pod čijom regulacijom će se nalaziti

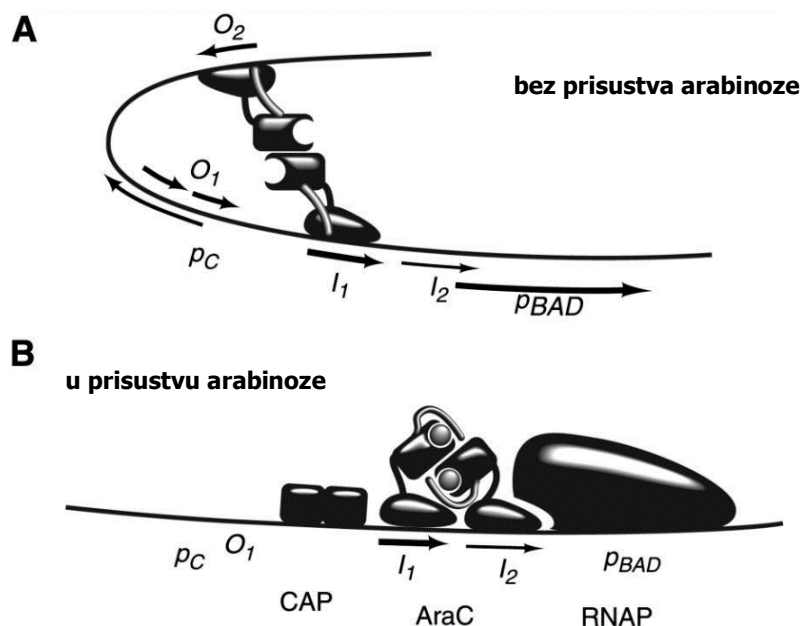


klonirani gen. U svrhu heterologne ekspresije vrlo često se koriste promotori koji osiguravaju nisku konstitutivnu ekspresiju i visoku razinu ekspresije uz prisutnost induktora. Najčešće se koristi promotor operona *lac* koji je dobro istražen, ali ima visoku konstitutivnu ekspresiju. Kao alternativa s niskom konstitutivnom ekspresijom koristi se promotor operona *araBAD*.

## 2.2. Operon *araBAD*

Operon *araBAD* omogućuje bakteriji *E. coli* da koristi arabinozu kao izvor energije i ugljika ako joj nije dostupan neki lakše asimilirajući izvor. Proteini AraA, AraB i AraD enzimi su koji kataliziraju konverziju arabinoze do ksiluloza-5-fosfata koji ulazi u put pentozna fosfata, a protein AraC regulatorni je protein koji sudjeluje u kontroli ekspresije tih proteina. (Cleary i Englesberg, 1974.).

Operon *araBAD* sadrži dvije obrnuto orijentirane promotorske regije (Slika 1). Regija *pC* koja služi za regulaciju ekspresije proteina AraC i *pBAD* koja regulira ekspresiju strukturnih gena. Kada u stanici još nije prisutan AraC dolazi RNA polimeraza veže se za *pC* promotor i odvija se transkripcija gena *araC*, a transkripcija s promotora *pBAD* iznimno je niska. Kada koncentracija AraC poraste i u stanici nije prisutna arabinoza, protein AraC veže se za regulatornu regiju *O<sub>1</sub>* i sprječava daljnju transkripciju gena *araC*, odnosno reprimira vlastitu sintezu. Također, bez prisustva arabinoze, dolazi do dimerizacije proteina AraC u represorski oblik koji se veže za 210 parova baza udaljene regije *O<sub>2</sub>* i *I<sub>1</sub>* uzrokujući savijanje DNA i stvaranje petlje što sprječava transkripciju s promotora *pBAD*.



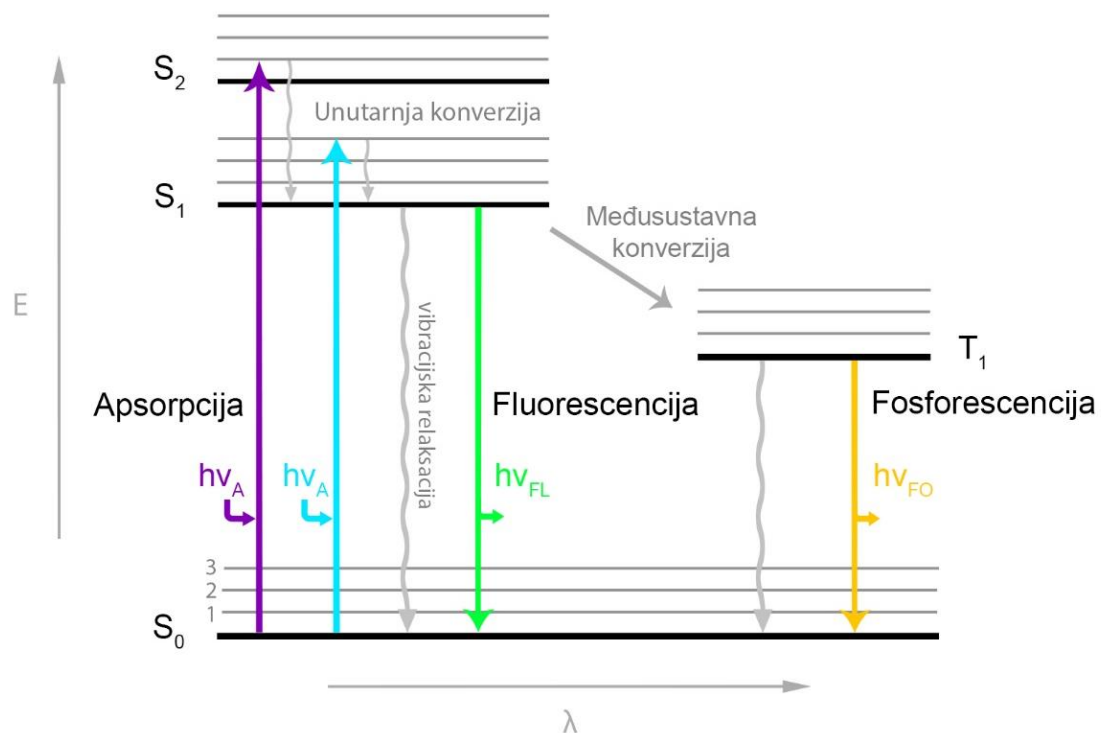
**Slika 1** Model regulacije *araBAD* operona (Schleif, 2010.)

Kada je u stanici prisutna arabinoza, ona se veže za protein AraC uzrokujući promjenu konformacije u aktivatorski oblik koji omogućuje otpuštanje jedne podjedinice dimera s  $O_2$  regije. Ta podjedinica sada se veže na  $I_2$  regiju, DNA više ne tvori petlju i može doći do transkripcije (Slika 1).

Osim proteina AraC u regulaciji sudjeluje i katabolički aktivator koji vezan s cAMP-om (CAP-cAMP) signalizira nisku razinu glukoze u stanici. On se veže za regiju između  $O_1$  i  $I_1$  te onemogućuje stvaranje petlje aktivirajući transkripciju DNA (Sinden, 1994.). Dakle, transkripcija strukturnih gena operona *araBAD* regulirana je pozitivno i negativno proteinom AraC te pozitivno proteinom CAP-cAMP što rezultira brzom indukcijom, efikasnom i brzom represijom te mogućnošću modulacije ekspresije (Guzman i sur., 1995.).

### 2.3. Fluorescencija

Luminiscencija je emitiranje elektromagnetskog zračenja tvari koja je u pobuđenom stanju. S obzirom na trajanje emisije svjetlosti dijeli se na dvije vrste, fluorescenciju i fosforescenciju. Fluorescencija je pojava da tvar apsorbira i u isto vrijeme emitira elektromagnetsko zračenje najčešće veće valne duljine, odnosno manje energije nego apsorbirano zračenje. Fosforescencija je slična pojava, ali do emitiranja elektromagnetskog zračenja dolazi i nakon prekida primarnog zračenja. Kako dolazi do fluorescencije najlakše je objasniti razmatranjem Jablonskijevog dijagrama (Slika 2).



**Slika 2** Primjer Jablonskijevog dijagrama

Prema Jablonskijevom dijagramu, tvar apsorbira elektromagnetsko zračenje te dolazi do ekscitacije fluorofora s osnovnog singletnog stanja (S<sub>0</sub>) u pobuđena singletna stanje (S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>). Tada dolazi do unutarnje konverzije, odnosno fluorofor gubi energiju kroz vibracijsku relaksaciju i dolazi do najnižeg pobuđenog singletnog stanja S<sub>1</sub>. Iz stanja S<sub>1</sub> fluorofor se u osnovno stanje može vratiti gubeći energiju u obliku topline ili emisijom energije u obliku elektromagnetskog zračenja odnosno fluorescencijom. Osim u singletno stanje, fluorofor može prijeći i u tripletno stanje niže energije T<sub>1</sub>. Taj prijelaz spinski je zabranjen i traje puno dulje nego prijelaz u singletno stanje pa se emisija svjetlosti, odnosno fosforescencija događa i nakon prestanka apsorpcije (Luterotti, 2012.).

Unutarnja konverzija odvija se iznimno brzo pa do emisije fluorescencije uglavnom dolazi s najnižeg pobuđenog stanja  $S_1$  (Kashino pravilo) što znači da emitirana svjetlost ima manju energiju, odnosno veću valnu duljinu nego apsorbirana. Također, fluorescencijom se fluorofor može vratiti u stanje  $S_0$  više vibracijske energije ( $S_0$  1, 2 i 3) što povećava gubitak energije toplinom. Kod fluorescencije stanje  $T_1$  niže je energije od stanja  $S_1$  pa emitirano svjetlo ima još manju energiju. Taj pomak valnih duljina emitirane svjetlosti prema većim vrijednostima naziva se Stokesov pomak. Osim navedenog razloga na Stokesov pomak mogu utjecati otapala, reakcije u pobuđenom stanju, formiranje kompleksa i prijenosi energije (Lakowicz, 2007).

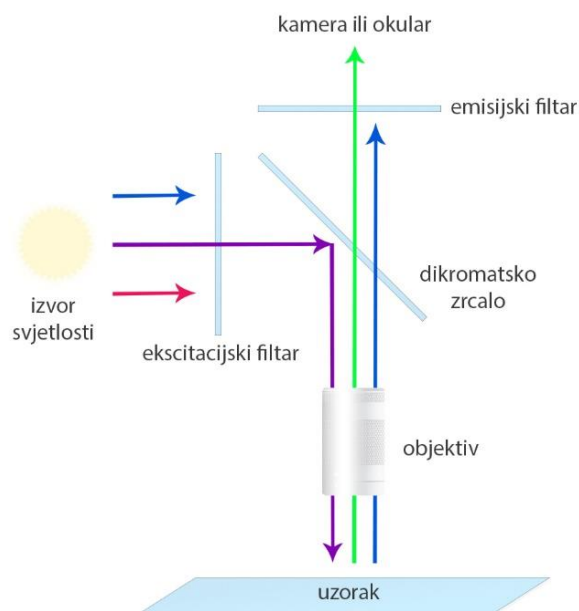
Mogućnost da fluorofor bude u različitim vibracijskim razinama rezultira specifičnim spektrima. Prilikom emisije i apsorpcije dolazi do istih prijelaza energije te su vibracijske energetske razine stanja  $S_1$  i  $S_0$  (Slika 2) podjednako energetske udaljene. Zato su apsorpcijski i emisijski spektri uglavnom jednaki, ali zrcalno simetrični.

Još jedno svojstvo fluorofora kvantni je prinos fluorescencije. To je omjer apsorbiranih i fluorescencijom emitiranih fotona. On nam daje informaciju o udjelu molekula koje se u osnovno stanje vraćaju emisijom fotona (Odak i Škorić, 2017.). Tvari s većim kvantnim prinosom pokazuju veći intenzitet svjetlosti, ali on nije samo intrinzično svojstvo fluorofora, već na njega utječu i vanjski faktori poput kisika koji gasi fluorescenciju, povećanje temperature koje pogoduje vibracijskim konverzijama te pH, viskoznost, polarnost itd. (Lakowicz, 2007).

## 2.4. Fluorescencijska mikroskopija

Pri mikroskopiranju fluorescentnih tvari iskorištava se njihova sposobnost emitiranja svjetlosti. Kod konvencionalne svjetlosne mikroskopije uočava se svjetlo koje uzorak apsorbira stvarajući kontrast, dok se kod fluorescencijske mikroskopije uočava samo svjetlo koje emitira preparat.

Princip rada i osnovni dijelovi fluorescencijskog mikroskopa prikazani su na Slici 3. Mikroskop mora biti opremljen ekscitacijskim i emisijskim filtrom da bi se postigla zadovoljavajuća ekscitacija uzorka i da bi se izoliralo samo svjetlo koje preparat emitira. Ekscitacijski filtar služi da od izvora svjetla filtrira samo valne duljine koje ekscitiraju kromofor, a emisijski da propusti samo valne duljine koje emitira kromofor. Bitno je da izolira svo svjetlo kojim je kromofor ekscitiran jer je ono puno većeg intenziteta od svjetla samog kromofora. Mikroskop je još opremljen dikromatskim zrcalom koje usmjeruje svjetlost te objektivom i okularom, a u novije vrijeme mikroskopi su često opremljeni i digitalnom kamerom (Slika 3) (Aswani i sur., 2012.).



**Slika 3** Shematski prikaz rada fluorescencijskog mikroskopa

### 2.4.1. Izvori svjetlosti fluorescencijskih mikroskopa

Izvor svjetlosti jedan je od najbitnijih dijelova fluorescencijskog mikroskopa. Uobičajen i najčešće korišteni izvor svjetlosti je elektroćna svjetiljka. Koriste se živine, ksenonske i metal-halogene svjetiljke koje svjetlost stvaraju pri pražnjenju elektriciteta u elektrićnom luku. Emitiraju u UV, vidljivom i neke u infracrvenom cijelu spektra visokim intezitetom pa je za korištenje razlićitih kromofora dovoljno zamijeniti ekscitacijski filtar koji izolira željenu valnu duljinu, a ne cijeli izvor svjetlosti.

Nedostaci elektroćnih svjetiljka su generiranje velike kolićine topline, kratki radni vijek koji se kreće od 200 sati (živina svjetiljka) do 2000 sati (metal-halogene svjetiljke) i visoka cijena. Također, UV svjetlost koju emitiraju elektroćne svjetiljke negativno utjeće na žive preparate pa ju je neophodno potpuno filtrirati.

U novije vrijeme kao izvor svjetlosti koriste se svjetleće diode (light emitting diode, LED), odnosno poluvodički elementi koji električni signal pretvaraju u svjetlosti (Wessels i sur., 2012.). Prednosti nad elektrolučnim svjetiljkama su manje generirane topline, precizna kontrola inteziteta, zanemarivo vrijeme za zagrijavanje i hlađenje te male dimenzije.

Pored navedenih prednosti, mana im je da ne emitiraju pravo bijelo svjetlo već su limitirane na određene valne duljine specifične za pojedine diode što znači da je potrebno mijenjati izvor svjetlosti s obzirom na kromofor. Također, kod nekih sustava diode pojedinih valnih duljina nisu ni dostupne pa je izbor kromofora smanjen (Aswani i sur., 2012.).

## 2.5. Fluorescentni proteini

Tijekom proučavanja zelene luminiscencije meduze *Aequorea victoria* 1961. godine izoliran je protein aekvorin koji u prisutnosti kalcijevih iona svijetli plavo. Daljnjim istraživanjem otkriven je još jedan protein koji svijetli zeleno. Taj protein nazvan je zeleni fluorescentni protein, GFP (green fluorescent protein) te je dokazano da protein aekvorin služi kao donor energije zelenom fluorescentnom proteinu u procesu danas znanom kao FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) Energija se prenosi dipol-dipol interakcijama što rezultira samo zelenim svjetlom kojim svijetli meduza (Morise i sur., 1974).

Godine 1979. predložena je struktura kromofora GFP-a. Pročišćeni GFP pocijepan je proteinazom papainom čime su dobiveni polipeptidi od kojih je jedan pokazivao isti apsorpcijski spektar kao i nepocijepani protein. Uspoređena su fizikalno-kemijska svojstva tog polipeptida i modelnih molekula te je predloženo da struktura p-hidroksibenzilideneimidazolinon omogućuje fluorescenciju (Shimomura, 1979).

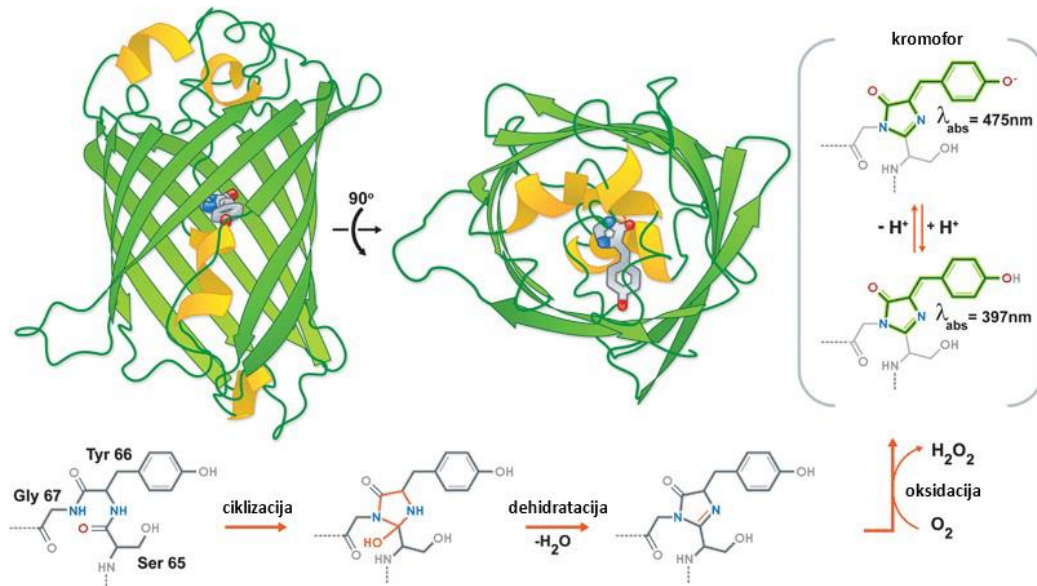
S pristupom primarnoj strukturi GFP-a koju su utvrdili Prasher i suradnici 1992. godine, 1993. godine struktura kromofora potvrđena je te su utvrđeni aminokiselinski ostaci koji ju čine. To su serin, tirozin i glicin pozicionirani na položajima od 65 do 67 od ukupno 238 aminokiselinskih ostataka proteina (Cody i sur., 1993). Tada je još nije bilo poznato trebaju li za tvorbu kromofora enzimi ili drugi faktori specifični za meduzu *Aequorea victoria* ili se kromofor formira spontano.

Odgovor na to pitanje dan je kada je gen *gfp* eksprimiran u bakteriji *E. coli* i eukariotu, nematodi *Caenorhabditis elegans*. Heterologni GFP pokazivao je identične apsorpcijske i emisijske spektre onom izoliranom iz meduze (Chalfie i sur., 1994.). Time je potvrđeno da sazrijevanje kromofora ne zahtijeva dodatne enzime ili faktore, iako mehanizam reakcije još nije bio poznat.

Usljedilo je eksprimiranje GFP-a u najbitnijim modelnim organizmima: kvascu *Saccharomyces cerevisiae*, stanicama sisavaca (Chalfie i sur., 1994.) i mušici *Drosophila melanogaster* (Wang i Hazelrigg, 1994.). Ova otkrića omogućila su širok spektar upotrebe GFP-a za vizualizaciju proteina, tkiva i stanica.

Mogućnost heterologne ekspresije učinila je GFP jednostavno dostupnim i potaknula njegova intenzivna istraživanja. Analiza kristalne strukture proteina pokazala je da se protein sastoji od beta naborane ploče s 11 lanaca ovijenih oko centralne zavojnice (Slika 4). To čini cilindričnu strukturu koja je vjerojatno odgovorna za izrazitu otpornost proteina na

denaturirajuće agense i proteolizu. Kromofor je smješten u središtu molekule i tako izoliran od utjecaja otapala. Centralni položaj vjerojatno je odgovoran i za mali Stokesov pomak, veliki kvantni prinos te sprječavanje molekularnog kisika da priguši fluorescenciju (Ormö i sur., 1996.). Autokatalitičkoj formaciji kromofora prethodi smatanje proteina, a mehanizam se sastoji od ciklizacije serin, tirozin, glicin motiva, dehidratacije te oksidacije molekularnim kisikom pri čemu nastaje molekula vodikova peroksida (Slika 4) (Craggs, 2009.).



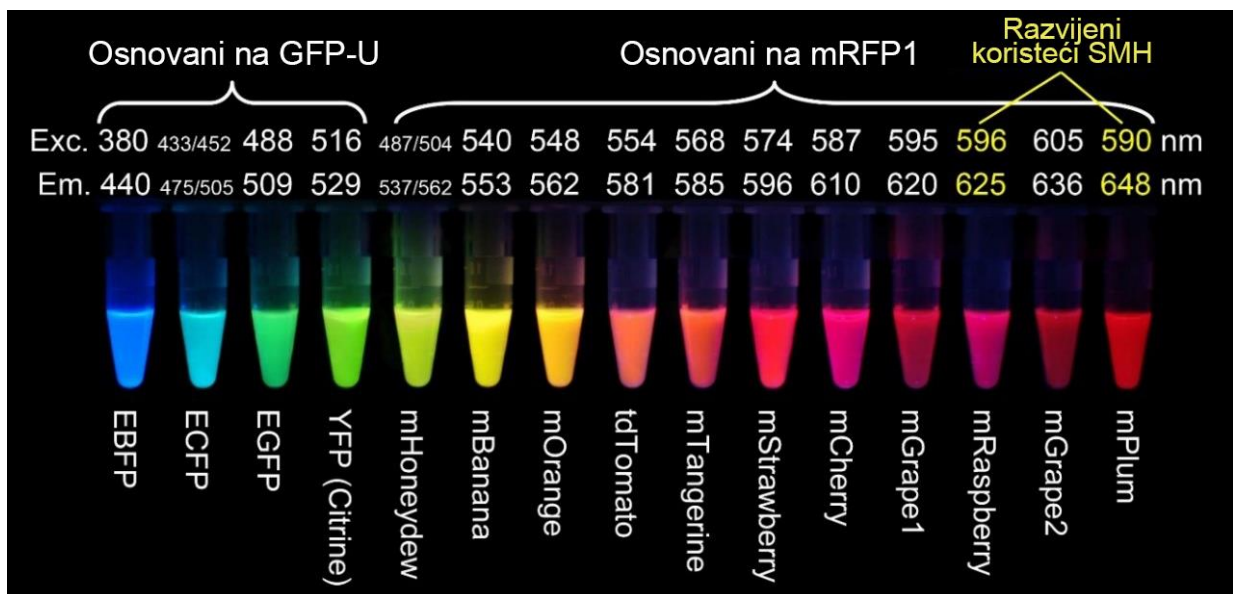
**Slika 4** Sekundarna struktura proteina i struktura kromofora (Lippincott-Schwartz i Patterson, 2003.)

Poznavanje kristalne strukture i strukture kromofora (Slika 4) omogućilo je unošenje određenih promjena u strukturu proteina. Tako je postignuto brže i poboljšano sazrijevanjem proteina pri 37 °C za ekspresiju u bakteriji *E. coli*, efikasnija ekspresija u modelnim organizmima koji imaju drugačije uporabe sličnih kodona (codon bias) te je riješen problem dimerizacije pri visokim koncentracijama GFP-a u stanici.

Zamjenom određenih aminokiselina GFP-a postignuto je da nove inačice fluorescentnih proteina (Slika 5) svijetle intenzivnije i imaju samo jedan apsorpcijski maksimum dok divlji tip GFP-a ima dva. Iz GFP-a razvijeni su proteini BFP (blue fluorescent protein), CFP (cyan fluorescent protein) i YFP (yellow fluorescent protein) koji svijetle plavo, tirkizno i žuto. Daljnji cilj istraživanja bila je konstrukcija crvenih fluorescentnih proteina jer u plavo-zelenom dijelu svjetlosnog spektra apsorbira više tvari stvarajući nepoželjne interferencije (Simoneov i Davis, 2015.). Međutim, pokušaji konstruiranja crvenih fluorescentnih proteina na temelju strukture GFP-a nisu bili uspješni (Lippincott-Schwartz i Patterson, 2003.).



Velika popularnost GFP-a ponukala je znanstvenike na traženje inačica fluorescentnih proteina u drugim organizmima. Tako su u organizmima razreda koralja, koji ne pokazuju svojstva bioluminiscencije, pronađeni proteini čije boje variraju od tirkizne do crvene (Matz i sur., 1999.). Najzanimljiviji od njih pokazao se protein DsRed tako nazvan jer dolazi iz koralja *Discosoma sp.* Njegova struktura slična je strukturi GFP-a, ali kromofor mu prolazi još jedan korak oksidacije što rezultira dodatnom dvostrukom vezom koja povećava konjugirani sustav i pomiče apsorpcijske i emisijske spektre prema crvenom dijelu (Strack i sur., 2010.). Iz proteina DsRed razvijen je monomerni oblik mRFP1, a na temelju njega razvijena je cijela serija mutanata poznata pod imenom „mFruits“ (Slika 5) koja pokriva crveni dio spektra (Shaner, 2013.).



**Slika 5** Paleta monomernih fluorescentnih proteina (Tsien, 2008.); SHM – somatic hypermutation

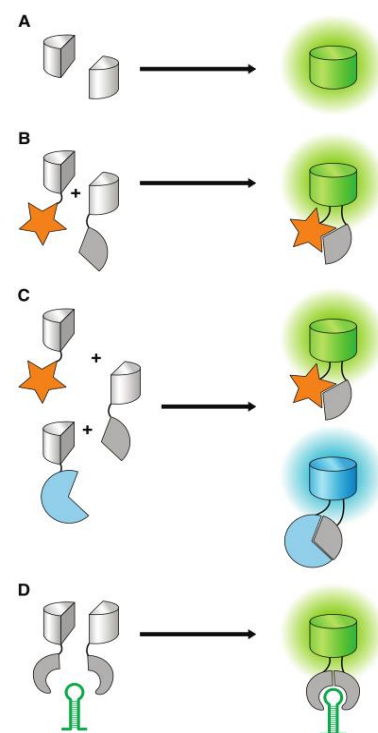
## 2.6. Primjena fluorescentnih proteina

Fluorescentni proteini u molekularnoj genetici mogu se koristiti kao oznake („tagovi“) ili kao indikatori. Prva primjena GFP-a bila je praćenje ekspresije *in vivo*. Sposobnost proteina da fluoresciraju bez enzimskih supstrata omogućava proučavanje karakteristika promotora u prirodnom genetičkom okruženju i pod utjecajem raznih faktora. Na sličnom principu temelji se i označavanje različitih stanica i tkiva. Kloniranjem gena za fluorescentne proteine pod kontrolu različitih promotora, fluorescentni proteini omogućuju vizualizaciju određenih tipova stanica u životinjama, organima, tkivima i kulturama stanica.

Fluorescentni proteini koriste se i za praćenje lokalizacije proteina u stanici, degradacije proteina i utjecaj vanjskih faktora na proteine. Protein od interesa fuzionira se s genom za neki od fluorescentnih proteina stvarajući fuzijski konstrukt kojeg je lako detektirati. Osim pojedinačnih proteina možemo detektirati i interakciju proteina stvarajući fuzije dvaju proteina čiju interakciju u stanici želimo proučiti s dva dijela fluorescentnog proteina koji odvojeni ne daju fluorescenciju (split fluorescent protein). Ako dolazi do interakcije tih proteina, dijelovi fluorescentnih proteina doći će u kontakt te će se formirati aktivni kromofor. Na ovaj način mogu se detektirati i interakcije proteina i RNA ili DNA molekula (Slika 8). Osim kao što je spomenuto, interakciju možemo detektirati i pomoću svojstva fluorescentnih proteina da kromofor više energije dio svoje ekscitacijske energije može prenijeti

kromoforu niže energije kroz neradijativnu dipol-dipol interakciju. Eksperiment se provodi kao i kod komplementacije, ali se mjeri promjena fluorescencije do koje dolazi samo kada su kromofori FRET parova udaljeni manje od 10 nm.

Osim kao pasivne oznake, fluorescentni proteini mogu se koristiti i kao aktivni indikatori stanja u stanici. Razvijeni su fluorescentni proteini kojima se može izmjeriti pH pojedinih organela i dijelova stanice *in vivo*. Fuzijom domena drugih proteina osjetljivih na pojedine spojeve i fluorescentnih proteina omogućuje se detekcija raznih spojeva kao npr. kalcija, vodikovog peroksida i fosfora (Chudakov i sur., 2010.).



**Slika 6** Fluorescentna komplementacija (Chudakov i sur., 2010.)

### 3. Materijali i metode

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Plazmidi

U ovom radu korišteno je 10 plazmida na kojima se nalazi 10 gena za odgovarajuće fluorescentne proteine (Addgene, Tablica 1). Svi plazmidi sadrže ishodište replikacije u bakteriji *E. coli* (*ori*) i gen *bla* koji je odgovoran za rezistenciju bakterija na antibiotik ampicilin.

Samo plazmid pUCP20T-E2Crimson kao okosnicu sadrži vektor pUCPT20 i promotor *lac*, dok svi ostali plazmidi sadrže vektor pBAD te se fluorescentni proteini nalaze pod regulacijom promotora operona *araBAD* (promotor operona *araBAD* opisan je u poglavlju 2.2)

**Tablica 1** Popis korištenih plazmida

| ime plazmida              | Veličina [pb] | referenca   |
|---------------------------|---------------|---|
| <b>pBAD-mCherry</b>       | 4834          | Michael Davidson i Roger Tsien                                    |
| <b>pBAD-mCitrine</b>      | 4791          | Robert Campbell, Michael Davidson, Oliver Griesbeck i Roger Tsien |
| <b>pBAD-mEGFP</b>         | 4791          | Michael Davidson  |
| <b>pBAD-mKate</b>         | 4782          | Michael Davidson  |
| <b>pBAD-mPlum</b>         | 4749          | Michael Davidson i Roger Tsien                                    |
| <b>pBAD-mTagBFP2</b>      | 5423          | Michael Davidson  |
| <b>pBAD-mTagRFP</b>       | 4782          | Michael Davidson  |
| <b>pBAD-mTFP1</b>         | 4802          | Robert Campbell i Michael Davidson                                |
| <b>pBAD-tdTomato</b>      | 5521          | Michael Davidson i Roger Tsien                                    |
| <b>pUCPT20T-E2Crimson</b> | 4927          | Mariette Barbier  |

##### 3.1.2. Mikroorganizmi

Plazmidi na kojima se nalaze geni za fluorescentne proteine navedeni u prethodnom poglavlju (Tablica 1), nabavljeni su u bakteriji *Escherichia coli* soj DH5 $\alpha$  genotipa: F<sup>-</sup> *endA1 glnV44 thi1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20*  $\phi$ 80d/*lacZ* $\Delta$ M15 $\Delta$ (*lacZYAargF*)U169, *hsdR17(r $\bar{k}$  m $\bar{k}^+$ )*,  $\lambda^-$  (Bethesda Research Laboratories).

Osim tog soja u ovom radu je korištena i bakterija *Escherichia coli* soj NEB stable genotipa: F' *proA+B+ lacI<sup>q</sup> Δ(lacZ)M15 zff::Tn10 (Tet<sup>R</sup>) Δ(ara-leu) 7697 araD139 fhuA ΔlacX74 galK16 galE15 e14- Φ80dlacZΔM15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (Str<sup>R</sup>) rph spoT1 Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)* (New England Biolabs) koja je prikladnija za ekspresiju fluorescentnih proteina (objašnjeno u poglavlju 4.1.)

### 3.1.3. Fluorescentni proteini

U ovom radu korišteni su fluorescentni proteini koji pokrivaju cijeli spektar vidljive svjetlosti. Njihov popis dan je u Tablici 2.

**Tablica 2** Popis fluorescentnih proteina korištenih u ovom radu

| fluorescentni protein | ekscitacija [nm] | emisija [nm] | ishodni organizam            | ishodni protein |
|-----------------------|------------------|--------------|------------------------------|-----------------|
| mTagBFP2              | 399              | 456          | <i>Discosoma sp.</i>         | mTagRFP         |
| mTFP1                 | 462              | 492          | <i>Clavularia sp.</i>        | cFP484          |
| mEGFP                 | 488              | 507          | <i>Aequorea victoria</i>     | GFP             |
| mCitrine              | 516              | 529          | <i>Aequorea victoria</i>     | GFP             |
| tdTomato              | 554              | 581          | <i>Discosoma sp.</i>         | DsRed           |
| mTagRFP               | 555              | 584          | <i>Entacmaea quadricolor</i> | eqFP587         |
| mCherry               | 587              | 610          | <i>Discosoma sp.</i>         | mRFP1           |
| mKate                 | 588              | 635          | <i>Entacmaea quadricolor</i> | eqFP587         |
| mPlum                 | 590              | 649          | <i>Discosoma sp.</i>         | mRFP1           |
| E2Crimson             | 611              | 646          | <i>Discosoma sp.</i>         | DsRed-Express2  |

### 3.1.4. Restriksijski enzimi

Za restriksijsku analizu plazmida korišteni su ovi restriksijski enzimi: *AccI*, *AlwNI*, *BglI*, *BsrBI*, *EcoRI*, *HincII*, *PstI*, *SspI* i *XmnI* (New England Biolabs).

### 3.1.5. Hranjive podloge

Korištene su tekuća i kruta hranjiva podloga LB uz dodatak ampicilina i hranjiva podloga SOC.

#### Hranjiva podloga LB

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| Bacto-tryptone          | 10 g/L |
| Yeast extract           | 5 g/L  |
| NaCl                    | 5 g/L  |
| agar (za krutu podlogu) | 15 g/L |

## Hranjiva podloga SOC

|                                      |          |
|--------------------------------------|----------|
| Bacto-tryptone                       | 20 g/L   |
| Yeast extract                        | 5 g/L    |
| NaCl                                 | 600 mg/L |
| KCl                                  | 200 mg/L |
| MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O | 4,2 g/L  |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 2,5 g/L  |
| glukoza                              | 3,6 g/L  |

Podloge su sterilizirane u autoklavu pri 121 °C 15 minuta. Otopina ampicilina koncentracije 20 mg/mL sterilizirana je filtracijom i dodaje se u sterilnu podlogu do konačne koncentracije od 100 µg/mL. U krutu podlogu dodaje se prije izlivanja u Petrijeve zdjelice kada je podloga ohlađena na oko 60 °C tako da konačna koncentracija bude 50 µg/mL.

### 3.1.6. Otopine

#### *3.1.6.1. Otopine za izolaciju DNA*

#### Amonijev acetat (8 M):

61,66 g amonijevog acetata se otopi u 100 mL destilirane vode. Otopina se sterilizira filtracijom i čuva na 4 °C.

#### RNaza:

Ribonukleaza A otopi se u 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) i 15 mM natrijevom kloridu do konačne koncentracije 10 mg/mL te se zagrije 15 minuta u kipućoj vodenoj kupelji. Nakon hlađenja na sobnu temperature čuva se na -20 °C.

#### Kalijev acetat (3 M):

Korištena otopina je 3 M u odnosu na kalij i 5 M u odnosu na acetat, a priprema se tako da se u 60 mL 5 M otopine kalijeva acetata doda 11.5 mL ledene octene kiseline i 28.5 mL vode. Otopina se sterilizira filtracijom i čuva na 4 °C.

#### GTE-pufer:

|                   |       |
|-------------------|-------|
| glukoza           | 50 mM |
| EDTA              | 10 mM |
| Tris-HCl (pH 8,0) | 25 mM |

Priprema se iz sterilnih otopina neposredno prije upotrebe.

#### NaOH/SDS:

|      |        |
|------|--------|
| NaOH | 200 mM |
| SDS  | 10 g/L |

Otopina se ne sterilizira. Priprema se neposredno prije upotrebe.

### 3.1.6.2. Otopine za agaroznu gel elektroforezu

#### TBE-pufer (10x):

|                      |            |
|----------------------|------------|
| Tris                 | 50 mM      |
| Borna kiselina       | 55 g       |
| EDTA (0,5 M; pH 8,0) | 40 mL      |
| Destilirana voda     | do 1000 mL |

#### Agarozni gel (1 %):

U 100 mL 1x TBE pufera otopi se 1 g agaroze.

#### Etidij bromid:

Osnovna otopina se pripremi u koncentraciji od 10 mg/mL, ne sterilizira se i čuva se pri 4 °C u tamnoj boci. Pri otapanju je obavezna upotreba dvostrukih nitrilnih rukavica. Otopina za vizualizaciju DNA priprema se dodatkom 50 µL osnovne otopine na 1 L destilirane vode te se čuva u tamnoj boci.

### 3.1.6.3. Otopine za indukciju ekspresije

#### Arabinoza (20 %):

Ishodišna otopina L-arabinoze pripremljena je otapanjem 2 g arabinoze u maloj količini destilirane vode te dodatkom destilirane vode do oznake od 10 mL. Otopina je sterilizirana filtracijom i čuvana na -20 °C.

#### IPTG (20 %):

Ishodišna otopina IPTG-a pripremljena je otapanjem 2 g IPTG-a u maloj količini destilirane vode te dodatkom destilirane vode do oznake od 10 mL. Otopina je sterilizirana filtracijom i čuvana na -20 °C.

### 3.1.7. Kemikalije i enzimi

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| Agaroz                         | <i>Pharmacia</i> , Kopenhagen, Danska                    |
| Arabinoza                      | <i>Sigma-Aldrich</i> , St. Louis, SAD                    |
| Amonijev acetat                | <i>Lach-ner</i> , Neratovice, Češka                      |
| Borna kiselina                 | <i>Fisher Scientific</i> , Hampton, New Hampshire, SAD   |
| Standardi za gel elektroforezu | <i>New England Biolabs</i> , Ipswich, Massachusetts, SAD |
| EDTA                           | <i>Carlo Erba Reagents</i> , Rodano, Italija             |
| Etanol (96 %)                  | <i>Novokem</i> , Zagreb                                  |
| Etidijev bromid                | <i>Sigma-Aldrich</i> , St. Louis, SAD                    |

|                                      |   |
|--------------------------------------|---|
| Glicerol                             | <i>Gram-mol, Zagreb, Hrvatska</i>   |
| Izopropanol                          | <i>Gram-mol, Zagreb, Hrvatska</i>   |
| Migracijsko bojilo (Gel Loading Dye) | <i>New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, SAD</i>                           |
| Natrijev acetat                      | <i>Lach-ner, Neratovice, Češka</i>  |
| Ribonukleaza A                       | <i>New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, SAD</i>                           |
| Sastojci hranjive podloge            | <i>Biolife, Milan, Italija</i>  |
| SDS                                  | <i>Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italija</i>                                  |
| Tris                                 | <i>Merck, Hohenbrunn, Njemačka</i><br><i>Carlo Erba Reagents, Rodano, Italija</i> |

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Izolacija plazmidne DNA (MiniPrep)

Volumen od 3 mL bakterijske kulture uzgojene preko noći centrifugira se dvokratno u mikrokivetama od 1,5 mL 1 minutu pri  $10\,000\text{ min}^{-1}$  i sobnoj temperaturi. Supernatant se odlije te odsiše vakuum sisaljkom. Talog stanica resuspendira se mikropipetom u 120  $\mu\text{L}$  hladnog G-TE pufera. Suspenzija se 3 minute inkubira na ledu te se doda 240  $\mu\text{L}$  otopine NaOH/SDS i promiješa se okretanjem mikrokivete 20ak puta. Zatim se doda 360  $\mu\text{L}$  otopine natrijeva acetata i ponovi se miješanje. Nakon inkubacije na ledu od 10 minuta, mikrokivete se centrifugiraju 10 minuta pri  $10\,500\text{ min}^{-1}$  i  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . Supernatant se pažljivo prebaci u čistu mikrokivetu, a ako je potrebno ponovno se centrifugira kako bi se uklonili ostaci proteina. U otopinu se doda 390  $\mu\text{L}$  izopropanola i promiješa se okretanjem mikrokiveta. Slijedi centrifugiranje 20 minuta pri  $11\,000\text{ min}^{-1}$  i  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . Supernatant se odlije i odsiše vakuum sisaljkom te se ostavi sušiti na toplom. Kada talog postane proziran, što znači da je suh, resuspendira se u 300  $\mu\text{L}$  TE pufera. Kako bi se potpuno otopio talog se inkubira 5 minuta na  $55\text{-}70\text{ }^\circ\text{C}$ , promiješa mikropipetom te ponovno jednako inkubira.

Pročišćavanje izolirane DNA vrši se taloženjem amonijevim acetatom i etanolom. U 300  $\mu\text{L}$  DNA otopljene u TE puferu doda se 100  $\mu\text{L}$  8 M amonijevog acetata i 800  $\mu\text{L}$  96 % etanola. Otopina se inkubira 15 minuta na  $4\text{ }^\circ\text{C}$ , a zatim se centrifugira 35 minuta pri  $11\,500\text{ min}^{-1}$  i  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . Supernatant se odlije, a talog se osuši na toplom i otopi u 20  $\mu\text{L}$  TE pufera. Ovaj način izolacije plazmidne DNA izolira i ribonukleinske kiseline pa kako ne bismo imali karakterističan „smear“ na gelu za agaroznu elektroforezu u otopinu se doda 0,5  $\mu\text{L}$  RNaze, inkubira se 5 minuta na  $55\text{-}70\text{ }^\circ\text{C}$ , promiješa mikropipetom i ponovno jednako inkubira.

### 3.2.2. Agarozna gel elektroforeza

U svrhu provjere izolacije i restrikcijske analize plazmida korištena je agarozna gel elektroforeza. Gel je pripremljen otapanjem određene mase agaroze za željenu koncentraciju gela u 1x TBE puferu tako da je tikvica s otopinom grijana u intervalima od 30 sekundi u mikrovalnoj pećnici dok u otopini više nije bilo neotopljene agaroze. Gel je prije izlijevanja ohlađen na oko  $60\text{ }^\circ\text{C}$ . Kalupi su pripremljeni tako da su oblijepljeni krep trakom i u utore su umetnuti češljevi za stvaranje jažica. Kalupi su postavljeni na ravnu površinu i gel je izliven do polovice visine češlja. Zatim je češalj izvađen, njime su uklonjeni mjehurići nastali izlijevanjem te je vraćen u kalup.



Kada se gel skrutne, uklone se trake te se gel s kalupom stavi u kadicu ispunjenu TBE puferom tako da on u potpunosti prekriva gel. Češljevi se okomito izvuku i u dobivene jažice otpipetiraju se uzorci DNA pomiješani s migracijskim bojilom. Elektroforeza malih gelova vođena je u Wide Mini-Sub Cell GT Bio-Rad kadici prateći migracijsko bojilo kao orijentir za zaustavljanje elektroforeze. Elektroforeza velikih gelova vođena je u kadici Pharmacia Biotech GNA 200. Po završetku elektroforeze, gelovi su bojani u otopinu etidijevog bromida 20ak minuta te fotografirani na transiluminatoru kroz crveni filter.

### 3.2.3. Cijepanje DNA restrikcijskim enzimima

Restrikcijske smjese pripremljene su u ukupnom volumenu od 20  $\mu$ L prema uputama proizvođača (New England Biolabs).

### 3.2.4. Transformacija kemijski kompetentnih stanica bakterije *Escherichia coli* soj NEB Stable

Otpipetirano je 5  $\mu$ L dovoljno otopljene suspenzije stanica trajne kulture i prebačeno u mikrokivetu na ledu. Dodano je 2  $\mu$ L otopine DNA i promiješano. Mikrokivete su inkubirane na ledu 30 minuta, a zatim toplinski šokirane pri 42 °C točno 30 sekundi. Dodano je 950  $\mu$ L SOC podloge i mikrokivete su inkubirane na 37 °C 60 minuta. Suspenzija je naciepljena na LB Amp ploče i inkubirana preko noći na 37 °C.

### 3.2.5. Indukcija ekspresije fluorescentnih proteina

Nakon provedenog eksperimenta zaključeno da je optimalna koncentracija za indukciju ekspresije fluorescentnih proteina 0,02 % otopina arabinoze u LB-Amp hranjivoj podlozi. Podloga za ekspresiju pripremljena je dodatkom 20 % filtracijom sterilizirane otopine arabinoze u sterilnu LB podlogu s ampicilinom.

Indukcija IPTG-om provedena je tako da je u LB-Amp podlogu dodano je 0,56  $\mu$ L/mL 20 % otopine IPTG-a, odnosno podloga je sadržavala 0,112 mg/mL IPTG-a. Bakterije su naciepljene iz pojedinačnih kolonija i uzgajane u Falcon kivetama na tresilici pri 37 °C.

### 3.2.6. Fluorescencijska mikroskopija

Za fluorescencijsku mikroskopiju korišten je mikroskop EVOS FLoid Cell Imaging Station tvrtke Invitrogen čije povećanje iznosi 400 puta. Budući da mikroskop fotografira tri različita kanala (Tablica 3) te ih zatim programski preklapa, potrebno je osigurati da se promatrane

stanice tijekom mikroskopiranja ne pomaknu. To je osigurano idućim protokolom: Mikropipetom je uzeto 1,5 mL prekonoćne kulture, prebačeno u mikroketu i centrifugirano 1 minutu na  $10\,000\text{ min}^{-1}$ . Supernatant je odliven te je postupak još jednom ponovljen. Talog kulture resuspendiran je u  $100\ \mu\text{L}$  50 % glicerola.

Stanice su mikroskopirane između dva pokrovna stakalca jer zbog njihove male debljine ne dolazi do interferencija nečistoća iz stakla koje se očituju na plavom kanalu mikroskopa. Na pokrovno stakalce dodano je  $2\ \mu\text{L}$  suspenzije stanica u glicerolu te je poklopljeno drugim stakalcem. Podešene su optimalne vrijednosti intenziteta svjetlosti za svaki kanal te su fotografije spremljene kao JPG format.

**Tablica 3** Valne duljine ekscitacije i emisije na mikroskopu EVOS Flouid

| <b>boja kanala</b> | <b>ekscitacija [nm]</b> | <b>emisija [nm]</b> |
|--------------------|-------------------------|---------------------|
| plava              | 390/40                  | 446/33              |
| zelena             | 482/18                  | 532/59              |
| crvena             | 586/15                  | 646/68              |

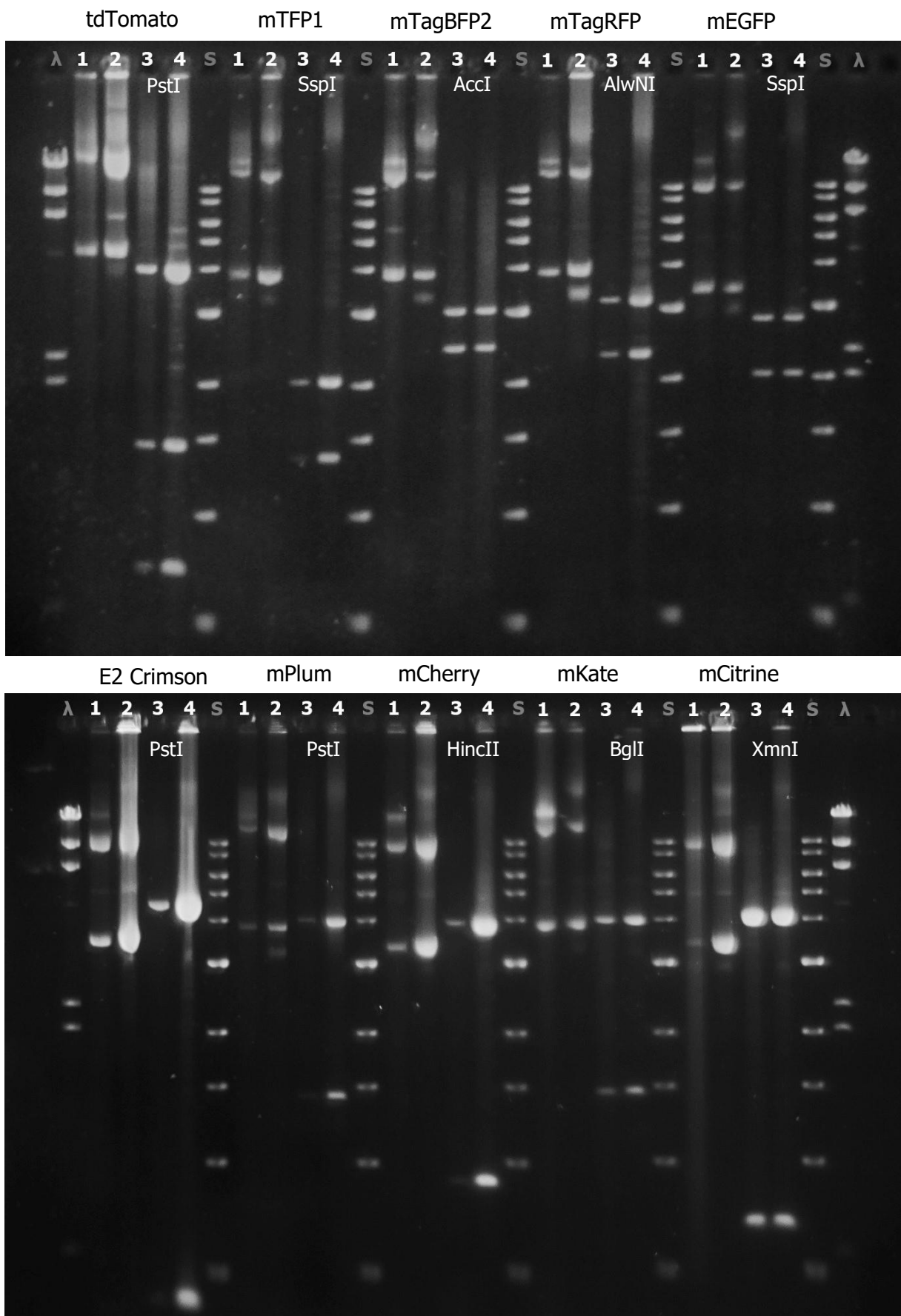
## 4. Rezultati i rasprava

Cilj ovog rada je istražiti kompatibilnost deset često korištenih fluorescentnih proteina s fluorescencijskim mikroskopom EVOS Fluid Imaging Station, odnosno koji su od 10 proteina vidljivi te mogu li se međusobno razlikovati ovim mikroskopom koji kao izvor svjetlosti koristi plave, crvene i zelene svjetleće diode. Za ostvarenje ovog cilja, prije samog mikroskopiranja bilo je potrebno: (i) izolirati plazmide koji nose gene za fluorescentne proteine iz bakterije *E. coli* soj DH5 $\alpha$ ; (ii) tim plazmidima transformirati bakteriju *E. coli*, soj NEB Stable koji je prikladniji za ekspresiju fluorescentnih proteina (poglavlje 4.1); (iii) potvrditi strukturu svih deset plazmida restrikcijском analizom i (iv) optimizirati ekspresiju fluorescentnih proteina u bakterijskim stanicama.

### 4.1. Transformacija bakterije *E. coli* soj NEB Stable

Plazmidi koji nose gene za fluorescentne plazmide nabavljeni su u soju bakterije *E. coli* DH5 $\alpha$ , ali taj soj sposoban je unijeti arabinozu u stanicu te je metabolizirati pa nije prikladan za ekspresiju proteina reguliranu promotorom operona *araBAD*. Naime, u tom slučaju u stanici bi tijekom uzgoja došlo do smanjenja koncentracije arabinoze, a time i smanjenja ekspresije fluorescentnih proteina. Zato je bilo potrebno izolirati plazmidnu DNA iz soja DH5 $\alpha$  te njome transformirati soj NEB stable koji ima mutaciju *araD139* (genotip soja naveden je u poglavlju 3.1.2.). Posljedica navedene mutacije nedostatak je L-ribuloza-fosfat 4-epimeraze što sprječava katabolizam, ali ne i transport arabinoze pa je njena koncentracija u stanici stalna. Također, soj NEB Stable ima mutaciju *lacI<sup>q</sup>* koja uzrokuje visoku ekspresiju proteina represora *lac* operona pa u stanicama ne dolazi do konstitutivne ekspresije fluorescentnog proteina E2Crimson čiji je gen pod kontrolom pod *lac* promotora. Zahvaljujući tome, do aktivacije ekspresije fluorescentnih proteina dolazi tek dodatkom IPTG-a (Englesberg i sur., 1962.).

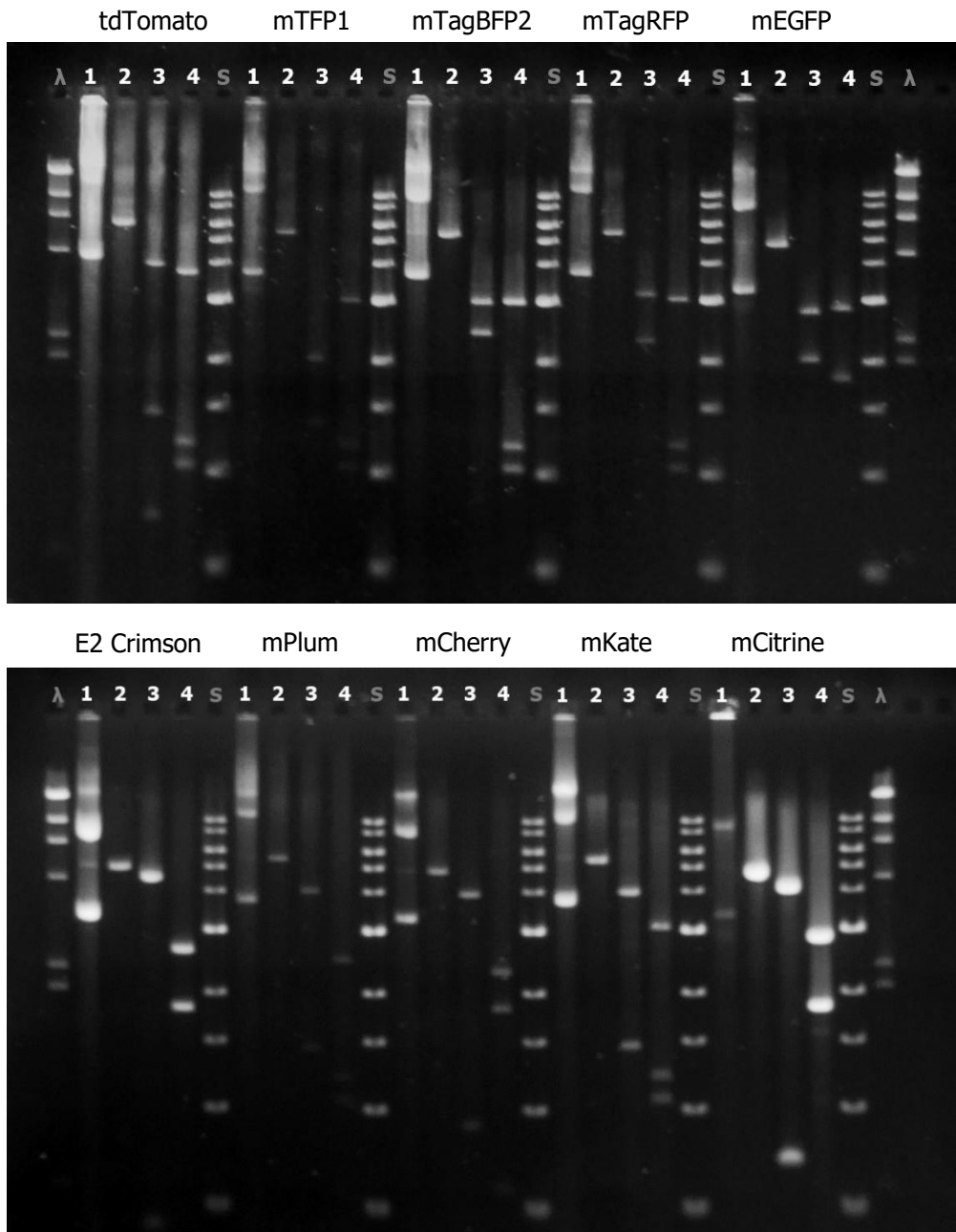
Iz bakterijskih stanica plazmidna DNA izolirana je prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.1, a kemijski kompetentan soj NEB Stable transformiran je prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.4. Uspješnost transformacije provjerena je gel elektroforezom uspoređujući plazmidnu DNA izoliranu iz soja DH5 $\alpha$  kojom je transformiran soj NEB Stable i plazmidnu DNA izoliranu iz soja NEB Stable nakon transformacije. Uspoređena je kružna plazmidna DNA (Slika 7, jažice 1 i 2) te ista DNA pocijepana navedenim restrikcijским enzimima (Slika 7, jažice 3 i 4).



**Slika 7** Usporedba plazmida koji kodiraju za proteine navedene na slici izoliranih iz sojeva DH5a i NEB Stable;  
*S* - NEB 1 kb ladder 100 ng;  
*λ* - *λ*/HindIII 100 ng; 1- kružni plazmid iz DH5a; 2- kružni plazmid iz NEB Stable; 3 - pocijepani plazmid iz DH5a;  
 4 - pocijepani plazmid iz NEB Stable

## 4.2. Dodatna restrikcijska analiza plazmida

U svrhu dodatne provjere strukture plazmida prije ekspresije fluorescentnih proteina napravljena je restrikcijska analiza. Svi plazmidi koji kodiraju za fluorescentne proteine pocijepani su restrikcijskim enzimom koji cijepa plazmid samo na jednom mjestu (*EcoRI*, jažica 2), restrikcijskim enzimom koji daje veći broj fragmenata (*BsrBI*, jažica 4) te restrikcijskim enzimom koji svaki plazmid cijepa na različite fragmente (Tablica 4, jažica 3 na Slici 8).



**Slika 8** Restrikcijska analiza plazmida koji kodiraju za proteine navedene na slici; S - NEB 1 kb ladder 100 ng;  $\lambda$  -  $\lambda$ /HindIII 100 ng; 1 - kružni plazmid; 2 - plazmid pocijepan restrikcijskim enzimom *EcoRI* (single cutter); 3 - plazmid pocijepan enzimima navedenima u Tablici 4; 4 - plazmid pocijepan restrikcijskim enzimom *BsrBI*

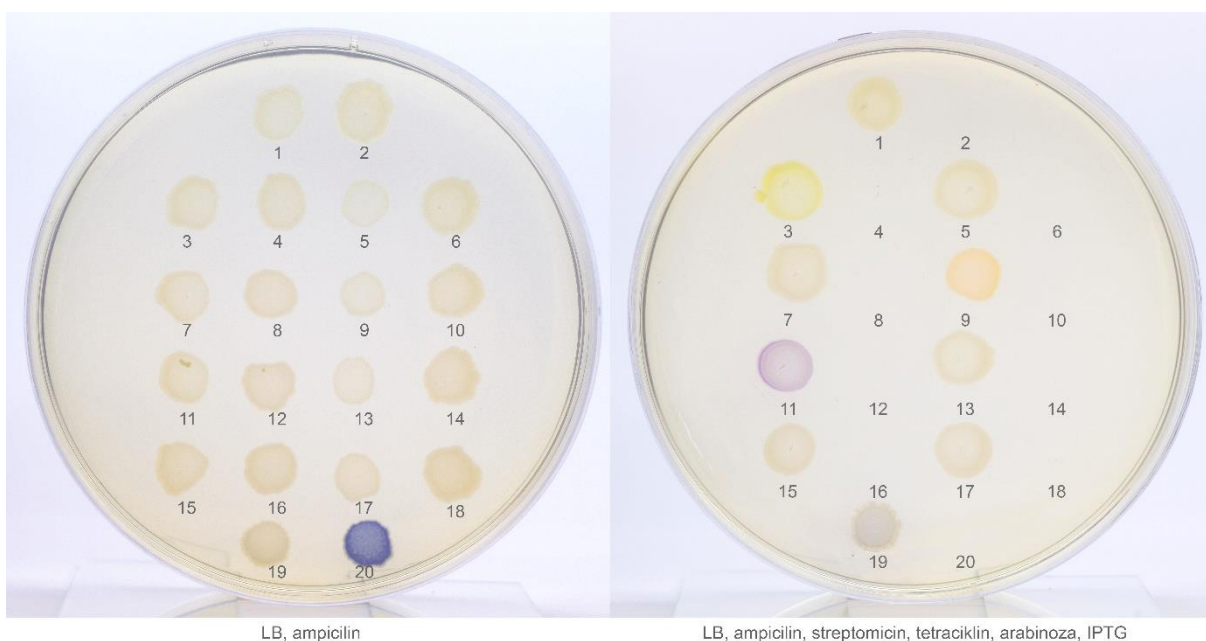
**Tablica 4** Popis restrikcijskih enzima koji svaki plazmid cijepaju na različite fragmente (Slika 8, jažica 3)

| uzorak DNA<br>u jažici 3 | restrikcijski<br>enzim | uzorak DNA<br>u jažici 3 | restrikcijski<br>enzim |
|--------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|
| pBAD-tdTomato            | <i>PstI</i>            | pUCP20T-E2Crimson        | <i>PstI</i>            |
| pBAD-mTFP1               | <i>SspI</i>            | pBAD-mPlum               | <i>PstI</i>            |
| mTagBFP2                 | <i>AccI</i>            | pBAD-mCherry             | <i>HincII</i>          |
| mTagRFP                  | <i>AlwNI</i>           | pBAD-mKate               | <i>BglI</i>            |
| mEGFP                    | <i>SspI</i>            | pBAD-mCitrine            | <i>XmnI</i>            |

Iz plazmidnih mapa (Prilog 1) vidljivo je kako se fragmenti dobiveni restrikcijskom analizom sa Slike 8 poklapaju s očekivanim fragmentima.

#### 4.3. Provjera transformiranih sojeva

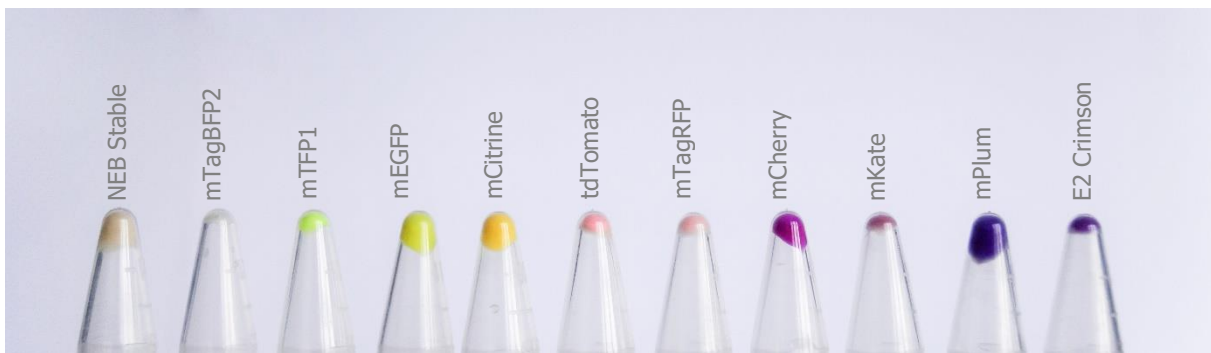
Osim provjere plazmida, provjeren je i fenotip sojeva (Slika 9). Soj NEB Stable rezistentan je na streptomycin i tetraciklin, a netransformirani soj DH5a nije rezistentan na antibiotike (genotip naveden u poglavlju 3.1.2.). Oba soja nacijepljena su u obliku kapljica na krutu LB podlogu s ampicilinom i na podlogu s ampicilinom, tetraciklinom, streptomycinom, arabinozom i IPTG-om. Soj DH5a transformiran plazmidima koji nose gene za fluorescentne proteine nije porastao na podlozi s ampicilinom, tetraciklinom i streptomycinom, dok NEB Stable jest što potvrđuje da se radi o navedenim sojevima.



**Slika 9** Provjera fenotipa sojeva DH5a i NEB Stable koji ekspimiraju navedene fluorescentne proteine; neparni brojevi označavaju soj NEB Stable, a parni DH5a; dani redom: 1,2 -mTagBFP2; 3, 4 - mTFP1; 5, 6 - mEGFP; 7, 8 - mCitrine; 9, 10 - tdTomato; 11, 12 - mTagRFP; 13, 14 - mCherry; 15, 16 - mKate; 17, 18 - mPlum; 19, 20 - E2 Crimson

Također, vidljivo je da je na podlozi bez IPTG-a soj DH5 $\alpha$  koji pod regulacijom *lac* promotora ekspirira protein E2Crimson obojan, što ukazuje na konstitutivnu ekspresiju fluorescentnog proteina pod *lac* promotorom, dok u soju NEB Stable koji ekspirira isti protein nije došlo do obojenja na podlozi bez IPTG-a jer soj ekspirira represor *lac* operona.

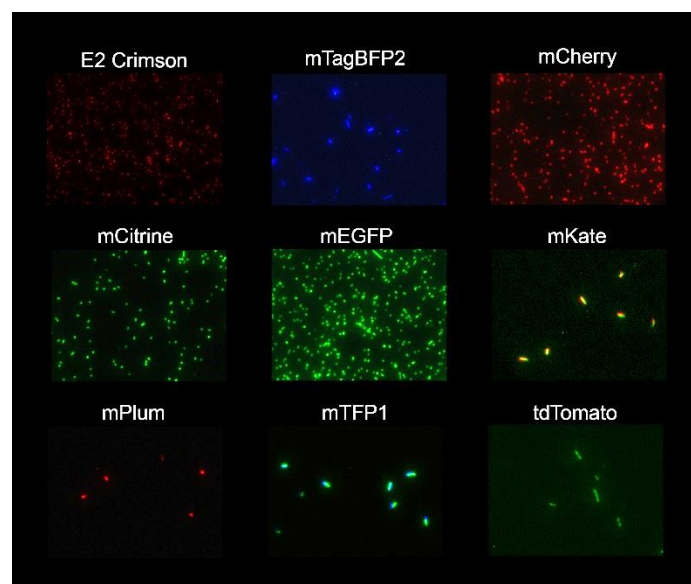
Uzgoj u podlozi s arabinozom i centrifugiranje (opisano u poglavlju 3.2.7. i 3.2.8.) rezultirao je obojenim talogom stanica (Slika 10) što je vizualna potvrda uspješnosti transformacije i indukcije ekspresije.



**Slika 10** Talog stanica soja NEB Stable koji ekspirira navedene fluorescentne proteine dobiven postupkom opisanim u poglavlju 3.2.6.

#### 4.4. Mikroskopiranje stanica koje ekspiriraju fluorescentne proteine

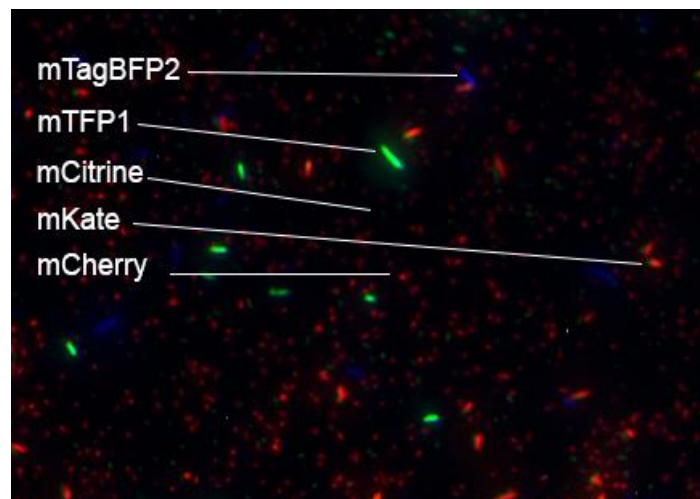
Mikroskopiranjem stanica u kojima su ekspirirani fluorescentni proteini (na način opisan u poglavlju 3.2.6.) utvrđeno je da je EVOS Floid Imaging Station fluorescencijskim mikroskopom moguće vidjeti sve korištene proteine, osim proteina mTagRFP (Slika 11).



**Slika 11** Proteini vidljivi na fluorescencijskom mikroskopu EVOS Floid Imaging Station

Nadalje, mikroskopiranjem svih kombinacija od po dva soja koja ekspimiraju različiti fluorescentni protein (Prilog 2) utvrđeno je da međusobno nije moguće razlikovati proteine Citrine, mEGFP i tdTomato koji svi svijetle samo na zelenom kanalu. Isto je i s proteinima mCherry, E2 Crimson i mPlum za crveni kanal.

Protein mTagBFP2 jedini svijetli samo na plavom kanalu. Protein mTFP1 svijetli na zelenom i slabije na plavom kanalu što preklapanjem slika tih kanala daje tirkizno obojenje. Slično je i s proteinom mKate koji svijetli na crvenom i zelenom kanalu dajući narančasto obojenje. To omogućuje međusobno razlikovanje do pet fluorescentnih proteina (Slika 12) u istom uzorku, jedan crveni (mCherry, mPlum ili E2 Crimson), jedan zeleni (mEGFP, mCitrine ili tdTomato) te plavi mTagBFP2, tirkizni mTFP1 i narančasti mKate.

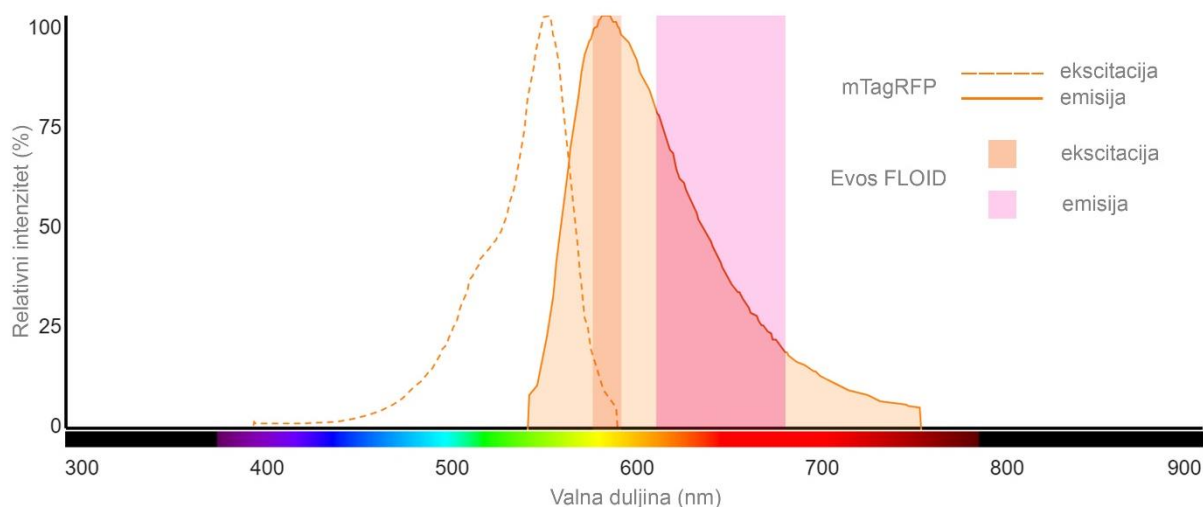


**Slika 12** Bakterije s ekspimiranim proteinima mTagBFP2, mTFP1, mCitrine, mKate i mCherry u istom uzorku

Također, prilikom fotografiranja parova bakterija, određeni su intenziteti svjetlosti pojedinih kanala koji daju najbolje razlikovanje bakterijskih stanica s ekspimiranim fluorescentnim proteinima (Prilog 3).



Protein mTagRFP kojeg nije moguće detektirati ima ekscitacijski maksimum na 555 nm, a emisijski na 584 nm. Crveni kanal mikroskopa ekscitira pri 586 nm, a širina pojasa je 15 nm, emisija se bilježi na 646 nm pri širini pojasa od 68 nm što ukazuje da je razlog nemogućnosti detekcije nedovoljna ekscitacija proteina (Slika 13).



**Slika 13** Usporedba ekscitacijskih i emisijskih spektara proteina mTagRFP i mikroskopa

Kod ovog primjera usporedbom ekscitacijskih i emisijskih maksimuma i uzimanjem u obzir širine pojasa filtera mikroskopa, lako je predvidjeti da detekcija proteina nije moguća.

Ista usporedba napravljena je za sve proteine i dana u Tablici 5. Nula označava da i ekscitacijski i emisijski maksimum ulaze u pojas mikroskopa, a brojčana vrijednost srednja je vrijednost razlike ekscitacijskog i emisijskog maksimuma (u nanometrima) proteina i najbliže granice pojasa mikroskopa ekscitacije i emisije.

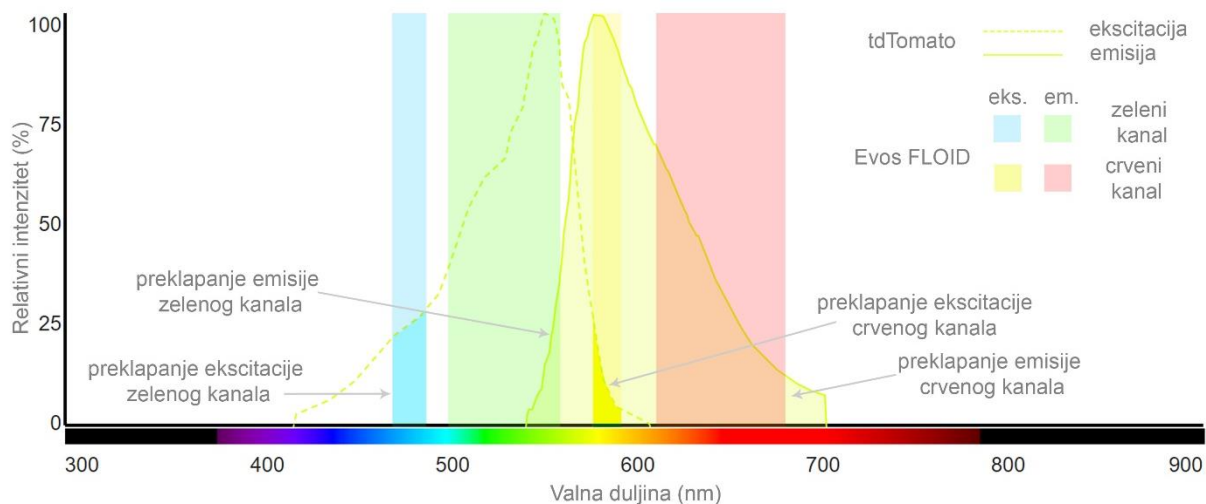
**Tablica 5** Usporedba maksimuma ekscitacije i emisije proteina i mikroskopa

| protein   | kanal |        |        |
|-----------|-------|--------|--------|
|           | plavi | zeleni | crveni |
| mTagBFP2  | 0     | 60,5   | 168    |
| mTFP1     | 40,5  | 11     | 118,5  |
| mEGFP     | 59    | 0      | 98     |
| mCitrine  | 86    | 12,5*  | 73     |
| tdTomato  | 131   | 41     | 28     |
| mTagRFP   | 133   | 43     | 26     |
| mCherry   | 162   | 72     | 1      |
| mKate     | 175   | 85     | 0      |
| mPlum     | 183   | 93     | 0      |
| E2Crimson | 192   | 102    | 9**    |

\*maksimum samo unutar emisijskog pojasa; \*\*maksimum samo unutar ekscitacijskog pojasa

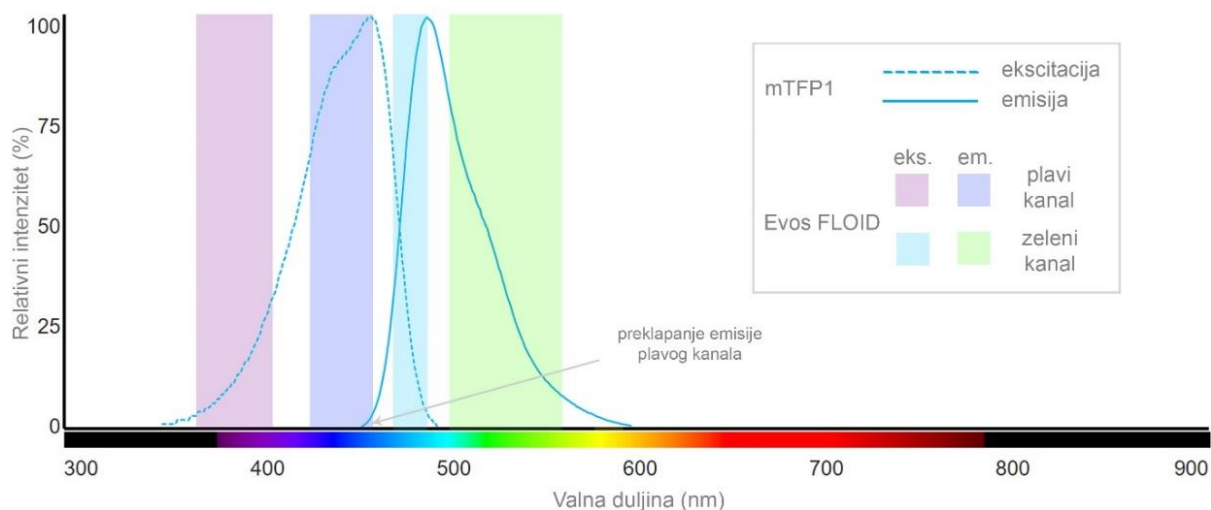
Iz Tablice 4 je vidljivo da su samo proteini mTagBFP2, mEGFP, mKate i mPlum u potpunosti kompatibilni s mikroskopom, ali moguće ih je detektirati sve osim navedenog mTagRFP. Razlog tome različite su krivulje apsorpcije proteina.

Protein tdTomato po valnoj duljini spada u crvene proteine, ali na crvenom kanalu mikroskopa i pri najvećem intenzitetu izrazito je taman. Međutim, na zelenom kanalu dobro se vidi pri intenzitetu od 70 %, a razlog tome bolje je preklapanje ekscitacije zelenog, nego crvenog kanala (Slika 14).



**Slika 14** Usporedba ekscitacijskih i emisijskih spektara proteina tdTomato i mikroskopa

Protein mTFP1 spada u tirkizne proteine, iako bi se pregledom apsorpcijske krivulje (Slika 15) dalo zaključiti kako protein neće biti vidljiv na plavom kanalu, dobro je vidljiv pri maksimalnom intenzitetu. Na zelenom kanalu odlično je vidljiv pa preklapanjem kanala dobivamo tirkizno obojenje koje je različito od svih ostalih proteina. Protein mKate isti je slučaj za crveni dio spektra. Svijetli na zelenom i crvenom kanalu preklapanjem dajući narančasto obojenje koje se razlikuje od svih ostalih proteina (Slika 11).



**Slika 15** Usporedba ekscitacijskih i emisijskih spektara proteina mTFP1 i mikroskopa

## 5. Zaključak

Mikroskopom EVOS Flouid Imaging Station moguće je detektirati bakterijske stanice koje ekspriiraju proteine mTagBFP2, mTFP1, mEGFP, mCitrine, tdTomato, mCherry, mKate, mPlum i E2Crimson, ali nije moguće detektirati stanice koje ekspriiraju fluorescentni protein mRFP1.

Od svih deset istraživanih proteina, u istom uzorku međusobno je moguće razlikovati pet proteina. I to plavi (mTagBFP2), tirkizni (mTFP1), narančasti (mKate) te po jedan od tri zelena (mEGFP, mCitrine ili tdTomato) i tri crvena (mCherry, mPlum ili E2 Crimson) fluorescentna proteina.

## 6. Literatura

- Aswani, K., Jinadasa, T. and Brown, C. (2012). Fluorescence Microscopy Light Sources. *Microscopy Today*, **20(04)**, str.22-28.
- Rosano, G. and Ceccarelli, E. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. and Prasher, D. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, **263(5148)**, str.802-805.
- Chudakov, D., Matz, M., Lukyanov, S. and Lukyanov, K. (2010). Fluorescent Proteins and Their Applications in Imaging Living Cells and Tissues. *Physiological Reviews*, **90(3)**, str.1103-1163.
- Cleary, P. P., & Englesberg, E. (1974). Transcriptional Control in the l-Arabinose Operon of *Escherichia coli* B/r. *Journal of Bacteriology*, **118(1)**, 121–128.
- Cody, C., Prasher, D., Westler, W., Prendergast, F. and Ward, W. (1993). Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the Aequorea green-fluorescent protein. *Biochemistry*, **32(5)**, str.1212-1218.
- Craggs, T. (2009). Green fluorescent protein: structure, folding and chromophore maturation. *Chemical Society Reviews*, **38(10)**, str.2865.
- Englesberg E., Anderson R. L., Weinberg R, Lee N., Hoffee P., Huttenhauer G., Boyer H. (1962). L-arabinose-sensitive, l-ribulose 5-phosphate 4-epimerase-deficient mutants of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **84**, 137-136
- Guzman, L., Belin, D., Carson, M. and Beckwith, J. (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *Journal of Bacteriology*, **177(14)**, str.4121-4130.
- Casali, N. (2003). *Escherichia coli* Host Strains. U: N. Casali and A. Preston, ur., *E. coli Plasmid Vectors Methods and Applications*. New York: Humana Press. str. 44.
- Lakowicz, J. (2010). *Principles of fluorescence spectroscopy*. New York: Springer Science+Business Media, str.1-19.
- Lippincott-Schwartz, J. (2003). Development and Use of Fluorescent Protein Markers in Living Cells. *Science*, **300(5616)**, str.87-91.

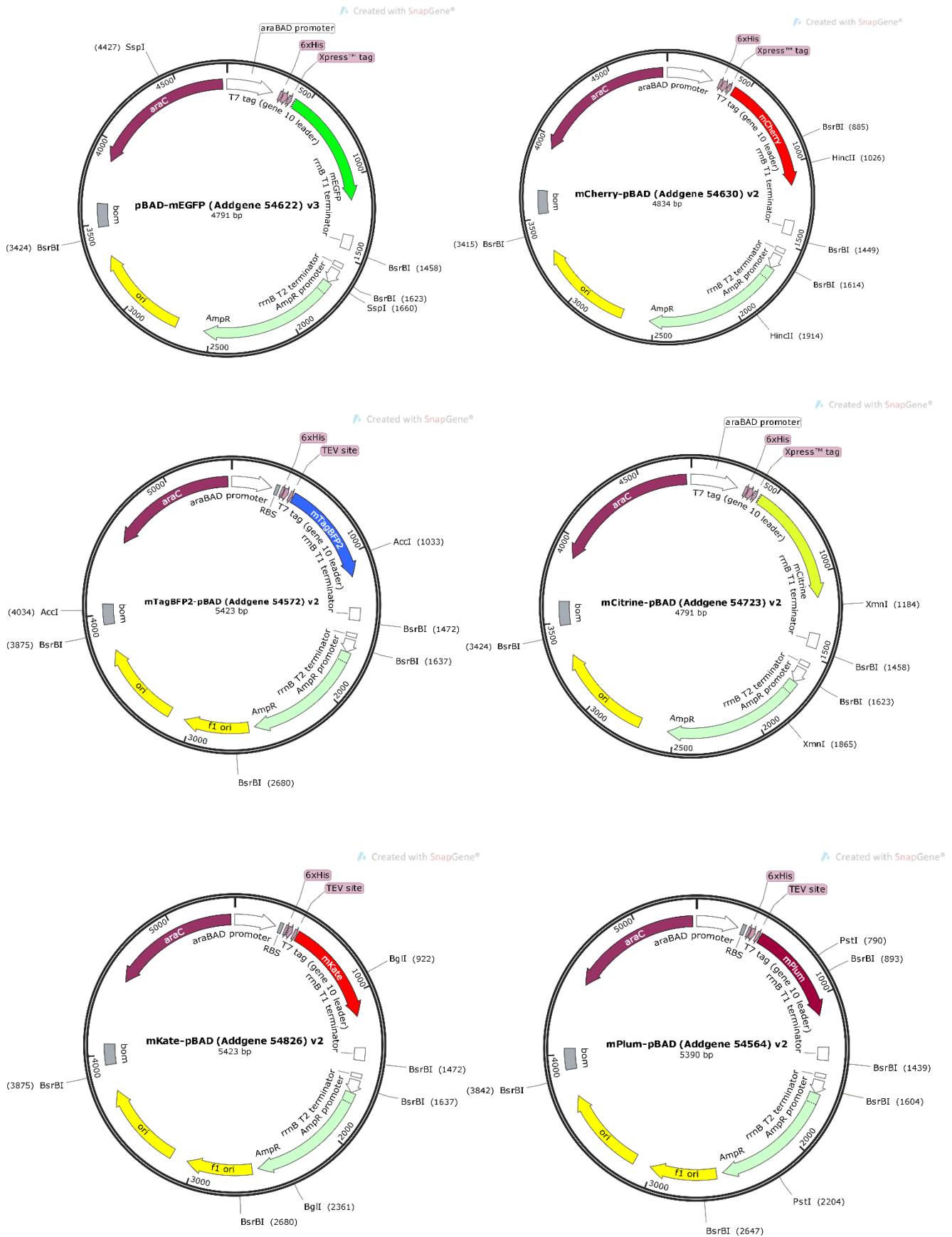
- Luterotti, S. (2002). *Uvod u kemijsku analizu*. [online] <[http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana\\_Luterotti/06/061.htm](http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/06/061.htm)> Pristupljeno 26. lipnja 2017.
- Matz, M., Fradkov, A., Labas, Y., Savitsky, A., Zaraisky, A., Markelov, M. and Lukyanov, S. (1999). Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nature Biotechnology*, **17(10)**, str.969-973.
- Morise, H., Shimomura, O., Johnson, F. and Winant, J. (1974). Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry*, **13(12)**, str.2656-2662.
- Odak, Lj., Škorić, I. (2017). *Organska fotokemija*. 1. izd Zagreb: Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, str. 21-53.
- Ormö, M., Cubitt, A., Kallio, K., Gross, L., Tsien, R. and Remington, S. (1996). Crystal Structure of the *Aequorea victoria* Green Fluorescent Protein. *Science*, **273(5280)**, str.1392-1395.
- Schleif, R. (2010). AraC protein, regulation of the L-arabinose operon in *Escherichia coli*, and the light switch mechanism of AraC action. *FEMS Microbiology Reviews*, **34(5)**, str.779-796.
- Shaner, N. (2013). The mFruit Collection of Monomeric Fluorescent Proteins. *Clinical Chemistry*, **59(2)**, str.440-441.
- Shimomura, O. (1979). Structure of the chromophore of *Aequoreagreen* fluorescent protein. *FEBS Letters*, **104(2)**, str.220-222.
- Simeonov, A. and I. Davis, M. (2016). Interference with Fluorescence and Absorbance. U: G. Sittampalam i sur. urd. [online] Bethesda: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, str.712.  
<[https://www.researchgate.net/profile/Jeffrey\\_Weidner/publication/224889574\\_Calculations\\_and\\_Instrumentation\\_used\\_for\\_Radioligand\\_Binding\\_Assays/links/57dff6fd08aee5d2c6dd99b8/Calculations-and-Instrumentation-used-for-Radioligand-Binding-Assays.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Jeffrey_Weidner/publication/224889574_Calculations_and_Instrumentation_used_for_Radioligand_Binding_Assays/links/57dff6fd08aee5d2c6dd99b8/Calculations-and-Instrumentation-used-for-Radioligand-Binding-Assays.pdf)> Pristupljeno 23. lipnja 2017.
- Sinden, R. (1994). *DNA Structure and Function*. 1st ed. Burlington: Elsevier Science, str.75-77.
- Strack, R., Strongin, D., Mets, L., Glick, B. and Keenan, R. (2010). Chromophore Formation in DsRed Occurs by a Branched Pathway. *Journal of the American Chemical Society*, **132(24)**, str.8496-8505.

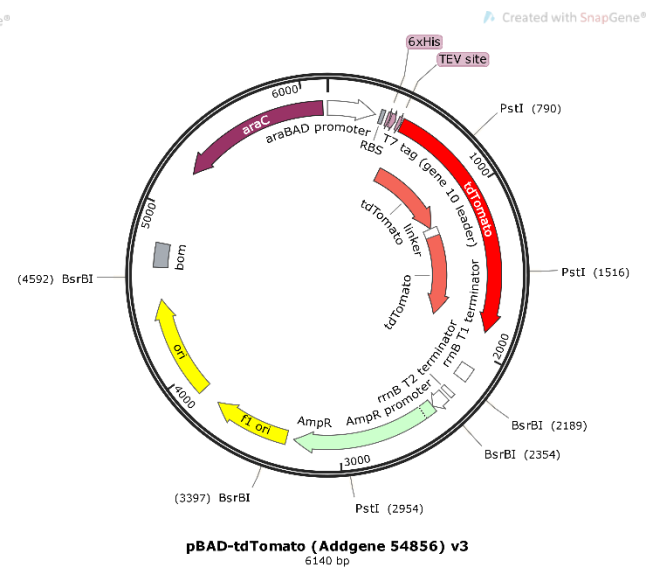
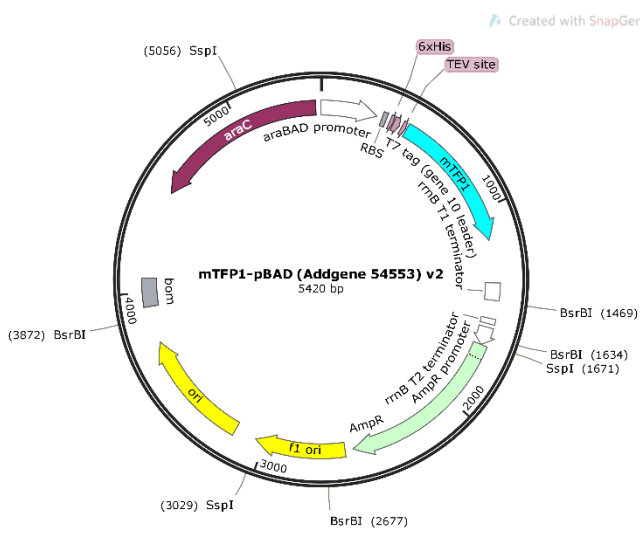
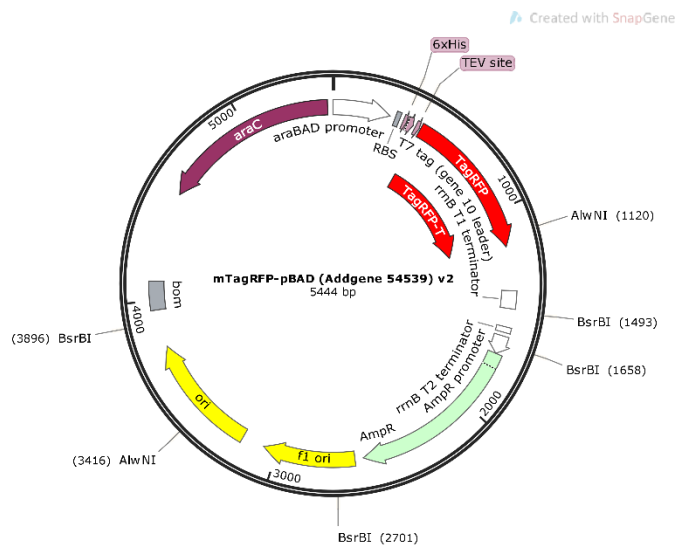
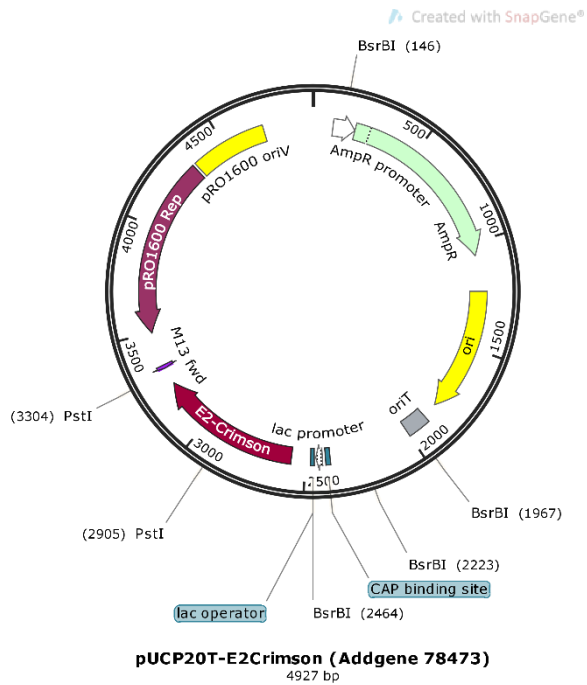
Morse, N. and Alper, H. (2016). In: S. Van Dien, ed., *Metabolic Engineering for Bioprocess Commercialization*, 1. izd. San Diego, CA: Springer, str.8.

Wang, S. and Hazelrigg, T. (1994). Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila* oogenesis. *Nature*, **369(6479)**, str.400-403.

Wessels, J., Pliquett, U. and Wouters, F. (2012). Light-emitting diodes in modern microscopy-from David to Goliath?. *Cytometry Part A*, **81A(3)**, str.188-197.

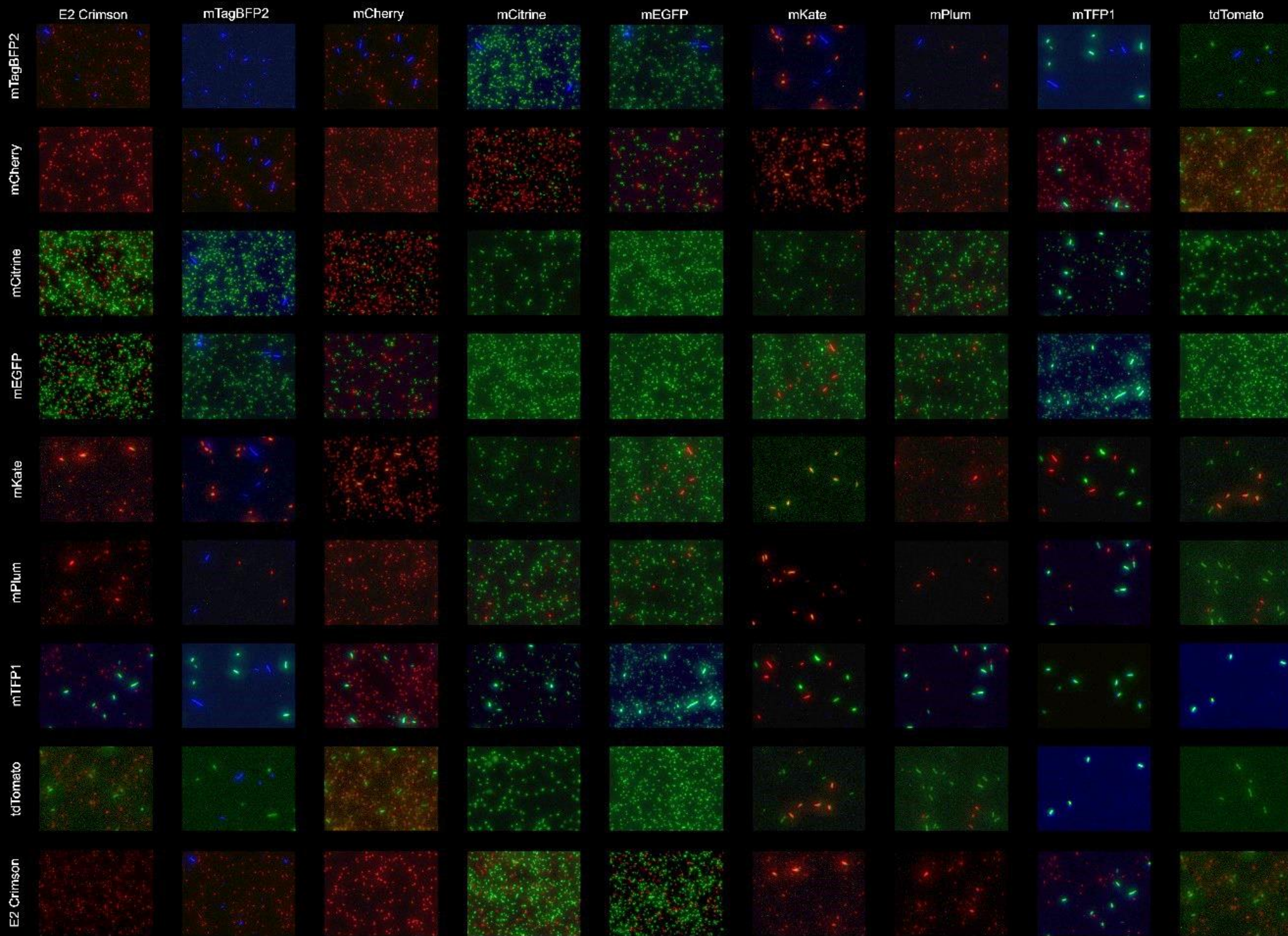
# 7. Prilozi





**Prilog 1** Mape korištenih plazmida (Addgene)





**Prilog 2** Mikroskopske fotografije svih kombinacije bakterija s eksprimiranim fluorescentnim proteinima

**Prilog 3** Intenziteti svjetlosti [%] pojedinih kanala korišteni za fotografiranje parova bakterija sa slike Prilog 2

|            | E2 Crimson |     |    | mTagBFp2 |     |    | mCherry |     |    | mCitrine |    |    | mEGFP |    |    | mKate |     |    | mPlum |     |    | mTFP1 |     |     | tdTomato |     |     |
|------------|------------|-----|----|----------|-----|----|---------|-----|----|----------|----|----|-------|----|----|-------|-----|----|-------|-----|----|-------|-----|-----|----------|-----|-----|
| kanal →    | R          | G   | B  | R        | G   | B  | R       | G   | B  | R        | G  | B  | R     | G  | B  | R     | G   | B  | R     | G   | B  | R     | G   | B   | R        | G   | B   |
| E2 Crimson | 90         | 50  | 50 | 50       | 90  | 80 | 60      | 50  | 50 | 100      | 50 | 50 | 50    | 50 | 50 | 90    | 90  | 50 | 100   | 50  | 50 | 100   | 40  | 90  | 90       | 100 | 50  |
| mTagBFp2   | 50         | 90  | 80 | 50       | 50  | 80 | 90      | 50  | 80 | 50       | 50 | 80 | 50    | 50 | 80 | 90    | 90  | 80 | 70    | 50  | 80 | 50    | 40  | 90  | 50       | 100 | 80  |
| mCherry    | 60         | 50  | 50 | 90       | 50  | 80 | 60      | 50  | 50 | 70       | 50 | 50 | 50    | 50 | 50 | 60    | 90  | 50 | 70    | 50  | 50 | 60    | 40  | 90  | 60       | 100 | 50  |
| mCitrine   | 100        | 50  | 50 | 50       | 50  | 80 | 60      | 50  | 50 | 50       | 50 | 50 | 50    | 50 | 50 | 60    | 50  | 50 | 70    | 50  | 50 | 50    | 40  | 90  | 50       | 50  | 50  |
| mEGFP      | 100        | 50  | 50 | 50       | 50  | 80 | 70      | 50  | 50 | 50       | 50 | 50 | 50    | 50 | 50 | 70    | 50  | 50 | 70    | 50  | 50 | 50    | 40  | 90  | 50       | 50  | 50  |
| mKate      | 90         | 90  | 50 | 90       | 90  | 80 | 60      | 90  | 50 | 70       | 50 | 50 | 50    | 50 | 50 | 70    | 50  | 50 | 70    | 90  | 50 | 70    | 40  | 50  | 70       | 100 | 50  |
| mPlum      | 100        | 50  | 50 | 70       | 50  | 80 | 60      | 50  | 50 | 70       | 50 | 50 | 50    | 50 | 50 | 70    | 90  | 50 | 70    | 50  | 50 | 70    | 100 | 90  | 80       | 100 | 50  |
| mTFP1      | 100        | 40  | 90 | 50       | 40  | 90 | 60      | 40  | 90 | 50       | 40 | 90 | 40    | 40 | 90 | 70    | 40  | 50 | 70    | 100 | 90 | 50    | 40  | 90  | 50       | 60  | 100 |
| tdTomato   | 90         | 100 | 50 | 50       | 100 | 80 | 60      | 100 | 50 | 50       | 50 | 50 | 50    | 50 | 50 | 70    | 100 | 50 | 80    | 100 | 50 | 50    | 60  | 100 | 50       | 100 | 50  |

## Izjava o izvornosti

*Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*



---

Irin Antun Stošić