

Razvoj sustava za ispitivanje interakcija Mate3 proteina zebrice s okolišnim tvarima

Mišić, Lana

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:159:570741>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-06**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2021.

Lana Mišić
1323/MB

**RAZVOJ SUSTAVA ZA
ISPITIVANJE INTERAKCIJA
Mate3 PROTEINA ZEBRICE S
OKOLIŠNIM TVARIMA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju na Zavodu za istraživanje mora i okoliša Instituta Ruđer Bošković pod mentorstvom izv.prof.dr.sc. Igora Stuparevića, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć dr.sc. Jovice Lončara, Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu.

ZAHVALA

Zahvaljujem svom mentoru prof. Igoru Stupareviću na ukazanom povjerenju i prilici da eksperimentalni dio diplomskog rada odradim na Institutu Ruđer Bošković. Hvala Vam na svom prenesenom znanju tijekom studiranja, poticanju i vjeri u mene te na pokazanom iznimnom razumijevanju.

Zahvaljujem dragom Jovici Lončaru na velikoj pomoći tijekom izrade diplomskog rada, što je strpljivo i neumorno odgovarao na milijun mojih pitanja i maksimalno mi olakšao izradu i pisanje rada. Hvala ti na svom prenesenom znanju, velikoj podršci, razumijevanju i uloženom vremenu i trudu tijekom cijelog procesa. Vječno sam ti zahvalna! Također, hvala svima iz Laboratorija za molekularnu ekotoksikologiju na IRB-u na veoma ugodnoj, prijateljskoj i poticajnoj radnoj atmosferi.

Veliko hvala mojoj predivnoj mami Sanji i najboljoj seki Nikolini na godinama bezuvjetne ljubavi, razumijevanja i podrške, što su se nosile sa svim mojim ludim idejama i nisu dopustile da posustanem. Hvala vam što ste od prvog dana vjerovali u mene i što ste se živcirale, plakale, ljutile se i smijale samnom tijekom ove lude pustolovine studiranja. Hvala ti mama što si najbolja mama na svijetu i što si mi pružila cijeli svijet, i više od toga!

Hvala mom dragom Davoru koji je stoički pretrpio sve moje burne godine studiranja i moja danonoćna učenja olakšao svojim radom, vremenom i trudom i stalno me uveseljavao prefinom papicom. Hvala ti što si uvijek vjerovao u mene, čak i kada sama nisam, što si me podignuo kada sam bila na dnu i što si bio uz mene u svemu dobrom i lošem svih ovih godina i pružio mi beskonačnu ljubav.

I najveća hvala mome tati bez kojega ništa od ovoga ne bi bilo moguće. Ti si bio moj najveći navijač, moja najveća potpora i zahvaljujući tebi sam danas ovdje gdje jesam. Zbog toga što si vjerovao da mogu postići sve što naumim i da mogu doseći zvijezde. Vjerujem da si sada neizmjereno ponosan i sretan. Hvala ti tata!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za biokemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

RAZVOJ SUSTAVA ZA ISPITIVANJE INTERAKCIJA *Mate3* PROTEINA ZEBRICE S OKOLIŠNIM TVARIMA

Lana Mišić, 1323/MB

Sažetak: *Ubrzani rast populacije i tehnološki napredak rezultiraju sve većom izloženosti organizama okolišnim ksenobioticima. Nakon početne apsorpcije i distribucije u organizmu, slijedi detoksikacija i izlučivanje ksenobiotika iz organizma, najčešće putem urina ili žuči. U procesu izlučivanja, važnu ulogu imaju MATE sekundarni transporter, prisutni u svim carstvima živog svijeta, koji kataliziraju elektroneutralan antiport protona i organskih kationa. Uspješno smo, pomoću Flp-In rekombinantnog sustava, razvili stabilnu HEK293T staničnu liniju sa prekomjerno eksprimiranim *Mate3* transportnim proteinom zebrice (*Danio rerio*) koja se smatra jednim od najvažnijih modelnih organizama u ekotoksikološkim studijama. Uspješno smo optimirali visoko procesivan transportni sustav za ispitivanje interakcija *Mate3* proteina s okolišnim tvarima, što će omogućiti detaljnu karakterizaciju uloge *Mate3* proteina u detoksikacijskim procesima zebrice.*

Ključne riječi: *zebrica, ksenobiotici, Mate, transport, optimizacija*

Rad sadrži: 78 stranica, 22 slike, 2 tablice, 28 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: *izv.prof.dr.sc. Igor Stuparević*

Pomoć pri izradi: *dr.sc. Jovica Lončar*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. *Izv.prof.dr.sc. Igor Slivac*
2. *Izv.prof.dr.sc. Igor Stuparević*
3. *Dr.sc. Tvrtko Smital*, znanstveni savjetnik, Institut Ruđer Bošković
4. *Dr.sc. Jovica Lončar*, znanstveni suradnik, Institut Ruđer Bošković (zamjena)

Datum obrane: 24. rujna 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of chemistry and biochemistry
Laboratory for biochemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

DEVELOPMENT OF AN ASSAY FOR STUDYING INTERACTIONS OF ZEBRAFISH *Mate3* PROTEIN WITH ENVIRONMENTAL CHEMICALS

Lana Mišić, 1323/MB

Abstract: *Rapid growth of populations and technological advancement has resulted in growing exposure of organisms to the innumerable environmental xenobiotics. After the initial absorption and distribution throughout the organism, xenobiotics are detoxified and excreted outside of the organism, mainly by urine and bile. In the excretion process, the secondary MATE transporters, found in all kingdoms of life, bear a significant role in electroneutral H^+ /organic cation antiport. By using Flp-In recombinant system, we have successfully developed a stable HEK293T cell line with overexpressed *Mate3* transport protein found in zebrafish (*Danio rerio*), that is considered one of the most important model organisms in ecotoxicological studies. Also, we have successfully optimized highly processive transport assay for identifying interactions between *Mate3* protein and environmental substances, which will allow detailed characterization of the *Mate3* role in detoxification processes in zebrafish.*

Keywords: *zebrafish, xenobiotics, Mate, transport, optimization*

Thesis contains: 78 pages, 22 figures, 2 tables, 28 references,

Original in: Croatian

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

Mentor: *Igor Stuparević, doc.dr.sc.*

Technical support and assistance: *Jovica Lončar, dr.sc*

Reviewers:

1. PhD. *Igor Slivac*, Associate professor
2. PhD. *Igor Stuparević*, Associate professor
3. PhD. *Tvrtko Smital*, scientific advisor, Ruđer Bošković Institute
4. PhD. *Jovica Lončar*, research associate, Ruđer Bošković Institute (substitute)

Thesis defended: 24 September 2021

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. ZEBRICA (<i>Danio Rerio</i>)	3
2.1.1. Zebrica kao modelni organizam	3
2.1.2. Zebrica u službi ekotoksikologije	6
2.2. MATE (MULTIDRUG AND TOXIC COMPOUND EXTRUSION) PROTEINI	10
2.2.1. Struktura, uloga i rasprostranjenost MATE proteina	10
2.2.2. Mate proteini zebrice	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. MATERIJALI	18
3.1.1. Kit-ovi.....	18
3.1.4. Kemikalije	18
3.1.5. Laboratorijski pribor.....	19
3.1.6. Instrumenti.....	20
3.2. METODE	20
3.2.1. Proizvodnja stanične linije sa stabilno i prekomjerno ekspimiranim Mate3 transportnim proteinom zebrice.....	20
3.2.1.1. Kloniranje cijelog mate3 gena u eukariotski ekspresijski vektor pcDNA3.1/His.....	20
3.2.1.2. Prekloniravanje mate3 gena restrikcijom iz pcDNA3.1/His vektora u pcDNA5/FRT vektor ...	21
3.2.1.3. Gel elektroforeza i purifikacija iz gela.....	21
3.2.1.4. Ligacija, transformacija, umnažanje i izolacija plazmida	22
3.2.1.5. Flp-in sustav.....	22
3.2.1.6. Transfekcija	24
3.2.2. Izolacija RNA TRIzol metodom te određivanje koncentracije i integriteta RNA	24
3.2.3. Reverzna transkripcija	26
3.2.4. Dizajn početnica i PCR.....	26
3.2.5. Kvantitativni PCR (qPCR)	28
3.2.6. Mjerenje aktivnosti Mate3 transportnog proteina	32
3.2.7. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu.....	35
4. REZULTATI I RASPRAVA	36

4.1. PROIZVODNJA STANIČNE LINIJE SA STABILNO I PREKOMJERNO EKSPRIMIRANIM MATE3 TRANSPORTNIM PROTEINOM ZEBRICE	37
4.2. IZOLACIJA RNA TRIZOL METODOM TE ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE I INTEGRITETA RNA.....	40
4.3. REVERZNA TRANSKRIPCIJA, DIZAJN POČETNICA I PCR.....	42
4.4. KVANTITATIVNI PCR (qPCR).....	49
4.5. MJERENJE AKTIVNOSTI Mate3 TRANSPORTNOG PROTEINA.....	55
4.5.1. Određivanje optimalnih uvjeta transporta.....	56
4.5.2. Inhibicija transporta modelnog supstrata	64
4.5.3. Ispitivanje broja veznih mjesta Mate3 proteina	66
5. ZAKLJUČCI.....	73
6. LITERATURA	75

1. UVOD

Usljed sve bržeg rasta globalne populacije i tehnološkog napretka, sve je veća izloženost organizama brojnim okolišnim ksenobioticima, odnosno potencijalno toksičnim tvarima stranim organizmu. To dovodi do vitalne potrebe za njihovom identifikacijom, proučavanjem posljedica izloženosti ksenobioticima te razumijevanjem bioloških, kemijskih i genetskih mehanizama koji se nalaze u pozadini tih učinaka. Znanstveno-utemeljena javnozdravstvena agencija ATSDR (eng. *Agency for toxic substances and disease registry*), stvorena s ciljem proučavanja zdravstvenih učinaka štetnih tvari u okolišu, provela je veliki broj istraživanja o posljedicama kratkoročne i dugoročne izloženosti okolišnim toksikantima na zebri (*Danio rerio*), kao jednom od glavnih modelnih organizama u ekotoksikološkim studijama, koje su osigurale kritične informacije o zdravstvenim učincima više od 200 ispitivanih tvari kao potencijalnih toksikanata (Bambino i Chu, 2017). U svrhu boljeg razumijevanja razmjera ekoloških učinaka ksenobiotika, potrebno je krenuti od samog početka te više napora uložiti u temeljne studije sa ciljem analize mehanizama uključenih u kemijsku sudbinu ksenobiotika u organizmu, njegove biodostupnosti, unosa preko bioloških barijera te, u konačnici, njegove bioakumulacije i toksičnosti.

U sudbini ksenobiotika u organizmu, jednu od glavnih uloga imaju transmembranski transportni proteini koji djeluju kao krajnje točke detoksikacije i eliminacije štetnih tvari iz organizma. MATE (eng. *multidrug and toxic compound extrusion*) transportni proteini predstavljaju veliku obitelj sekundarnih aktivnih transportera te čine osnovnu staničnu mašineriju uključenu u H⁺-ovisan antiport različitih tvari, pretežito organskih kationa, preko stanične membrane i membrana organela, pri čemu su prisutni u sve tri domene života. Glavni supstrati bakterijskih MATE transportera su klinički važni antibiotici čime je omogućena MATE-posredovana antibiotska multirezistentnost patogenih bakterija. S druge strane, biljni MATE proteini, prisutni u znatno većem broju u odnosu na ostale organizme, važni su u sekvestraciji toksičnih sekundarnih metabolita u vakuole, čime štite vitalne dijelove stanice od oštećenja, te osiguravaju toleranciju biljke na povišene koncentracije metala i drugih ksenobiotika u tlu. Ljudski MATE transporteri, pretežito eksprimirani u apikalnoj četkastoj membrani proksimalnih tubula bubrega, služe u izbacivanju organskih kationa (lijekova) iz organizma, pri čemu, uslijed interakcije dva ili više lijeka te posljedične inhibicije i gubitka aktivnosti MATE proteina, dolazi do klinički značajnih promjena u raspodjeli lijeka,

učinkovitosti te toksičnosti na organizam, što ima veliki značaj u kliničkim ispitivanjima novih lijekova (Kusakizako i sur., 2020).

Unatoč njihovoj iznimnoj važnosti, veoma je malo spoznaja o Mate proteinima u zebrici kao važnom ekotoksikološkom modelnom organizmu. U nedavnim istraživanjima, pokazano je kako zebrica u svom genomu sadrži šest *mate* gena, pri čemu se, temeljem zanimljivog ekspresijskog profila, istaknuo *mate3* gen koji kodira za Mate3 transmembranski protein konstitutivno eksprimiran tijekom embrionalnog razvoja zebrice te praćen izrazito naglašenom tkivno-specifičnom ekspresijom u odraslih jedinki. Mate3 protein visoko je eksprimiran u bubrezima, crijevima, testisima i mozgu mužjaka, dok je razina ekspresije u ženki veoma niska (Lončar i sur., 2016). Kako su istraživanja tek u početnoj fazi, sljedeći korak u karakterizaciji Mate3 proteina je istraživanje njegovih potencijalnih supstrata i inhibitora, što će omogućiti bolji uvid u njegovu funkciju i pretpostavljenu važnost u pogledu ekotoksikologije. U tu svrhu, potrebno je razviti jednostavan, visoko ponovljiv i visoko procesivan sustav, u laboratorijskim mjerilima, kako bi se ispitali brojni spojevi kao potencijalni interaktori, što se najčešće postiže razvojem staničnih linija koje prekomjerno ekspimiraju protein od interesa.

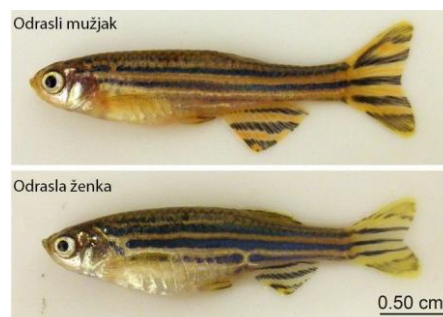
Cilj rada je uspostava stabilne rekombinantne stanične linije, koja prekomjerno ekspimirira Mate3 protein, u svrhu ispitivanja interakcija Mate3 s okolišnim tvarima, pri čemu se aktivnost Mate3 proteina dokazuje razinom transkripcije *mate3* gena te transportnim eksperimentom, kao završnom potvrdom aktivnosti.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ZEBRICA (*Danio rerio*)

2.1.1. Zebrica kao modelni organizam

Zebrica (*Danio rerio*, Hamilton 1822) je vrsta slatkovodne, tropske ribe iz porodice Cyprinidae (šarani) koja prirodno obitava u rijekama južne i jugoistočne Azije, a prvi put se pojavila u Južnoj Aziji prije otprilike 320 milijuna godina (Ribas i Piferrer, 2014). Budući da ju se često može vidjeti uz rubove rižinih polja Indije, ime je dobila prema bengalskoj riječi „dhani“ što znači „od rižinih polja“. Što se osnovnih morfoloških karakteristika tiče, prosječno su duge oko 5 cm, teže 0,5 - 0,9 g i svijetlo sivog su obojenja s četiri horizontalne tamne pruge koje se protežu od škržnih poklopaca pa sve do repa. Tijekom odrasle faze, spolni dimorfizam se očituje u različitoj veličini, obliku tijela te pigmentaciji, pri čemu su mužjaci često manji od ženki te imaju izduženije i žućkasto tijelo, dok se ženke odlikuju većim tijelom sa zaobljenim bjelkastim trbuhom te posjeduju genitalnu papilu (mala, mesnata cijev iza anusa) koja služi za izbacivanje jajašaca (slika 1) (Višić, 2017). Zebrice posjeduju visoku sposobnost prilagodbe na različite okolišne uvjete zbog raznovrsnih staništa u kojima žive, a koja mogu imati znatne varijacije u fizikalno-kemijskim svojstvima. One su euritermni organizmi tj. podnose velika kolebanja temperature (od 16,5 °C do 38,6 °C) te mogu živjeti u vodama različite kiselosti (od pH 5,5 do pH 9) i različite koncentracije otopljenih soli tj. u uvjetima niske električne vodljivosti (od 10 do 271 μS) do uvjeta visokog saliniteta (1000 μS). Međutim, optimalni uvjeti uzgoja zebrice podrazumijevaju temperaturu od 26 - 29 °C, pH 7 - 8, tvrdoću vode (količina otopljenog kalcijevog karbonata CaCO₃) 72 - 200 mgL⁻¹ te vodljivost od 700 - 1000 μS (Ribas i Piferrer, 2014).



Slika 1. Usporedba odraslog mužjaka i ženke. Tijelo mužjaka ima žutu nijansu i vretenastiji oblik, naspram ženke koja je krupnija te zaobljenija s bijelom nijansom (Višić, 2017).

Ribe se koriste kao modelni organizmi u različitim područjima istraživanja već dugi niz godina. Pri tome je zebrića, prema broju objavljenih radova, uvjerljivo vodeći modelni organizam, posebice u područjima razvojne biologije, toksikologije te genetskih istraživanja. Naime, životinja postaje modelni organizam ukoliko svojim biološkim karakteristikama predstavlja veću skupinu organizama, a istovremeno omogućuje lakše i ekonomičnije rukovanje i proučavanje u odnosu na ostale organizme koje predstavlja. Općenito, dobar životinjski modelni organizam trebao bi posjedovati sve ili većinu sljedećih karakteristika: strukturnu jednostavnost uz posjedovanje osnovnih staničnih procesa koje imaju kompleksniji organizmi, dostupnost za istraživanje, jednostavno rukovanje, jednostavan i ekonomičan uzgoj u laboratoriju te relativno mali i stabilan genom podložan genetskom inženjerstvu (Ribas i Piferrer, 2014). Otprilike 450 milijuna godina divergentne evolucije razdvaja ljudsku vrstu od zebrića, no unatoč filogenetskoj udaljenosti, zebriće se smatraju veoma dobrim modelom u humanim istraživanjima jer, kao kralježnjaci, dijele sa ljudima većinu razvojnih puteva, fizioloških mehanizama i organskih sustava, uz visok stupanj konzerviranosti (otprilike 70 %) genoma (Višić, 2017).

Brojne su prednosti korištenja zebriće kao modelnog organizma u znanstvenim istraživanjima. Zebrića se smatra relativno jednostavnim organizmom u usporedbi sa sisavcima, no ukoliko promatramo genom, situacija je potpuno drugačija. Naime, genom zebriće veoma je kompleksan te sadrži čak dva para kromosoma više od 23 para humanih kromosoma. Do ove razlike došlo je tijekom evolucije pravih koštunjača kada se dogodila duplikacija cijelog genoma, što je rezultiralo duplikacijom gena, od kojih su neki zadržali istu funkciju, neki dobili novu, a neki se, primjerice, eksprimiraju u potpuno različitim tkivima u odnosu na gen iz kojeg su nastali (Hill i sur., 2005). Važnost duplikacije genoma očituje se u tome što mutacija u nekom ortolognom genu sisavaca koja dovodi do smrti embrija, u jednom od paralognih gena zebriće ima određeni fenotipski učinak, no embriji ostaju živi. To omogućava analizu funkcija određenih gena u mutantima zebriće što je veoma teško postići u modelima sisavaca. Neke od osnovnih prednosti korištenja zebriće kao modelnog organizma su njena veličina, uzgoj i rana morfologija. Za razliku od ostalih ribljih vrsta, odrasle zebriće su dugačke tek oko 5 cm, što značajno doprinosi smanjenju prostora i cijene uzgoja (Hill i sur., 2005). Mala veličina ličinki i odraslih zebrića minimizira troškove preko manje količine tvari potrebne za doziranje tijekom provođenja eksperimenata (npr. kemikalije, lijekovi) te manje količine upotrijebljene laboratorijske opreme i kemikalija za tretiranje i održavanje riba na životu, čime se stvara manja količina otpada. Također, koriste se kao modelni organizmi

već dugi niz godina te su dobro poznati optimalni uvjeti uzgoja i održavanja te uspostavljeni brojni protokoli i alati za genetsku manipulaciju i analizu (Ribas i Piferrer, 2014).

Zebrice imaju znatno kraći životni ciklus u usporedbi s drugim vrstama riba koje se koriste u akvakulturi, pri čemu postižu spolnu zrelost tj. sposobnost reprodukcije već oko trećeg mjeseca života, a plodne su sve do 42. mjeseca, iako prosječni životni vijek iznosi 36 mjeseci. Mrijeste se asinkrono, tj. oocite sazrijevaju tijekom cijele sezone mrijesta, a jajnici sadrže jajne stanice u svim fazama razvoja. U laboratorijskim uvjetima, zebrice se mrijeste kroz godinu svakih 4 do 7 dana, no bolji mrijest (više jajašaca) dobije se svakih desetak dana. Iz perspektive biomedicinskih istraživanja, zebrice imaju visok fekunditet (do 200 jajašaca svakih 7 dana) u usporedbi sa životinjama koje zamjenjuju u istraživanjima, u prvom redu sisavcima, što predstavlja značajnu prednost u brojnim područjima istraživanja, posebice u proizvodnji transgenih životinja (Ribas i Piferrer, 2014). Stalna dostupnost potomaka zebrice, nastalih iz roditelja točno određenih genetskih karakteristika (genotipa), idealna je za istraživanje novih gena i njihovih specifičnih funkcija u kralježnjacima (Khan i Alhewairini, 2019). Uz to, embriji i ličinke zebrice su mali i prozirni te podliježu brzom razvoju izvan organizma (lat. *ex utero*) (Tavares i Santos Lopes, 2013). Embriji zebrice ostaju prozirni tijekom cijelog embrionalnog razvoja koji traje veoma kratko, tj. od oplodnje pa sve do otprilike 72 sata nakon oplodnje (kada počinje pigmentacija), što omogućuje nesmetano *in vivo* promatranje glavnih morfoloških promjena i vizualizaciju unutarnjih procesa poput formacije organa i njihove funkcije u realnom vremenu. Time je znatno olakšano i praćenje fluorescentno obilježenih transgena te mjerenje genske aktivnosti. Kompletan tjelesni plan zebrice uspostavljen je do 24 sata nakon oplodnje, a većina unutarnjih organa poput srca, jetre, bubrega i crijeva u potpunosti je razvijena 96 sati nakon oplodnje, što zebricu čini veoma prigodnim modelom u *in vivo* istraživanjima organa kao zamjenu za modele sisavaca (Višić, 2017).

Dostupni istraživački alati, kao i plastičnost zebrice kao biološkog modela, omogućili su uspostavljanje zebrice kao modela u brojnim područjima istraživanja (Tavares i Santos Lopes, 2013). Pionir u korištenju zebrice kao modelnog organizma bio je George Streisinger koji je prije 40-ak godina objavio prvu studiju u kojoj su zebrice korištene kao modelni organizam za humana istraživanja. On je, po prvi puta, uspio klonirati kralježnjaka (zebricu) te dobiti recesivne mutante u diploidnom kralježnjaku. Osim toga, 70-ih godina prošloga stoljeća zebrice su se počele koristiti i u ribljim istraživanjima, u studijama okolišnog stresa uzrokovanog vodenim onečišćivalima. U godinama koje su uslijedile, postale su jedan od

glavnih modela kralježnjaka, posebice u razvojnoj biologiji (embrionalni razvoj) i istraživanjima ljudskih bolesti. Danas se koriste kao modelni organizmi u brojnim istraživanjima: studije reproduktivnog sustava (spolna determinacija i diferencijacija, gametogeneza, kontrola spolne reprodukcije, spolni dimorfizam, reproduktivno ponašanje, krioprezervacija gameta), studije stresa, patologija (kontrola bolesti, imunološki sustav i imunološki odgovor, razvoj cjepiva), razvoj tumora i angiogeneza, toksikološka ispitivanja, proizvodnja mutanata, genomska istraživanja itd. (Ribas i Piferrer, 2014). Uz to, zebrice posjeduju mogućnost regeneracije tkiva poput peraja, srca, fotoreceptorskih stanica, neurona mrežnice, čak i leđne moždine te je, posljednjih godina, provedeno nekoliko studija o razvoju i diferencijaciji živčanog sustava zebrice, uz mapiranje njihove moždane mreže, što znatno doprinosi proučavanju ljudskih neuroloških oboljenja (Khan i Alhewairini, 2019). Posljednjih godina koriste se i kao modeli u istraživanjima matičnih stanica i regenerativnoj medicini. Još jedno veoma važno područje istraživanja su toksikološke studije i otkriće lijekova. Utjecaj različitih lijekova na rast i razvoj može se pratiti vizualno preko fenotipa (duljina i oblik tijela zebrice), ali i putem morfologije unutarnjih organa. Embriji zebrice koriste se kao modeli u određivanju letalne koncentracije (LC50) različitih kemikalija i uspoređuju sa LC50 vrijednostima u sisavaca, a proučavan je i učinak različitih lijekova (gentamicin, cisplatina, vinblastin, doksorubicin, fluorouracil itd.) na specifične organe, pri čemu je utvrđeno da je toksičnost za organe veoma slična u zebricama i sisavaca (Khan i Alhewairini, 2019). Istraživanja na zebricama dodatno su podržana velikom bazom podataka koja sadrži sve informacije (genomske, fenotipske) o zebrici, tzv. ZFIN (eng. *The Zebrafish Information Network*) (Tavares i Santos Lopes, 2013). Više se zna o zebrici, nego o bilo kojoj drugoj vrsti ribe, uključujući morfološke, biokemijske i fiziološke karakteristike u svim fazama ranog razvoja te u mladim i odraslim ribama oba spola, što čini zebricu jednim od najvažnijih istraživačkih alata današnjice.

2.1.2. Zebrica u službi ekotoksikologije

Sa sve većim razvojem proizvodnih procesa i nastankom novih sintetskih tvari, kako bi se držao korak s rastućom globalnom potražnjom, sve je veća zabrinutost oko zdravlja okoliša i posljedica izloženosti ksenobiotikima. Pri tome, ksenobiotikom se u ekologiji smatra svaka tvar antropogenog porijekla koja je strana organizmu u kojem se nalazi, odnosno organizam ju ne proizvodi niti se očekuje da u njemu bude prisutna (Bambino i Chu, 2017). U organizmu, ksenobiotici podliježu metabolizmu, biotransformaciji te izlučivanju pri čemu mogu i ne moraju imati toksičan učinak. To ponajviše ovisi o uspješnosti njihove

detoksikacije i izlučivanja iz organizma, što pak ovisi o njihovim kemijskim svojstvima i koncentraciji. No, posebno zabrinjavaju ksenobiotici otporni na kemijsku i biološku razgradnju koji se akumuliraju u tkivima poput jetre, bubrega, živaca ili masnog tkiva ispoljavajući toksičan učinak (Zeitoun i Mehana, 2014).

Znanost koja se bavi proučavanjem toksičnih učinaka kemijskih i fizikalnih agensa na žive organizme, posebice na populacije i zajednice unutar definiranog ekosustava, naziva se ekotoksikologija (Boudou i Ribeyre, 1997). Pri tome, toksikologija voda, kako joj samo ime kaže, proučava učinke antropogenih aktivnosti i ksenobiotika na vodene organizme na različitim razinama biološke organizacije, od substancijskih učinaka do učinaka na vodeni ekosustav (Wells, 2009). Neke od najvažnijih skupina ksenobiotika, ako se uzme u obzir njihova visoka toksičnost i prisutnost u okolišu, uključuju metale i metaloide, pesticide, radioaktivne tvari, policikličke aromatske ugljikovodike (PAH), farmaceutike, endokrine disruptore te, posljednjih godina, nanomaterijale (Nikinmaa, 2014). Ksenobiotici najčešće dolaze u vodeni okoliš preko otpadnih voda iz industrije i kućanstava i, iako bi takve vode trebale obavezno proći učinkovit tretman pročišćavanja, to često nije slučaj uslijed razlika u propisanim zahtjevima između zemalja za pročišćavanjem otpadnih voda prije njihova otpuštanja u vodeni okoliš (jezera, rijeke, mora, oceane). Pri tome, najveći problem predstavljaju ksenobiotici koji, unatoč pročišćavanju otpadnih voda, ne bivaju razgrađeni ili detoksicirani. Veću skupinu takvih ksenobiotika predstavljaju farmaceutici, dizajnirani sa ciljem otpornosti na razgradnju, pri čemu su većinom baktericidni te ubijaju bakterije odgovorne za sekundarno pročišćavanje vode, zbog čega bivaju otpušteni u vodeni okoliš nepromijenjeni (Nikinmaa, 2014). Poznato je da farmaceutici uzrokuju akutnu i kroničnu toksičnost u vodenim organizama, pri čemu često djeluju kao endokrini disruptori te uzrokuju smanjenu proizvodnju spolnih stanica (spermija i jajašaca), a nedavne studije pokazale su da izloženost antibioticima interferira sa imunološkim sustavom zebrice i njenim embriološkim razvojem (Inyinbor i sur., 2018).

Zebrice predstavljaju veoma koristan alat u ekotoksikološkim istraživanjima, pri čemu se embriji, larve i odrasle jedinke koriste u detekciji ksenobiotika, biomonitoringu, testovima toksičnosti i teratogenosti, istraživanjima mehanizama djelovanja ksenobiotika i fenotipa bolesti vezanih uz akutnu ili kroničnu izloženost. Ispitivana tvar (ksenobiotik) doda se u medij u kojem se nalaze embriji te se prozirne zebrice proučavaju u pogledu letalnosti i/ili razvojnih abnormalnosti, od oplodnje i kroz stadije ličinke (Bambino i Chu, 2017). Iako mlade i odrasle zebrice nisu prozirne, proizvodnja nepigmentirane, tzv. *casper* mutantne linije zebrica

omogućila je proučavanje organskog sustava u odraslih zebrića, posebice u kombinaciji sa transgenim fluorescentnim proteinima. Promatranje učinaka ksenobiotika *in vivo* omogućava direktnu procjenu toksičnosti, kao i mjerenje apsorpcije, distribucije, metabolizma i izlučivanja ksenobiotika iz organizma. Uz to, zebrića eksprimira cijeli spektar citokrom P450 (*cyp*) gena potrebnih za metabolizam ksenobiotika, njihovu biotransformaciju i detoksikaciju. U genomu zebriće, ukupno je identificirano 86 *cyp* gena koji imaju slične metaboličke karakteristike kao *cyp* geni u ljudi, no i dalje nisu razjašnjeni njihovi specifični mehanizmi aktivnosti (Bambino i Chu, 2017). Zebrića predstavlja jedinstven sustav koji omogućava *in vitro* proučavanje molekularnih mehanizama koji leže u pozadini toksičnih učinaka ksenobiotika, koristeći stabilne stanične linije, uz *in vivo* proučavanja učinaka ksenobiotika na cijeli organizam, pri čemu su znatno jednostavnije za održavanje od, primjerice, glodavaca (Bambino i Chu, 2017).

Brojni su primjeri uspješne primjene zebrića u ekotoksikološkim studijama te se već skoro dva desetljeća koriste u svrhu biomonitoringa, odnosno uporabe organizama za procjenu promjena u ekosustavu uzrokovanih okolišnom kontaminacijom. Visoka osjetljivost zebriće na različite ksenobiotike čini ju idealnim modelnim organizmom u biomonitoringu okoliša, pri čemu kao biološki indikatori služe karakteristične promjene u morfologiji, ekspresiji gena, ponašanju i fiziologiji (Dai i sur., 2014). Razvijene su transgene linije u kojima je fluorescentni protein pod regulacijom tzv. elementa odgovora (eng. *response element*) koji se aktivira u prisustvu stresora, odnosno ispitivanog ksenobiotika, što dovodi do ekspresije fluorescentnog proteina te takav sustav omogućava procjenu razine ksenobiotika u ispitivanom uzorku i saznanja o tkivnoj specifičnosti njegove distribucije i djelovanja. Jedne od važnijih uspostavljenih transgenih linija zebrića su one u kojima je ekspresija fluorescentnih proteina luciferaze ili GFP-a (eng. *green fluorescent protein*) aktivirana uslijed prisustva, primjerice, aromatskih ugljikohidrata, teških metala, pesticida ili estrogenih komponenata (Bambino i Chu, 2017). Od spomenutih, veliki ekološki problem predstavljaju teški metali poput žive, kadmija, arsena, kroma ili olova, čija glavna opasnost leži u sposobnosti bioakumulacije i biomagnifikacije u organizmu, pri čemu ribe predstavljaju glavnu metu jer su pri vrhu hranidbenog lanca u vodenom okolišu. Neki od dokazanih učinaka teških metala na ribe su zakašnjeli embrionalni razvoj, različite malformacije organa te smanjen rast odraslih jedinki (Zeitoun i Mehana, 2014). Toksični teški metali mogu se detektirati indirektno u vodenom okolišu praćenjem enzimske aktivnosti ili ekspresije biomarkera (fluorescentni protein) u embrijima i odraslim zebrićama divljeg tipa. Naime,

otkriveno je da na ekspresiju nekih enzima, poput superoksid dismutaze, katalaze ili acetilkolinesteraze, utječe izloženost organizma kadmiju i cinku. Uz to, genska ekspresija proteina metalotioneina, koji ima sposobnost vezanja teških metala, snažno je inducirana *in vivo* i *in vitro* kada su zebrice izložene živi, bakru, cinku te kadmiju (Dai i sur., 2014). U svrhu povećanja osjetljivosti detekcije, razvijena je i *Tg* transgena zebrica koja dodatno eksprimira GFP protein koji je pod istom transkripcijskom kontrolom kao i metalotionein (Zeitoun i Mehana, 2014). Stanični stres glavni je odgovor organizma na izloženost ksenobioticima, pri čemu je najprisutniji oksidativni stres uslijed proizvodnje reaktivnih kisikovih čestica tijekom metabolizma ksenobiotika (posebice pesticida i metala). Stanice se sa stresom uzrokovanim, primjerice, visokim temperaturama bore ekspresijom proteina toplinskog šoka (eng. *heat shock protein*) koji, između ostalog, djeluju kao šaperoni te sprječavaju agregaciju razmotanih i krivo smotanih proteina akumuliranih u stanici uslijed stresa. Osim visokim temperaturama, ovakav odgovor stanice može biti induciran i starenjem ili izloženošću toksikantima. Tako se specifična ekspresija GFP-a pod kontrolom promotora jednog od proteina toplinskog šoka, *hspb11:GFP*, koristi kao marker u identifikaciji tkivno specifičnog učinka pesticida. U embrijima zebrice, izloženim različitim pesticidima od 9 do 48 sati nakon oplodnje, proučavana je indukcija *hspb11:GFP* transgena te je primijećena njegova najveća aktivnost u mišićima, pri čemu su neki od pesticida uzrokovali tešku disrupciju integriteta mišića. Pri tome, transgen je ostao aktivan u mišićnom tkivu sve do 48 h nakon što su pesticidi uklonjeni, što je dokazalo dugotrajan učinak izloženosti ksenobioticima u stanicama (Dai i sur., 2014). Osim fizičkih učinaka, pomoću zebrice su proučavani i učinci anorganskih i organskih ksenobiotika na ponašanje, osobnost te kognitivne sposobnosti te je pokazano da, primjerice, glifosat utječe na istraživanje, kretanje, agresiju i pamćenje zebrice, dok metil-živa ima utjecaj na kretanje i snalaženje zebrice u prostoru (Jacquin i sur., 2020).

Eksperimentalne studije koje koriste jedan specifičan modelni organizam u *in vivo* i *in vitro* istraživanjima, poput zebrice, ispunjavaju dvije svrhe ekotoksikoloških studija. Prvo, pošto se u istraživanjima koriste i niže biološke razine organizacije (substanični odjeljci, stanice, tkiva i organi), moguće je praćenje velikog broja parametara odjednom te bolje razumijevanje ekotoksikoloških mehanizama djelovanja. Takvo istraživanje komplementira *in vivo* toksikološkim studijama te njihova kombinacija omogućava povezivanje znanja o specifičnim kemijskim reakcijama ksenobiotika, njihovom unosu preko bioloških membrana, njihovim funkcionalnim ili strukturalnim toksičnim učincima na molekularnom i staničnom nivou, sa saznanjima o *in vivo* djelovanju ksenobiotika na organizam i ponašanje zebrice.

Druga svrha je uspostava standardiziranih testova toksičnosti, temeljenih na jednoj vrsti, za predviđanje toksičnosti pojedinih ksenobiotika ili otpadnih voda unutar strogo kontroliranih uvjeta. Većina studija regulatornih agencija, kojima je u cilju procijeniti rizik uvođenja novog proizvoda na tržište ili procijeniti kvalitetu okoliša, temeljena je na ovim metodologijama (Boudou i Ribeyre, 1997).

Iako se najpreciznije spoznaje o učincima toksikanata dobivaju na molekularnoj razini putem istraživanja u laboratoriju, treba imati na umu da su učinci ksenobiotika ekološki bitni ukoliko se rezultati istraživanja mogu ekstrapolirati najprije na *in vivo* sustav, a zatim i na populaciju te, u konačnici, na ekosustav, što je iznimno kompleksan zadatak (Nikinmaa, 2014). Kao prvo, cjelokupan funkcionalan odgovor organizma na ksenobiotik, u vidu detoksikacije, izlučivanja, proizvodnje energije, kretanja, malformacija itd., veoma je rijetko uzrokovan promijenjenom funkcijom pojedinog gena. Umjesto toga, svaki promatrani učinak uglavnom je rezultat promjena ekspresije brojnih gena, pri čemu isti krajnji učinak može biti rezultat promjena ekspresije različitih gena koji sudjeluju u različitim putevima. Uz to, ksenobiotici se ne pojavljuju zasebno u okolišu već kao kompleksan koktel te su uvijek u interakciji sa okolišnim varijablama (Nikinmaa, 2014). Toksikologija vode je uistinu integrativna znanost i treba prihvatiti činjenicu da pojedini znanstvenik može raditi samo na jednom zasebnom, manjem dijelu u „moru“ ekotoksikologije te da niti jedna tradicionalna disciplina nije prikladna u rješavanju pitanja kako ksenobiotici utječu na populacije i ekosustav te koje ekološke odluke shodno tome treba poduzeti. Stoga, jednostavnost interpretacije toksikoloških rezultata obrnuto je proporcionalna njenoj ekološkoj važnosti.

2.2. MATE (MULTIDRUG AND TOXIC COMPOUND EXTRUSION) PROTEINI

2.2.1. Struktura, uloga i rasprostranjenost MATE proteina

Sudbina ksenobiotika (toksikanta) u organizmu ovisi o četiri međusobno povezana procesa koja se odvijaju od ulaska toksikanta u organizam pa sve do njegove eliminacije iz organizma, odnosno ovisi o apsorpciji, raspodjeli, metabolizmu i izlučivanju, tzv. ADME (eng. *Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion*). Ksenobiotici se, na razini organizma, apsorbiraju najčešće preko gastrointestinalnog trakta, zatim pluća (škrge u riba) ili kože. Ukoliko je mjesto apsorpcije gastrointestinalni trakt, ksenobiotik prije ulaska u cirkulaciju može biti metaboliziran stanicama probavnog trakta ili dospijeva do jetre, koja ga može metabolizirati i izlučiti u žuč. Pri tome, jetra predstavlja glavno mjesto metabolizma i biotransformacije ksenobiotika koji rezultiraju pretvorbom lipofilnih spojeva u hidrofilne

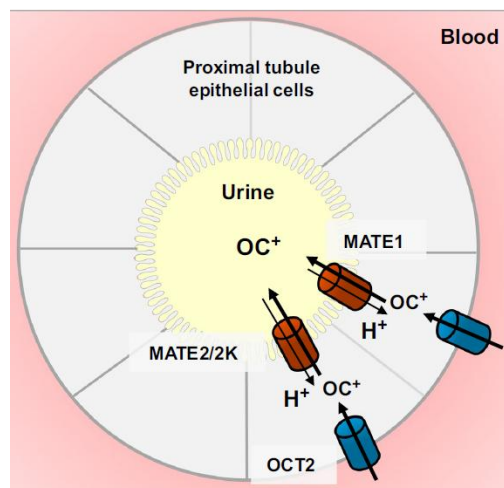
metabolite u svrhu njihova izlučivanja iz organizma (Hodgson, 2004). Biotransformacija, te često posljedična detoksikacija, podrazumijeva dvije faze, pri čemu se u fazi I uvode funkcionalne skupine na kostur molekule ksenobiotika, najčešće reakcijama oksidacije, redukcije i hidrolize (katalizirane pretežito citokrom P450 monooksigenazama), čineći tako ksenobiotike podnesim za reakcije faze II u kojima dolazi do kovalentnog vezanja endogenih molekula (sulfat, glutation, aminokiseline, acetat) na ksenobiotik, čime nastaju polarni, hidrofilni konjugati, te je tako olakšano njihovo izlučivanje iz organizma putem transportnih sustava koji ih prepoznaju. Osim dvije spomenute faze, treća faza (faza III) biotransformacije ključna je u procesu detoksikacije te uključuje transmembranske proteinske transportere koji su zaslužni za transport ksenobiotika u urin ili iz jetre u žuč, čime se smanjuje njihova koncentracija u organizmu. Pri tome, najviše se toksikanata izlučuje urinom, dok se preko jetre u žuči uglavnom izlučuju veći konjugati, a plinovi i neke hlapljive tvari (npr. kloroform), izlučuju se preko pluća (Hodgson, 2004). Toksikanti se urinom izlučuju istim mehanizmima kojima se izlučuju i produkti metabolizma, a oni uključuju: glomerularnu filtraciju, tubularno izlučivanje i tubularnu reapsorpciju.

Izlučivanje egzogenih toksičnih tvari, u svrhu očuvanja stanične homeostaze, od esencijalne je važnosti za sva živa bića (Kusakizako i sur., 2020). Pri tome, izlučivanje se najčešće proučava na staničnoj razini te podrazumijeva slobodnu difuziju, endocitozu te aktivan ili pasivan transport. Najviše pažnje pridaje se istraživanju aktivnih transmembranskih transportera koji iz krvi unose ksenobiotike, kroz staničnu membranu, u unutrašnjost stanice, odnosno posreduju u izlučivanju ksenobiotika iz stanice u izvanstanične tekućine (urin, žuč) (Nikinmaa, 2014). Štoviše, statistička analiza dostupnih genomskih sekvenci eubakterija, arheja i eukariota, pokazala je da 20 % - 30 % svih otvorenih okvira čitanja (eng. *open reading frames*, ORF) kodira za integralne membranske proteine. Viši organizmi sadrže dvije superobitelji transportera koji sudjeluju u procesu izlučivanja ksenobiotika, odnosno primarne ABC (eng. *ATP-binding cassette*) transportere koji troše energiju hidrolize ATP-a kao pokretačku silu transporta supstrata uz koncentracijski gradijent te SLC (eng. *solute carrier*) transportere kojima pripadaju i tzv. MATE (eng. *multidrug and toxic compound extrusion*) transporteri (Kusakizako i sur., 2020).

MATE transporteri prvi su puta identificirani u bakterijama *Vibrio parahaemolyticus* i *E. coli*, nazvani NorM, odnosno YdhE, kao proteini odgovorni za rezistenciju bakterija na lijekove na način da posreduju u njihovom izbacivanju iz stanice, što je tada privuklo znatnu pažnju zbog rastućeg problema bakterijske rezistencije. Nakon toga, otkriveno je kako su

MATE proteini zaslužni i za multirezistentnost *Staphylococcus aureus*, koja predstavlja veliki problem u bolničkim infekcijama (Kusakizako i sur., 2020). Od tada, MATE proteini identificirani su u svim carstvima živog svijeta, od bakterija i arheja, preko gljiva i biljaka, do životinja. U 2005. godini, MATE1 (*SLC47A1*) i MATE2 (*SLC47A2*) transportni proteini identificirani su kao ljudski ortolozi bakterijskog NorM proteina, lokalizirani u tandemu na kromosomu 17 te su temeljem aminokiselinske sekvence i predložene funkcije, svrstani u SLC superobitelj, odnosno u SLC47 obitelj transportera. Nedugo nakon toga, otkrivene su još tri transkript varijante MATE2 proteina, nazavane MATE2-K, MATE2-B i MATE2_tv4 (poznat kao MATE2 izoforma 3 s nepoznatom funkcijom u organizmu), pri čemu se MATE2-K i MATE2-B razlikuju u sekvenci između egzona 6 i 7. MATE2-K ima deleciju od 108 pb (parova baza) u egzonu 7 mRNA u odnosu na MATE2 mRNA, dok kod MATE2-B mRNA, tijekom procesiranja primarnog RNA transkripta, ne dolazi do izrezivanja introna od 154 pb (između egzona 6 i 7) unutar kojeg se nalazi stop kodon (Yonezawa i Inui, 2011). Ekspresija MATE1 transportnog proteina, sastavljenog od 570 aminokiselina, najveća je u bubrezima i jetri, ali detektirana je i drugdje u organizmu. U jetri se MATE1 nalazi u kanalikularnoj membrani hepatocita gdje posreduje u izlučivanju organskih kationa u žuč. Do sada su dvije transkript varijante pronađene u jetri, bubregu i ostalim tkivima, no njihova ekspresija i aktivnost nije dokazana. Što se tiče MATE2 transportera, temeljem dosadašnjih spoznaja, smatra se da MATE2 i MATE2-K transkript varijante predstavljaju aktivne oblike *SLC47A2* gena u organizmu, pri čemu je, specifična, najveća ekspresija pokazana u bubrezima, dok je MATE2-B slabo eksprimiran u organizmu te je njegova funkcija, ukoliko postoji, i dalje nejasna (Yonezawa i Inui, 2011). Dakle, MATE1 i MATE2 transportni proteini imaju glavnu ulogu u bubrezima, u kojima se nalaze u apikalnoj četkastoj membrani epitelnih stanica proksimalnih tubula gdje posreduju u izlučivanju, pretežito, organskih kationa u lumen tubula (u kojem se formira urin), koji su dospjeli u epitelne stanice iz krvnih kapilara putem transportera, većinski OCT2 (eng. *organic cation transporter 2*, *SLC22A2*) smještenog u bazolateralnoj membrani epitelnih stanica proksimalnih tubula (slika 2) (Nies i sur., 2016). Pri tome, transport putem sekundarnog OCT2 transportera odvija se zahvaljujući razlici u membranskom potencijalu sa dviju strana membrane, dok MATE sekundarni transporteri funkcioniraju na način da koriste energiju nastalu stvaranjem elektrokemijskog gradijenta protona (ili Na^+ u bakterijama) putem primarnih transportera, u svrhu elektroneutralnog antiporta protona i organskih kationa. Dakle, primarni transporteri troše energiju ATP-a kako bi transportirali proton izvan stanice, tj. uz koncentracijski gradijent, nakon čega se energija

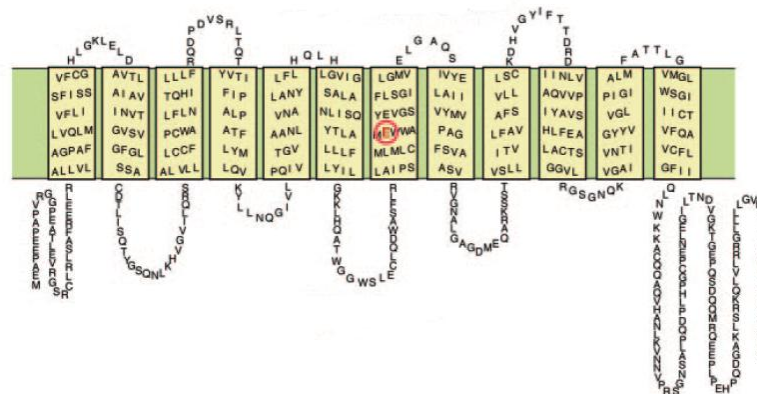
oslobođena uslijed kretanja protona nazad u stanicu (putem MATE transportera), niz koncentracijski gradijent koristi za izbacivanje supstrata izvan stanice (Yonezawa i Inui, 2011). Iako većinom sudjeluju u transportu organskih kationa, MATE proteini transportiraju i neke *zwitterionske* (cefaleksin) te anionske supstrate (estron sulfat), što je dokazano *in vitro* eksperimentima. Također, kako su MATE1 i MATE2 eksprimirani i u drugim organima osim jetre i bubrega, funkcija MATE proteina u sisavaca nije ograničena samo na izlučivanje organskih kationa, već vjerojatno djeluju i tako što omogućavaju homeostazu elektrolita kroz učinkovit i reguliran transport fizioloških metabolita (Omote i sur., 2006).



Slika 2. Shematski prikaz presjeka epitelnih stanica proksimalnog tubula bubrega, na čijoj su bazolateralnoj membrani smješteni OCT2 transporteri koji transportiraju organske katione iz krvi u unutrašnjost epitelnih stanica, nakon čega ih MATE1 i/ili MATE2/MATE2-K, smješteni u apikalnoj četkastoju membrani, preko elektroneutralnog antiporta proton / organski kation, izlučuju u lumen tubula gdje se stvara mokraća (Nies i sur., 2016).

Kako je poznavanje strukture neophodno u razumijevanju mehanizma prepoznavanja supstrata i transporta, veliki napor uložen je u određivanje strukture MATE proteina. Do sada je objavljeno više od 20 struktura MATE proteina, na temelju kojih su MATE transporteri klasificirani u tri potporodice: NorM, DinF i eukariotski MATE (eMATE). Bakterijski MATE transporteri pripadaju NorM i DinF potporodicama, arheje pripadaju DinF potporodici, a eukariotski (eMATE) transporteri pripadaju eMATE potporodici (Kusakizako i sur., 2020). MATE transporteri sastoje se od 12 transmembranskih uzvojnica (TM1-12, od N- prema C-kraju proteina), pri čemu MATE transporteri sisavaca posjeduju jednu dodatnu 13. transmembransku uzvojnica na C-terminalnom kraju proteina, za koju se smatra da služi u stabilizaciji transportera u staničnoj membrani i u interakcijama sa drugim proteinima, no

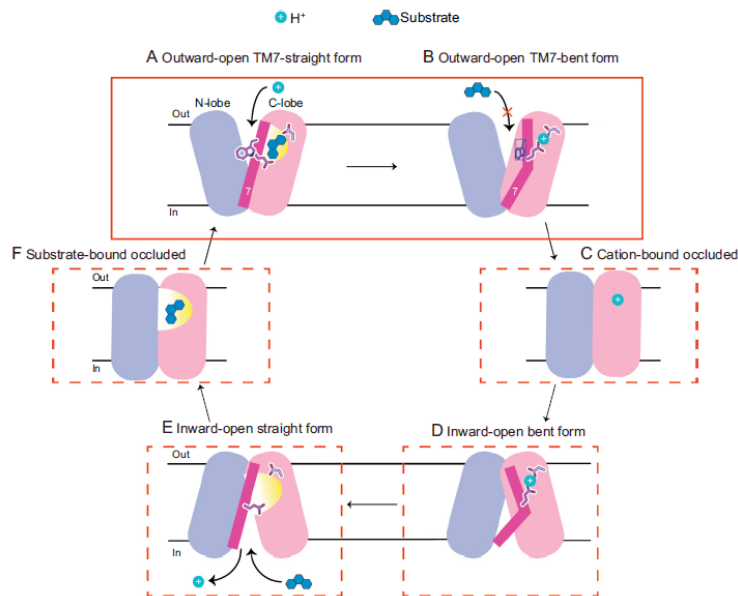
njena stvarna uloga i dalje nije u potpunosti razjašnjena (slika 3) (Kusakizako i sur., 2020). Analiza aminokiselinske sekvence MATE transportera otkrila je da eMATE i NorM posjeduju visoko konzervirane parove kiselih aminokiselinskih ostataka u 7. transmembranskoj uzvojnici proteina (TM7), pri čemu je biokemijskom analizom pokazano da neutralizacija kiselih ostataka u TM7 utječe na afinitet vezanja supstrata, te tako u potpunosti onemogućava transportnu aktivnost. No, detaljan mehanizam transporta ostat će nerazjašnjen sve do određivanja kristalne strukture eMATE proteina (Kusakizako i sur., 2020).



Slika 3. Shematski prikaz sekundarne strukture MATE proteina u sisavaca koja se sastoji od 12 transmembranskih uzvojnica i jedne unutarstanične uzvojnice, uz crveno zaokruženu aminokiselinu glutamat u sedmoj transmembranskoj uzvojnici (TM7) od N-kraja proteina, za koju se smatra da ima esencijalnu ulogu u transportnoj aktivnosti proteina (Otsuka i sur., 2005).

Nedavno su objavljene kristalne strukture eMATE iz *Arabidopsis thaliana* (AtDTX14) i *Camelina sativa* (CasMATE), pri čemu obje dijele otprilike 32 % homologije sa ljudskim MATE1 proteinom (Kusakizako i sur., 2020). Pri tome, dobivene su pri različitim pH vrijednostima, čime se dobio uvid u važne, pH-ovisne, strukturne promjene u transportnom mehanizmu MATE transportera. Jedna od glavnih razlika između kristalnih struktura ova dva biljna organizma, dobivenih pri različitim pH vrijednostima, je konformacija TM7 uzvojnice, koja može biti savijena (AtDTX14) ili ravna (CasMATE). U CasMATE strukturi, par konzerviranih kiselih aminokiselinskih ostataka (Glu265 and Asp383) razdvoji se za oko 6.5 Å pri čemu se formira veliki utor (džep) te je predloženo da je upravo on vezno mjesto supstrata. Transporter veže supstrat u citoplazmi, nakon čega se okreće prema izvanstaničnom prostoru, pri čemu TM7 uzvojnica zauzima ravnu konformaciju. Visoka koncentracija protona u izvanstaničnom kiselom okruženju ulazi u kompeticiju sa vezanim kationskim supstratom te

se on otpušta, a proton veže, pri čemu se konformacija TM7 uzvojnice mjenja iz ravne u savijenu. To pak dovodi do protonacije konzerviranih aminokiselinskih ostataka koji ulaze u interakciju, čime se sužava vezni džep za supstrat i tako sprječava njegovo ponovno vezanje (slika 4) (Kusakizako i sur., 2020).



Slika 4. Predloženi mehanizam antiporta protona i organskog kationa putem MATE transportera. Prikazana je pretpostavljena promjena konformacije TM7 transmembranske uzvojnice uslijed vezanja supstrata u citoplazmi (ravna konformacija), odnosno protona u izvanstaničnom prostoru, uz otpuštanje supstrata (savijena konformacija) (Kusakizako i sur., 2020).

Kao što je prethodno spomenuto, bakterijski MATE proteini imaju ulogu u izbacivanju antibiotika iz stanice kao dijela mehanizma bakterijske rezistencije. Do danas je okarakterizirano 17 MATE proteina u 11 bakterijskih vrsta koji omogućavaju multirezistenciju na antibiotike bakterijama koje ih sadrže, u prvom redu na kationske antibiotike poput etidij bromida, berberina, norfloksacina i dr. (Yazaki i sur., 2008). Za razliku od relativno malog broja *MATE* gena u bakterijskom i životinjskom carstvu, MATE transporteri imaju veoma velik broj ortologa u biljaka. Primjerice, *A. thaliana* ima 58 *MATE* ortologa, iako njihova uloga u organizmu i transportni mehanizam nisu u potpunosti razjašnjeni. Ono što se zna, za sada, je da MATE proteini u biljkama sudjeluju u detoksikaciji endogenih sekundarnih metabolita i ksenobiotika (posebice u korijenu) te su, osim u staničnoj membrani, lokalizirani i u vakuolama, pri čemu transportiraju sekundarne metabolite i biljne

hormone (primjerice nikotin, flavonoidi, organske kiseline) i ksenobiotike preko H^+ antiporta (Yazaki i sur., 2008). Osim toga, smatra se da MATE proteini sudjeluju i u održavanju ravnoteže iona željeza u biljci te povećavaju tolerantnost biljke na aluminij i druge metale prisutne u zemlji. Mogući razlog velike raznolikosti MATE proteina biljaka u odnosu na životinje je taj što biljke proizvode mnogo više toksičnih nusprodukata metabolizma koji moraju biti izlučeni ili sekvestrirani u vakuole gdje ih se drži u inertnom stanju (Nikinmaa, 2014).

MATE transporteri, koji imaju ključnu ulogu u konačnom (finalnom) koraku detoksikacije ksenobiotika, odgovorni su za nefrotoksičnost induciranu nekim lijekovima, što je izazvalo veliku pozornost znanstvenika. Primjerice, klinički važan antitumorski lijek, cisplatina, biva transportirana u epitelne stanice proksimalnih tubula velikim afinitetom putem OCT transportera, dok MATE transporter ima dosta manji afinitet prema cisplatinu, uslijed čega dolazi do njezine akumulacije u bubrezima i, posljedične, nefrotoksičnosti (Kusakizako i sur., 2020). Studije na štakorima, kod kojih je cisplatina primijenjena uz oralnu primjenu antitumorskog lijeka imatiniba, pokazale su znatno manju bubrežnu akumulaciju i nefrotoksičnost cisplatine uslijed inhibicije OCT2 imatinibom. Veliki je potencijal kliničke primjene ovakvih rezultata istraživanja u poboljšanju učinkovitosti i sigurnost cisplatine (Motohashi i Inui, 2013). S druge strane, metmorfin je antidijabetik, čiji je glavni mehanizam djelovanja supresija glukoneogeneze u jetri te je supstrat OCT2, MATE1 i MATE2-K u bubrezima, pri čemu se gotovo u potpunosti izlučuje iz organizma putem urina (Yonezawa i Inui, 2011). Laktična acidoza je fatalni neželjeni učinak metformina te se može dogoditi u pacijenata bez ikakvog rizičnog faktora. U studijama na štakorima, pokazano je kako je uklanjanje metformina putem bubrega značajno smanjeno u prisustvu terapijskih doza pirimetamina i ondansetrona. Temeljem toga, došlo se do zaključka da su MATE proteini inhibirani putem ta dva lijeka te da je povećan rizik od razvoja laktične acidoze budući da bubrezi ne uklanjaju metformin dovoljno učinkovito (Motohashi i Inui, 2013). Važnost MATE transportera naglašena je brojnim primjerima u kojima je gubitak funkcije transportnog proteina zbog polimorfizama ili interakcija lijekova rezultirao klinički značajnim promjenama u raspodjeli lijeka, njegovoj učinkovitosti i toksičnosti. Stoga su regulatorne agencije, poput FDA i EMA-e, uključile MATE transportere kao sastavni dio *in vitro* istraživanja u studijama interakcija lijekova (Lechner i sur., 2016).

2.2.2. Mate proteini zebrice

Za razliku od opsežnog istraživanja provedenog na MATE proteinima bakterija i sisavaca te, posljednjih godina, biljaka, vrlo malo se zna o Mate proteinima vodenih organizama. U radu Lončar i sur., iz 2016, po prvi su puta okarakterizirani Mate proteini zebrice, pri čemu je filogenetskom analizom otkriveno šest Mate proteina, anotiranih Mate3-8. Sintenijom je utvrđeno da su zebričini *mate* geni ortolozi humanim *SLC47A1* (MATE1) i *SLC47A2* (MATE2) genima, pri čemu su *mate3*, *4* i *6* lokalizirani na kromosomu 21, a *mate5*, *7* i *8* na kromosomu 15. Analizom genske ekspresije dobiveni su veoma zanimljivi rezultati, koji se dijelom razlikuju od onih u sisavaca. Ekspresija gena, praćena tijekom embrionalnog razvoja zebrice, pokazala je nisku do umjerenu razinu ekspresije svih *mate* gena do 4 sata nakon oplodnje, što se većinom pripisuje maternalnom mRNA transferu. Oko 6 sati nakon oplodnje, došlo je do značajnog povećanja ekspresije *mate6* i *mate7* gena zbog čega je pretpostavljena njihova važna uloga u ranom embrionalnom razvoju, vjerojatno u službi obrambenog mehanizma zaštite ranog embrija od okolišnih utjecaja. Od 72 sata nakon oplodnje pa do završetka organogeneze (120 sati nakon oplodnje), svi geni osim *mate4* postigli su umjerenu do visoku razinu ekspresije.

Temeljem analize rezultata genske ekspresije, pri čemu je najveća razina ekspresije primijećena u bubrezima, pretpostavljena uloga *mate* gena zebrice slična je onoj u sisavaca, odnosno pretpostavljena je uloga u izlučivanju štetnih ksenobiotika i endogenih tvari putem urina kao glavnog sekretornog puta. No, za razliku od MATE/mate proteina u čovjeka, štakora i miša, razina ekspresije niti jednog od šest *mate* gena zebrice nije prevladavala samo u jednom tkivu, već su svi bili visoko ekspimirani u mnogim tkivima.

Mate3 gen pokazao je veoma zanimljiv, po prvi puta viđen, profil genske ekspresije. Naime, od svih *mate* gena i ispitivanih organa, najveća razina ekspresije pronađena je u bubrezima mužjaka i to *mate3* gena, sa znatno izraženom spolnom razlikom. U bubrezima mužjaka, razina ekspresije *mate3* gena bila je čak 1500 puta veća u odnosu na ženke. Osim toga, visoka razina ekspresije pokazana je i u crijevima, testisima te mozgu, no ponovno samo u mužjaka. Visoka razina ekspresije *Mate3* proteina u testisima ukazuje na moguću važnu ulogu u transportu testosterona, što je u korelaciji sa rezultatima visoke razine ekspresije humanih MATE proteina u Leydigovim stanicama testisa (Omote i sur., 2006). Dakle, utvrđeno je da je *mate3* gen konstitutivno ekspimiran tijekom embrionalnog razvoja te praćen naglašenom tkivno-specifičnom ekspresijom u odraslih jedinki.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kit-ovi

Za proizvodnju Flp-In-293/drM3 i Flp-In-293/Mock staničnih linija korišten je *Flp-In system for generating stable mammalian expression cell lines by Flp recombinase-mediated integration*, proizvođača Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD. Sastoji se od 20 µg liofiliziranih pFRT/*lacZeo*, pOG44, pcDNA5/FRT i pcDNA/FRT/CAT plazmida, 2 µg liofiliziranih CMV prednjih početnica i BGH stražnjih početnica te 1g antibiotika zeocina i higromicina B.

Za reverznu transkripciju korišten je *High capacity cDNA reverse transcription kits for 200 reactions*, proizvođača Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD. Sastoji se od 1mL 10× koncentriranog pufera, 1 mL 10× koncentriranih nasumičnih početnica, 100 mM 25× koncentriranih dNTP-ova, *MultiScribe* reverzne transkriptaze aktivnosti 50 U/µL i 100 µL RNaza inhibitora.

3.1.2. Početnice

Početnice za provođenje PCR-a naručene od tvrtke Macrogen, Amsterdam, Nizozemska:

SLC47A1: 5'CTTGGGGTGATAGGCTCTGC3'; 5'CCCCATGTAGCTTGATGCAGT3'
SLC47A2.1: 5'CTCCTCTGCTGCCTCCCTT3'; 5'CTGGGTCAACCTGGACACG3'
SLC47A2.2: 5'TGAGGCCATCTGTTGTGTCT3'; 5'CCAGTGGTAGGCCGATGATG3'
mate3: 5'TCGGATGTACCAAAGATGT3'; 5'CGGTAATGCCCGCTATGG3'

3.1.3. Fluorescentne boje

ASP+ (4-(4-(dimetilamino)stiril)-N-metilpiridin jodid), Merck KgaA (Sigma-Aldrich), Missouri, SAD

Boja za sabijanje uzoraka na gelu (*Deep Purple*), kat. br. RO611, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD

Boja za vizualizaciju DNA (*Gel Star*), Lonza Group, Basel, Švicarska

DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), Merck KgaA (Sigma-Aldrich), Darmstadt, Njemačka

3.1.4. Kemikalije

10 mM nukleotidi (dNTP), New England Biolabs, Massachusetts, SAD

10% FBS (*Fetal Bovine Serum*), Merck KgaA (Sigma-Aldrich), Darmstadt, Njemačka

10× koncentrirani PCR pufer, New England Biolabs, Massachusetts, SAD
Agarozna, kat. br. EMR010500, EuroClone, Pero, Italija
Amonijev klorid (NH₄Cl), Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska
BSA, *Bovine Serum Albumin (Albumin Fraction V, NZ-Origin, 10 g)*, kat. br. 8076.4, Carl Roth GmbH & Company KG, Karlsruhe, Njemačka
CBB reagens (*Coomassie Brilliant blue G 250*), kat. br. 27815, Merck KgaA (Sigma-Aldrich), Darmstadt, Njemačka
DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD
Etanol (96%-tni), Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska
Izopropilni alkohol, Merck KgaA (Sigma-Aldrich), Darmstadt, Njemačka
Kloroform, kat. br. C2432, Merck KgaA (Sigma-Aldrich), Darmstadt, Njemačka
Na-transportni pufer (145 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 5 mM glukoze te 5 mM Hepes (pH 7,4) / 10 mM Tris (pH 8,4) / 5 mM Hepes + 30 mM NH₄Cl), sastojci pufera nabavljeni od Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska, osim Hepes i Tris (Sigma-Aldrich)
PBS (*Phosphate Buffered Saline*), Merck KgaA (Sigma-Aldrich), Darmstadt, Njemačka
PEI (polietilenimin), Merck KgaA (Sigma-Aldrich), Darmstadt, Njemačka
Smjesa za kvantitativni PCR za SYBR bojom (*Power SYBR™ Green PCR Master Mix*), Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD
Standardi DNA poznate molekulske mase (eng. *ladder*), kat. br. SMO333, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD
TAE (*Tris acetate EDTA*) pufer, sastojci nabavljeni od Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska
Taq DNA polimeraza, New England Biolabs, Massachusetts, SAD
TRIZOL reagens (*Tri Reagent Solution*), kat. br. AM9738, Thermo Fisher Scientific (Life Technologies), Massachusetts, SAD

3.1.5. Laboratorijski pribor

Kadica za horizontalnu elektroforezu (*Biometra Compact XS/S*), Analytik Jena, Jena, Njemačka
Mikroploče sa 6 jažica (*BioLite 6 Well Multidish*), kat. br. 130184, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD
Mikroploče sa 96 jažica (*Multiwell plate with lid*), kat. br. CC7682-7596, Starlab Group, Hamburg, Njemačka
Nastavci za pipete, Starlab Group, Hamburg, Njemačka

Neubauer-ova komorica (*Neubauer-improved, 0,1 mm*), Merck KGaA (Sigma-Aldrich), Darmstadt, Njemačka

Pipete, Eppendorf Austria GmbH, Beč, Austrija

Posuda za uzgoj stanica 25 cm² i 75 cm² (*TPP Zellkulturflasche*), Faust Lab Science GmbH, Klettgau, Njemačka

Vorteks, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD

3.1.6. Instrumenti

Analitička vaga, Sartorius, Göttingen, Njemačka

BioSpec-nano (*BioSpec-nano Spectrophotometer for Life Science*), Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan

Centrifuga (*Universal 32R Hettich Centrifuge*), DJB Labcare Ltd, Newport Pagnell, Ujedinjeno Kraljevstvo

Čitač mikrotitarskih ploča (*TECAN Infinite M200 PRO*), Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka

Invertni mikroskop, Helmut Hund GmbH, Wetzlar, Njemačka

Kvantitativni PCR termocikler, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD

PCR termocikler (*T100 thermal cycler*), Bio-Rad Laboratories, Kalifornija, SAD

Uređaj za vizualizaciju vrpce na gelu (*ChemiDoc XRS+ System with Image Lab Software*), Bio-Rad Laboratories, Kalifornija, SAD

Vaga (*Kern EMB 200-2*), Kern & Sohn, Baden-Württemberg, Njemačka

3.2. METODE

3.2.1. Proizvodnja stanične linije sa stabilno i prekomjerno eksprimiranim *Mate3* transportnim proteinom zebrice

3.2.1.1. Kloniranje cijelog *mate3* gena u eukariotski ekspresijski vektor *pcDNA3.1/His*

Postupak kloniranja cijelog gena iz bubrega mužjaka zebrice opisan je u radu Lončar i sur., 2016. te ukratko ide ovako: najprije se izolira RNA iz bubrega mužjaka u kojem je pokazana visoka razina ekspresije *mate3* gena, nakon čega slijedi reverzna transkripcija ukupne RNA u cDNA. Koristeći dobivenu cDNA kao kalup, provodi se PCR reakcija termostabilnom polimerazom, tzv. *Phusion high-fidelity* DNA polimerazom, koja osigurava visoku vjernost replikacije DNA, pri čemu posjeduje 5' → 3' polimeraznu aktivnost i 3' → 5'

egzonukleaznu (*proofreading*) aktivnost. Početnice koje se koriste u svrhu umnažanja *mate3* gena sadrže NheI i EcoRI restrikcijska mjesta u prednjoj početnici (eng. *forward primer*), odnosno NotI i KpnI restrikcijska mjesta u stražnjoj početnici (eng. *reverse primer*). Nakon završetka PCR-a, dobiveni DNA fragmenti (umnožene sekevence *mate3* gena) pročiste se iz PCR smjese, pocijepaju restrikcijskim enzimima te ligiraju u pcDNA3.1/His plazmid prethodno lineariziran (pocijepan) kombinacijom NheI i NotI restrikcijskih enzima. Sekvenca *mate3* gena validirana je DNA sekvenciranjem Sangerovom metodom koristeći kapilarnu elektroforezu za analizu fragmenata te je slijed nukleotida uspoređen sa sekvencom *mate3* gena u NCBI i ENSEMBL bazama. Dobivena sekvenca *mate3* gena korištena je u daljnjem radu za kloniranje u pcDNA5/FRT ekspresijski plazmid, u svrhu proizvodnje Mate3 eksprimirajuće Flp-In-293 stabilne stanične linije.

3.2.1.2. Prekloniranje *mate3* gena restrikcijom iz pcDNA3.1/His vektora u pcDNA5/FRT vektor

Prvi korak u proizvodnji Mate3 eksprimirajuće stabilne stanične linije je kloniranje *mate3* gena (NM_001080179.1) u pcDNA5/FRT plazmid koji služi za transfekciju Flp-In-293 stanica. *Mate3* sekvenca već je bila dostupna u laboratoriju, ali u pcDNA3.1/His plazmidu, stoga je preklonirana u pcDNA5/FRT vektor koristeći ranije uvedena restrikcijska mjesta: NheI u prednjoj početnici i KpnI u stražnjoj početnici. Postupak restrikcije proveden je prema uputama proizvođača enzima (Flp-In System manual, Thermo Fisher Scientific).

3.2.1.3. Gel elektroforeza i purifikacija iz gela

Porezani pcDNA3.1/His plazmid i *mate3* gen razdvojeni su gel elektroforezom. Za pripremu agaroznog gela, najprije se pripravi 450 mL pufera (9 mL 50× koncentriranog TAE pufera u 441 mL destilirane vode) te se u 100 mL tako pripremljenog pufera otopi 1,5 g agaroze, kako bi dobili 1,5 %-tni agarozni gel. Agaroz se otopi u puferu zagrijavanjem u mikrovalnoj pa se nakon hlađenja izlije u kalup, doda se 0,5 µL boje Gel Star koja interkalira u DNA (boja za vizualizaciju), stavi se češljic te ostavi 30 minuta da polimerizira. Nakon 30 minuta, ostatak pripremljenog pufera (350 mL) izlije se u veliku kadu, kalup sa polimeriziranim agaroznim gelom stavi se u veliku kadu, ukloni se češljic te se u jažice nanose uzorci (20 µL po jažici) u koje se doda 4 uL 6× koncentrirane boje za sabijanje uzoraka na dnu jažice, na „startnoj“ liniji (eng. *Purple Dye*). U jednu jažicu nanese se DNA standard poznate molekulske mase koji služi za procjenu veličine molekula koje putuju kroz gel ovisno o prijašnjem putu (eng. *ladder*). Nakon provedene elektroforeze, vrpca sa *mate3*

genom izrezana je i pročišćena kitom za izolaciju iz gela prema uputama proizvođača (Qiagen).

3.2.1.4. Ligacija, transformacija, umnažanje i izolacija plazmida

Mate3 sekvenca je, u molarnom omjeru 3:1, ulgirana u pcDNA5/FRT vektor T4 ligazom prema uputama proizvođača (Flp-In System manual, Thermo Fisher Scientific) inkubacijom na 22 °C, jedan sat. Plazmidni vektor sa željenom genskom sekvencom (*mate3* u ovom slučaju) umnaža se transformacijom bakterije *Escherichia coli*, konkretno korištenjem kompetentnog soja DH5 α *E.coli* bakterijskih stanica. Nakon otapanja DH5 α kompetentnih stanica na ledu, alikvot od 50 μ L stanica (za svaku transformaciju) stavi se u kivetu te doda 5 μ L DNA (plazmida) i promiješa. Kivete se zatim inkubiraju pola sata na ledu, nakon čega slijedi toplinski šok (1 minuta, 42 °C u termobloku) što dovodi do povećanja propusnosti bakterijske stanične stijenke i membrane, čime je omogućen ulazak plazmida unutar stanica. Nakon toga, kivete se stavljaju na led 2 minute, doda se prethodno zagrijan LB medij za uzgoj bakterija te slijedi inkubacija na tresilici 30 minuta na 37 °C pri 225 rpm. Na kraju, 200 μ L bakterijske kulture izlije se u prethodno zagrijane Petrijeve zdjelice u kojima hranjivi medij s agarom sadrži antibiotik ampicilin, čime je osiguran rast samo onih bakterija koje su primile željeni plazmid na kojemu se nalazi gen za rezistenciju na ampicilin te se Petrijeve zdjelice inkubiraju preko noći na 37 °C. Na ovaj način, selekcijom i diobom bakterije *E.coli* koja sadrži željeni plazmid, umnažaju se i željeni plazmidi te se razbijanjem bakterijskih stanica i centrifugiranjem, korištenjem kita za mini prep prema uputama proizvođača (ZYMO Research) izdvajaju i koriste za transfekciju HEK293T stanica.

3.2.1.5. Flp-In sustav

Stanična linija koja konstitutivno eksprimira gen koji kodira za *Mate3* transportni protein razvijena je pomoću Flp-In sustava koji omogućava integraciju gena od interesa u specifično mjesto u genomu HEK293T stanica, tzv. FRT (eng. *Flp Recombination Target*) mjesto. Stanice s uvedenim FRT mjestom, korištene za transfekciju, komercijalno su dostupne pod imenom Flp-In-293. To su HEK293T stanice, u koje je prethodno uvedeno FRT mjesto tj. slijed nukleotida u DNA koji prepoznaje enzim Flp rekombinaza te na to mjesto ubacuje gen od interesa (ukoliko stanična linija s kojom radimo nema insertirano FRT mjesto, prvi korak transfekcije je njegova insercija u genom). HEK293 (eng. *human embryonic kidney*) stanice, prvi puta uzgojene 1970-ih, potječu iz embrionalnog bubrega abortiranog ljudskog fetusa. Kako bi ih se imortaliziralo, transfecirane su sa DNA ljudskog adenovirusa 5 (Ad5) koja je

integrirana u kromosom 19, a kodira za E1A/E1B proteine koji interferiraju sa normalnom kontrolom staničnog ciklusa te tako sprječavaju apoptozu, čime je osigurana kontinuirana dioba stanica. Za razliku od izvornih HEK293 stanica, HEK293T stanična linija korištena u radu, dodatno eksprimira temperaturno-osjetljiv alel SV40 T antigena koji, vezanjem za SV40 ishodište replikacije (SV40 *ori*), omogućava znatno veću razinu replikacije vektora koji ga sadrže. Time se povećava razina ekspresije gena od interesa uslijed prijelazne transfekcije stanica sa vektorom koji sadrži navedeno ishodište replikacije (Abaandou i sur., 2021). Zbog jednostavnosti održavanja i brze diobe, HEK293T stanice jedne su od najčešće korištenih stanica u biotehnologiji i mnogobrojnim istraživanjima, posebice u svrhu visoko učinkovite proizvodnje proteina za biomedicinska i farmaceutska istraživanja. No, glavne mane korištenja HEK293 stanica su što relativno lako podliježu bakterijskoj i virusnoj kontaminaciji te što duže vrijeme uzgoja rezultira narušavanjem zdravlja stanica.

Flp-In sustav, korišten za transfekciju, sastoji se od pOG44 plazmida koji sadrži gen za Flp rekombinazu, pcDNA5/FRT ekspresijskog plazmida u koji je integriran *mate3* gen (gen od interesa) te plazmid koji služi kao pozitivna kontrola, a nosi gen koji kodira za enzim kloramfenikol acetil transferazu (CAT). Na plazmidu pOG44 nalazi se gen za enzim Flp rekombinazu pod kontrolom CMV (eng. *cytomegalovirus*) promotora koji, kao jaki promotor, uzrokuje konstitutivnu ekspresiju navedenog gena. Flp rekombinaza, izolirana iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, katalizira homolognu rekombinaciju između homolognih sekvenci, tj. FRT mjesta pri čemu se jedno FRT mjesto nalazi unutar genoma Flp-In-293 stanica, a drugo na ekspresijskom plazmidu pcDNA5/FRT/*mate3*. Ovo je primjer mjesno-specifične rekombinacije kod koje Flp rekombinaza prepoznaje specifične FRT sekvence na DNA (genomskoj i plazmidnoj), veže se na njih, uzrokuje lomove dvolančane DNA te katalizira izmjenu lanaca između genomske DNA i plazmida zbog čega dolazi do integracije plazmida u genom. Ekspresijski plazmid, osim već navedenog FRT mjesta, sadrži i gen odgovoran za rezistenciju na antibiotik higromicin B, gen za rezistenciju na antibiotik ampicilin (selekcija nakon umnažanja plazmida u *E.coli*) te gen od interesa (*mate3*) pod jakim CMV promotorom. Kako bi selektirali stanice kod kojih je došlo do ugradnje željenog gena u genom, stanice se uzgajaju u mediju koji sadrži antibiotik higromicin B, pri čemu prežive i rastu samo one koje sadrže gen za rezistenciju na higromicin B koji se nalazi na navedenom plazmidu i ugrađuje u genom stanica domaćina zajedno sa željenim genom.

3.2.1.6. Transfekcija

Stanice za transfekciju naciepljene su na mikroploče sa 6 jažica u koncentraciji 7.5×10^5 st/jažici. Nakon 48 sati uzgoja, stanice su kotransfecirane sa plazmidom pcDNA/FRT/*mate3* (375 ng) i pOG44 plazmidom (3375 ng) u omjeru 1 : 9, sa polietileniminom (PEI) kao transfekcijskim agensom. PEI je stabilni kationski polimer koji „omota“ negativno nabijenu DNA (plazmid) te se takve pozitivno nabijene čestice vežu za negativno nabijenu staničnu membranu i endocitozom bivaju transportirane u citoplazmu gdje dolazi do otpuštanja plazmida nakon što endosom pukne uslijed osmotskog oticanja koje je posljedica protonacije PEI-ja, tj. tzv. efekta protonske spužve. Nakon transfekcije, stanice se ponovno inkubiraju 48 sati, a zatim prebace (bez tripsinizacije) u mali flask (25 cm²) gdje se uzgajaju u DMEM (eng. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) mediju sa 10 % FBS-a (eng. *Fetal Bovine Serum*). Stanice se ostave preko noći da se prilijepe za podlogu pa se ujutro doda $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ antibiotika higromicina B koji služi, kako je prethodno objašnjeno, za selekciju stanica kod kojih je došlo do ugradnje željenog gena (pcDNA/FRT/*mate3*) u genom. Uzgoj se nastavlja sljedećih 25 do 30 dana sve dok se ne pojave pojedinačne kolonije stanica, pri čemu se uzgojni medij sa higromicinom B mijenja svaka 3 do 4 dana. Navedeni postupak opisuje razvoj Flp-In-293/drM3 stanične linije, odnosno stanične linije koja prekomjerno eksprimira *mate3* gen. Na identičan način, proizvedena je i Flp-In-293/Mock stanična linija koja služi kao negativna kontrola u daljnim eksperimentima, sa jedinom razlikom što je transfecirana sa pCDNA/FRT plazmidom koji ne sadrži *mate3* gen te tako Flp-In-293/Mock stanična linija nema Mate3 transportni protein uklopljen u staničnu membranu (transfekcija „praznim“ plazmidom).

3.2.2. Izolacija RNA TRIzol metodom te određivanje koncentracije i integriteta RNA

Izolacija RNA pomoću TRIzol-a jedna je od najčešće korištenih metoda izolacije RNA. Odlikuju ju jednostavnost i učinkovitost, uz dobivanje RNA molekula visoke čistoće. TRIzol reagens sastoji se od fenola i gvanidin izotiocijanata te uzrokuje lizu stanica i staničnih komponenata, uz očuvanje integriteta molekule RNA. Flp-In-293/drM3 i Flp-In-293/Mock stanice, koje rastu u monosloju, uzgojene su do konfluentnosti, isprane PBS-om, sastrugane, centrifugirane 5 min na 500 g i 4 °C, supernatant je uklonjen, a suhi talog stanica pohranjen u frižideru na -80 °C. Prvi korak u izolaciji RNA su liza i homogenizacija stanica što se postiže dodatkom 500 μL TRIzol-a na talog stanica, nakon čega slijedi vorteks te inkubacija 5 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim se doda 100 μL kloroforma koji služi za ekstrakciju, tj. razdvajanje organske faze od vodene. Nakon inkubacije tri minute na sobnoj

temperaturi te centrifugiranja pet minuta pri 12 000 g (na 4 °C), jasno se vide odvojene faze: na dnu epice nalazi se organska (crvena fenol-kloroform) faza u kojoj se nalazi DNA (kiseli fenol pH 4 - 5 uzrokuje neutralizaciju negativno nabijene DNA te ona postaje topljiva u organskoj fazi), sredinu epice zauzima interfaza u kojoj se nalaze denaturirani proteini, dok RNA zaostaje u gornjoj, vodenoj fazi (tvori supernatant). Dobiveni supernatant RNA prebaci se u novu epicu te se doda isti volumen izopropilnog alkohola kao što je volumen izuzetog supernatanta. Izopropilni alkohol uzrokuje taloženje RNA molekula iz vodene faze, tj. stvaranje peleta RNA na dnu epice. Nakon dodatka izopropilnog alkohola, slijedi kratki vorteks, a zatim se uzorak stavi u frižider na -20 °C, 20 minuta, pri čemu počinje taloženje RNA. Slijedi centrifuga 5 minuta, pri 12 000 g (na 4 °C), nakon koje je na dnu epice jasno vidljiv stvoreni pelet RNA. Supernatant se ukloni, a na pelet RNA doda se 500 µL 75 %-tnog etanola kako bi se RNA isprala od eventualno zaostalih organskih nečistoća. Nakon centrifuge od 10 minuta pri 12 000 g (na 4°C), supernatant koji sadrži etanol se ukloni, a pelet RNA stavi na sušenje 10 minuta na 42 °C kako bi isparilo preostalo otapalo koje se nalazi uz pelet.

Daljnji postupci uključuju određivanje koncentracije te integriteta izolirane RNA. Koncentracija i čistoća uzoraka RNA određuju se spektrofotometrijski pomoću NanoDrop-a (spektrofotometar), dok se integritet RNA provjerava gel elektroforezom. Određivanje koncentracije i čistoće uzoraka RNA veoma je bitno za sva daljnja mjerenja, uključujući reverznu transkripciju te PCR. Pomoću NanoDrop-a se koncentracija RNA odredi mjerenjem apsorbancije pri 260 nm, dok čistoću uzoraka RNA definira omjer apsorbancija A_{260} / A_{280} te A_{260} / A_{230} . Najprije se očita vrijednost apsorbancije slijepe probe (1 µL vode) kako bi se mogla oduzeti od vrijednosti apsorbancija uzoraka RNA. Nakon toga, dodaje se 1 µL RNA uzoraka te se očitavaju rezultati. Koncentracija RNA izražava se kao $\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$ te, ukoliko je značajno viša od $1000 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1}$, uzorak RNA potrebno je razrijediti vodom jer je preciznost (osjetljivost) uređaja manja pri previsokim koncentracijama RNA.

Slijedi provjera integriteta RNA pomoću gel elektroforeze. Na temelju očitanih koncentracija RNA, pomoću NanoDrop-a, izračuna se koliki volumen uzorka RNA je potrebno uzeti kako bi dobili 500 ng RNA te se ostatak volumena (do 10 µL) dopuni vodom. U tako pripremljene uzorke RNA ($V = 10 \mu\text{L}$), doda se 2 µL 6× koncentrirane boje *Purple Dye* (boja za sabijanje uzoraka na dnu jažice, na „startnoj“ liniji) te se 12 µL tako pripremljenih uzoraka unosi u jažice, uz *ladder* u jednoj od jažica. Nakon provedene elektroforeze, analiziraju se dobivene vrpce (eng. *band*).

3.2.3. Reverzna transkripcija

Kako bi se odredila razina ekspresije pojedinih gena unutar stanične linije, izolirana RNA prevodi se reverznom transkripcijom u jednolančanu komplementarnu cDNA koja služi kao kalup u PCR reakciji (lančanoj reakciji polimerazom). Za prevođenje RNA u jednolančanu cDNA korišten je *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor*. Navedeni kit sadrži sve komponente potrebne za provođenje reverzne transkripcije, tzv. Master Mix koji se sastoji od 10× koncentriranog pufera, 25× koncentriranih nukleotida (dNTP), 10× koncentriranih nasumičnih (eng. *random*) početnica, enzima reverzne transkriptaze, RNaza inhibitora te vode. Nakon što se komponente Master Mix-a otope na ledu, pripremi se 2× koncentrirani Master Mix pri čemu volumen dodanih komponenata ovisi o broju reakcija, tj. broju uzoraka RNA koje želimo prevesti u cDNA. U svaku od kiveta u kojima će se provoditi reakcija, doda se 10 µL pripremljenog Master Mix-a i 10 µL uzorka RNA (svi uzorci RNA su namješteni na masu od 1 µg). Dodatkom 10 µL uzorka RNA u ukupni volumen od 20 µL, 2× koncentrirani Master Mix postaje 1× koncentrirani. Nakon kratke centrifuge, uzorci se stavljaju u termocikler (PCR uređaj) te se namještaju uvjeti potrebni za provođenje reverzne transkripcije: 10 minuta pri 25 °C, zatim 120 minuta pri 37 °C te konačno 5 minuta pri 85 °C. Nakon provedene reverzne transkripcije, uzorci cDNA uskladište se na -20 °C do daljnje uporabe.

3.2.4. Dizajn početnica i PCR

Za provođenje PCR-a, najprije je potrebno dizajnirati i naručiti odgovarajuće početnice. Prilikom dizajna treba voditi računa o nekoliko bitnih stvari. Što se tiče duljine početnica, trebale bi biti dovoljno dugačke kako bi se postigla što veća specifičnost vezanja za ciljnu sekvencu na DNA kalupu, no ne predugačke jer se time povećava temperatura taljenja (T_m), a time i temperatura potrebna za vezanje početnica na DNA kalup (eng. *annealing temperature*, T_a), stoga je optimalna duljina početnica 18 - 22 pb (parova baza). Temperatura taljenja (eng. *melting temperature*, T_m) podrazumijeva temperaturu pri kojoj je 50 % početnica vezano na DNA kalup (a ostatak se nalazi slobodno/nevezano) te bi, idealno, trebala iznositi 52 - 60 °C, dok bi T_a trebala biti oko 5 °C niža od T_m . Navedene temperature ovise o GC sastavu početnica (udio nukleotida gvanina i citozina) koji bi trebao iznositi 40 - 60 % kako bi se postigla optimalna stabilnost i specifičnost vezanja početnica na DNA kalup (što je veći postotak GC pb u početnici, to je stabilnija njena hibridizacija sa kalupom te veća specifičnost vezanja za ciljnu sekvencu). Uz to, poznavajući GC sastav početnica, jednostavnim formulama mogu se izračunati optimalne T_m i T_a vrijednosti za pojedinu PCR

reakciju. Kako ne bi došlo do hibridizacije početnica međusobno (eng. *primer dimer*) treba izbjegavati uporabu prednjih (eng. *forward*) i stražnjih (eng. *reverse*) početnica koje imaju komplementarne 3' krajeve. Također, treba izbjegavati početnice koje imaju mogućnost tvorbe sekundarnih struktura intramolekulskim interakcijama, odnosno sparivanjem parova baza unutar početnice (npr. struktura ukosnice). Kako bi se povećala specifičnost vezanja početnica na DNA kalup, osim odabira odgovarajuće dužine i GC sastava početnica, treba obratiti pažnju na to da se G i C nukleotidi nalaze pretežito na 3' kraju početnice, kao i izbjegavati uzastopne ponavljajuće nukleotide ili sekvence. Uz to, za uspješno umnažanje željenog DNA fragmenta (amplikona), njegova optimalna veličina treba biti između 70 i 200 pb. U svrhu dizajna početnica koristi se program Primer-BLAST (alat unutar NCBI baze podataka), u koji se unese identifikacijski broj željenog gena (cDNA) koji želimo umnožiti PCR-om, namjestite se željeni parametri i, kao rezultat, dobije se nekoliko mogućih kombinacija parova početnica.

Geni čiju razinu ekspresije (u formi cDNA) u Flp-In-293 (Mock i drM3) stanicama želimo provjeriti su *SLC47A1* koji kodira za humani MATE1 protein (eng. *multidrug and toxin extrusion protein 1*; hsM1) i *SLC47A2* koji kodira za humani MATE2 protein (eng. *multidrug and toxin extrusion protein 2*; hsM2). Alternativnim procesiranjem *SLC47A2* mRNA nastaju četiri transkript varijante koje se transliraju u četiri izoforme proteina MATE2 (MATE2, MATE2-K, MATE2-B i MATE2_tv4). Nakon odabira gena kojeg želimo umnožiti, u programu Primer-BLAST odabere se željena duljina (veličina) amplikona (90 - 110 pb), organizam kojemu navedeni gen pripada (*Homo sapiens*) te baza podataka u kojoj želimo da se vrši pretraga početnica za odabrani gen, tj. cDNA (*Refseq mRNA*). Osim toga, pošto se umnaža cDNA, odabere se opcija da se početnice protežu preko dva susjedna egzona, odnosno da jedan dio početnice hibridizira na 3' kraj jednog egzona, a drugi dio na 5' kraj susjednog egzona. Na taj način, izbjegava se umnažanje genomske DNA koja sadrži introne, a možda je zaostala, u maloj količini, tijekom izolacije RNA pa se nalazi i u uzorku cDNA koji služi kao kalup tijekom PCR reakcije. Ostali parametri programa nisu mijenjani, već su ostale zadane vrijednosti.

Za pripremu 100 μ M otopine početnica koje će se uskladištiti na -20 °C, izvorni uzorci početnica (25 nmola liofiliziranih početnica) otope se u 250 μ L vode. Kako protokol nalaže, za provođenje PCR-a potrebna je 20 μ M početnica, stoga se pripremljene otopine od 100 μ M razrijede 5 \times te kao takve čuvaju i koriste prilikom svakog provođenja reakcije. Smjesa za PCR sastoji se od 10 \times koncentriranog pufera, 10 mM nukleotida (dNTP), Taq DNA

polimeraze, 20 μ M prednjih početnica (pF), 20 μ M stražnjih početnica (pR) te vode. Volumen dodanih komponenata ovisi o broju reakcija koje se provode, što pak ovisi o broju različitih kombinacija početnica i uzoraka cDNA koje želimo ispitati. Na kraju se u svaku pripremljenu smjesu dodaje cDNA do konačnog volumena od 20 μ L. Tako pripremljeni uzorci stave se u PCR uređaj te se namjeste uvjeti za provođenje reakcije. Ti uvjeti uključuju početnu denaturaciju pri 95 °C (30 s) tijekom koje dolazi do razdvajanja lanaca kalupa cDNA, nakon čega slijedi 34 ciklusa koja se sastoje od ponavljanja tri ključna koraka: denaturacija pri 95 °C (30 s), vezanje početnica za ciljne sekvence kalupa cDNA pri 60 °C (30 s, eng. *annealing*) te elongacija početnica vezanih na kalup tj. sinteza ciljne cDNA pri 68 °C (20 s) pomoću termostabilne Taq polimeraze koja omogućava provođenje reakcije pri višim temperaturama, čime se povećava specifičnost vezanja početnica za ciljne sekvence DNA. Završni korak lančane reakcije polimerazom je finalna elongacija pri 68 °C, 5 minuta. Nakon provedenog PCR-a, pomoću gel elektroforeze, provjerava se prisutnost fragmenata DNA (cDNA) određene veličine koji su, ako su prisutni, vidljivi kao vrpca (eng. *band*) na agaroznom gelu. Gel elektroforeza provodi se na prethodno opisani način, sa tom razlikom što se ovdje koristi 4 μ L boje Purple Dye na 20 μ L uzorka te se ukupni volumen uzorka od 24 μ L nanosi u jažice.

3.2.5. Kvantitativni PCR (qPCR)

Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (eng. *real-time* PCR) naziva se još i kvantitativni PCR (qPCR), a predstavlja metodu koja omogućava preciznu kvantifikaciju specifičnih molekula DNA u uzorku. Zasniva se na istom principu kao i tradicionalni PCR, s tom razlikom što se u smjesu dodaje fluorescentna komponenta, poput boje SYBR Green I ili TaqMan sonde, koja ulazi u interakciju s produktima (umnoženim DNA fragmentima) kvantitativnog PCR-a te se tako produkti analiziraju istovremeno dok i nastaju, mjerenjem fluorescencije pomoću fluorimetra (praćenje reakcije u stvarnom vremenu). Za razliku od toga, umnoženi produkti klasičnog PCR-a detektiraju se, nakon provedbe reakcije, na agaroznom gelu. Fluorescentna boja SYBR Green I najčešće je korištena boja u svrhu detekcije qPCR produkata. Ona se nespecifično veže za dvolančanu DNA (dsDNA) interkalacijom između parova baza i/ili vezanjem u mali utor DNA te joj se vezanjem višestruko poveća fluorescencija (više od 100 \times). Dakle, količina vezane boje proporcionalna je količini DNA fragmenta nastalog amplifikacijom u svakom qPCR ciklusu. Tijek lančane reakcije polimerazom sastoji se od tri faze: eksponencijalna faza u kojoj se broj kopija PCR produkta udvostručuje u svakom ciklusu, linearna faza u kojoj se reaktanti troše i reakcija usporava te plato faza u kojoj dolazi do zaustavljanja reakcije te početka razgradnje produkata.

Tradicionalnim PCR-om analiziraju se, na gelu, produkti iz plato faze, dok se kvantitativnim PCR-om prikupljaju podaci o fluorescenciji tijekom eksponencijalne faze. Dakle, kvantitativni PCR temelji se na mjerenju fluorescencije u svakom PCR ciklusu tijekom eksponencijalne faze, pri čemu je povećanje fluorescencije direktno proporcionalno povećanju udjela ciljnog DNA fragmenta. Kao rezultat, dobije se amplifikacijska krivulja koja prikazuje odnos fluorescentnog signala (y-os) i broja PCR ciklusa (x-os) te se iz nje iščita Ct (eng. *cycle threshold*) vrijednost koja predstavlja broj PCR ciklusa koji su potrebni da fluorescentni signal prijeđe tzv. graničnu (eng. *threshold*) vrijednost. Ct vrijednost obrnuto je proporcionalna količini DNA kalupa na početku PCR reakcije pa tako, što je veća količina DNA (cDNA) kalupa, brže se (u ranijem ciklusu) postiže fluorescencija iznad određene granične vrijednosti, odnosno manja je Ct vrijednost. Granična vrijednost (linija) odabire se proizvoljno, a trebala bi biti malo iznad bazne linije (eng. *baseline*) koja predstavlja pozadinski fluorescentni signal (šum) detektiran u ranim PCR ciklusima kada nema značajnog povećanja fluorescencije u vidu umnažanja DNA fragmenata.

Nakon što se klasičnim PCR-om provjeri specifičnost početnica, prvi korak qPCR-a je provjera učinkovitosti (efikasnosti) početnica, odnosno efikasnosti samog qPCR-a, pri različitim koncentracijama cDNA kalupa. U svrhu provjere amplifikacijske učinkovitosti koriste se početnice za humane *SLC47A1*, *SLC47A2.2* (obuhvaćaju 3 transkript varijante MATE2 proteina) gene i *mate3* gen te početnice za *EEF1A1 housekeeping* gen (eng. *elongation factor 1- α*) koji je konstitutivno eksprimiran u istraživanim stanicama. Prema protokolu, smjesa za provođenje svake pojedinačne qPCR reakcije, tzv. Master Mix sastoji se od 1,5 μL cDNA kalupa ($c = 10 \text{ ng}/10 \mu\text{L}$ tj. 10 ng/jažici), 0,5 μL prednje početnice ($c = 300 \text{ nM}$), 0,5 μL stražnje početnice ($c = 300 \text{ nM}$), 5 μL SYBR Green PCR Master Mix-a koji sadrži boju SYBR Green I, termostabilnu DNA polimerazu, dNTP-ove i pufer te 2,5 μL vode, što čini ukupni volumen reakcije od 10 μL . Kako bi pripravili 300 nM početnice, potrebno je 20 μM radne stockove početnica razrijediti 3,3 puta čime se dobiju 6 μM početnice. Na taj način, kada se 0,5 μL 6 μM početnica stavi u ukupni volumen reakcije (10 μL), dobije se željena koncentracija početnica (300 nM). Nakon toga, pripreme se razrjeđenja cDNA u rasponu koncentracija 0 - 10 ng/jažici (0, 0,1, 1, 2,5, 5 i 10 ng/jažici). Za pripremu 10 ng/10 μL cDNA, 50 $\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$ početne otopine cDNA potrebno je razrijediti 7,5 \times kako bi se dobila koncentracija cDNA od 6,67 $\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$. Kada se 1,5 μL cDNA koncentracije 6,67 $\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$ doda u 10 μL ukupnog volumena reakcije, dobije se željena koncentracija cDNA od 10 ng/jažici. Iz tako pripremljene otopine cDNA najveće koncentracije pripreme se redom razrjeđenja cDNA,

sve do najmanje koncentracije od 0,1 ng/jažici. Nakon pripreme početnica i serijskog razrjeđenja cDNA, slijedi priprema Master Mixa (u ovom slučaju, četiri Master Mixa zbog četiri različita para početnica: *EEF1A1*, *SLC47A1*, *SLC47A2.2* i *mate3*) koji se sastoji od gore navedenih komponenata. Volumen dodanih komponenata ovisi o broju reakcija koje se provode, tj. o broju pripremljenih razrjeđenja cDNA te broju paralela koje se provode za svako razrjeđenje za pojedini par početnica. Tijekom pripreme Master Mix-a, najprije se dodaje voda, zatim prednja i stražnja početnica, nakon čega se ugasi svjetlo i doda SYBR Green PCR Master Mix (SYBR Green boja osjetljiva je na svjetlost). Zatim se u svaku od epica doda 8,5 µL pripremljenog Master Mixa te 1,5 µL cDNA određenog razrjeđenja. U prvu se jažicu, umjesto cDNA, doda 1,5 µL vode što služi kao negativna kontrola, tzv. NTC (eng. *no template control*) te u njoj ne bi trebalo doći do pojave fluorescencije (nema umnažanja jer nema kalupa). U konačnici, pripremljeni uzorci u epicama centrifugiraju se 2 minute pri 500 g te slijedi provođenje reakcije u qPCR uređaju. Uvjeti za provođenje qPCR-a postavljaju se kako slijedi: 2 min na 50 °C (aktivacija enzima), 10 min na 95 °C (početna denaturacija), zatim slijedi 40 ciklusa tijekom kojih se ponavljaju 2 koraka (denaturacija 15 sekundi pri 95 °C te vezanje početnica, elongacija početnica i očitavanje fluorescencije 1 minutu pri 60 °C). Na kraju qPCR-a provodi se i disocijacijski korak koji se sastoji od početne denaturacije 15 sekundi pri 95 °C, zatim sparivanja fragmenata 1 minutu na 45 °C (dolazi do povećanja fluorescencije), nakon čega slijedi postepeno povećanje temperature do 95 °C 15 sekundi tijekom kojeg se lanci razdvajaju (dolazi do smanjenja fluorescencije) te završnih 15 sekundi na 60 °C, pri čemu kao rezultat nastaje disocijacijska krivulja (eng. *melting curve*). Disocijacijska analiza počiva na načelu da svaki umnoženi fragment (amplikon) ima različitu disocijacijsku temperaturu kod koje dolazi do smanjenja fluorescencije uslijed razdvajanja komplementarnih lanaca, ovisnu o veličini amplikona i sastavu baza te se tako, temeljem dobivene disocijacijske krivulje, može zaključiti o broju različitih amplikona u jednoj reakciji ili o prisustvu međusobno hibridiziranih početnica (eng. *primer dimer*). Nakon provedenog qPCR-a, rezultati se prikazuju u obliku grafa ovisnosti Ct-a (ciklus u kojem dolazi do povećanja fluorescencije iznad granične vrijednosti) o koncentraciji cDNA kalupa (log cDNA). Iz nagiba pravca, izračuna se učinkovitost (efikasnost; *E*) amplifikacije prema jednadžbi:

$$E = -1 + 10^{\left(-\frac{1}{\text{nagib pravca}}\right)} \quad [1]$$

Nakon provjere učinkovitosti, slijedi kvantifikacija razine ekspresije ljudskih *SLC47A1* i *SLC47A2* gena, u odnosu na *mate3* gen zebrice u Flp-In-293 stanicama pomoću

qPCR-a. U tu svrhu, koriste se početnice koje se vežu za cDNA navedenih gena, tj. početnice za *SLC47A1.1* (četiri transkript varijante) i *SLC47A2.2* (tri transkript varijante), *mate3* te početnice za *EEF1A1* (eng. *housekeeping* gen). Postupak je isti kao prethodno opisan za određivanje qPCR učinkovitosti. Dakle, za provedbu reakcije potrebno je pripremiti Master Mix koji se sastoji od 1.5 µL cDNA kalupa (c = 10 ng/jažici), 0.5 µL prednje početnice (c = 300 nM), 0.5 µL stražnje početnice (c = 300 nM), 5 µL SYBR Green PCR Master Mix-a te 2.5 µL vode, što čini ukupni volumen reakcije od 10 µL. U ovom slučaju, cDNA kalupe za umnažanje čini šest cDNA dobivenih tijekom tri zasebne izolacije RNA (te kasnije reverzne transkripcije) iz Flp-In-293/Mock, odnosno Flp-In-293/drM3 stanica. Najprije se pripreme 6 µM početnice iz 20 µM radnih stockova, nakon čega slijedi priprema cDNA na način da se 50 ngµL⁻¹ početne otopine cDNA razrijedi 7,5× kako bi se dobila koncentracija od 6,67 ngµL⁻¹, što u ukupnom volumenu od 10 µM daje željenu koncentraciju cDNA kalupa od 10 ng/jažici. Nakon toga, pripremi se Master Mix na prethodno opisan način te se u svaku od epica dodaje 8,5 µL pripremljenog Master Mix-a te 1,5 µL pojedine cDNA pa slijedi provedba reakcije u qPCR uređaju. Uvjeti provođenja qPCR reakcije isti su kao i tijekom određivanja qPCR amplifikacijske učinkovitosti. Tijekom provedbe qPCR-a nastaje amplifikacijska krivulja ovisnosti fluorescentnog signala (y-os) o broju PCR ciklusa (x-os) te se iz nje iščita Ct vrijednost koja je potrebna za određivanje razine ekspresije. Nakon završetka reakcije i obrade rezultata, razina ekspresije ciljnih gena u Flp-In-293/Mock i Flp-In-293/drM3 stanicama izražava se u obliku srednje normalizirane vrijednosti ekspresije, tzv. MNE (eng. *mean normalised expression*), odnosno kao relativna razina ekspresije ciljnih gena (relativna količina mRNA) u odnosu na razinu ekspresije (količinu mRNA) referentnog *EEF1A1 housekeeping* gena. MNE za pojedini gen računa se prema jednadžbi:

$$\overline{MNE} = \frac{E(hkg)^{Ct(hkg)}}{E(targ)^{Ct(targ)}} \times 10^6 \quad [2]$$

pri čemu je, $E(hkg)$ efikasnost umnažanja *EEF1A1 housekeeping* gena (određena u prošlom eksperimentu), $E(targ)$ efikasnost umnažanja ciljnog gena (određena u prošlom eksperimentu), $Ct(hkg)$ srednja vrijednost broja ciklusa u kojem je došlo do povećanja fluorescencije iznad granične vrijednosti za *EEF1A1 housekeeping* gen, a $Ct(targ)$ srednja vrijednost broja ciklusa u kojem je došlo do povećanja fluorescencije iznad granične vrijednosti za ciljni gen.

3.2.6. Mjerenje aktivnosti Mate3 transportnog proteina

Kako bi se odredilo je li pojedini spoj supstrat/inhibitor ili uopće ne ulazi u interakciju sa Mate3 proteinom (drM3), potrebno je ispitati utjecaj tog spoja na transport neke tvari za koju je dokazano da je supstrat, tj. biva transportirana unutar stanice pomoću Mate3 proteina. Kao supstrat, koristi se plava fluorescentna boja DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) zbog toga što se njen transport u stanicu može pratiti u realnom vremenu (eng. *real time*). DAPI ulazi u interakciju sa DNA tako što se veže za AT-bogate regije unutar malih utora dvolančane DNA. Transport DAPI-ja u stanicu moguće je pratiti u realnom vremenu, bez potrebe za lizom stanica, zbog toga što DAPI fluorescira (emitira apsorbirano elektromagnetsko zračenje) tek kada je vezan za dvolančanu DNA, tj. vezanjem postiže 20 puta veću fluorescenciju koja se mjeri pomoću čitača mikrotitarskih ploča (TECAN Infinite M200 PRO) koristeći valne duljine ekscitacije od 360 nm te emisije na 460 nm. Tijekom optimizacije sustava transporta, kao supstrat Mate3 transportnog proteina korištena je, osim DAPI-ja, i ASP+ (4-(4-(dimetilamino)stiril)-N-metilpiridin jodid) fluorescentna boja koja također fluorescira tek ulaskom u stanicu i vezanjem za DNA. Budući da je transportna aktivnost Flp-In-293/drM3 ovisna o pH gradijentu, optimizacija sustava transporta podrazumijeva određivanje optimalne pH vrijednosti transportnog medija (pufera). K_m vrijednost, pri izabranom pH, bitna je za daljnji rad jer je upravo to koncentracija supstrata koja se koristi u daljnjim eksperimentima. Kinetički parametri (V_{max} , K_m) određuju se prilagodbom (fitanjem) krivulje, opisane Michaelis-Menten funkcijom, podacima pomoću GraphPad programa. Michaelis-Menten jednadžba glasi:

$$V = \frac{V_{max} \times [S]}{S + K_m} \quad [3]$$

gdje je V brzina reakcije (transporta) (pikomol supstrata po miligramu proteina po minuti), V_{max} maksimalna brzina reakcije, $[S]$ koncentracija supstrata, a K_m Michaelis-Menten konstanta (koncentracija supstrata kod koje se postiže 50 % V_{max}).

Dakle, prvi korak u određivanju aktivnosti Mate3 transportnog proteina je optimizacija sustava transporta pomoću fluorescentnih boja DAPI i ASP+. U tu svrhu, Flp-In-293/Mock i Flp-In-293/drM3 stanice, uzgajane u DMEM mediju obogaćenom sa 10 % FBS, naciepljene su u mikrotitarske ploče sa 96 jažica (125 μ L suspenzije stanica po jažici) u konačnoj koncentraciji od 6×10^5 stanica/mL. Kako bi znali koliki volumen stanica je potrebno uzeti i razrijediti kako bi dobili željenu konačnu koncentraciju, broj stanica određen je brojanjem u Neubauerovoj komorici pomoću invertnog mikroskopa. Nakon 48 sati od naciepljivanja, stanice su postigle konfluentnost te slijedi provođenje transportnog eksperimenta. Najprije se

pripremi serija razrjeđenja supstrata (DAPI ili ASP+) u rasponu koncentracija od 0,1 do 10 μM . Nakon što se iz jažica izbaci medij u kojem su stanice rasle, doda se 125 μL transportnog pufera čiji sastav ovisi o uvjetima transporta koje želimo postaviti (pH 7,4, pH 8,4 ili unutarstanično zakiseljavanje). Prema tome, transportni pufer sastoji se od 145 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂, 5 mM glukoze te 5 mM Hepes (pH 7,4) / 10 mM Tris (pH 8,4) / 5 mM Hepes + 30 mM NH₄Cl (unutarstanično zakiseljavanje). Nakon transportnog pufera, u jažice se doda 25 μL pripremljenih 6 \times koncentriranih razrjeđenja supstrata kako bi se postigla željena, konačna koncentracija supstrata. Slijedi praćenje brzine transporta fluorescentnog supstrata (DAPI ili ASP+) iz medija u stanice u realnom vremenu (kroz 10 minuta) mjerenjem fluorescencije (360/460 nm za DAPI; 450/590 nm za ASP+) na TECAN-u. Što se tiče unutarstaničnog zakiseljavanja, jedina razlika je ta što se najprije vakuum pumpom izvadi medij iz jažica, doda 100 μL 20 mM amonijevog klorida (NH₄Cl) u kojem se stanice inkubiraju 20 minuta, nakon čega se vakuum pumpom izvadi dodani amonijev klorid te doda 125 μL transportnog pufera pH 7,4. Svi daljnji postupci isti su kao gore navedeni. Pri tome, sva mjerenja provode se u četiri paralele za pojedini transportni sustav i pojedinu koncentraciju supstrata (DAPI ili ASP+). Primjerice, na mikrotitarskoj ploči sa 96 jažica u kojoj su jažice označene vertikalno slovima A-H te horizontalno brojevima 1-12, ukoliko se želi provesti eksperiment sa Flp-In-293/drM3 stanicama pri sva tri pH transportnog medija, u jažicama A-H i 1-4 provodi se transport pri pH 7,4, u jažicama A-H i 5-8 transport pri pH 7,4 uz unutarstanično zakiseljavanje te u jažicama A-H i 9-12 transport pri pH 8,4. Pri tome, u sve jažice A doda se 25 μL supstrata (DAPI ili ASP+) najmanje koncentracije od 0,1 μM (najveće razrjeđenje), u sve jažice B doda se supstrat u koncentraciji od 0,3 μM i tako redom do H jažica u koje se doda 25 μL supstrata najveće koncentracije od 10 μM (najmanje razrjeđenje). Na taj se način transport pri, primjerice, pH 7,4 i koncentraciji supstrata od 0,1 μM provodi u četiri paralele. Uz to, fluorescentni signal prati se na četiri mjesta u jažici kako bi se onemogućio utjecaj različite gustoće stanica u jažici na rezultate te se automatski računa srednja vrijednost mjerenja. U konačnici, tijekom prikaza rezultata pomoću grafova, prikažu se srednje vrijednosti fluorescentnog signala dobivene iz svih ponavljanja i paralela. Nakon mjerenja fluorescencije, stanice se pohrane na -20 °C te služe za određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu. Kako bi se zanemario utjecaj broja stanica u pojedinoj jažici na dobivene rezultate brzine transporta (unos) supstrata u stanice, nakon što se odredi koncentracija proteina u svakoj od jažica, rezultati se izraze kao $\text{pmolmg}^{-1}\text{min}^{-1}$, odnosno pmol supstrata koji se transportira u stanicu po mg proteina u minuti. Flp-In-293/Mock

stanice koriste se kao kontrola zbog toga što nemaju Mate3 transportni protein uklopljen u staničnu membranu, stoga fluorescentna boja može ući u njih jedino procesom pasivne difuzije. Fluorescencija kao posljedica difuzije fluorescentne boje u Mock stanice, ukoliko je prisutna, oduzima se od dobivenih rezultata transporta (fluorescencije) u drM3 stanicama.

Kako bi otkrili spojeve koji su potencijalni supstrati ili inhibitori Mate3 transportnog proteina, prvi korak je utvrđivanje broja veznih mjesta za supstrat u aktivnom mjestu Mate3 proteina. U tu svrhu, koriste se fluorescentne boje DAPI i ASP+ kao supstrati Mate3 proteina pri čemu se prati transport jednog supstrata u prisutnosti drugog (služi kao inhibitor). Pošto znamo da su i DAPI i ASP+ supstrati, ukoliko je njihov odnos tijekom transporta takav da su jedan drugome kompetitivni inhibitori (isti V_{max} , veći K_m), to znači da Mate3 transportni protein ima jedno vezno mjesto za supstrat. Međutim, ukoliko je njihov odnos takav da su jedan drugome nekompetitivni inhibitori (isti K_m , manji V_{max}), to upućuje na postojanje minimalno dva vezna mjesta za supstrat. Za utvrđivanje navedenih odnosa, potrebno je znati IC_{50} vrijednost spoja koji se koristi kao inhibitor (DAPI ili ASP+), odnosno koncentraciju tog spoja pri kojoj se postiže 50 %-tna inhibicija transporta supstrata.

Za određivanje IC_{50} vrijednosti, prati se transport supstrata (u koncentraciji koja odgovara K_m vrijednosti dobivenoj tijekom optimizacije sustava transporta) uz odgovarajući raspon koncentracija inhibitora (0,1 – 100 μM za ASP+; 0,1 - 10 μM za DAPI). Nakon što se iz jažica izbacij medij u kojem su stanice rasle, doda se 100 μL transportnog pufera određenog pH (ovisno koji je supstrat), zatim 25 μL pripremljenih razrjeđenja inhibitora odgovarajućeg raspona koncentracija te, na kraju, 25 μL supstrata. Slijedi praćenje brzine transporta supstrata mjerenjem fluorescencije na fluorimetru. Iz dobivenih rezultata, pomoću GraphPad programa, odredi se IC_{50} vrijednost ASP+-a te DAPI-ja koja je potrebna za daljnji rad, prilagodbom (fitanjem) sigmoidalne doza-odgovor krivulje podacima, prema jednadžbi:

$$V = V_{min} + \frac{V_{max} - V_{min}}{1 + 10^{(\log IC_{50} - A) \times h}} \quad [4]$$

gdje je V odgovor, V_{min} minimalni odgovor, V_{max} maksimalni odgovor, h Hillov koeficijent, IC_{50} koncentracija inhibitora kod koje se postiže 50 %-tna inhibicija transporta i A koncentracija testiranog spoja.

Odlučeno je kako će se u daljnjem radu kao supstrat koristiti DAPI fluorescentna boja. Kako bi se odredio broj veznih mjesta za supstrat u aktivnom mjestu Mate3 proteina, najprije se izbacij uzgojni medija iz jažica te doda 100 μL transportnog pufera odgovarajućeg pH. Nakon što se u jažice doda 25 μL inhibitora (ASP+) u koncentraciji koja odgovara IC_{50} vrijednosti, slijedi dodavanje 25 μL supstrata (DAPI) u odgovarajućem rasponu koncentracija

(0.1 – 10 μM) te mjerenje fluorescencije u TECAN-u. Iz dobivenih rezultata kinetičkih parametara (K_m i V_{max}), zaključuje se koliki je broj veznih mjesta za supstrat u Mate3 transportnom proteinu.

3.2.7. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

Metoda za određivanje ukupne koncentracije staničnih proteina po Bradfordu temelji se na izravnom vezanju boje CBB (eng. *Coomassie Brilliant Blue G-250*) na proteine u kiselom mediju. CBB reagira prvenstveno sa pobočnim grupama arginina, a u manjoj mjeri i sa pobočnim grupama aminokiselina histidina, lizina, tirozina, triptofana i fenilalanina. Slobodna boja CBB u otopini (nevezana za proteine) postoji u kationskom ili neutralnom obliku te kao takva ima apsorpcijski maksimum pri 465 nm (smeđa boja). Vezanjem za proteine hidrofobnim i ionskim interakcijama, boja CBB prelazi u plavi anionski oblik te se maksimum apsorpcije pomiče na 595 nm. Dakle, određivanje koncentracije proteina provodi se spektrofotometrijskim određivanjem količine plave boje u anionskom obliku, mjerenjem apsorpcije pri valnoj duljini od 595 nm. Nakon što se izmjeri apsorpcija, nepoznate koncentracije proteina u uzorcima očitavaju se iz kalibracijskog pravca dobivenog mjerenjem apsorpcije niza razrijeđenja otopine standarda tj. proteina albumina iz goveđeg seruma (BSA) te izražavaju kao mg proteina u mL citosola. Kako bi se povećalo područje linearnosti pravca, pri računanju se uzima u obzir omjer apsorpcija izmjerenih pri 595 nm (boja vezana za proteine) te 450 nm (slobodna, nevezana boja) tj. 595/450 nm, čime se višestruko povećava osjetljivost metode.

Samo izvođenje metode prilično je jednostavno. Najprije se napravi serija razrijeđenja BSA standarda (0 - 10 mg mL^{-1}), a zatim se 20 μL razrijeđenja pomiješa sa 200 μL Bradford reagensa (pripremljena otopina CBB). Slijedi inkubacija 3 minute te mjerenje apsorpcije na 595 nm te 450 nm. Isti postupak ponovi se i prilikom određivanja koncentracije proteina u uzorcima stanica, pri čemu se 20 μL uzorka stanica pomiješa sa 200 μL Bradford reagensa, inkubira 3 minute te se mjeri apsorpcija pri istim valnim duljinama (595 i 450 nm). Na kraju se napravi kalibracijska krivulja ovisnosti apsorpcije o koncentraciji BSA standarda, iz koje se može odrediti, na temelju izmjerene apsorpcije, nepoznata koncentracija proteina u uzorcima stanica.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Kako bi se razvio sustav za ispitivanje interakcija Mate3 proteina zebrice s okolišnim tvarima, što je svrha ovog rada, prvi i osnovni preduvjet je razvoj stabilnog sustava koji će omogućiti nesmetano provođenje eksperimenata tijekom duljeg vremenskog perioda. Pomoću Flp-In rekombinantnog sustava, razvijena je stabilna Flp-In-293/drM3 stanična linija, odnosno stanična linija embrionalnih humanih stanica bubrega, koja konstitutivno eksprimira gen koji kodira za Mate3 transportni protein zebrice. Osim toga, istom metodom, razvijena je i Flp-In-293/Mock stanična linija koja se razlikuje od Flp-In-293/drM3 stanica utoliko što ne sadrži gen koji kodira za Mate3 transportni protein te tako služi kao negativna kontrola tijekom provođenja transportnog eksperimenta.

Transportni eksperiment, odnosno mjerenje aktivnosti Mate3 proteina, podrazumijeva praćenje transporta tvari, za koju se zna da je supstrat Mate3 proteina (fluorescentne boje DAPI i ASP+), u realnom vremenu mjerenjem promjene intenziteta fluorescencije do koje dolazi uslijed transporta supstrata u stanicu i vezanja za DNA. Pošto se smatra da je transport supstrata kroz staničnu membranu putem Mate3 proteina ovisan o pH gradijentu, kako je dokazano na drugim MATE proteinima, transport supstrata prati se pri tri različita reakcijska uvjeta, odnosno pri tri različite pH vrijednosti transportnog medija te se usporedbom kinetičkih parametara (K_m i V_{max}) izabiru optimalne pH vrijednosti medija za odvijanje transporta. Osim toga, usporedbom kinetičkih parametara transporta jednog supstrata u prisustvu drugog, dolazi se do spoznaja o broju veznih mjesta Mate3 proteina za supstrat.

Ovdje se pojavljuje očigledno pitanje, a to je koju svrhu ima transportni eksperiment u razvoju sustava za ispitivanje interakcija Mate3 proteina sa okolišnim tvarima. Naime, kako bi se utvrdilo ulazi li pojedini spoj u interakciju s Mate3 proteinom i ukoliko da, djeluje li taj spoj kao inhibitor ili kao supstrat Mate3 proteina, indirektno se prati učinak tog spoja na promjenu kinetičkih parametara transporta supstrata (DAPI ili ASP+) putem Mate3 proteina. Zbog toga je potrebno razviti stabilan i pouzdan sustav transporta koji će služiti za ispitivanje interakcija različitih spojeva s Mate3 proteinom, pri čemu će dobiveni rezultati biti međusobno usporedivi. Tu se dolazi do iznimne važnosti Flp-In-293/Mock stanične linije kao negativne kontrole, koja služi za razlikovanje specifičnog transporta supstrata u stanicu putem Mate3 proteina od pasivne difuzije supstrata kroz staničnu membranu. Pri tome se vrijednosti transporta dobivene u Flp-In-293/Mock stanicama koje nemaju Mate3 protein uklopljen u

staničnu membranu oduzimaju od vrijednosti transporta dobivenih u Flp-In-293/drM3 stanicama čime se postiže da dobiveni rezultati prikazuju isključivo specifičan transport.

No, kako bi se moglo sa sigurnošću tvrditi da je transport u Flp-In-293/drM3 stanicama posredovan isključivo Mate3 transportnim proteinom, a u Flp-In-293/Mock stanicama isključivo pasivnom difuzijom, potrebno je potvrditi uspješnost transfekcije i proizvodnje stabilnih staničnih linija; jedne koja prekomjerno eksprimira *mate3* gen i druge koja ga uopće ne posjeduje u genomu. Uz to, kako proizvedene stanične linije potječu od humanih stanica bubrega u kojima se prirodno nalaze humani MATE transporteri (pretežito MATE1 i MATE2-K), potrebno je isključiti utjecaj ostalih transportera prisutnih u membrani Flp-In-293 stanica na transport supstrata. Provjera uspješnosti stabilne transfekcije Flp-In-293 stanica provodi se pomoću kvantitativnog PCR-a kojim se utvrđuje razina transkripcije prekomjerno ekspimiranog *mate3* gena koji kodira za Mate3 protein zebriće, *SLC47A1* gena koji kodira za humani MATE1 transportni protein te *SLC47A2* gena koji kodira za humani MATE2 transportni protein. U svrhu provedbe kvantitativnog PCR-a, najprije je izolirana ukupna stanična RNA reverznom transkripcijom prevedena u cDNA koja zatim služi kao kalup PCR reakcije. Svrha tradicionalnog PCR-a je provjera specifičnosti dizajniranih početnica, odnosno provjera vežu li se početnice na željenu, specifičnu, sekvencu gena čiju razinu transkripcije želimo utvrditi. Nakon provjere specifičnosti početnica, kvantitativnim PCR-om najprije se provjerava efikasnost početnica i, u konačnici, razina transkripcije željenih gena. Konačna potvrda specifičnog transporta posredovanog Mate3 proteinom u Flp-In-293/drM3 stanicama, odnosno pasivne difuzije supstrata, ukoliko je prisutna, u Flp-In-293/Mock stanicama, postiže se praćenjem transporta fluorescentnih supstrata (DAPI i ASP+) te uspoređivanjem dobivenih rezultata sa rezultatima kvantitativnog PCR-a.

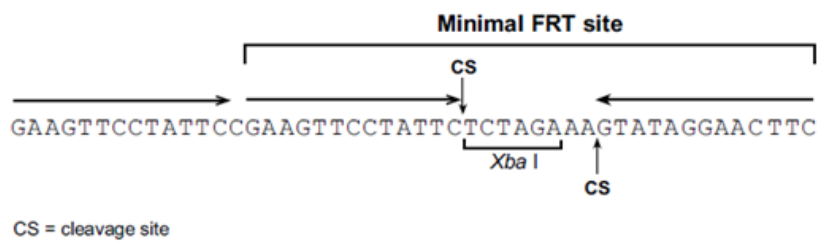
4.1. PROIZVODNJA STANIČNE LINIJE SA STABILNO I PREKOMJERNO EKSPRIMIRANIM MATE3 TRANSPORTNIM PROTEINOM ZEBRICE

Stabilna Flp-In-293 stanična linija, koja konstitutivno eksprimira gen koji kodira za Mate3 transportni protein (Flp-In-293/drM3), razvijena je pomoću Flp-In sustava koji se temelji na mjesno-specifičnoj (FRT mjesto) homolognoj rekombinaciji kataliziranoj pomoću enzima Flp rekombinaze. Neke od prednosti Flp-In sustava su te što, jednom kada se uspostavi stabilna stanična linija sa integriranim FRT mjestom, rast i razvoj narednih generacija Flp-In stanica koje ekspimiraju gen od interesa je brz i učinkovit. Također, sustav omogućava proizvodnju izogene stabilne stanične linije (isti genotip).

Najvažniji djelovi sustava su pFRT/lacZeo plazmid koji sadrži FRT mjesto uzvodno od fuzioniranih gena za β -galaktozidazu i rezistenciju na antibiotik Zeocin pod SV40 (simian virus 40) promotorom, a služi za uvođenje FRT mjesta u genom stanica domaćina, zatim pOG44 plazmid koji sadrži gen za Flp rekombinazu te pcDNA5/FRT ekspresijski plazmid koji sadrži FRT mjesto i gen od interesa (*mate3* gen). U ovom radu, korištene su komercijalno dostupne Flp-In-293 stanice, tj. HEK293T stanice u čiji je genom transfekcijom sa pFRT/lacZeo plazmidom već uvedeno FRT mjesto. Proizvedena stanična linija sadrži samo jedno FRT mjesto integrirano u genom (potvrđeno Southern blot analizom) te treba biti održavana u mediju koji sadrži antibiotik Zeocin, zbog toga što sadrži pFRT/lacZeo gen koji, osim ekspresije β -galaktozidaze, eksprimira i gen za rezistenciju na Zeocin.

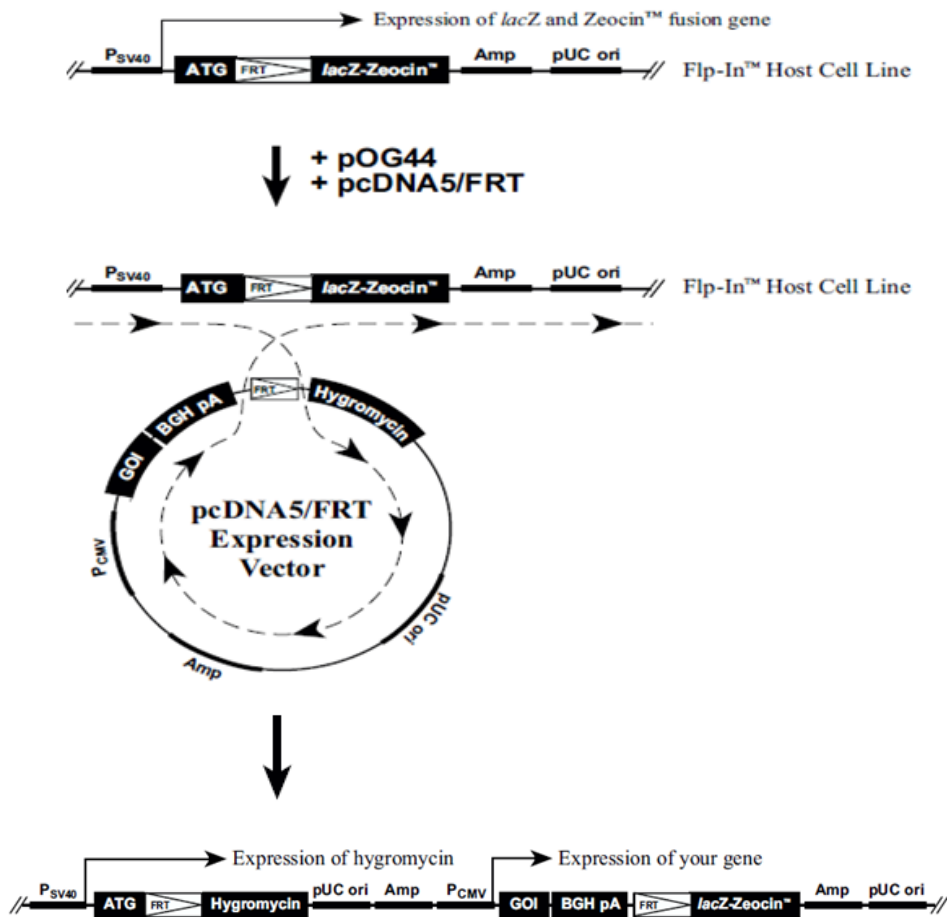
Flp-In-293/drM3 stanice kotransfecirane su u omjeru 9:1 sa pOG44 plazmidom koji nosi gen za Flp rekombinazu pod transkripcijskom kontrolom jakog citomegalovirus (CMV) promotora te pcDNA5/FRT ekspresijskim plazmidom koji sadrži *mate3* gen od interesa također pod kontrolom CMV promotora i FRT mjesto. Za razliku od native Flp rekombinaze, izolirane iz *S.cerevisiae*, FLP gen na pOG44 plazmidu, kodira temperaturno osjetljivu Flp rekombinazu (relativno niska aktivnost pri 37 °C), koja nosi točkastu mutaciju supstitucije aminokiseline fenilalanina sa leucinom na poziciji 70 od N'-terminalnog kraja proteina. Studije su pokazale da Flp rekombinaza ekspimirana sa pOG44 plazmida posjeduje tek 10 % aktivnosti native Flp rekombinaze iz *S.cerevisiae* pri 37 °C. Kako je ispravna integracija pcDNA5/FRT konstrukta u genom Flp-In-293 stanica ovisna o Flp rekombinazi, razina njene ekspresije u stanici određuje učinkovitost rekombinacije. Razina ekspresije Flp rekombinaze mora biti dovoljno visoka da katalizira homolognu rekombinaciju između genomske DNA i pcDNA5/FRT DNA na FRT mjestima (jedan rekombinacijski događaj) te da nadoknadi prethodno spomenutu nisku razinu aktivnost enzima, zbog čega je preporučena kotransfekcija Flp-In-293 stanica u omjeru 9:1 (pOG44:pcDNA5/FRT ekspresijski plazmid). No, nije poželjna previsoka razina ekspresije Flp rekombinaze kako ne bi došlo do neželjenih rekombinacijskih događaja. Jednom kada je pcDNA5/FRT konstrukt integriran u genom, aktivnost Flp rekombinaze više nije potrebna stanici. Štoviše, kontinuirana prisutnost Flp rekombinaze mogla bi uzrokovati izrezivanje pcDNA5/FRT konstrukta iz genoma Flp-In-293 stanica uslijed rekombinacijskog događaja između dva istosmjerna ponavljanja FRT sekvence, što bi bilo presudno za stanice. Zbog toga pOG44 plazmid ne sadrži selekcijski marker za antibiotsku rezistenciju, kako bi se tijekom vremena izgubio iz transfeciranih stanica kako one bivaju uzgajane i selektirane u higromicinu.

Mjesto vezanja Flp rekombinaze i cijepanja DNA, tzv. FRT mjesto, uklopljeno je u 5' kodirajuću regiju gena za rezistenciju na antibiotik higromicin u pcDNA5/FRT plazmidu, pri čemu mu nedostaju promotor i ATG start kodon (inicijacijski kodon translacije). Kako je prikazano na slici 5, minimalno FRT mjesto sastoji se od sekvence duge 34 pb koja sadrži 13 pb obrnutih ponavljanja, za koje se veže Flp rekombinaza, razdvojenih sekvencom dugom 8 pb koja sadrži *Xba* I restrikcijsko mjesto te predstavlja mjesto cijepanja DNA. Većina FRT mjesta sadrži i dodatnu 13 pb dugu sekvencu (ponavljanje), no ona nije presudna za cijepanje.



Slika 5. FRT mjesto vezanja Flp rekombinaze i cijepanja DNA; CS (eng. *cleavage site*) = mjesto cijepanja (Flp-In System manual, Thermo Fisher Scientific).

Tijekom kotransfekcije, Flp rekombinaza posreduje u intermolekularnoj homolognoj rekombinaciji između dva FRT mjesta (jedno integrirano u genom Flp-In-293 stanične linije, a drugo u pcDNA5/FRT plazmid) tako da pcDNA5/FRT konstrukt biva insertiran u genom na FRT mjestu. Takva rekombinacija je konzervirana, ne zahtjeva DNA sintezu, FRT mjesta su očuvana nakon rekombinacije te je šansa za uvođenje mutacija tijekom procesa minimalna. Insercija pcDNA5/FRT plazmida u genom dovodi SV40 promotor i ATG start kodon (iz pFRT/lacZeo plazmida) u neposrednu blizinu gena za rezistenciju na higromicin te ga tako aktivira, dok istodobno inaktivira ekspresiju lacZ-Zeocin fuzijskog gena. Stoga, stabilna Flp-In-293/drM3 stanična linija, dobivena pomoću Flp-In sustava, u konačnici je rezistentna na antibiotik higromicin, osjetljiva na antibiotik Zeocin, nema β -galaktozidaznu aktivnost te prekomjerno eksprimira rekombinantni gen od interesa (*mate3*) (Slika 6). Kako je već pethodno objašnjeno, Flp-In-293/Mock stanična linija identična je Flp-In-293/drM3 staničnoj liniji, s tom razlikom što je kotransfecirana sa pOG44 plazmidom i pcDNA5/FRT ekspresijskim plazmidom koji ne sadrži *mate3* gen (tzv. „prazni“ plazmid). Nakon što dobijemo Flp-In-293/drM3 i Flp-In-293/Mock staničnu liniju, one se dalje kontinuirano uzgajaju i precijepljuju kako stanice prerastaju podlogu (pasaža stanica).



Slika 6. Shematski prikaz intermolekulske homologne rekombinacije između dva FRT mjesta posredovane Flp rekombinazom (Flp-In System manual, Thermo Fisher Scientific).

4.2. IZOLACIJA RNA TRIZOL METODOM TE ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE I INTEGRITETA RNA

Prvi korak u određivanju razine ekspresije *SLC47A1*, *SLC47A2* te *mate3* gena u Flp-In-293 (drM3 i Mock) stanicama je izolacija ukupne stanične RNA. Ukupna stanična RNA iz Flp-In-293/drM3 i Flp-In-293/Mock stanica izolirana je TRIzol (fenol i gvanidin izotiocijanat) metodom koja istovremeno omogućava razgradnju biološkog materijala (staničnih komponenata), denaturaciju proteina djelovanjem kaotropnog agensa gvanidin izotiocijanata i, u konačnici, odvajanje (izolaciju) RNA od DNA, proteina te ostalih staničnih komponenata. Odvajanje RNA od DNA omogućeno je uslijed niskog pH (pH 4 - 5) postavljenog pomoću kiselog fenola tako što negativno nabijene fosfatne skupine dvolančane DNA bivaju neutralizirane protonacijom u kiselom okruženju te tako DNA postaje topljiva u organskoj fazi. S druge strane, do neutralizacije negativno nabijene RNA ne dolazi zbog toga

što izložene dušikove baze jednolančane RNA tvore vodikove veze sa vodom, tako ju držeći u vodenoj fazi. Provedene su tri odvojene izolacije RNA, pri čemu je prilikom svake izolacije, RNA izolirana iz jedne Flp-In-293/drM3 pasaže stanica i jedne Flp-In-293/Mock pasaže stanica.

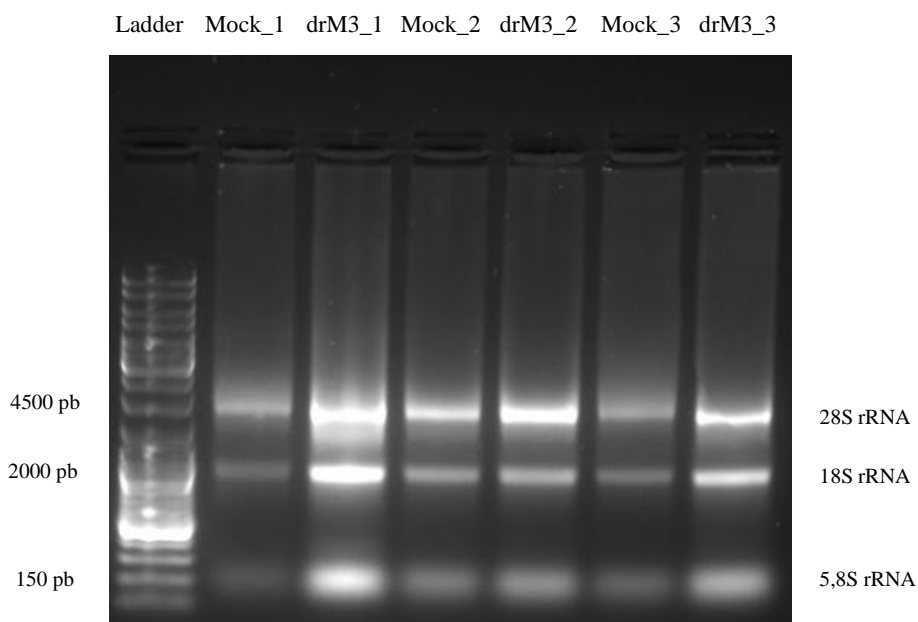
Nakon izolacije, uslijedilo je spektrofotometrijsko određivanje koncentracije i čistoće izolirane ukupne stanične RNA pomoću NanoDrop-a. Koncentracija RNA određena je mjerenjem apsorbancije pri 260 nm (apsorbancija aromatskih dušikovih baza). Čistoća izolirane RNA definirana je omjerom apsorbancija valnih duljina 260 / 280 nm te 260 / 230 nm. Omjer A_{260} / A_{280} trebao bi biti veći od 1,9 kako bi se uzorak RNA smatrao čistim. Ukoliko je navedeni omjer manji od 1,9, to ukazuje na kontaminaciju uzorka RNA proteinima (aromatske aminokiseline apsorbiraju svjetlost valne duljine 280 nm) ili reagensima koji apsorbiraju svjetlost valne duljine 280 nm. S druge strane, omjer A_{260} / A_{230} trebao bi biti veći od 1,7 kako bi se RNA uzorak smatrao čistim od kontaminanata koji apsorbiraju pri 230 nm, kao što su kaotropne soli (gvanidin izotiocijanat) te fenol koji su sastavni dio TRIzol reagensa korištenog za izolaciju RNA. Stanice korištene za izolaciju RNA, izmjerene koncentracije i omjeri apsorbancija koji ukazuju na čistoću uzoraka, prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Prikaz rezultata spektrofotometrijskog određivanja koncentracije (c RNA; $\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$) i čistoće (omjeri apsorbancija A_{260} / A_{280} i A_{260} / A_{230}) izolirane RNA iz Flp-In-293/drM3 i Flp-In-293/Mock uzgojenih stanica, pomoću NanoDrop-a ($n = 3$).

	Prva izolacija		Druga izolacija		Treća izolacija	
	Flp-In-293/Mock	Flp-In-293/drM3	Flp-In-293/Mock	Flp-In-293/drM3	Flp-In-293/Mock	Flp-In-293/drM3
c (RNA) ($\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$)	951,56	1357,29	1130,88	1112,92	1590,47	1716,39
A_{260} / A_{280}	1,99	2,02	2,01	2,02	2,06	2,05
A_{260} / A_{230}	1,53	1,60	1,53	1,75	1,82	1,79

Integritet izolirane stanične RNA provjerava se gel elektroforezom tijekom koje se RNA molekule razdvajaju na gelu temeljem svoje veličine (dužine), pri čemu veće RNA molekule sporije migriraju kroz gel. U stanicama koje se aktivno dijele, oko 80 % ukupne stanične RNA čini ribosomalna RNA (rRNA), 15 % transportna RNA (tRNA), a tek mali dio glasnica RNA (mRNA). Eukariotska ribosomalna RNA (80S) dijeli se na 5S, 5,8S i 28S

rRNA koje tvore veliku 60S podjedinicu ribosoma te 18S rRNA koja je sastavni dio male 40S podjedinice ribosoma. Zbog velike razlike u udjelu pojedinih RNA u stanici, jasno je kako su tijekom provjere integriteta izolirane RNA na agaroznom gelu, vidljive jedino rRNA vrpce. Ukoliko su na gelu prisutne dvije oštre vrpce jedna iznad druge, koje odgovaraju 28S rRNA (oko 4500 pb), odnosno 18S rRNA (oko 2000 pb), te oštra vrpca pri dnu koja odgovara 5,8S rRNA (oko 150 pb), može se zaključiti kako je integritet RNA uzorka očuvan, dok vrpce tj. „razmaz“ (eng. *smear*) iznad njih ukazuje na kontaminaciju genomskom DNA, a *smear* ispod njih ukazuje na raspad RNA uzorka. Provjera integriteta izoliranih RNA prikazana je na slici 7. Jasno se vide oštre 28S, 18S i 5,8S vrpce, nema vrpce sa *smear*-om iznad 28S i 18S rRNA vrpce niti *smear*-a ispod njih, na temelju čega zaključujemo da je integritet RNA očuvan.



Slika 7. Provjera integriteta RNA (Flp-In-293/drM3 i Flp-In-293/Mock ukupne stanične RNA dobivene tijekom tri odvojene izolacije) na 1,5 %-tnom agaroznom gelu; *ladder* = standardi DNA poznate molekulske mase koji služe za procjenu veličine molekula koje putuju kroz gel.

4.3. REVERZNA TRANSKRIPCija, DIZAJN POČETNICA I PCR

Geni čiju razinu transkripcije u Flp-In-293 (Mock i drM3) stanicama želimo provjeriti pomoću PCR-a (i kasnije qPCR-a) su *SLC47A1* koji kodira za humani MATE1 transportni protein (eng. *multidrug and toxin extrusion protein 1*), *SLC47A2* koji kodira za humani MATE2 transportni protein (eng. *multidrug and toxin extrusion protein 2*) te prekomjerno eksprimiran *mate3* koji kodira za zebričin Mate3 transportni protein. Geni *SLC47A1* i

SLC47A2 koji kodiraju za MATE1, odnosno MATE2 transportne proteine visoko su eksprimirani u humanim stanicama bubrega, kojima pripadaju HEK293T stanice, posebice u stanicama proksimalnih tubula te se zbog toga ispituje njihova razina ekspresije, u odnosu na razinu ekspresije prekomjerno eksprimiranog *Mate3* proteina. U tu svrhu, najprije je prethodno izolirana ukupna stanična RNA, procesom reverzne transkripcije, prevedena u komplementarnu DNA (cDNA) koja zatim služi kao DNA kalup tijekom PCR reakcije. Komplementarna DNA (cDNA), za razliku od genomske DNA (gDNA) ne sadrži introne niti bilo koje druge nekodirajuće dijelove DNA.

Odabir početnica za provođenje PCR reakcije kritičan je korak koji znatno utječe na kvalitetu i pouzdanost dobivenih rezultata. Početnice za umnažanje *SLC47A1*, *SLC47A2* i *mate3* gena, odnosno njihovih cDNA kao kalupa dobivenih reverznom transkripcijom, dizajnirane su pomoću alata Primer-BLAST, pri čemu je odabir temeljen na najvažnijim kriterijima koje početnice moraju zadovoljiti za dobivanje optimalnih rezultata. Jedan od tih kriterija je duljina PCR produkta (amplikona) koji nastaje, pri čemu je optimalna duljina 70-200 pb. Termostabilna Taq polimeraza koja se koristi tijekom PCR-a ne posjeduje tzv. *proofreading* aktivnost stoga je znatno manja vjernost replikacije dugačkih amplikona, dok se pretjeranim smanjenjem duljine amplikona smanjuje i specifičnost umnažanja željene sekvence DNA. Nadalje, jedan od najbitnijih kriterija je duljina početnica koja bi idealno trebala iznositi 18-22 pb. Početnice trebaju biti dovoljno dugačke kako bi se postigla veća specifičnost vezanja za cDNA kalup, no ne predugačke jer se porastom duljine povećava i temperatura taljenja (T_m) te posljedično temperatura potrebna za vezanje početnica za DNA kalup (T_a). Temperatura taljenja (optimalna temperatura iznosi 52 - 58 °C) predstavlja temperaturu pri kojoj su početnice vezane za DNA kalup u ravnoteži sa slobodnim (nevezanim) početnicama u PCR smjesi, odnosno pri kojoj je 50 % početnica vezano za kalup. Temperatura taljenja ovisi o duljini i sastavu početnica, odnosno o stabilnosti interakcija između DNA i početnica. Temperature iznad 65 °C uzrokuju brže odvajanje početnica od kalupa, pri čemu se Taq polimeraza ne stigne vezati za početnice i stabilizirati ih te započeti elongaciju lanca, pa tako može doći do sekundarnog *annealing*-a slobodnih početnica. Temperatura taljenja najvažnija je u određivanju temperature vezanja početnica za kalup, tj. temperature *annealing*-a. Što je temperatura *annealing*-a veća, to je veća specifičnost vezanja početnica za ciljnu sekvencu, no vezanje se odvija rijetko. Na taj način, dobije se čisti produkt, ali je potrebno povećati broj ciklusa PCR-a kako bi se dobio željeni broj umnoženih fragmenata. Sve navedene karakteristike ponajviše ovise o GC sastavu

početnica (udio nukleotida gvanina i citozina), pri čemu optimalni GC sastav iznosi 40 - 60 %. Naime, GC nukleotidi međusobno su povezani sa tri vodikove veze, dok su AT nukleotidi povezani sa dvije vodikove veze, što čini vezu između gvanina i citozina jačom i stabilnijom. Zbog toga, početnice koje sadrže veći GC sastav, stabilnije i sa većom specifičnošću hibridiziraju sa DNA kalupom čime je omogućeno korištenje veće T_a i T_m tijekom provođenja PCR reakcije.

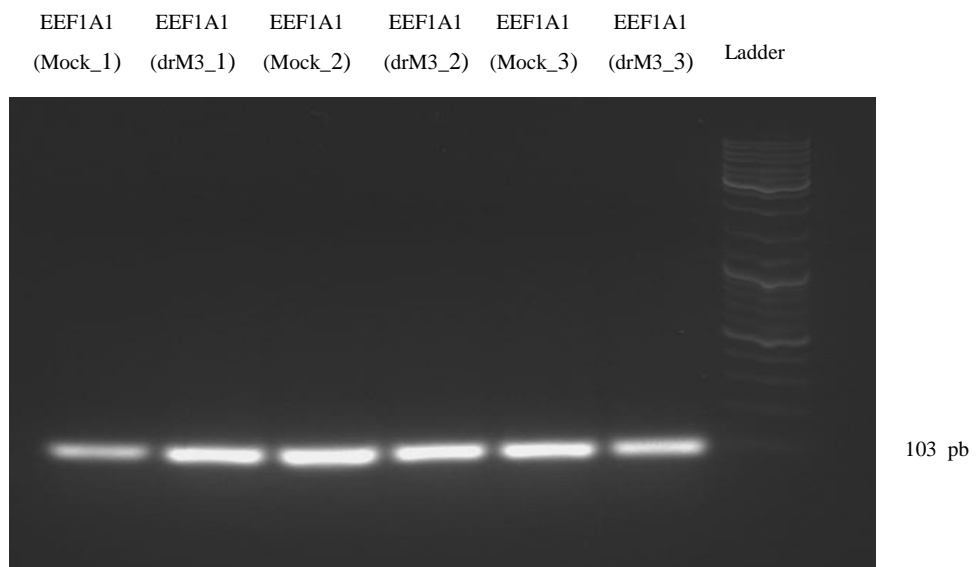
Pretraga početnica pomoću alata PRIMER-Blast objašnjena je u dijelu rada Metode. Pri tome, pretraga se vršila za humane MATE gene, *SLC47A1* i *SLC47A2*, dok su početnice za umnažanje *mate3* gena već bile dostupne u laboratoriju, pri čemu je dokazana njihova specifičnost vezanja za *mate3* cDNA. Na temelju dobivenih rezultata pretrage, izaberu se oni parovi početnica (prednje i stražnje) koji imaju optimalne vrijednosti T_m i % GC, što manju vrijednost međusobne komplementarnosti te koji se vežu za odgovarajuće regije na cDNA kalupu. Alternativnim procesiranjem *SLC47A2* mRNA nastaju četiri transkript varijante koje se transliraju u četiri izoforme proteina MATE2 (MATE2, MATE2-K, MATE2-B i MATE2_tv4) te su sve četiri homologne samo u regiji od 1. do 530. nukleotida, stoga je odabran jedan par početnica (nazvan *SLC47A2.1*) koji se veže za cDNA kalup upravo u toj regiji, čime se PCR-om umnožavaju sve četiri transkript varijante (ukoliko su prisutne u stanici) te drugi par početnica (nazvan *SLC47A2.2*) koji obuhvaća sve transkript varijante, osim MATE2-B. Parovi početnica odabrani za provedbu PCR-a i umnažanje željenih gena (cDNA) prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Odabrani parovi početnica za umnažanje cDNA od interesa (*SLC47A1*, *SLC47A2*, *mate3*) u svrhu provedbe PCR-a i/ili qPCR-a; tv= transkript varijanta.

Geni	Prednja početnica	Stražnja početnica
<i>SLC47A1</i>	5'CTTGGGGTGATAGGCTCTGC3'	5'CCCATGTAGCTTGATGCAGT3'
<i>SLC47A2.1-4 tv</i>	5'CTCCTCTGCTGCCTCCCTT3'	5'CTGGGTCAACCTGGACACG3'
<i>SLC47A2.2-3 tv</i>	5'TGAGGCCATCTGTTGTGTCT3'	5'CCAGTGGTAGGCCGATGATG3'
<i>mate3</i>	5'TCGGATGTACCAAAGATGT3'	5'CGGTAATGCCCGCTATGG3'

Svrha tradicionalnog PCR-a je provjera specifičnosti odabranih početnica, odnosno provjera vežu li se početnice na željenu, specifičnu, sekvencu cDNA kalupa. Kako je

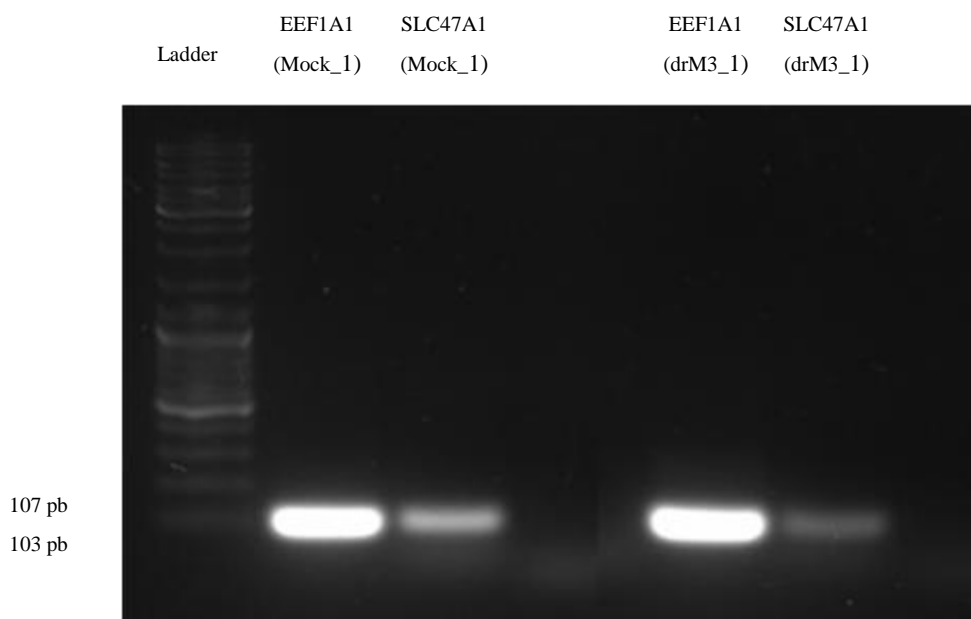
specifičnost mate3 početnica već provjerena, ona se neće provjeravati u ovom koraku. Prvi korak PCR-a je konačna provjera integriteta cDNA kalupa, odnosno prvotno izolirane RNA te provjera ispravnosti provođenja PCR reakcije i gel elektroforeze. U tu svrhu, kao pozitivna kontrola, korištene su početnice za umnažanje *EEF1A1 housekeeping* gena koji kodira za humani EF1- α (eng. *elongation factor 1-alpha 1*) protein koji pomoću hidrolize GTP-a katalizira vezanje za ribosom i translokaciju transportne RNA (tRNA) tijekom translacije zbog čega je konstitutivno eksprimiran u svim stanicama. Ukoliko je očuvan integritet cDNA, a PCR i gel elektroforeza su provedeni pri optimalnim uvjetima, razina transkripcije *housekeeping* gena u svim ispitivanim uzorcima trebala bi biti ista (slika 8).



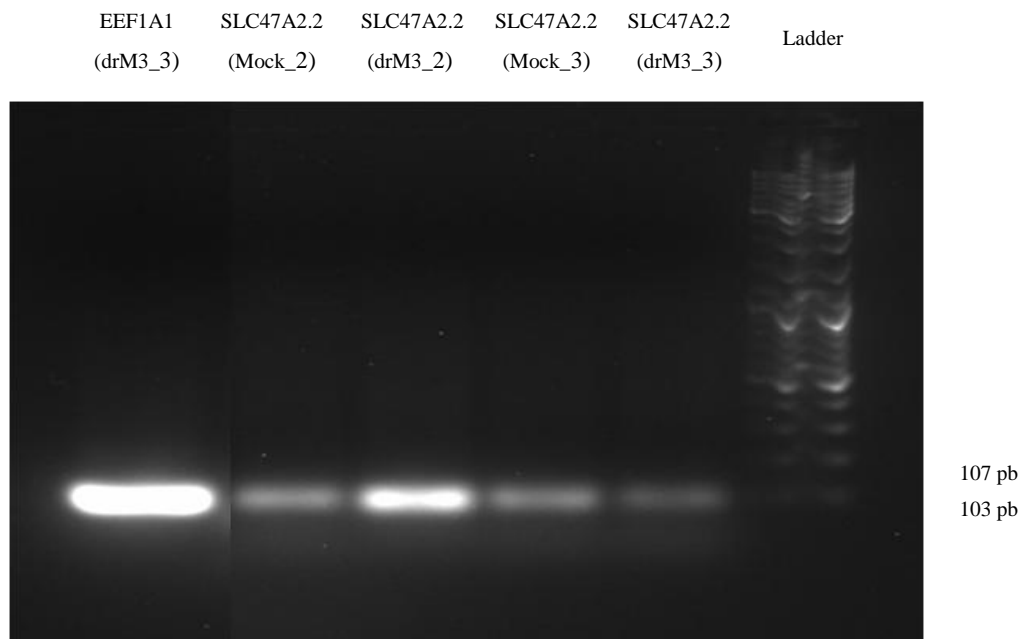
Slika 8. Provjera razine transkripcije *EEF1A1 housekeeping* gena u cDNA uzorcima nakon PCR-a na 1,5 %-tnom agaroznom gelu pri 80 V. Korišteni su cDNA kalupi dobiveni izolacijom i reverznom transkripcijom RNA iz Flp-In-293/drM3 stanica (drM3_izolacija 1, 2 i 3) i Flp-In-293/Mock stanica (Mock_izolacija 1, 2 i 3); *ladder* = standardi DNA poznate molekulske mase koji služe za procjenu veličine molekula koje putuju kroz gel.

Nakon provjere integriteta cDNA kalupa, pomoću PCR-a, određena je specifičnost odabranih početnica (*SLC47A1*) koje se vežu za cDNA *SLC47A1* gena koji kodira za humani MATE1 protein, pri čemu je kao pozitivna kontrola korišten *EEF1A1 housekeeping* gen. Rezultati prikazani na slici 9 pokazuju, očekivanu, visoku razinu transkripcije konstitutivno eksprimiranog *EEF1A1* gena (duljina amplikona iznosi 103 pb) te nižu razinu transkripcije

SLC47A1 gena (duljina amplikona iznosi 107 pb). Nadalje, provjerena je specifičnost početnica koje se vežu za cDNA *SLC47A2* gena koji kodira za četiri varijante humanog MATE2 proteina, pri čemu se ovaj par početnica (*SLC47A2.2*) veže za tri transkript varijante nastale alternativnim procesiranjem primarnog transkripta *SLC47A2* gena (ne veže se za MATE2-B transkript varijantu). Izuzimanje MATE2-B transkript varijante ne predstavlja značajan problem zbog toga što je u brojnim radovima dokazano kako je razina ekspresija MATE2-B u bubrezima veoma niska. Dobiveni rezultati pokazali su visoku razinu transkripcije *EEF1A1 housekeeping* gena (duljina amplikona iznosi 103 pb) te nižu razinu transkripcije *SLC47A2* gena (duljina amplikona iznosi 107 pb), što je u skladu s očekivanjima (slika 10). Pri tome, dobivena veća razina transkripcije *SLC47A2* gena u drM3_izolaciji 2 pripisuje se grešci prilikom dodavanja cDNA kalupa u PCR reakcijsku smjesu. Dakle, iz dobivenih rezultata zaključujemo da se *SLC47A1* i *SLC47A2.2* početnice specifično vežu za ciljne cDNA sekvence.

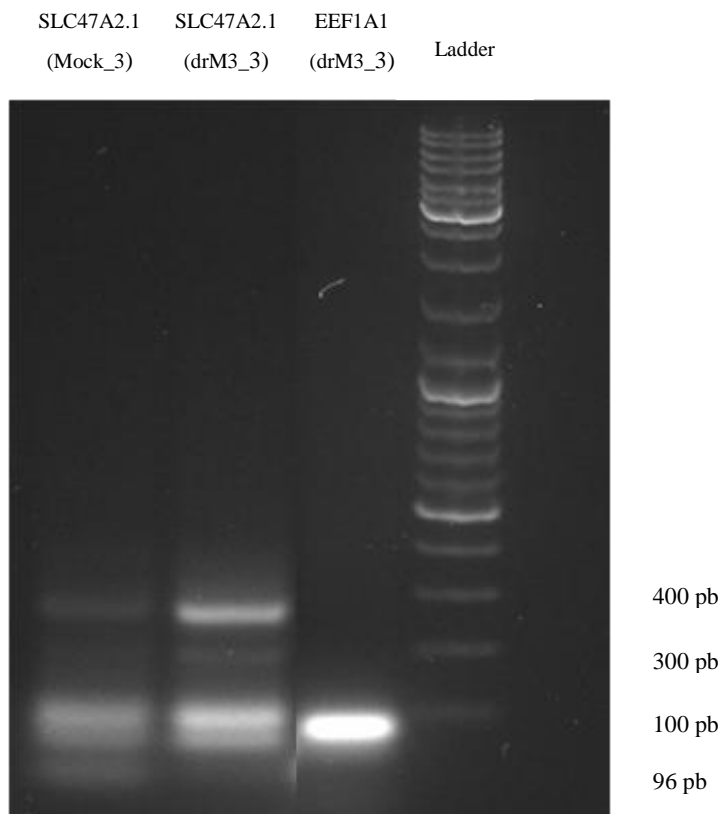


Slika 9. Provjera razine transkripcije *SLC47A1* gena (uz *EEF1A1* kao kontrolu) u cDNA uzorcima nakon PCR-a na 1,5 %-tnom agaroznom gelu pri 80 V. Korišteni su cDNA kalupi dobiveni izolacijom i reverznom transkripcijom RNA iz Flp-In-293/drM3 stanica (drM3_izolacija 1) i Flp-In-293/Mock stanica (Mock_izolacija 1); *ladder* = standardi DNA poznate molekulske mase koji služe za procjenu veličine molekula koje putuju kroz gel.



Slika 10. Provjera razine transkripcije *SLC47A2* gena (uz *EEF1A1* kao kontrolu) sa početnicama koje obuhvaćaju tri od četiri transkript varijante *SLC47A2* gena (*SLC47A2.2*) u cDNA uzorcima nakon PCR-a na 1,5 %-tnom agaroznom gelu pri 80 V. Korišteni su cDNA kalupi dobiveni izolacijom i reverznom transkripcijom RNA iz Flp-In-293/drM3 stanica (drM3_izolacija 2 i 3) i Flp-In-293/Mock stanica (Mock_izolacija 2 i 3); *ladder* = standardi DNA poznate molekulske mase koji služe za procjenu veličine molekula koje putuju kroz gel.

Naposljetku, provedena je PCR reakcija sa početnicama koje se vežu za cDNA *SLC47A2* gena, uz *EEF1A1* gen kao pozitivnu kontrolu, pri čemu se ovaj par početnica (*SLC47A2.1*) veže za sve četiri transkript varijante nastale alternativnim procesiranjem primarnog transkripta *SLC47A2* gena (*MATE2*, *MATE2-K*, *MATE2-B* i *MATE2_tv4*). Očekivana je visoka razina transkripcije *EEF1A1* gena (duljina amplikona iznosi 103 pb) te niža razina transkripcije *SLC47A2* gena (duljina amplikona iznosi 96 pb). No, iz dobivenih rezultata prikazanih na slici 11, vidljivo je više vrpce (eng. *band*-ova) različitih duljina, što ukazuje na moguće nespecifično vezanje početnica koje obuhvaćaju sve četiri transkript varijante.



Slika 11. Provjera razine transkripcije *SLC47A2* gena (uz *EEF1A1* kao kontrolu) sa početnicama koje obuhvaćaju sve četiri transkript varijante *SLC47A2* gena (*SLC47A2.1*) u cDNA uzorcima nakon PCR-a na 1,5 %-tnom agaroznom gelu pri 80 V. Korišteni su cDNA kalupi dobiveni izolacijom i reverznom transkripcijom RNA iz Flp-In-293/drM3 stanica (drM3_izolacija 3) i Flp-In-293/Mock stanica (Mock_izolacija 3); *ladder* = standardi DNA poznate molekulske mase koji služe za procjenu veličine molekula koje putuju kroz gel.

Važno je napomenuti kako je, zbog greške prilikom uzorkovanja cDNA, provedeno devet ponavljanja PCR reakcija s različitim kombinacijama početnica i cDNA kalupa. Naime, zbog veoma malog volumena cDNA od tek 0,2 μ L koji je korišten za provođenje reakcije, u nekoliko ponavljanja dogodilo se da je stavljena različita količina cDNA kalupa u uzorke. To je bilo vidljivo, u prvom redu, iz veoma niske dobivene razine transkripcije ili potpunog odsutstva *band-a EEF1A1 housekeeping* gena kao pozitivne kontrole te posljedično nekonzistentnih rezultata dobivenih, primarno, u eksperimentima provjere razine transkripcije *SLC47A2* gena sa početnicama koje obuhvaćaju sve četiri transkript varijante *SLC47A2* gena (*SLC47A2.1*). U konačnici, eksperiment je uspješno proveden te su rezultati prikazani na slici 11 potvrđeni provjerom specifičnog vezanja početnica pomoću alata Primer-BLAST. Nakon

što je unesen identifikacijski broj mRNA *SLC47A2* gena, sekvence SLC47A2.1 prednje i stražnje početnice čiju specifičnost želimo ispitati te organizam (*Homo sapiens*) na kojem želimo da se izvrši pretraga unutar Refseq mRNA baze, dobiveni su rezultati (slika 12) koji ukazuju na nespecifično vezanje SLC47A2.1 početnica unutar humanog genoma, pri čemu nastaju ampliconi duljine 100, 300 i 400 pb, što odgovara dobivenim PCR rezultatima. Ovakvo nespecifično vezanje, greškom, nije uočeno tijekom samog dizajna početnica.

```

>XM\_017025256.1 PREDICTED: Homo sapiens scavenger receptor class F memb
product length = 119
Forward primer 1 CTCCTCTGCTGCCTCCCTT 19
Template 316 TG.....TG.T... 334

Reverse primer 1 CTGGGTCAACCTGGACACG 19
Template 434 .A.CT...T..... 416

>XM\_017022463.2 PREDICTED: Homo sapiens phosphopantothenoylcysteine dec
product length = 400
Forward primer 1 CTCCTCTGCTGCCTCCCTT 19
Template 1220 ..GTC.....T.....G 1238

Reverse primer 1 CTGGGTCAACCTGGACACG 19
Template 1619 ...T.AG.....T. 1601

>NM\_001282683.2 Homo sapiens F-box protein 31 (FBXO31), transcript variant 2,
product length = 308
Forward primer 1 CTCCTCTGCTGCCTCCCTT 19
Template 3016 TC..G.....G....G 2998

Reverse primer 1 CTGGGTCAACCTGGACACG 19
Template 2709 GCT..G..C..... 2727

>NM\_024735.5 Homo sapiens F-box protein 31 (FBXO31), transcript variant 1, mRI
product length = 308
Forward primer 1 CTCCTCTGCTGCCTCCCTT 19
Template 3237 TC..G.....G....G 3219

Reverse primer 1 CTGGGTCAACCTGGACACG 19
Template 2930 GCT..G..C..... 2948

>XM\_017004891.1 PREDICTED: Homo sapiens transient receptor potential cation
product length = 494
Forward primer 1 CTCCTCTGCTGCCTCCCTT 19
Template 1384 AC.G..A.T..... 1402

```

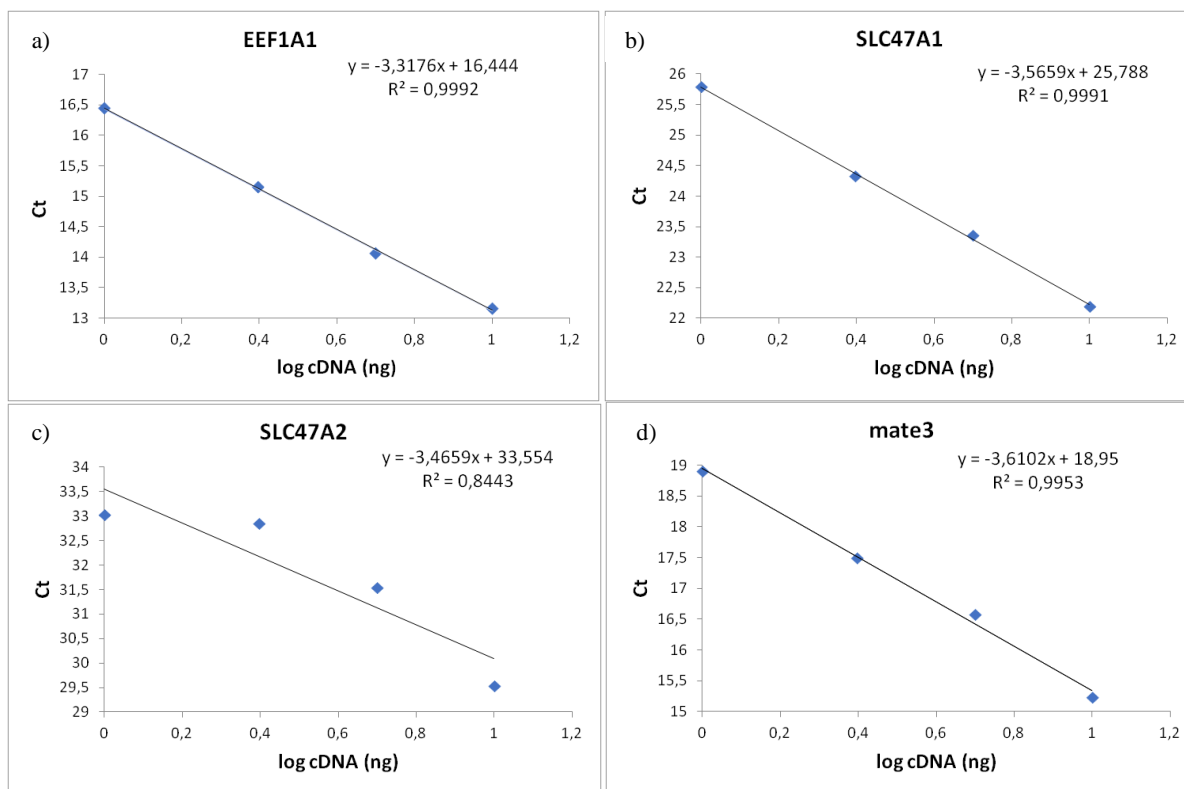
Slika 12. Prikaz nespecifičnog vezanja SLC47A2.1 početnica u genomu, koje obuhvaćaju sve četiri transkript varijante *SLC47A2* gena.

4.4. KVANTITATIVNI PCR (qPCR)

Nakon što se klasičnim PCR-om odredi specifičnost početnica, pomoću kvantitativnog PCR-a (qPCR, eng. *real-time PCR*) određuje se, najprije, amplifikacijska učinkovitost početnica te se, u konačnici, kvantificira razina ekspresije ljudskih *MATE* gena (*SLC47A1* i *SLC47A2*) u odnosu na *mate3* gen zebrice u Flp-In-293 (drM3 i Mock) stanicama. Za razliku od klasičnog PCR-a, u reakcijsku smjesu dodaje se fluorescentna boja SYBR Green I koja se nespecifično veže za dvolančanu DNA (dsDNA), odnosno umnožene DNA fragmente nastale

tijekom qPCR reakcije, pri čemu joj se vezanjem višestruko poveća fluorescencija te se tako umnoženi DNA fragmenti analiziraju istovremeno kako i nastaju, mjerenjem fluorescencije pomoću fluorimetra (praćenje reakcije u stvarnom vremenu). Dakle, povećanje fluorescencije direktno je proporcionalno povećanju udjela ciljnog DNA fragmenta (ciljna cDNA). Što je veća početna razina transkripcije određenog gena, to je veća količina njegove mRNA (transkripta), odnosno reverznom transkripcijom nastaje više njegove cDNA koja se koristi kao kalup u qPCR-u što uzrokuje manju Ct vrijednost, tj. manji broj PCR ciklusa potrebnih da fluorescentni signal nastao vezanjem boje SYBR Green I za ciljnu cDNA prijeđe tzv. graničnu (eng. *threshold*) vrijednost. Dakle, Ct vrijednost obrnuto je proporcionalna količini cDNA kalupa na početku PCR reakcije pa tako, što je veća početna količina cDNA kalupa, brže se (u ranijem ciklusu) postiže fluorescencija iznad određene granične vrijednosti.

U svrhu provjere amplifikacijske učinkovitosti ($n = 2$) koriste se početnice za humane *SLC47A1*, *SLC47A2* (2) (obuhvaćaju tri transkript varijante MATE2 proteina) gene i *mate3* gen te, kao pozitivna kontrola, početnice za *EEF1A1 housekeeping* gen konstitutivno eksprimiran u istraživanim stanicama. Kako je klasičnim PCR-om utvrđeno nespecifično vezanje *SLC47A2.1* početnica (obuhvaćaju sve četiri transkript varijante MATE2 proteina) za cDNA, one nisu korištene tijekom provođenja qPCR-a. Učinkovitost pojedine početnice određuje se preko Ct vrijednosti dobivene pri različitim koncentracijama cDNA kalupa. Za provedbu reakcije pripreme se razrjeđenja cDNA u rasponu koncentracija 0 - 10 ng/jažici (0, 0,1, 1, 2,5, 5 i 10 ng/jažici). U prvu se jažicu, umjesto cDNA kalupa, doda voda koja služi kao negativna kontrola, tzv. NTC (eng. *no template control*) te u njoj ne bi trebalo doći do pojave fluorescencije (nema umnažanja jer nema kalupa). Kako svako dodatno razrjeđenje sadrži odgovarajuću manju početnu količinu cDNA kalupa, serijsko razrjeđenje uzrokuje određenu razliku Ct vrijednosti između uzoraka s različitim koncentracijama cDNA kalupa. Nakon provedbe qPCR reakcije, kao rezultat (slika 13) se dobiju Ct vrijednosti koje se stave na pravac nasuprot logaritma koncentracije cDNA kalupa ($\log cDNA$) te se na temelju linearne regresijske krivulje i pripadajućeg nagiba pravca izračuna učinkovitost (efikasnost) prema jednadžbi: $E = -1 + 10^{\left(\frac{1}{\text{nagib pravca}}\right)}$.



Slika 13. Grafovi ovisnosti Ct-a (*cycle threshold*; ciklus u kojem dolazi do povećanja fluorescencije iznad granične vrijednosti) o koncentraciji cDNA kalupa (log cDNA) za a) *EEF1A1*, b) *SLC47A1*, c) *SLC47A2* i d) *mate3* gen.

Izračun učinkovitosti početnica za umnažanje gena *EEF1A1*, *SLC47A1*, *SLC47A2* i *mate3*:

$$a) E (EEF1A1) = -1 + 10^{[-1/(-3.3176)]} \times 100 = 100,18 \%$$

$$b) E (SLC47A1) = -1 + 10^{[-1/(-3.5659)]} \times 100 = 90,74 \%$$

$$c) E (SLC47A2) = -1 + 10^{[-1/(-3.4659)]} \times 100 = 94,33 \%$$

$$d) E (mate3) = -1 + 10^{[-1/(-3.6102)]} \times 100 = 89,23 \%$$

Na temelju rezultata može se zaključiti da je amplifikacijska učinkovitost iznimno dobra, pošto je poželjna učinkovitost između 90 i 100 %. U idealnom slučaju, broj molekula ciljne sekvence trebao bi se udvostručiti tijekom eksponencijalne faze svakog replikacijskog ciklusa qPCR-a, što predstavlja 100 %-tnu amplifikacijsku učinkovitost, pri čemu bi razrjeđenje cDNA $10\times$ trebalo uzrokovati pomak Ct vrijednosti od 3.3 ciklusa ($2^{3.3} = 9.48$). Najčešći razlozi manje učinkovitosti su loš dizajn početnica (tvorba sekundarnih struktura poput dimera ili ukosnica, neodgovarajuća temperatura taljenja) koji utječe na *annealing* početnica na kalup ili neoptimalni reakcijski uvjeti (koncentracija reaktanata, duljina

amplikona, neprecizno pipetiranje uzorka ili regensa itd.). Učinkovitost koja značajno prelazi 100 % najčešće je uzrokovana inhibicijom DNA polimeraze inhibitorima poput fenola, etanola ili gvanidin izotiocijanata zaostalih tijekom postupka izolacije RNA ili do inhibicije dolazi uslijed prevelike količine cDNA kalupa. U takvim situacijama, iako se doda više cDNA kalupa u reakcijsku smjesu, Ct vrijednost se, uslijed inhibicije, neće pomaknuti u raniji ciklus što uzrokuje manji nagib pravca te posljedičnu amplifikacijsku učinkovitost preko 100 %.

Nakon provjere učinkovitosti, slijedi kvantifikacija razine transkripcije ljudskih *SLC47A1* i *SLC47A2* gena koji kodiraju za MATE1 odnosno MATE2 proteine, u odnosu na razinu transkripcije *mate3* gena koji kodira za Mate3 protein zebrice, u Flp-In-293/drM3 i Flp-In-293/Mock stanicama pomoću qPCR-a (n = 2). U svrhu kvantifikacije, koristi se šest cDNA kalupa (tri Flp-In-293/drM3 paralele i tri Flp-In-293/Mock paralele) u koncentraciji 10 ng/jažici za svaki ispitivani par početnica. Tijekom provedbe qPCR-a nastaje amplifikacijska krivulja ovisnosti fluorescentnog signala o broju PCR ciklusa iz koje se iščita Ct vrijednost koja je potrebna za određivanje razine ekspresije. Razina ekspresije ciljnih gena u Flp-In-293/Mock i Flp-In-293/drM3 stanicama izražava se u obliku normalizirane vrijednosti ekspresije, tzv. MNE (eng. *mean normalised expression*), odnosno kao relativna razina ekspresije ciljnih gena (relativna količina mRNA) u odnosu na razinu ekspresije (količinu mRNA) referentnog *housekeeping* gena (*EEF1A1*). Razina ekspresija gena normalizira se prema *housekeeping* genu kako bi se onemogućio utjecaj nekontroliranih varijabli na rezultate, poput broja stanica, količine cDNA kalupa, enzimske učinkovitosti ili samih uvjeta reakcije. Srednja vrijednost MNE za pojedini gen računa se prema jednadžbi: $\overline{MNE} = \frac{E(hkg)^{Ct(hkg)}}{E(targ)^{Ct(targ)}} \times 10^6$, (izražena na milijun, 10^6) pri čemu su $E(hkg)$, odnosno $E(targ)$ prethodno izračunate efikasnosti amplifikacije *EEF1A1 housekeeping* gena odnosno ciljnog gena, no ovaj put izražene kao $E = 10^{\left(-\frac{1}{nagib\ pravca}\right)}$, a $Ct(hkg)$ i $Ct(targ)$ vrijednosti broja ciklusa u kojem je došlo do povećanja fluorescencije iznad granične vrijednosti za *housekeeping* gen, odnosno ciljni gen. Kako se reakcija za svaki par početnica provodi na šest cDNA kalupa (tri Flp-In-293/drM3 paralele i tri Flp-In-293/Mock paralele) dobivenih tijekom tri izolacije RNA, najprije se izračuna MNE vrijednost za svaku paralelu, a zatim i konačna srednja vrijednost MNE (slika 14).

Primjer izračuna razine ekspresije *SLC47A1* gena u Flp-In-293/Mock i Flp-In-293/drM3 stanicama:

a) Flp-In-293/Mock (izolacija_1):

$$MNE = \frac{E(hkg)^{Ct(hkg)}}{E(targ)^{Ct(targ)}} \times 10^6 = \frac{2^{14,629}}{1,91^{24,212}} = 3975,59$$

Flp-In-293/Mock (izolacija_2):

$$MNE = \frac{E(hkg)^{Ct(hkg)}}{E(targ)^{Ct(targ)}} \times 10^6 = \frac{2^{14,1995}}{1,91^{24,3759}} = 2654,81$$

Flp-In-293/Mock (izolacija_3):

$$MNE = \frac{E(hkg)^{Ct(hkg)}}{E(targ)^{Ct(targ)}} \times 10^6 = \frac{2^{15,0751}}{1,91^{24,97025}} = 3315,77$$

Flp-In-293/Mock:

$$\overline{MNE} = \frac{3975,59 + 2654,81 + 3315,766}{3} = 3315,39$$

b) Flp-In-293/drM3 (izolacija_1):

$$MNE = \frac{E(hkg)^{Ct(hkg)}}{E(targ)^{Ct(targ)}} \times 10^6 = \frac{2^{14,5339}}{1,91^{24,1784}} = 3803,79$$

Flp-In-293/drM3 (izolacija_2):

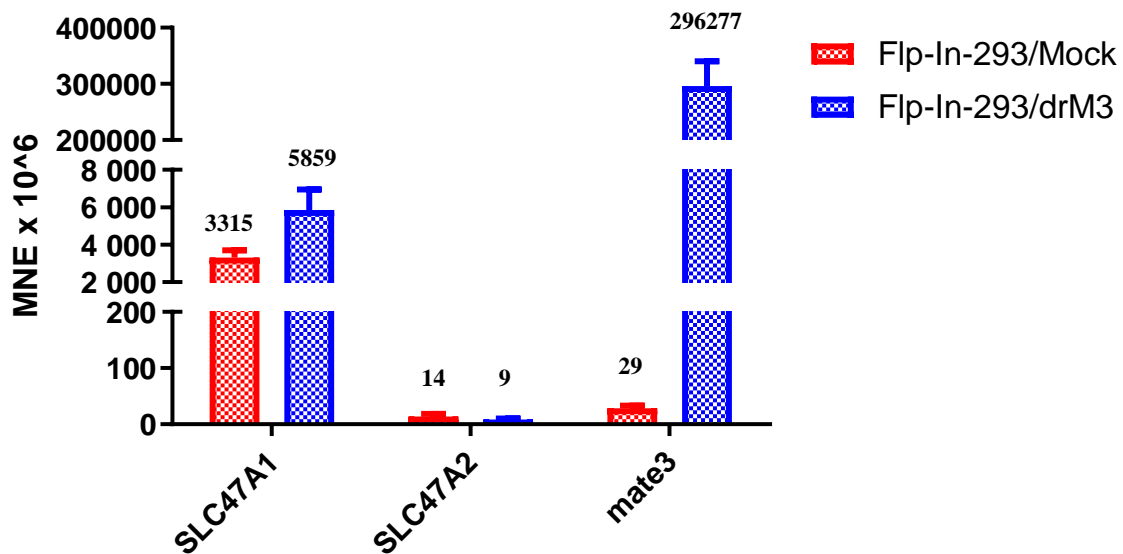
$$MNE = \frac{E(hkg)^{Ct(hkg)}}{E(targ)^{Ct(targ)}} \times 10^6 = \frac{2^{14,4855}}{1,91^{23,07}} = 7535,81$$

Flp-In-293/drM3 (izolacija_3):

$$MNE = \frac{E(hkg)^{Ct(hkg)}}{E(targ)^{Ct(targ)}} \times 10^6 = \frac{2^{13,9223}}{1,91^{22,75895}} = 6237,43$$

Flp-In-293/drM3:

$$\overline{MNE} = \frac{3803,79 + 7535,81 + 6237,43}{3} = 5859,01$$



Slika 14. Razina transkripcije *SLC47A1*, *SLC47A2* i *mate3* gena u Flp-In-293/Mock i Flp-In-293/drM3 stanicama izražena kao MNE $\times 10^6$.

Iz dobivenih rezultata vidi se velika razlika u razini transkripcije *mate3* gena zebrice u Flp-In-293/drM3 stanicama, u odnosu na humane *SLC47A1* i *SLC47A2* gene, što je potvrda uspješnosti stabilne transfekcije stanica pomoću Flp-In sustava, zahvaljući kojoj rekombinantne stanice prekomjerno ekspimiraju transfecirani *mate3* gen. Uz to, vidljiva je i uspješnost stabilne transfekcije Flp-In-293/Mock stanica, koje služe kao negativna kontrola prilikom transportnog eksperimenta, sa „praznim“ plazmidom, čime je dokazano da ne posjeduju *mate3* gen unutar genoma, odnosno nemaju Mate3 transportni protein uklopljen u staničnu membranu. Pri tome, MNE vrijednost od 29 pripisuje se mogućoj kontaminaciji uslijed pripreme reakcijske qPCR smjese. Kada se uspoređuje razina transkripcije *SLC47A1* gena u Flp-In-293/drM3 i Flp-In-293/Mock stanicama, vidljiva je malo veća razina transkripcije *SLC47A1* gena u transfektantima u odnosu na divlji tip (Mock), što može biti posljedica blage promjene ekspresijskog profila transfektanata uslijed manipulacije genomom. Razina transkripcije *SLC47A2* je zanemariva te se ne može usporediti s transkripcijom *SLC47A1* i *mate3* gena. Takvi rezultati ukazuju na prirodno nisku razinu transkripcije *SLC47A2* u HEK293 staničnoj liniji. Naime, poznato je da HEK293T stanične linije imaju nisku razinu ekspresije endogenih transportera, što predstavlja veliku prednost njihovog korištenja u istraživanjima rekombinantnih transportera. U prilog neznatnoj ekspresiji *SLC47A2* gena ide i rad Prasad i sur., iz 2016., u kojem je masenom spektrometrijom

pokazano da je razina ekspresije MATE2-K u bubrezima ispod limita detekcije, za razliku od visoko eksprimiranog MATE1 transportera.

4.5. MJERENJE AKTIVNOSTI MATE3 TRANSPORTNOG PROTEINA

U svrhu razvoja sustava za ispitivanje interakcija Mate3 proteina sa okolišnim tvarima, uspješno je proizvedena stabilna stanična linija koja prekomjerno eksprimira Mate3 protein, što je pokazano kvantitativnim PCR-om. No, kako bi se dokazala aktivnost Mate3 proteina u Flp-In-293/drM3 staničnoj liniji te optimizirao sustav transporta, potrebno je provesti transportni eksperiment sa tvari koja je, dokazano, supstrat Mate3 proteina. U tu svrhu, koriste se dvije fluorescentne boje, DAPI i ASP+, čija glavna prednost, u odnosu na često korištene supstrate poput tetraetilamonija (TEA), leži u tome što je njihov transport moguće pratiti u realnom vremenu mjerenjem fluorescencije nastale njihovim unosom u stanicu i vezanjem za dvolančanu DNA. To je moguće zbog toga što se, vezanjem za DNA, fluorescencija DAPI-ja i ASP+-a povećava čak 20×, dok je pozadinska fluorescencija, kada nisu vezane za DNA, zanemariva. To znatno olakšava provođenje eksperimenta u svrhu određivanja aktivnosti Mate3 proteina jer nema potrebe za ispiranjem i lizom stanica, radioaktivnim obilježavanjem supstrata u svrhu njegove detekcije ili provođenja kromatografije (uz masenu spektrometriju) za detekciju transportiranog supstrata.

Mate3 je sekundarni aktivni transporter koji katalizira elektroneutralan antiport protona i supstrata (najčešće organski kationi) tako što koristi energiju nastalu stvaranjem elektrokemijskog gradijenta protona primarnim transporterima. Naime, primarni transporteri troše energiju ATP-a kako bi transportirali proton izvan stanice, tj. uz koncentracijski gradijent, nakon čega se energija oslobođena uslijed kretanja protona nazad u stanicu (putem transportera), tj. niz koncentracijski gradijent koristi za transport odnosno izbacivanje supstrata izvan stanice. Budući da je transportna aktivnost Mate3 proteina ovisna o pH gradijentu, optimizacija sustava transporta podrazumijeva određivanje optimalne pH vrijednosti transportnog medija (pufera), odnosno pH vrijednosti kod koje se postižu optimalni kinetički parametri u vidu K_m i V_{max} vrijednosti. Pri tome, V_{max} predstavlja maksimalnu brzinu transporta supstrata pri kojoj su sva vezna mjesta transportera u potpunosti zasićena supstratom te bilo kakvo daljnje dodavanje supstrata neće rezultirati povećanjem brzine, dok K_m (Michaelis-Menten konstanta) predstavlja koncentraciju supstrata kod koje se postiže 50 % V_{max} , odnosno kod koje je 50 % transportera zasićeno supstratom te odražava afinitet transportera prema supstratu. U organizmu, kako je prethodno objašnjeno, Mate transporteri kataliziraju izbacivanje supstrata iz stanice uz unos jednog protona u stanicu

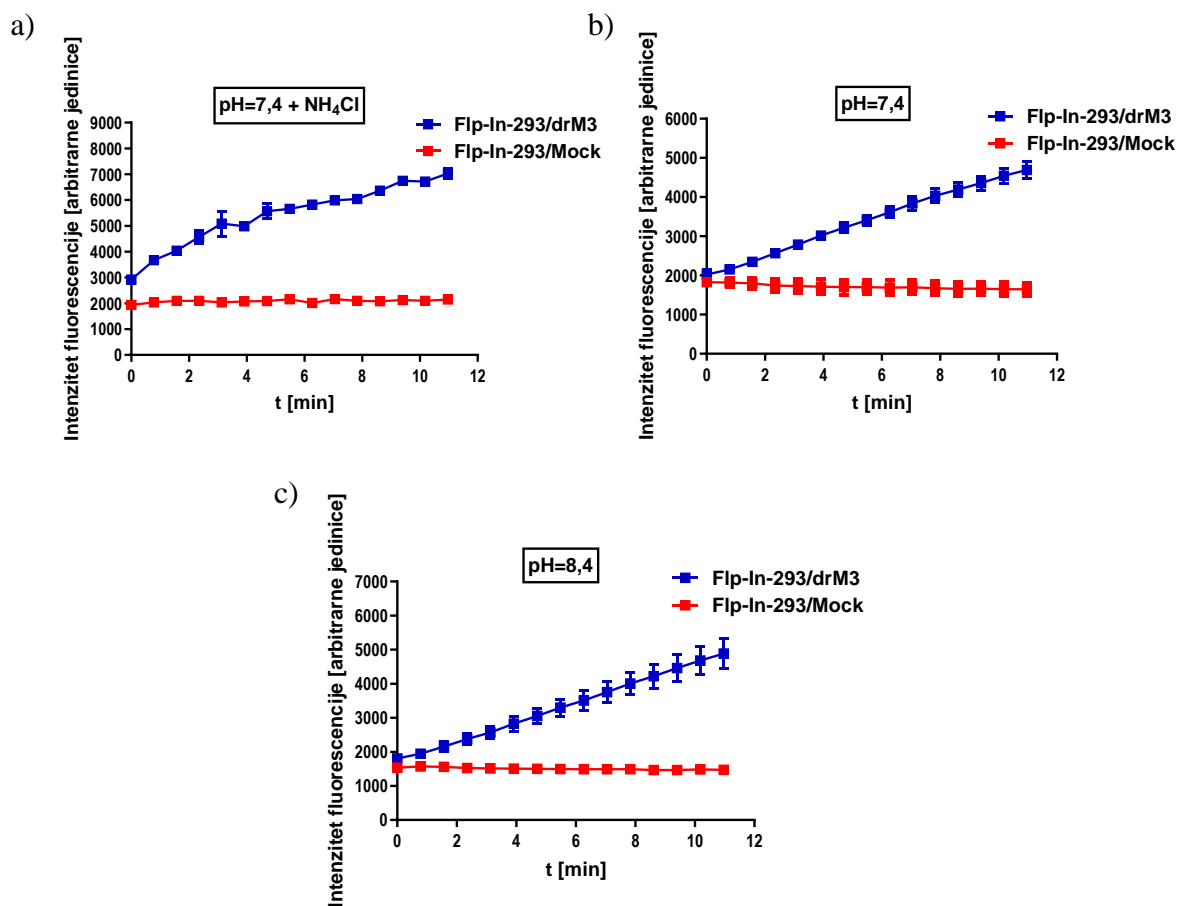
(elektroneutralan antiport). Kako bi se omogućio suprotan transport, odnosno unos supstrata u stanicu, a izbacivanje protona iz stanice, potrebno je namjestiti pH tako da unutrašnjost stanice bude kiseliya (više H^+) u odnosu na izvanstanični prostor (manje H^+), čime se osigurava transport protona izvan stanice, niz koncentracijski gradijent, uz transport supstrata u stanicu. Provođenje eksperimenta u sustavu u kojem se prati unos supstrata mnogo je jednostavnije i praktičnije za izvedbu u odnosu na eventualno provođenje eksperimenta nalik na prirodni proces u kojem bi najprije trebalo ubaciti supstrat u stanicu pa onda pratiti njegovo izbacivanje, odnosno transport iz stanice.

Kako bi se odabrali optimalni kinetički parametri, transport DAPI-ja i ASP+-a ispituje se pri dvije različite pH vrijednosti transportnog medija (izvanstanični pH), odnosno pri pH 7,4 i pH 8,4 te pri pH 7,4 uz unutarstanično zakiseljavanje. Pri izvanstaničnom pH (pH transportnog medija) od 7,4 uspostavlja se blagi koncentracijski gradijent u odnosu na unutrašnjost stanice, dok se pri pH 8,4 stvara dosta veći koncentracijski gradijent koji osigurava transport supstrata u stanicu, uz antiport protona iz stanice. Uz to, kako bi se postigao i najveći koncentracijski gradijent, provedeno je i unutarstanično zakiseljavanje stanica, inkubacijom stanica 20 minuta u amonijevom kloridu (NH_4Cl), nakon čega se stanice ispiru i eksperiment se provodi pri pH 7,4. Kao negativna kontrola transportnog eksperimenta koriste se Flp-In-293/Mock stanice koje nemaju Mate3 transportni protein uklopljen u staničnoj membrani, stoga je fluorescencija, ukoliko je prisutna, posljedica pasivne difuzije fluorescentnih boja kroz staničnu membranu, što je moguće pogotovo pri većim koncentracijama boje ili ukoliko je integritet stanične membrane narušen uslijed prisustva organskih otapala korištenih za, primjerice, otapanje boje. Kod obrade i prikaza rezultata, fluorescencija prisutna u Flp-In-293/Mock stanicama oduzima se od dobivenih vrijednosti fluorescencije u Flp-In-293/drM3 stanicama kako bi dobiveni rezultati bili prikaz isključivo aktivnosti Mate3 transportera.

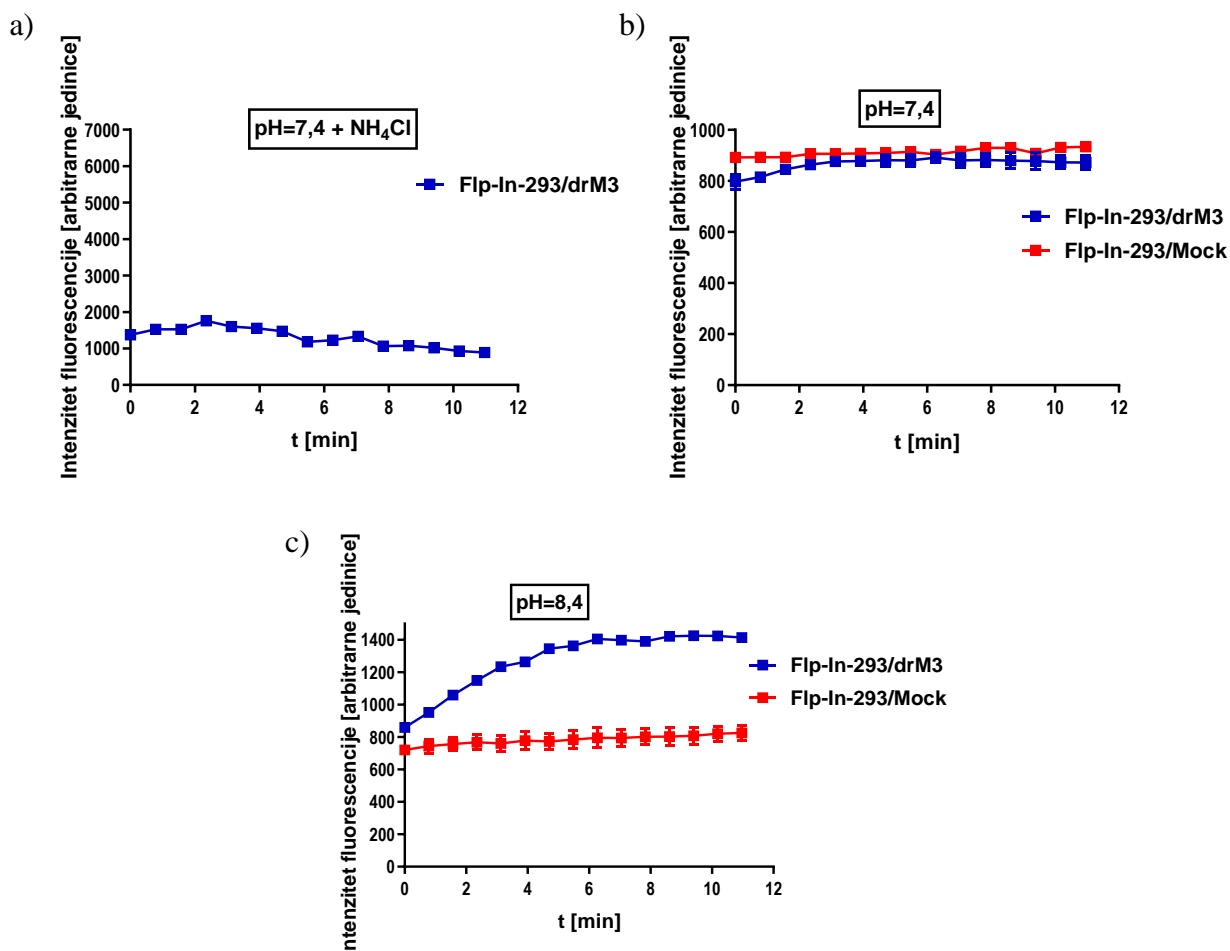
4.5.1. Određivanje optimalnih uvjeta transporta

Kako bi se odredili kinetički parametri (K_m i V_{max}) transporta DAPI-ja, odnosno ASP+-a u stanicu pri različitim uvjetima pH transportnog medija, potrebno je dobivene rezultate transporta izraziti kao ovisnost brzine unosa supstrata (povećanje intenziteta fluorescencije) o koncentraciji supstrata (DAPI ili ASP+). Pri tome se, za pojedinu koncentraciju supstrata, u obzir uzimaju dobivene vrijednosti koje pripadaju linearnom dijelu krivulje povećanja fluorescencije kroz vrijeme. Tako je za svaku jažicu u kojoj se provodio transport pri određenim uvjetima, određeno linearno područje tijekom 10 minuta transporta te

je dobivena vrijednost nagiba pravca, koja predstavlja intenzitet promjene fluorescencije kroz vrijeme, korištena za daljnji izračun brzine unosa supstrata. Za izračun je uzeto linearno područje jer ono predstavlja specifičan transport supstrata. S vremenom, na transport počinju utjecati i druge varijable, poput zasićenja transportera supstratom ili sve veća pasivna difuzija supstrata kroz staničnu membranu (ukoliko je prisutna), stoga se takvi rezultati transporta ne uzimaju u obzir. Na slikama 15 i 16, za ilustraciju su prikazani grafovi promjene intenziteta fluorescencije u ovisnosti u vremenu za 3 μM DAPI, odnosno 5 μM ASP+ kao fluorescentne supstrate u Flp-In-293/drM3 i Flp-In-293/Mock stanicama. Dobiveni rezultati transporta 3 μM DAPI-ja, pri sva tri pH transportnog medija, pokazuju povećanje fluorescencije tijekom vremena u Flp-In-293/drM3 stanicama, odnosno transport DAPI-ja putem prekomjerno eksprimiranog Mate3 proteina. Nasuprot tome, u Flp-In-293/Mock stanicama nema povećanja fluorescencije tijekom vremena, već samo konstantne pozadinske fluorescencije što znači da nema pasivne difuzije boje u stanicu. Što se tiče transporta ASP+-a, pri pH transportnog medija od 7,4 sa ili bez unutarstaničnog zakiseljavanja, nije primjećen specifičan, Mate3 posredovan, transport ASP+-a u Flp-In-293/drM3 stanice što se očituje u izostanku povećanja intenziteta fluorescencije tijekom vremena, već je fluorescencija ista u Flp-In-293/drM3 i Flp-In-293/Mock stanicama. Tek je pri pH transportnog medija od 8,4 vidljivo povećanje fluorescencije tijekom vremena u Flp-In-293/drM3 stanicama, uz blago povećanje fluorescencije i u Flp-In-293/Mock stanicama (pasivna difuzija boje u stanice).



Slika 15. Grafovi promjene intenziteta fluorescencije (arbitrarne jedinice) kroz vrijeme t (min) uz DAPI kao fluorescentni supstrat u Flp-In-293/drM3 i Flp-In-293/Mock stanicama pri različitim pH uvjetima; a) pH 7,4 uz unutarstanično zakiseljavanje stanica sa NH₄Cl; b) pH 7,4; c) pH 8,4.

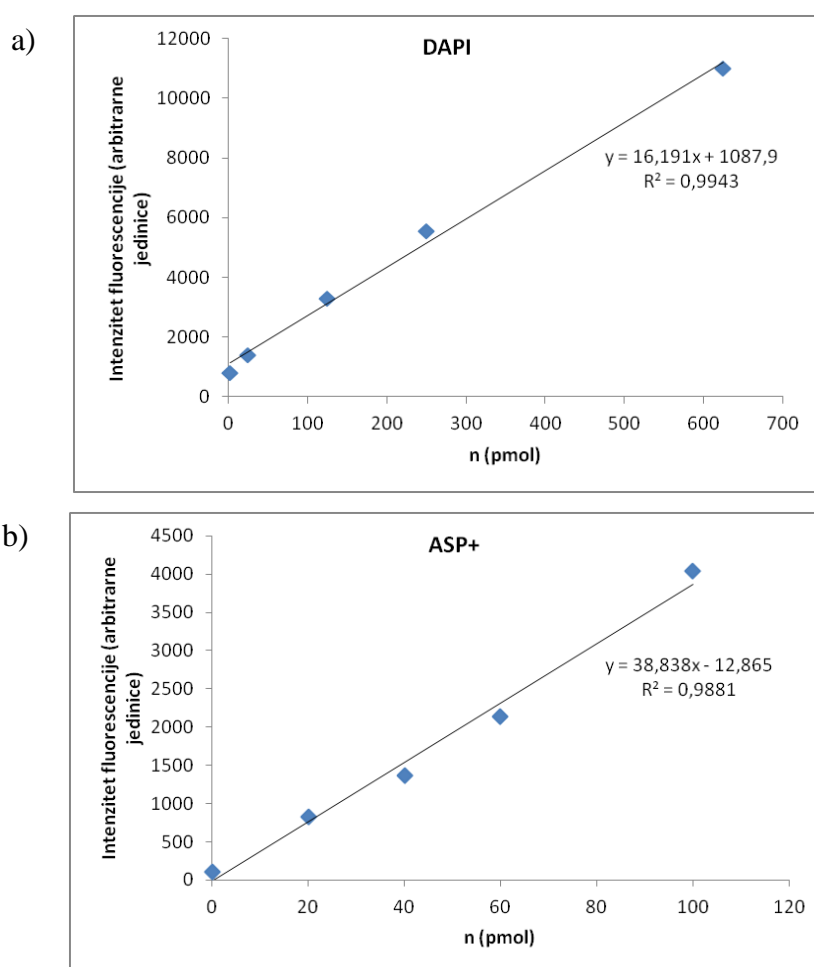


Slika 16. Grafovi promjene intenziteta fluorescencije (arbitrarne jedinice) kroz vrijeme t (min) uz ASP+ kao fluorescentni supstrat u FIp-In-293/drM3 i FIp-In-293/Mock stanicama pri različitim pH uvjetima; a) pH 7,4 uz unutarstanično zakiseljavanje stanica sa NH₄Cl; b) pH 7,4; c) pH 8,4.

Koncentracija proteina metodom po Bradford-u određuje se u svakoj od jažica u kojoj je proveden transportni eksperiment te služi tome da se ukloni utjecaj broja stanica na dobivene rezultate jer, što je više stanica, to je više Mate3 transportnih proteina u staničnoj membrani, čime se postiže veća brzina transporta pri datoj koncentraciji supstrata. Nakon što se izmjeri apsorbancija u svakoj od jažica, koncentracija proteina u uzorcima odredi se iz kalibracijskog pravca ovisnosti apsorbancije o koncentraciji BSA standarda te izražava kao mg proteina u mL citosola. Kako bi se povećalo područje linearnosti pravca, pri računanju se uzima u obzir omjer apsorbancija izmjerenih pri 595 nm te 450 nm, tj. A_{595}/A_{450} .

Za izračun brzine unosa DAPI-ja, odnosno ASP+-a u stanice u svakoj pojedinoj jažici, prethodno dobivena vrijednost nagiba pravca podijeli se sa dobivenom vrijednosti koncentracije proteina u toj jažici određenoj preko kalibracijskog pravca ovisnosti

apsorbancije o koncentraciji BSA, kako bi se uklonio utjecaj broja stanica na dobivene rezultate. Uz to, kako bi se dobiveni fluorescentni signal preveo u količinu DAPI-ja koja se transportira u stanicu, dobivena vrijednost se podijeli sa vrijednošću nagiba pravca baždarnog pravca ovisnosti fluorescencije o množini DAPI-ja uslijed njegova vezanja za dvolančanu DNA (slika 17). Na taj način, rezultati brzine transporta izraze se kao pmol DAPI-ja koji biva transportiran u stanicu u minuti po mg proteina u stanici. Ovisnost brzine unosa o koncentraciji supstrata (slika 18 i slika 19) opisana je Michaelis-Menten funkcijom ($V = \frac{V_{max} \times [S]}{S + K_m}$) iz koje se računaju potrebni kinetički parametri (V_{max} , K_m) prilagodbom krivulje dobivenim podacima.



Slika 17. Baždarni pravac ovisnosti intenziteta fluorescencije (arbitrarne jedinice) o množini (pmol) a) DAPI-ja i b) ASP+-a uslijed njihova vezanja za dvolančanu DNA.

Primjer izračuna brzine transporta DAPI-ja u jažici u kojoj je ispitivan transport 3 μM DAPI-ja putem Flp-In-293/drM3 stanica, pri pH transportnog medija od 7,4.

a (nagib pravca dijagrama linearne ovisnosti fluorescentnog signala o vremenu; linearnost prisutna do 5,48 min) = 251,429 FUmin⁻¹

c (protein; dobivena na temelju kalibracijskog pravca) = 0,490 mgmL⁻¹

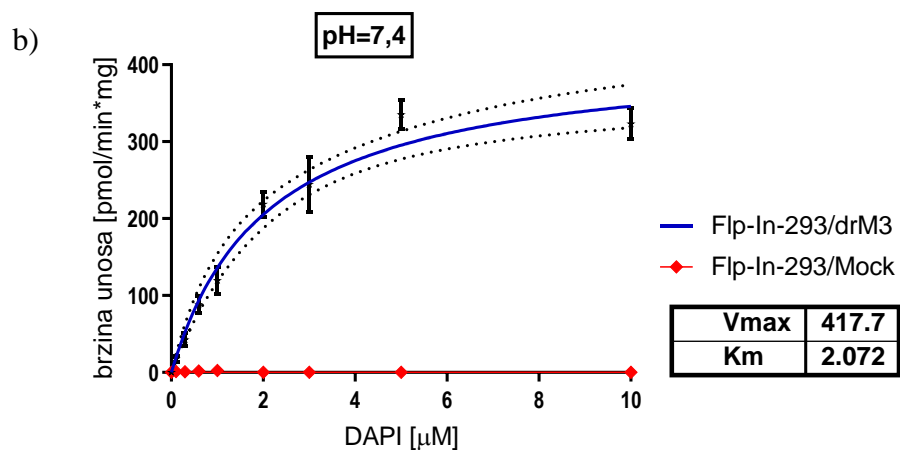
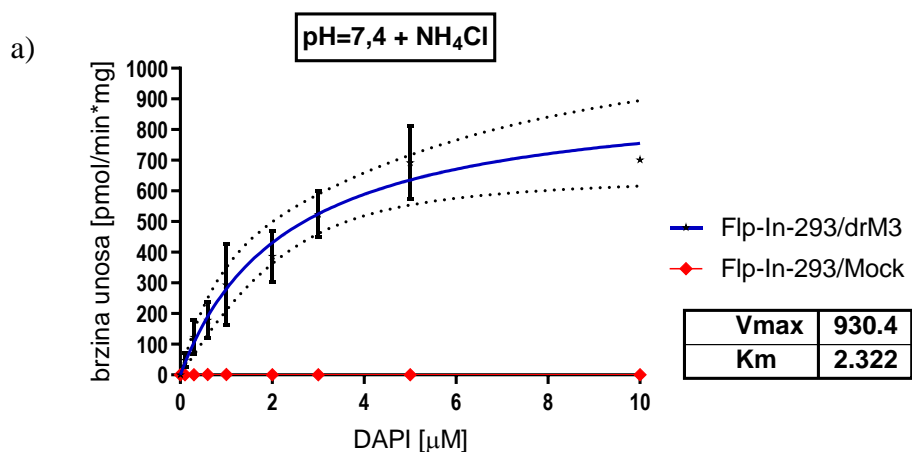
V (jažica) = 0,15 mL

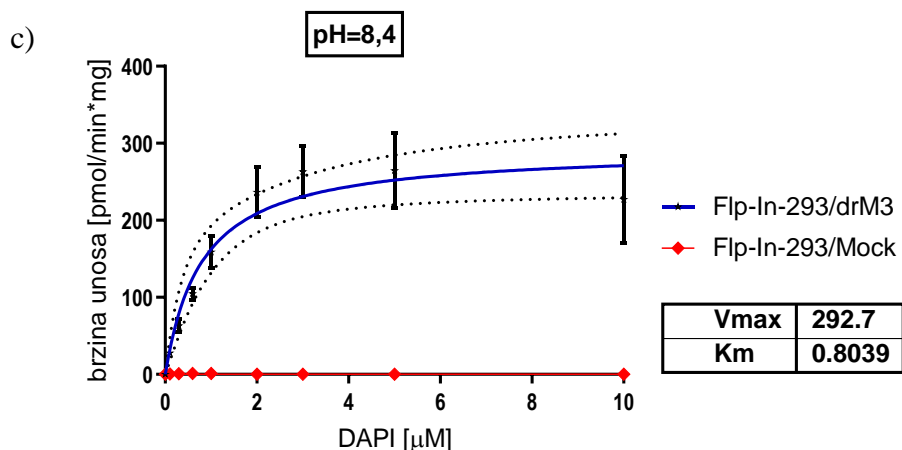
a' (nagib pravca dijagrama ovisnosti fluorescencije o koncentraciji DAPI-ja vezanog za DNA)

= 16,1909 FUpmol⁻¹

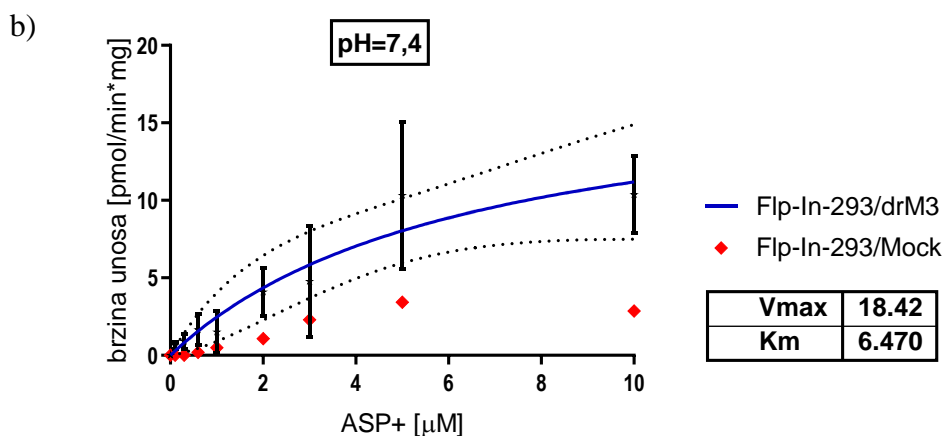
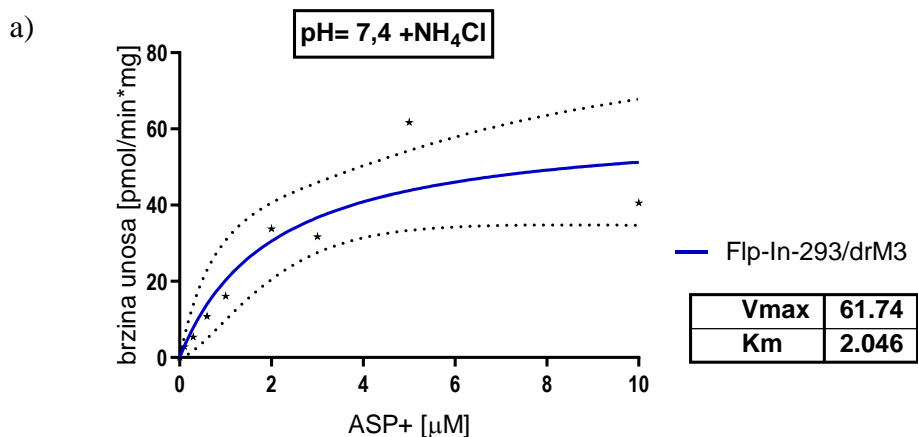
$$\text{Brzina unosa} = \frac{a}{V \times c \times a'} = \frac{251,429 \text{ FUmin}^{-1}}{0,15 \text{ mL} \times 0,490 \text{ mgmL}^{-1} \times 16,191 \text{ FUpmol}^{-1}}$$

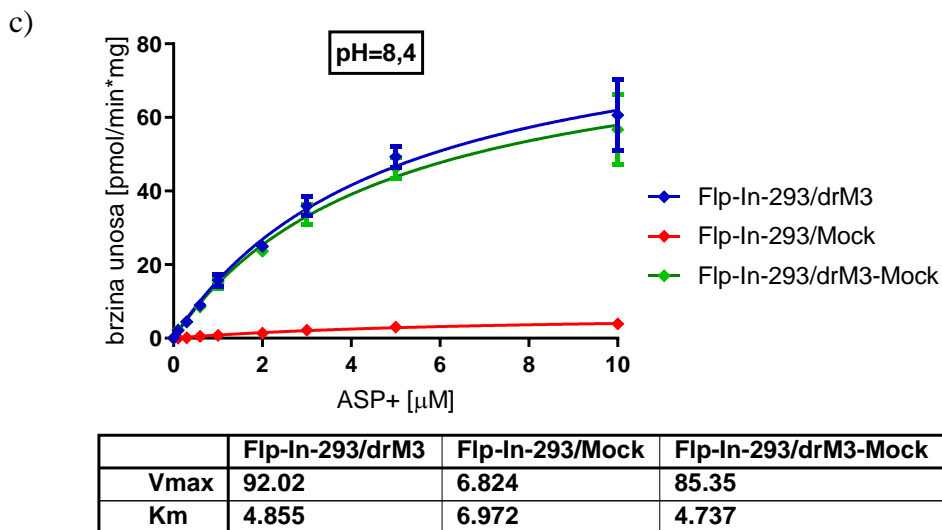
$$= 211,278 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$$





Slika 18. Grafovi ovisnosti brzine transporta DAPI-ja ($\text{pmolmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$) o koncentraciji DAPI-ja (μM) u Flp-In-293/drM3 i Flp-In-293/Mock stanicama pri različitim pH uvjetima; a) pH 7,4 uz unutarstanično zakiseljavanje stanica sa NH_4Cl ($n = 3$); b) pH 7,4 ($n = 4$); c) pH 8,4 ($n = 3$).





Slika 19. Grafovi ovisnosti brzine transporta ASP+-a ($\text{pmolmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$) o koncentraciji ASP+-a (μM) u Flp-In-293/drM3 i Flp-In-293/Mock stanicama pri različitim pH uvjetima; a) pH 7,4 uz unutarstanično zakiseljavanje stanica sa NH_4Cl ($n = 3$ za drM3); b) pH 7,4 ($n = 3$); c) pH 8,4 ($n = 3$).

Optimalne K_m i V_{max} vrijednosti transporta DAPI-ja (slika 18) dobivene su pri izvanstaničnom pH (pH transportnog pufera) od 7,4, dok je za transport ASP+-a optimalna pH vrijednost 8,4. Ukoliko je moguće, preferira se odabir pH 7,4 zbog toga što je najbliži fiziološkom pH, a kako je pH unutar citoplazme oko 7,2, postiže se mali, ali dovoljan, gradijent koncentracije protona potreban za unos supstrata u stanicu. Na taj način, najvjernije se oponašaju stvarni uvjeti u organizmu te je moguća pouzdanija ekstrapolacija dobivenih *in vitro* rezultata na *in vivo* sustav. S druge strane, najmanje preferiran transportni sustav je onaj koji uključuje prethodno unutarstanično zakiseljavanje zbog toga što podrazumijeva još jedan korak u provođenju eksperimenta, dodatnu manipulaciju sa stanicama te uvjete koji su daleko od fizioloških uvjeta. Pretjerana manipulacija sa stanicama može dovesti do narušavanja „fitness“-a stanica te ju je, ukoliko je moguće, potrebno izbjevati. Dakle, za transport DAPI-ja odabran je pH 7,4 zbog toga što je V_{max} dovoljno velik (duplo veći nego pri pH 8,4), a K_m vrijednost se ne razlikuje značajno od K_m vrijednosti unutarstaničnog zakiseljavanja. Također, na temelju vrijednosti brzine unosa u Flp-In-293/Mock stanicama od $0 \text{ pmolmg}^{-1}\text{min}^{-1}$, zaključeno je da tijekom transporta DAPI-ja nema pasivne difuzije boje u

stanicu, odnosno DAPI ne difundira kroz staničnu membranu čak niti pri većim koncentracijama. Što se tiče transporta ASP⁺-a (slika 19), pri pH 7,4 nije primjećen značajan transport putem Flp-In-293/drM3 stanica, što pokazuju veoma male vrijednost V_{max} te se vrijednosti transporta ne razlikuju znatno od vrijednosti dobivenih u Flp-In-293/Mock stanicama uslijed pasivne difuzije ASP⁺-a u stanicu. Usporedbom dobivenih rezultata transporta pri pH 8,4 i rezultata unutarstaničnog zakiseljavanja pri pH 7,4, uvjeti transporta pri pH 8,4 odabrani su kao optimalni za provođenje daljnjih eksperimenata zbog toga što rezultiraju većom V_{max} vrijednošću i ne pretjerano većom K_m vrijednošću u odnosu na unutarstanično zakiseljavanje, koje je, kako je prethodno objašnjeno, najmanje poželjan izbor. Zbog toga nije niti proveden eksperiment transporta ASP⁺ u Flp-In-293/Mock stanice u uvjetima unutarstaničnog zakiseljavanja. Kako je i pri pH 8,4 pokazano da ASP⁺ ulazi u stanicu pasivnom difuzijom kroz staničnu membranu, što je vidljivo iz povećanja fluorescencije uslijed povećanja koncentracije ASP⁺ u Flp-In-293/Mock stanicama, vrijednosti transporta u Flp-In-293/drM3 umanjene su za vrijednosti dobivene u Flp-In-293/Mock stanicama.

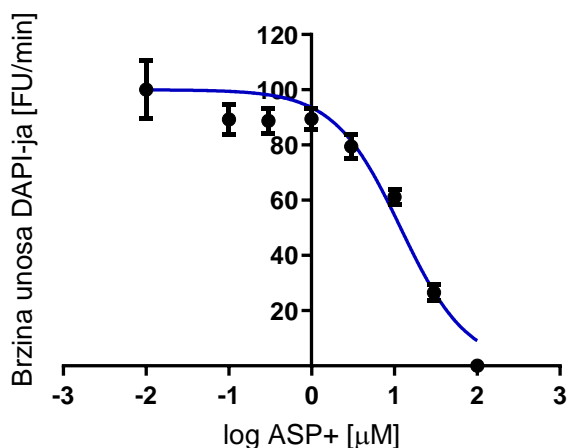
4.5.2. Inhibicija transporta modelnog supstrata

U svrhu uspješnog razvoja sustava za ispitivanje interakcija Mate3 proteina sa okolišnim tvarima, što je svrha rada, dobivene vrijednosti optimalnog pH transportnog medija i K_m vrijednosti supstrata od iznimne su važnosti. Naime, kako bi se utvrdilo da li je pojedini spoj inhibitor Mate3 proteina, indirektno se prati njegov inhibitorni učinak preko promjene transporta poznatog, dobro utvrđenog, supstrata Mate3 proteina (DAPI ili ASP⁺) u prisustvu tog spoja. Najprije se, iz krivulje ovisnosti brzine transporta supstrata o rastućoj koncentraciji inhibitora, odredi IC_{50} vrijednost koja odgovara koncentraciji inhibitora kod koje se postiže 50 %-tna inhibicija transporta supstrata, pri čemu se prati brzina transporta supstrata pri optimalnoj koncentraciji supstrata koja odgovara K_m vrijednosti (npr. 3 μ M za DAPI). Nakon toga, provodi se kinetički eksperiment u kojem se prati brzina transporta (povećanje fluorescencije) supstrata posredovana Mate3 proteinom pri rastućim koncentracijama supstrata, u uvjetima bez inhibitora i uz prisustvo inhibitora čija koncentracija odgovara, prethodno utvrđenoj, IC_{50} vrijednosti. Iz dobivenih rezultata promjene K_m i V_{max} vrijednosti transporta u prisustvu potencijalnog inhibitora u odnosu na kontrolu, odredi se stupa li uopće ispitivani spoj u interakciju sa Mate3 proteinom i ukoliko stupa, kakva je vrsta interakcije u pitanju (kompetitivna ili ne-kompetitivna inhibicija) te se utvrđuje da li je neka od ispitivanih tvari zapravo supstrat Mate3 proteina.

Opisane metode utvrđivanja inhibicije Mate3 proteina, iskorištene su u drugu svrhu tijekom razvoja sustava za ispitivanje interakcija u ovome radu, odnosno iskorištene su kako bi se odredio broj veznih mjesta za supstrat u aktivnom mjestu Mate3 proteina. Naime, prethodnim eksperimentima utvrđeno je kako su DAPI i ASP+ supstrati Mate3 proteina, pri čemu se optimalni kinetički parametri transporta postižu pri pH transportnog medija od 7,4 za DAPI, odnosno pri pH od 8,4 za ASP+. Ukoliko postavimo eksperiment u kojem se prati transport jednog supstrata u prisustvu drugog kao inhibitora, preko promjene kinetičkih parametara (K_m i V_{max}), može se zaključiti sadrži li Mate3 transportni protein jedno ili više veznih mjesta za supstrat. U tu svrhu, najprije se odredi IC_{50} vrijednost spoja koji se koristi kao inhibitor, praćenjem brzine transporta supstrata pri koncentraciji koja odgovara K_m vrijednosti uz odgovarajući raspon koncentracija inhibitora. Kako bi se odredila IC_{50} vrijednost ASP+-a kao inhibitora (slika 20; $n = 2$), brzina transporta 3 μM DAPI-ja prati se uz raspon koncentracija ASP+-a od 0,1 – 100 μM pri pH transportnog medija od 7,4, dok se za određivanje IC_{50} vrijednosti DAPI-ja kao inhibitora (slika 21; $n = 2$), prati brzina transporta 5 μM ASP+-a uz raspon koncentracija DAPI-ja 0,1 - 10 μM pri pH transportnog medija od 8,4. Rezultati povećanja fluorescencije u ovisnosti o koncentraciji inhibitora izraze se kao postotak brzine transporta (0 % odgovara najmanjoj vrijednosti brzine transporta, dok 100 % odgovara najvećoj vrijednosti brzine transporta) u ovisnosti o log koncentracije inhibitora. IC_{50} vrijednost ASP+-a te DAPI-ja odredi se pomoću GraphPad programa prilagodbom (fitanjem) sigmoidalne doza-odgovor krivulje podacima, prema jednadžbi:

$$V = V_{min} + \frac{V_{max} - V_{min}}{1 + 10^{(\log IC_{50} - A) \times h}}$$

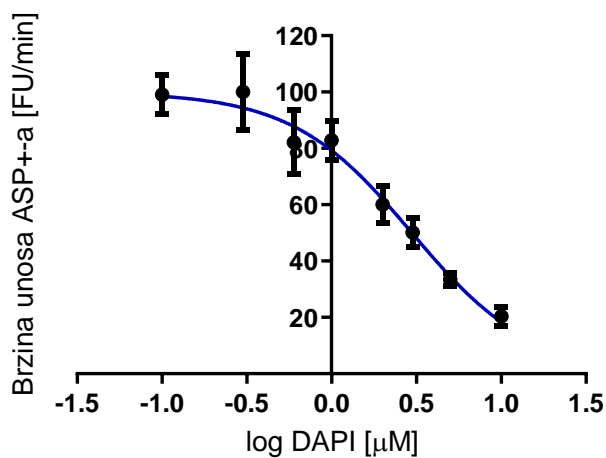
Na temelju prethodnih rezultata određivanja brzine transporta DAPI-ja odnosno ASP+-a pri različitim uvjetima pH transportnog medija te rezultata određivanja IC_{50} vrijednosti, može se zaključiti kako je DAPI bolji supstrat u ispitivanju aktivnosti Mate3 proteina. Transport DAPI-ja, u odnosu na ASP+, karakterizira veća V_{max} vrijednost, manja K_m vrijednost i izostanak pasivne difuzije u stanicu što znači da Mate3 ima veći afinitet prema DAPI-ju, nego prema ASP+-u. To je potvrđeno i manjom IC_{50} vrijednošću DAPI-ja u odnosu na ASP+, koja sugerira da je potrebna znatno manja količina DAPI-ja da inhibira transport ASP+-a, dok je potrebna dosta veća koncentracija ASP+-a kako bi došlo do inhibicije transporta DAPI-ja.



IC50 | **11.88**

95% CI (asymptotic) 10.01 to 14.10

Slika 20. Graf ovisnosti brzine unosa DAPI-ja (FUmin^{-1}) o log koncentraciji ASP+-a kao inhibitora (μM) pri pH 7,4 u Flp-In-293/drM3 stanicama, iz kojeg se iščita IC_{50} vrijednost ASP+-a.



IC50 | **2.973**

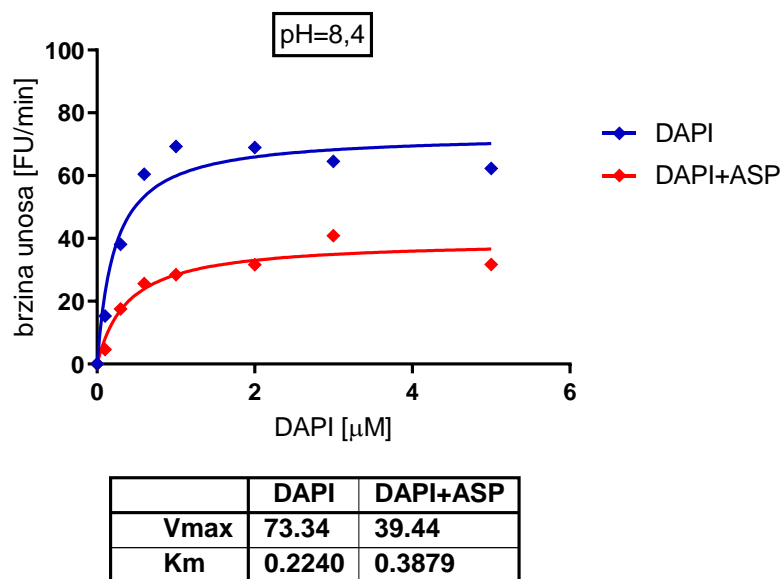
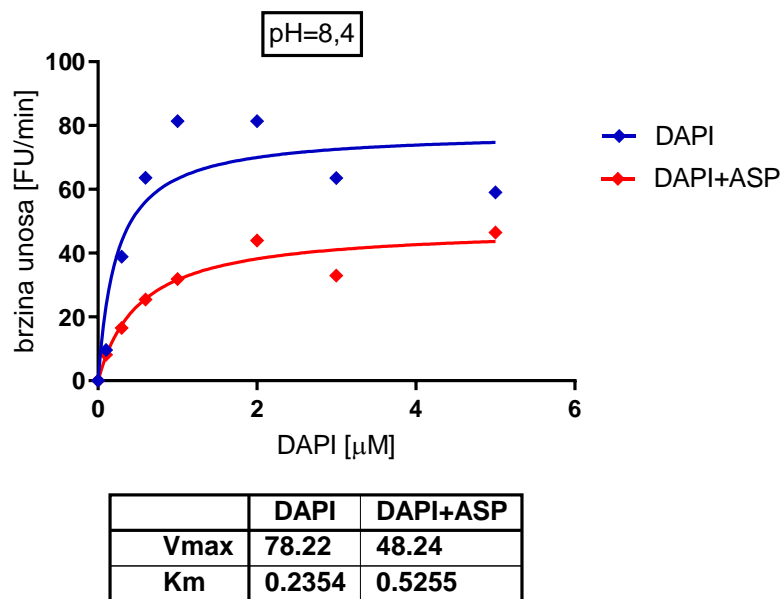
95% CI (asymptotic) 2.597 to 3.404

Slika 21. Graf ovisnosti brzine unosa ASP+-a (FUmin^{-1}) o log koncentraciji DAPI-ja kao inhibitora (μM) pri pH 8,4 u Flp-In-293/drM3 stanicama, iz kojeg se iščita IC_{50} vrijednost DAPI-ja.

4.5.3. Ispitivanje broja veznih mjesta Mate3 proteina

Kako bi se utvrdio broj veznih mjesta Mate3 proteina za supstrat, praćena je brzina transporta DAPI-ja u ovisnosti o njegovoj koncentraciji, bez inhibitora i uz ASP+ kao

inhibitor, pri koncentraciji ASP⁺-a od 12 μ M (IC_{50} vrijednost) (slika 22; n = 2). Pri tome, transport se odvijao u pH 8,4 umjesto u pH 7,4 zbog toga što je pokazano kako je brzina transporta DAPI-ja veoma dobra i pri pH 8,4 dok se transport ASP⁺ uopće nije odvijao pri pH 7,4 te je tako izbjegnuto pogrešno tumačenje rezultata. Usporedbom kinetičkih parametara (K_m i V_{max}) sa i bez inhibitora, izvodi se zaključak o broju veznih mjesta. Kako je dokazano da su i DAPI i ASP⁺ supstrati Mate3 transportnog proteina, ukoliko je njihov odnos tijekom transporta kompetitivan, odnosno u prisustvu inhibitora (ASP⁺) maksimalna brzina transporta DAPI-ja (V_{max}) ostaje ista, dok se K_m vrijednost povećava, to znači da Mate3 vjerojatno ima jedno vezno mjesto za supstrat na kojem se odvija kompeticija između vezanja DAPI-ja i ASP⁺-a, tj. potrebna je veća koncentracija DAPI-ja (veći K_m) za postizanje iste brzine transporta uslijed kompeticije sa ASP⁺-om za vezanje na Mate3. S druge strane, ukoliko postoje dva (ili više) vezna mjesta za supstrat, ASP⁺ se u tom slučaju veže nekompetitivno, odnosno veže se za drugo vezno mjesto zbog čega se afinitet Mate3 za vezanje DAPI-ja ne mijenja te K_m ostaje isti (DAPI ima drugo slobodno mjesto za vezanje), no dolazi do smanjenja brzine reakcije (V_{max}) transporta DAPI-ja uslijed mogućeg transporta ASP⁺-a. Dobiveni, neočekivani, rezultati kinetičkih parametara koji pokazuju povećanje K_m vrijednosti i smanjenje V_{max} vrijednosti kao posljedicu prisustva inhibitora mogli bi se, eventualno, objasniti prisutnošću dva vezna mjesta Mate3 proteina koji se nalaze u neposrednoj blizini, čime se osim očekivanog smanjenja V_{max} -a, smanjuje broj uspješnih interakcija drugog veznog mjesta i DAPI-ja što rezultira blagim povećanjem K_m vrijednosti. No, za razliku od ostalih eksperimenata koji su napravljeni sa Flp-In-293/drM3 i Flp-In-293/Mock stanicama u odličnom stanju, eksperiment određivanja broja veznih mjesta Mate3 proteina napravljen je sa stanicama koje su dosta sporije rasle i odljepljivale se od uzgojne podloge, stoga dobiveni rezultati nisu konkluzivni te je nužna dodatna provjera.



Slika 22. Grafovi ovisnosti brzine transporta DAPI-ja (FU/min) o koncentraciji DAPI-ja (μM), bez prisustva inhibitora (DAPI) i sa prisustvom inhibitora (DAPI + ASP) u koncentraciji ASP+ a od $12 \mu\text{M}$ (IC_{50}); prikazani su rezultati dvaju odvojenih ponavljanja.

Okolišni ksenobiotici znatno utječu na floru i faunu vodenih sustava te su poznati brojni primjeri u kojima je zagađena voda uzrokovala znatne štete na populacijama riba, utječući na njihovo reproduktivno zdravlje, razvoj embrija i larve te životni vijek. Glavni organi koji predstavljaju krajnje mete djelovanja ksenobiotika u riba su škrge, jetra i bubrezi, odnosno mjesta izlučivanja ksenobiotika iz organizma (Bambino i Chu, 2017). U zebrici je

identificirano šest transportnih proteina koji pripadaju SLC superobitelji, odnosno Mate obitelji transportnih proteina (Mate3-8) sa pretpostavljenom važnom ulogom u izbacivanju ksenobiotika iz organizma preko elektroneutralnog proton / supstrat antiporta, ponajviše putem jetre i bubrega. Pri tome, *mate3* gen pokazao je veoma visoku razinu transkripcije u bubrezima (dosta veću od ostalih Mate proteina), uz izraženu razliku u razini transkripcije između mužjaka i ženke. U svrhu karakterizacije Mate3 proteina, potrebno je identificirati potencijalne supstrate i inhibitore Mate3 proteina, pri čemu inhibitori mogu imati značajan ekotoksikološki učinak, smanjujući sposobnost zebrice za borbu protiv okolišnih ksenobiotika ili interferirajući sa transportom važnih fizioloških supstrata.

U svrhu razvoja sustava za ispitivanje interakcija Mate3 proteina sa okolišnim tvarima, uspješno je proizvedena stabilna rekombinantna Flp-In-293/drM3 stanična linija iz HEK293T stanica, koja prekomjerno eksprimira Mate3 protein te Flp-In-293/Mock stanična linija, kao negativna kontrola, koja ne sadrži *mate3* gen, već je transfecirana sa „praznim“ plazmidom. Stanice se mogu transfecirati prolazno, pri čemu ne dolazi do integracije *mate3* gena u genom stanica, no takva metoda je manje preferirana zbog toga što je, često, razina ekspresije transportera u stanicama varijabilna te tako dobiveni rezultati nisu međusobno usporedivi. Za stabilnu transfekciju, gen za rezistenciju na antibiotik, često higromicin, kotransfecira se u stanice zajedno s ekspresijskim plazmidom, omogućavajući stanicama domaćina da, pod selekcijskim pritiskom, konstitutivno ekspimiraju protein od interesa (Brouwer i sur., 2013). Kako bi se povećala učinkovitost transfekcije i omogućila integracija DNA na točno određenom mjestu, razvijeni su sustavi poput Flp-In sustava, koji omogućavaju integraciju DNA od interesa u genom preko Flp rekombinaza-posredovane mjesno-specifične rekombinacije. No, kod razvoja stabilne rekombinantne stanične linije, treba biti oprezan prilikom ekstrapolacije rezultata na organizam jer prekomjernom ekspresijom Mate3 proteina (odnosno bilo kojeg proteina) dolazi do narušavanja homeostaze stanica te je potrebno provesti *in vivo* eksperimente kako bi se uvidjele moguće razlike u funkcioniranju Mate3 proteina u prirodnim uvjetima u stanicama. Stanične linije sisavaca najčešće korištene u ekspresiji transportnih proteina su HEK293 (eng. *Human Embryonic Kidney*) i CHO (eng. *Chinese Hamster Ovary*) stanice, pri čemu se kao glavna prednost njihova korištenja u transportnim sustavima ističe niska razina aktivnosti transportera prirodno prisutnih u staničnoj membrani (Brouwer i sur., 2013). To je i dokazano kvantitativnim PCR-om, u kojem je razina transkripta humanih *SLC47A1* i *SLC47A2* gena, prirodno prisutnih u HEK293T stanicama, bila znatno manja u odnosu na pretjerano ekspimiran *mate3* gen

zebrice. Uz to, iznimno niska razina transkripta *SLC47A2* gena u korelaciji je s rezultatima rada Prasad i sur., iz 2016., u kojem je masenom spektrometrijom pokazano da je razina ekspresije MATE2-K u bubrezima ispod limita detekcije.

Studije mehanizma djelovanja pojedine tvari (ksenobiotika) zahtijevaju poznavanje načina na koji se funkcija produkta gena (proteina) mijenja, a to podrazumijeva mjerenje aktivnosti proteina. Određeni ksenobiotik može uzrokovati smanjenje aktivnosti proteina, koja mehanizmom povratne sprege, uzrokuje povećanje transkripcije relevantnog gena kako bi se povećala proizvodnja proteina i tako nadomjestila smanjena aktivnost. Ukoliko se promjena količine mRNA izjednači sa funkcionalnom promjenom proteina, dolazi se do potpuno krivog zaključka o djelovanju ksenobiotika. Manjak povezanosti između transkripcije i odgovora (aktivnosti) proteina primjećen je u brojnim studijama u kojima su se pokušavale objasniti funkcionalne posljedice izlaganja ksenobiotiku (Nikinmaa, 2014). Zbog toga, u radu nije razvijen sustav koji ima za cilj praćenje razine transkripta *mate3* gena uslijed izloženosti nekoj tvari, već je razvijen sustav u kojem je omogućeno praćenje i uspoređivanje aktivnosti produkta gena, odnosno transportnog proteina u prisustvu i odsustvu te tvari. U svrhu optimizacije takvog sustava transporta, koriste se poznati supstrati Mate3 proteina, fluorescentne boje DAPI i ASP+, kao pozitivne kontrole. Ukoliko nema transporta navedenih supstrata u Flp-In-293/drM3 stanicama, to je znak da eksperimentalni uvjeti nisu dobri (pH medija, broj ili stanje stanica) te ih treba modificirati. Pošto je Mate3 H⁺-ovisan antiporter, transport DAPI-ja i ASP+-a praćen je pri različitim pH vrijednostima transportnog medija kako bi se, preko mjerenja kinetičkih parametara (K_m i V_{max}), odredili optimalni pH uvjeti transporta. Kako bi se uspostavio jednostavniji transportni sustav unosa supstrata u stanice uz izbacivanje protona iz stanice, za razliku od prirodnog mehanizma izbacivanja supstrata iz stanica, potrebno je namjestiti pH transportnog medija tako da unutrašnjost stanice bude kiselija (više H⁺) u odnosu na izvanstanični prostor (manje H⁺), čime se osigurava transport protona izvan stanice, odnosno transport supstrata u stanicu. Pri tome, transport DAPI-ja i ASP+-a ispituje se pri izvanstaničnom pH od 7,4 tijekom kojeg se uspostavlja blagi koncentracijski gradijent protona u odnosu na unutrašnjost stanice, zatim pri većem koncentracijskom gradijentu uz izvanstanični pH od 8,4 te u uvjetima unutarstaničnog zakiseljavanja stanica inkubacijom u amonijevom kloridu (NH₄Cl), nakon čega se stanice ispiru i eksperiment se provodi pri pH 7,4. Kao rezultat, DAPI je izabran kao idealan supstrat za buduće ispitivanje interakcija Mate3 proteina s okolišnim tvarima, zbog optimalnih K_m i V_{max} vrijednosti dobivenih pri pH 7,4, što omogućava provođenje eksperimenata u uvjetima

najbližim fiziološkim uvjetima u stanici. Uz to, u Flp-In-293/Mock stanicama nije primijećena pasivna difuzija DAPI-ja u stanice, za razliku od prisutne pasivne difuzije ASP+-a. DAPI fluorescira tek vezanjem za dvolančanu DNA u jezgri, što znači da najprije mora biti transportiran preko membrane pa distribuiran u jezgri i tek onda vezan za DNA kako bi mogli detektirati promjenu intenziteta fluorescencije, stoga se brzina transporta DAPI-ja ne prati tijekom inicijalne faze reakcije, već se prati tijekom 10 minuta transporta. U radu Yasujima, i sur., iz 2010., ispitan je afinitet humanih MATE1 i MATE2 proteina za DAPI kao supstrat pri čemu je pokazan visok afinitet (K_m vrijednosti od 1,13 μM i 3,16 μM) za razliku od drugih važnih renalnih transportera organskih kationa (primjerice OCT2 i OCT3) koji nisu pokazali DAPI specifičan transport ili je bio prisutan uz značajno manji afinitet i brzinu transporta. Također, optimalne vrijednosti transporta DAPI-ja dobivene su pri pH 7,5, pri čemu nije bilo značajne razlike u odnosu na transport uz unutarstanično zakiseljavanje, što je pokazalo da transport DAPI-ja ne zahtijeva značajan transmembranski gradijent protona. Osim toga, u Mock stanicama kao kontroli nije bila prisutna pasivna difuzija DAPI-ja u stanice. Sve to, uz mogućnost praćenja transporta u realnom vremenu povećanjem intenziteta fluorescencije, ukazuje na veliki potencijal u korištenju DAPI-ja kao specifičnog supstrata MATE proteina. Također, u radu Lončar i sur., iz 2016., pokazano je kako svi Mate proteini zebrice transportiraju DAPI većim afinitetom nego druge testirane supstrate (ASP+, etidij bromid, rodamin, berberin itd.), pri čemu je K_m vrijednost transporta posredovanog Mate3 proteinom pri pH 7,4 iznosila 2,83, što odgovara izmjerenoj K_m vrijednosti u ovom radu od 2,072. Za razliku od toga, u radovima Otsuka i sur., iz 2005., Lechner i sur., iz 2016. te Masuda i sur., iz 2006., u kojima je praćen transport metformina, tiamina, tetraetilamonija (TEA), cimetidina i dr. kao supstrata MATE proteina, pokazana je znatna razlika u brzini transporta supstrata između pH transportnog medija od 7,4 i unutarstaničnog zakiseljavanja u korist zakiseljavanja te potreba radioaktivnog obilježavanja supstrata u svrhu njihove detekcije, što dodatno potvrđuje važnost DAPI-ja kao specifičnog MATE supstrata u optimizaciji sustava transporta.

U razvoju stabilnog sustava za ispitivanje interakcija, osim pozitivne kontrole, od iznimne je važnosti postojanje i negativne kontrole, odnosno Flp-In-293/Mock stanica. U prvom redu, one služe za razlikovanje specifičnog transporta supstrata posredovanog Mate3 proteinom od pasivne difuzije supstrata kroz staničnu membranu. Osim toga, organska otapala koja se koriste u svrhu otapanja spojeva koji se ispituju kao interaktori Mate3 proteina, ovisno o koncentraciji, mogu narušavati integritet stanične membrane te se dobiju lažno pozitivni rezultati, interpretirani kao povećanje intenziteta fluorescencije.

Nakon odabira supstrata čiji će se transport pratiti, u svrhu određivanja interakcija, u prisustvu potencijalnih supstrata i inhibitora Mate3 proteina, posljednji korak optimizacije sustava podrazumijeva određivanje broja veznih mjesta za supstrat Mate3 proteina. Ukoliko je iz kinetičkih parametara transporta ASP+-a i DAPI-ja (jednog kao supstrata, drugog kao inhibitora) jasno vidljiva njihova kompeticija za vezanje, karakterizirana povećanjem K_m vrijednosti u prisustvu inhibitora pri čemu V_{max} ostaje isti, to je jasna indikacija jednog veznog mjesta za supstrat. Ukoliko je to slučaj, ispitivanje interakcija toksičnih spojeva s Mate3 proteinom provodilo bi se, najprije, određivanjem kinetičkih parametara transporta DAPI-ja u prisustvu i odsustvu ispitivanog spoja, pri čemu bi kompetitivna inhibicija kao rezultat sugerirala da je ispitivana tvar supstrat, dok bi nekompetitivna inhibicija ukazivala na prisustvo potencijalnog inhibitora. Nakon toga, dobiveni rezultati kinetičkog eksperimenta potvrdili bi se ili opovrgnuli provođenjem testova toksičnosti (često MTT test) u kojima se uspoređuje preživljenje Flp-In-293/drM3 stanica u odnosu na Flp-In-293/Mock stanice. Pri tome, ukoliko su rezultati kinetičkog eksperimenta sugerirali da je ispitivana toksična tvar potencijalan supstrat Mate3 proteina, transport te toksične tvari pratio bi se u Flp-In-293/drM3 stanicama u odnosu na Flp-In-293/Mock stanice pri čemu bi preživljenje Flp-In-293/drM3 stanica bilo manje ukoliko bi toksična tvar zaista bivala transportirana putem Mate3. S druge strane, prisustvo inhibitora dokazalo bi se usporedbom transporta DAPI-ja (kao toksičnog supstrata) u Flp-In-293/drM3 stanicama u prisustvu tvari koja je potencijalni inhibitor i bez nje, pri čemu bi preživljenje Flp-In-293/drM3 stanica u koje je bio dodan inhibitor bilo veće ukoliko je ispitivana tvar zaista inhibirala Mate3-posredovan transport DAPI-ja. Uz to, kada gledamo preživljenje stanica uslijed prisustva inhibitora koji inhibira transport toksičnog supstrata, moramo imati Flp-In-293/Mock kao negativnu kontrolu jer ispitivani spoj može biti toksičan za stanice uslijed čega će stanice umirati bez obzira na transport toksičnog supstrata te tako možemo dobiti lažno negativne rezultate izostanka inhibicije transporta. U radu Lončar i Smital, iz 2018., pokazano je da Mate7 transportni protein zebrice ima jedno vezno mjesto za supstrat. Ukoliko bi ponovljeni eksperiment određivanja broja Mate3 veznih mjesta sa stanicama u dobrom stanju, pokazao iste rezultate, odnosno postojanje više od jednog veznog mjesta za supstrat, ispitivanje interakcija Mate3 proteina usporedbom kinetičkih parametara ne bi bilo moguće te bi se interakcije mogle ispitivati isključivo testovima toksičnosti ili bi se prisustvo određenog supstrata u stanicama određivalo uporabom kromatografskih metoda, poput HPLC-a ili radioaktivnim obilježavanjem testiranih spojeva.

5. ZAKLJUČCI

1. Na temelju rezultata kvantitativnog PCR-a, zaključuje se da je transfekcijom humanih embrionalnih stanica bubrega (HEK293T) pomoću Flp-In rekombinacijskog sustava, uspješno proizvedena stabilna Flp-In-293/drM3 stanična linija, koja prekomjerno eksprimira Mate3 transmembranski transportni protein zebrice (*Danio rerio*) te stabilna Flp-In-293/Mock stanična linija transfecirana sa plazmidom koji ne sadrži *mate3* gen (tzv. „prazni“ plazmid) te tako služi kao negativna kontrola eksperimenta. Količina transkripta *mate3* gena u Flp-In-293/drM3 staničnoj liniji, izražena kao srednja normalizirana vrijednost (MNE), iznosi 296277×10^6 , dok količina transkripta *mate3* gena u Flp-In-293/Mock staničnoj liniji, izražena kao MNE, iznosi tek 29×10^6 što se pripisuje kontaminaciji uzorka.

2. Na temelju rezultata kvantitativnog PCR-a, zaključuje se da je u Flp-In-293/drM3 stanicama razina transkripcije humanih gena, koji kodiraju za MATE proteine (*SLC47A1*, *SLC47A2*) prirodno prisutne u HEK293T stanicama, zanemariva u odnosu na razinu transkripcije prekomjerno ekspimiranog *mate3* gena. Količina transkripta *mate3* gena u Flp-In-293/drM3 staničnoj liniji, izražena kao srednja normalizirana vrijednost (MNE), iznosi 296277×10^6 , dok je količina transkripta *SLC47A1* gena, koji kodira za humani MATE1 transportni protein, 50 puta manja te iznosi 5859×10^6 , a količina transkripta *SLC47A2* gena, koji kodira za humani MATE2 transportni protein, zanemariva te iznosi 9×10^6 .

3. Mjerenjem transporta dva fluorescentna supstrata Mate3 proteina (DAPI i ASP+), u Flp-In-293/drM3 i Flp-In-293/Mock stanicama, i uspoređivanjem dobivenih rezultata, dokazana je aktivnost Mate3 proteina u Flp-In-293/drM3 stanicama te je odabran optimalan, visoko procesivan, sustav koji se može koristiti u svrhu ispitivanja interakcija Mate3 proteina sa okolišnim tvarima. Kao idealan supstrat Mate3 proteina, u svrhu budućeg ispitivanja interakcija, pokazao se DAPI čija je optimalna vrijednost kinetičkih parametara ($K_m = 2,072$; $V_{max} = 417,7$) izmjerena pri pH transportnog medija od 7,4 čime se transport odvija u uvjetima koji najvjernije oponašaju prirodne uvjete transporta u organizmu, stoga je moguća najbolja ekstrapolacija rezultata na *in vivo* sustav. Uz to, za razliku od ASP+-a, nema pasivne difuzije DAPI-ja kroz staničnu membranu.

4. Izostankom transporta supstrata u Flp-In-293/Mock staničnoj liniji, koji bi se osim pasivnom difuzijom mogao odvijati putem humanog MATE1 proteina čija je prisutnost

dokazana kvantitativnim PCR-om (količina transkripta *SLC47A1* gena iznosi 3315×10^6) ili nekim drugim transporterom, dokazano je kako rezultati transporta u Flp-In-293/drM3 stanicama prikazuju isključivo transport putem Mate3 transportnog proteina zebrice, odnosno korišteni sustav ispitivanja transporta nije dovoljno osjetljiv za detekciju transporta putem humanog MATE1 proteina prirodno prisutnog u HEK293T stanicama.

5. Ispitivanje broja veznih mjesta Mate3 proteina mjerenjem transporta DAPI-ja u prisustvu ASP+-a kao inhibitora, rezultiralo je smanjenjem V_{max} i povećanjem K_m vrijednosti što ukazuje na moguće postojanje više od jednog veznog mjesta za supstrat. No, zbog lošijeg stanja testiranih stanica, dobiveni rezultati nisu konkluzivni te bi se hipoteza o postojanju više veznih mjesta trebala provjeriti dodatnim eksperimentima.

6. LITERATURA

Abaandou, L., Quan, D., Shiloach, J. (2021) Affecting HEK293 cell growth and production performance by modifying the expression of specific genes. *Cells* **10**, 1667.

Bambino, K., Chu, J. (2017) Zebrafish in toxicology and environmental health. *Curr. Top. Dev. Biol.* **124**, 331–367.

Boudou, A., Ribeyre, F. (1997) Aquatic ecotoxicology: from the ecosystem to the cellular and molecular levels. *Environ. Health Persp.* **105**, 21-35.

Brouwer, K. L. R., Keppler, D., Hoffmaster, K. A., Bow, D. A. J., Cheng, Y., Lai, Y., Palm, J. E., Stieger, B., Evers, R. (2013). In vitro methods to support transporter evaluation in drug discovery and development. *Clin. Pharmacol. Ther.* **94**, 95-112.

Dai, Y-J., Jia, Y-F., Chen, N., Bian, W-P., Li, Q-K., Ma, Y-B., Chen, Y-L., Pei, D-S. (2014) Zebrafish as a model system to study toxicology. *Environ. Toxicol. Chem.* **33**, 11-17.

Hill, A. J., Teraoka, H., Heideman, W., Peterson, R. E. (2005) Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol. Sci.* **86**, 6-19.

Hodgson, E. (2004) *A Textbook of Modern Toxicology*, 3. izd., John Wiley & Sons, New Jersey.

Inyinbor, A. A., Adebisin, B. O., Oluyori, A. P., Adelani-Akande, T. A., Dada, A. O., Oreofe, T. A. (2018) Water pollution: effects, prevention, and climatic impact. U: Water challenges of an urbanizing world, (Glavan, M., ured.), IntechOpen, London, str. 33-53.

Jacquin, L., Petitjean, Q., Côte, J., Laffaille, P., Jean, S. (2020) Effects of pollution on fish behavior, personality, and cognition: some research perspectives. *Front. Ecol. Evol.* **8**, 1-12.

Khan, F. R., Alhewairini, S. S. (2019) Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism. U: Current trends in cancer management, (Streba, L., ured.), IntechOpen, London, str. 1-16.

Kusakizako, T., Miyauchi, H., Ishitani, R., Nureki, O. (2020) Structural biology of the multidrug and toxic compound extrusion superfamily transporters. *BBA-biomembranes* **1862**, 82-96.

Lechner, C., Ishiguro, N., Fukuhara, A., Shimizu, H., Ohtsu, N., Takatani, M., Nishiyama, K., Washio, I., Yamamura, N., Kusuhara, H. (2016) Impact of experimental conditions on the evaluation of interactions between multidrug and toxin extrusion proteins and candidate drugs. *Drug. Metab. Dispos.* **44**, 1381–1389.

Lončar, J., Popović, M., Krznar, P., Zaja, R., Smital, T. (2016) The first characterization of multidrug and toxin extrusion (MATE/SLC47) proteins in zebrafish (*Danio rerio*). *Sci. Rep.-UK* **6**, 1-15.

Lončar, J., Smital, T. (2018) Interaction of environmental contaminants with zebrafish (*Danio rerio*) multidrug and toxin extrusion protein 7 (Mate7/Slc47a7). *Aquat. Toxicol.* **205**, 193-203.

Masuda, S., Terada, T., Yonezawa, A., Tanihara Y., Kishimoto, K., Katsura, T., Ogawa, O., Inui, K. (2006) Identification and functional characterization of a new human kidney-specific H⁺/organic cation antiporter, kidney-specific multidrug and toxin extrusion 2. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, 2127-2135.

Motohashi, H., Inui, K-I. (2013) Organic Cation Transporter OCTs (SLC22) and MATEs (SLC47) in the human kidney. *AAPS. J.* **15**, 581-588.

Nies, A. T., Damme, K., Kruck, S., Schaeffeler, E., Schwab, M. (2016) Structure and function of multidrug and toxin extrusion proteins (MATEs) and their relevance to drug therapy and personalized medicine. *Arch. Toxicol.* **90**, 1555–1584.

Nikinmaa, M. (2014) An introduction to aquatic toxicology, 1. izd., Elsevier, Amsterdam.

Omote, H., Hiasa, M., Matsumoto, T., Otsuka, M., Moriyama Y. (2006) The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations. *Trends Pharmacol. Sci.* **27**, 587-593.

Otsuka, M., Matsumoto, T., Morimoto, R., Arioka, S., Omote, H., Moriyama, Y. (2005) A human transporter protein that mediates the final excretion step for toxic organic cations. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 17923-17928.

Prasad, B., Johnson, K., Billington, S., Lee, C., Chung, G. W., Brown, C. D. A., Kelly, E. J., Himmelfarb J., Unadkat, J. D. (2016) Abundance of drug transporters in the human kidney cortex as quantified by quantitative targeted proteomics. *Drug Metab. Dispos.* **44**, 1920-1924.

Ribas, L., Piferrer, F. (2014) The zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research. *Rev. Aquacult.* **6**, 209-240.

Tavares, B., Santos Lopes, S. (2013) The importance of zebrafish in biomedical research. *Acta. Medica Port.* **26**, 583-592.

Višić, H. (2017) Procjena toksičnosti onečišćenog sedimenta rijeke Save na embrije ribe zebrice (*Danio rerio*) (rad za rektorovu nagradu), Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Wells, P. G. (2009) Aquatic toxicology: concepts, practice, new directions. U: General, applied and system toxicology, (Casciano, D. A., Sahu, S. C., Ballantyne, B., Marrs, T. C., Syversen, T., ured.), John Wiley & Sons, New Jersey, str. 84-118.

Yasujima, T., Ohta, K., Inoue, K., Ishimaru, M., Yuasa, H. (2010) Evaluation of 4,6-diamidino-2-phenylindole as a fluorescent probe substrate for rapid assays of the functionality of human multidrug and toxin extrusion proteins. *Drug Metab. Dispos.* **38**, 715-721.

Yazaki, K., Sugiyama, A., Morita, M., Shitan, N. (2008) Secondary transport as an efficient membrane transport mechanism for plant secondary metabolites. *Phytochem. Rev.* **7**, 513-524.

Yonezawa, A., Inui, K-I. (2011) Importance of the multidrug and toxin extrusion MATE/SLC47A family to pharmacokinetics, pharmacodynamics/toxicodynamics and pharmacogenomics. *Brit. J. Pharmacol.* **164**, 1817-1825.

Zeitoun, M. M., Mehana, E. E. (2014) Impact of water pollution with heavy metals on fish health: overview and updates. *Glob. Vet.* **12**, 219-231.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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



Lana Mišić