

Sveučilište u Zagrebu

## PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET BIOLOŠKI ODSJEK

ANTEA TALAJIĆ

# Karakterizacija homologa onkogena R-RAS2 i supresora metastaziranja BRMS1 iz spužve *Eunapius subterraneus*

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2025.



Sveučilište u Zagrebu

## PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET BIOLOŠKI ODSJEK

ANTEA TALAJIĆ

# Karakterizacija homologa onkogena R-RAS2 i supresora metastaziranja BRMS1 iz spužve *Eunapius subterraneus*

DOKTORSKI RAD

Mentorica: dr. sc. Helena Ćetković

Zagreb, 2025.



University of Zagreb

### FACULTY OF SCIENCE DEPARTMENT OF BIOLOGY

ANTEA TALAJIĆ

# Characterization of oncogene R-RAS2 and metastasis suppressor BRMS1 homologs from the sponge *Eunapius subterraneus*

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor: Dr. Helena Ćetković

Zagreb, 2025.

Ovaj doktorski rad izrađen je u Laboratoriju za molekularnu genetiku Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković, pod mentorstvom dr. sc. Helene Ćetković, znanstvene savjetnice u trajnom izboru IRB-a, u sklopu Sveučilišnog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Ovaj rad izrađen je i financiran u okviru projekta "Geni spužvi povezani s nastankom raka" Hrvatske zaklade za znanost (voditeljica dr. sc. Helena Ćetković; IP-2019-04-5382).

#### ŽIVOTOPIS MENTORA

Helena Ćetković rođena je 1968. godine u Zagrebu, gdje je završila osnovnu i srednju školu. Diplomirala je 1993. na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, smjer molekularna biologija, magistrirala je 1997., a 2003. obranila je doktorsku disertaciju (smjer molekularna i stanična biologija, PMF) pod mentorstvom dr. sc. Vere Gamulin. Od 1994. radi na Institutu Ruđer Bošković u Laboratoriju za molekularnu genetiku gdje kontinuirano napreduje: 1999. u asistenta, 2003. višeg asistenta, 2005. znanstvenog suradnika, 2010. višeg znanstvenog suradnika, 2017. znanstvenog savjetnika, te 2024. u znanstvenog savjetnika u trajnom izboru. Od 2018. voditeljica je Laboratorija za molekularnu genetiku. Njezino područje istraživanja je molekularna evolucija Metazoa s naglaskom na evoluciju gena/proteina, organizaciju genoma i funkciju važnih proteina te filogeniju koristeći uglavnom najjednostavnije mnogostanične životinje - spužve kao modelni organizam. Do sada je objavila 57 znanstvenih radova u bazi podataka WoSCC koji su citirani preko 1000 puta, uz Hindeks 19. Vodila je jedan projekt financiran od Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta te jedan projekt financiran od Hrvatske zaklade za znanost te je sudjelovala na brojnim projektima kao suradnica ili voditeljica istraživačke grupe. Sudjelovala je u održavanju nastave na dodiplomskoj i poslijediplomskoj razini na PMF-u. Od 2008. godine nositeljica je kolegija "Određivanje i analiza primarne strukture DNA" u sklopu Doktorskog studija biologije na PMF-u, a od 2023. uključena je kao suradnik u organizaciju i izvođenje III ciklusa Doktorskog studija po bolonjskom principu na Odsjeku za biologiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Sarajevu, BiH. Bila je mentorica jedanaest diplomskih radova, šest doktorskih disertacija i vodila je sedam poslijedoktoranada. Dobitnica je šest Godišnjih nagrada Instituta Ruđer Bošković za znanstveni rad i Nagrade "Josip Juraj Strossmayer" za rad na knjizi "Metode u molekularnoj biologiji", na kojoj je jedna od urednica. Do sada je sudjelovala u organizaciji dvaju znanstvenih kongresa kao članica znanstvenih odbora. Također je bila suorganizatorica međunarodne konferencije International Congress of the NDP Kinase/Nm23/Awd Family (NDPK2016) koja se održala u Dubrovniku, te međunarodne radionice "Seminar on communicable diseases prevention and control" (organizator TAIEX, Medicinski fakultet i Institut Ruđer Bošković) koja se održala 2007. u Zagrebu. Bila je predsjednica Znanstvenog vijeća struke Biologija i članica Znanstvenog vijeća (2019. - 2022.), a od 2015. do danas član je Povjerenstva za kapitalnu opremu na IRB-u. Članica je Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju te Hrvatskog genetičkog društva, a od 2022. pomoćna je urednica časopisa Periodicum Biologorum.

Zahvaljujem mentorici dr. sc. Heleni Ćetković na prenesenom znanju, idejama, stručnom vodstvu i pomoći tijekom izrade i pisanja ove doktorske disertacije. Puno Vam hvala na ukazanom povjerenju, podršci i svemu što ste me naučili.

Veliko hvala doc. dr. sc. Kristini Dominko, neposrednoj voditeljici ovog doktorskog rada, na prenesenom znanju i savjetima. Hvala ti što si uvijek bila spremna pomoći i odgovoriti na sva moja pitanja, na uspomenama sa zajedničkih putovanja i prijateljskim razgovorima.

Zahvaljujem svim svojim kolegama iz Laboratorija za molekularnu genetiku koji su uvijek bili spremni pružiti pomoć i podršku te na ugodnoj radnoj atmosferi...

... dr. sc. Nikolini Škrobot Vidaček i dr. sc. Silvestru Beljanu koji su od samog početka radili sa mnom u laboratoriju, na prenesenom znanju, podršci i druženju.

... dr. sc. Andrei Hloušek-Kasun i dr. sc. Petri Mikolčević na savjetima i pomoći tijekom izolacije proteina, strpljenju za sva moja pitanja i što su mi dane na poslu učinile zabavnijima. ... dr. sc. Bastien Lucien Jean Proustu i dr. sc. Ivi Zonjić na druženju, savjetima i pomoći prilikom dovršetka ove disertacije.

... Magdaleni Grgić, Ladi Jovović, Mateu Čupiću i Luciji Kauf, kolegama s poslijediplomskog studija s kojima sam dijelila probleme i iskustva u njihovu savladavanju.

Zahvaljujem svim članovima Laboratorija za mitohondrijsku bioenergetiku i dijabetes, gdje sam radila sa staničnim kulturama i gdje sam uvijek mogla računati na pomoć i podršku.

Zahvaljujem Luciji Horvat, mag. biol. mol., na tehničkoj pomoći mikroskopiranja na konfokalnom mikroskopu, osobito za vrijeme bezbrojnih sati rada na spužvinim stanicama.

Zahvaljujem kolegama s drugih zavoda Instituta Ruđer Bošković koji su uvijek bili spremni pružiti savjet i pomoći.

Hvala mojim prijateljima na svakom razgovoru, podršci i smijehu kada mi je to najviše trebalo. Neizmjerno hvala mojoj obitelji – mami, tati, Emi, Mariji i Emilu – na bezuvjetnoj ljubavi, strpljenju i što su uvijek tu za mene.

I na kraju, od srca hvala Luci i Vedranu što vjeruju u mene i svakom mom uspjehu daju poseban smisao. Hvala i malenoj bebi koja tek stiže – bila si mi najveća motivacija da ovu disertaciju privedem kraju.

### Karakterizacija homologa onkogena R-RAS2 i supresora metastaziranja BRMS1 iz spužve *Eunapius subterraneus*

#### ANTEA TALAJIĆ

Institut Ruđer Bošković

Rak je bolest čiji molekularni mehanizmi još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni, a smatra se kako se pojavio tijekom rane evolucije Metazoa. Spužve (Porifera), kao jedna od najstarijih skupina životinja, imaju jednostavnu morfologiju, no kompleksan genom u kojemu većina gena/proteina pokazuje značajnu očuvanost s homolozima kod kralježnjaka, što ih čini dobrim modelnim organizmom za proučavanje raka iz evolucijske perspektive. U ovom radu analizirani su homolozi onkogena R-RAS2 i supresora metastaziranja BRMS1 iz slatkovodne spiljske spužve *Eunapius subterraneus*. Sveobuhvatna filogenetska analiza razjasnila je evolucijske odnose proteina R-RAS2 i BRMS1 unutar Metazoa. Metodom imunofluorescencije određen je unutarstanični smještaj egzogenih proteina R-RAS2 i BRMS1 iz spužve i čovjeka u stanicama spužve, te u normalnim i tumorskim staničnim linijama čovjeka. Pokazana je evolucijska očuvanost biokemijskih i bioloških svojstava proteina R-RAS2 i BRMS1 između spužve i čovjeka u stanicama spužve, uključujući i njihovu ulogu u procesima povezanima s rakom. Dobiveni rezultati upućuju na to da je onkogeni/supresorski potencijal proteina R-RAS2 i BRMS1 nastao vrlo rano u evoluciji, a usko je povezan s osnovnim funkcijama ovih proteina u stanici.

(125 stranica / 43 slike / 9 tablica / 199 literaturnih navoda / jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: R-RAS2, BRMS1, rak, evolucija, Porifera

Mentorica: dr. sc. Helena Ćetković, znanstvena savjetnica u trajnom izboru, IRB

Ocjenjivači: dr. sc. Andreja Ambriović Ristov, znanstvena savjetnica u trajnom izboru; izv. prof. dr. sc. Rosa Karlić; dr. sc. Petra Mikolčević, znanstvena suradnica; prof. dr. sc. Maja Matulić (zamjena)

# Characterization of oncogene R-RAS2 and metastasis suppressor BRMS1 homologs from the sponge *Eunapius subterraneus*

#### ANTEA TALAJIĆ

Ruđer Bošković Institute

Cancer is one of the most complex human diseases, but the mechanisms underlying its onset and progression are not yet fully understood. It is likely that cancer appeared during the early evolution of Metazoa. Sponges (Porifera), among the earliest-diverging animal lineages, possess a simple morphology but a complex genome, with many genes/proteins highly conserved to their vertebrate homologs. Therefore, sponges provide a suitable model for studying cancer-related genes within a broader evolutionary context. In the current study, we analyzed R-RAS2 oncogene and BRMS1 metastasis suppressor homologs from the freshwater cave sponge *Eunapius subterraneus*. Comprehensive phylogenetic analysis revealed the evolutionary relationships of R-RAS2 and BRMS1 proteins within Metazoa. Our transfection experiments showed the intracellular localization of exogenous sponge and human R-RAS2 and BRMS1 in both sponge and human cells. We revealed that the biochemical and biological features of R-RAS2 and BRMS1 are evolutionarily conserved between sponges and humans, underlining their roles in cancer-related processes. Our findings suggest that the oncogenic and metastasis-suppressing potential of R-RAS2 and BRMS1 emerged early in metazoan evolution, indicating their important functions in fundamental cellular pathways.

(125 pages, 43 figures, 9 tables, 199 references, original in Croatian)

Keywords: R-RAS2, BRMS1, cancer, evolution, Porifera

Supervisor: Dr. Helena Ćetković, Senior Scientist with Tenure, IRB

Reviewers: Dr. Andreja Ambriović Ristov, Senior Scientist with Tenure; Assoc. Prof. Dr. Rosa Karlić; Dr. Petra Mikolčević, Research Associate; Prof. Dr. Maja Matulić (Substitute Member)

### SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	LITERATURNI PREGLED	4
	2.1. Spužve (Porifera)	4
	2.2. Spužve kao modelni organizam	5
	2.3. Slatkovodna spiljska spužva Eunapius subterraneus	7
	2.4. Protein R-RAS2 (Ras-related protein 2)	8
	2.4.1. Superobitelj proteina Ras	8
	2.4.2. Podobitelj Ras-srodnih proteina (Ras-related protein subfamily)	9
	2.4.3. Struktura proteina R-RAS2	. 10
	2.4.4. Signalni putevi proteina R-RAS2	. 11
	2.4.5. Uloga proteina R-RAS2 u raku	. 13
	2.5. Protein BRMS1 (Breast cancer metastasis suppressor 1)	. 14
	2.5.1. Protein BRMS1 kao dio kompleksa Sin3-HDAC	. 14
	2.5.2. Proteini obitelji BRMS1	. 15
	2.5.3. Struktura i regulacija proteina BRMS1	. 17
	2.5.4. Signalni putevi proteina BRMS1	. 19
	2.5.5. Uloga proteina BRMS1 u raku	. 20
3.	MATERIJALI I METODE	23
	3.1. Animalni model	23
	3.2. Stanični modeli	23
	3.2.1. Stanične linije čovjeka u kulturi	23
	3.2.2. Primarna kultura stanica spužve	24
	3.3. Bakterijski sojevi i plazmidi	. 24
	3.3.1. Sojevi bakterije E. coli	. 24
	3.3.2. Komercijalno dostupni plazmidi	24
	3.4. Izolacija RNA i sinteza cDNA iz spužve E. subterraneus	25
	3.4.1. Elektroforeza nukleinskih kiselina u agaroznom gelu	26
	3.5. Bioinformatičke metode	26
	3.6. Kloniranje gena od interesa u ekspresijske vektore	27
	3.6.1. Izrada početnica	28
	3.6.2. Umnažanje DNA lančanom reakcijom polimeraze	30
	3.6.3. Razgradnja DNA fragmenata i vektora restrikcijskim endonukleazama	30

3.6.4. Ligacija DNA pomoću DNA-ligaze	. 31
3.7. Transformacija odabranih sojeva bakterije <i>E. coli</i>	. 31
3.7.1. Transformacija elektrokompetentnog soja OneShot TOP10 elektroporacijom	. 31
3.7.2. Kemijska transformacija ekspresijskog soja BL21 CodonPlus (DE3) pLysS	. 31
3.7.3. Izolacija plazmidne DNA iz bakterijskih kolonija	. 32
3.7.4. Provjera rekombinantnog plazmida restrikcijskim enzimima i sekvenciranjem	. 33
3.8. Metode izolacije proteina i biokemijski testovi	. 33
3.8.1. Pročišćavanje proteina metodom afinitetne kromatografije	. 33
3.8.1.1. Prekomjerna ekspresija proteina od interesa	. 33
3.8.1.2. Priprema proteinskog ekstrakta za izolaciju	. 34
3.8.1.3. Pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom na TALON agarozi	. 35
3.8.1.4. Ukoncentriravanje proteina i izmjena pufera ultrafiltracijom	. 35
3.8.2. Natrij dodecil sulfat-elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)	. 35
3.8.3. Određivanje koncentracije proteina na spektrofotometru	. 36
3.8.4. Test određivanja GTPazne aktivnosti proteina	. 37
3.8.5. Test vezanja proteina na molekulu RNA	. 37
3.9. Metode biološke karakterizacije proteina	. 38
3.9.1. Prolazna transfekcija staničnih linija čovjeka i primarnih stanica spužve	. 38
3.9.2. Određivanje razine ekspresije proteina metodom Western blot	. 38
3.9.2.1. Priprema staničnog lizata	. 38
3.9.2.2. Određivanje koncentracije proteina u staničnim lizatima	. 39
3.9.2.3. Vizualizacija proteina metodom Western blot	. 39
3.9.3. Određivanje protein-protein interakcija metodom koimunoprecipitacije	. 41
3.9.4. Određivanje unutarstaničnog smještaja proteina	. 41
3.9.4.1. Određivanje unutarstaničnog smještaja fluorescentno obilježenih proteina .	. 42
3.9.4.2. Određivanje smještaja proteina metodom imunofluorescencije	. 42
3.9.5. Određivanje biološke funkcije proteina u procesima povezanima s rakom	43
3.9.5.1. Ispitivanje uloge proteina u procesu stanične proliferacije	. 44
3.9.5.2. Ispitivanje uloge proteina u procesu stanične migracije	. 44
3.9.5.3. Ispitivanje uloge proteina u procesu stvaranja kolonija	. 45
3.10. Statistička obrada podataka	. 45
4. REZULTATI	. 47
4.1. Izolacija RNA i sinteza cDNA iz spužve Eunapius subterraneus	. 47

4.2. Karakterizacija homologa proteina R-RAS2 iz spužve i usporedba s proteinom R- RAS2 iz čovjeka
4.2.1. Bioinformatička analiza evolucijske prošlosti proteina podobitelji R-Ras
4.2.1.1. Filogenetska analiza proteina podobitelji R-Ras
4.2.1.2. Analiza evolucijske očuvanosti ključnih domena i motiva proteina R-RAS2 51
4.2.1.3. Analiza strukture gena r-ras2
4.2.2. Biokemijska analiza proteina R-RAS2 iz spužve i čovjeka
4.2.2.1. Pročišćavanje rekombinantnih proteina R-RAS2 iz spužve i čovjeka
4.2.2.2. GTPazna aktivnost proteina R-RAS2 iz spužve i čovjeka
4.2.2.3. Sposobnost vezanja proteina R-RAS2 iz spužve i čovjeka na molekulu RNA . 58
4.2.3. Biološka analiza proteina R-RAS2 iz spužve i čovjeka
4.2.3.1. Unutarstanični smještaj proteina R-RAS2 iz spužve i čovjeka
4.2.3.2. Kolokalizacija proteina R-RAS2 iz spužve i čovjeka s biljezima endosomalnog puta
4.2.3.3. Uloga proteina R-RAS2 iz spužve i čovjeka u procesima povezanima s rakom
4.3. Karakterizacija homologa proteina BRMS1 iz spužve i usporedba s proteinima BRMS1 i BRMS1-like iz čovjeka69
4.3.1. Bioinformatička analiza evolucijske prošlosti proteina BRMS1 69
4.3.1.1. Analiza evolucijske očuvanosti ključnih domena i motiva proteina BRMS1 70
4.3.1.2. Filogenetska analiza proteina BRMS1 i BRMS1-like
4.3.1.3. Analiza strukture gena brms177
4.3.2. Biokemijska analiza proteina BRMS1 iz spužve i čovjeka
4.3.2.1. Pročišćavanje rekombinantnih proteina BRMS1 iz spužve i čovjeka
4.3.2.2. Ispitivanje interakcija proteina BRMS1 metodom koimunoprecipitacije81
4.3.3. Biološka analiza proteina BRMS1 iz spužve te proteina BRMS1 i BRMS1-like iz čovjeka
4.3.3.1. Unutarstanični smještaj proteina BRMS1 iz spužve te proteina BRMS1 i BRMS1-like iz čovjeka
4.3.3.2. Uloga proteina BRMS1 iz spužve te proteina BRMS1 i BRMS1-like iz čovjeka u procesima povezanima s rakom
5. RASPRAVA
5.1. Protein R-RAS2
5.1.1. Struktura proteina R-RAS2 evolucijski je očuvana od spužve do čovjeka92
5.1.2. Proteini R-RAS2 iz spužve i čovjeka pokazuju mogućnost vezanja na RNA 93

5.1.3. Utjecaj hipervarijabilne regije na unutarstanični smještaj proteina R-RAS293
5.1.4. Biološke funkcije proteina R-RAS2 evolucijski su očuvane
5.2. Protein BRMS1
5.2.1. Evolucijska prošlost proteina BRMS1 i BRMS1-like
5.2.2. Tehničke poteškoće prilikom izolacije rekombinantnih proteina BRMS1 iz spužve i čovjeka
5.2.3. Protein BRMS1 iz čovjeka tvori homodimere i heterodimere s homogom iz spužve
5.2.4. Biološka funkcija proteina BRMS1 evolucijski je očuvana
5.3. Uspješno je određen smještaj proteina u stanicama spužve E. subterraneus 100
6. ZAKLJUČCI
7. LITERATURA
8. ŽIVOTOPIS
9. PRILOG

#### 1. UVOD

Rak se definira kao skupina bolesti obilježenih nekontroliranim rastom i širenjem abnormalnih stanica koje mogu infiltrirati okolna tkiva i/ili se proširiti (metastazirati) na udaljene dijelove tijela putem krvi i limfe. Metastaziranje je jedan od glavnih uzroka smrtnosti povezanih s rakom (World Health Organization [WHO], 2025). Iako se rak intenzivno proučava, molekularni i stanični mehanizmi njegovog nastanka i progresije još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. Proučavanje raka iz evolucijske perspektive upućuje na to da se bolest pojavila paralelno s razvojem višestaničnih organizama, tijekom rane evolucije životinja (Ćetković i sur., 2018a; Domazet-Lošo i Tautz, 2010; Domazet-Lošo i Tautz, 2008). Pojava višestaničnosti omogućila je razvoj složenih bioloških funkcija poput stanične specijalizacije, organizacije u tkiva i regulacije staničnog mikrookoliša. Ti procesi zahtijevaju preciznu kontrolu staničnog ciklusa, apoptoze, diferencijacije i međustanične komunikacije, a njihovi poremećaji mogu dovesti do razvoja tumora (Aktipis i Nesse, 2013; Davies i Lineweaver, 2011). Rak se stoga može promatrati kao rezultat nakupljanja genetičkih i epigenetičkih promjena koje zahvaćaju temeljne regulacijske mehanizme unutar stanice.

Iako je rak najčešće dokumentiran kod sisavaca i drugih kralježnjaka, sve je više dokaza o prisutnosti neoplazmi i kod beskralježnjaka, pa čak i kod jednostavnih životinja bez bilateralne simetrije poput žarnjaka (Cnidaria) i spužvi (Porifera) (Domazet-Lošo i sur., 2014; Kaczmarsky, 2006). Ranije se smatralo da su geni povezani s rakom prisutni isključivo kod kralježnjaka, djelomično zbog istraživanja na modelnim organizmima beskralježnjaka, poput *Caenorhabditis elegans* i *Drosophila melanogaster*. Međutim, ti su modelni organizmi tijekom evolucije izgubili mnoge gene, uključujući i homologe nekih gena povezanih s rakom kod čovjeka (Kortschak i sur., 2003). Novija genomska istraživanja pokazuju da su mnogi onkogeni i tumor supresorski geni bili prisutni već u genomima jednostavnih životinja bez bilateralne simetrije (Ćetković i sur., 2018a; Ćetković i sur., 2018b; Riesgo i sur., 2014; Harcet i sur., 2010; Domazet-Lošo i Tautz, 2010).

Spužve (Porifera) predstavljaju najjednostavnije životinje koje su se vjerojatno prve odvojile od razvojnog stabla Metazoa. Iako nemaju pravih tkiva i organa, spužve posjeduju kompleksan genom koji sadrži brojne gene čiji su homolozi povezani s rakom kod ljudi (Ćetković i sur., 2018a; Srivastava i sur., 2010; Harcet i sur., 2010). Primjerice, genom morske spužve *Amphimedon queenslandica* sadrži oko 90 % homologa ljudskih gena povezanih s nastankom

raka (Srivastava i sur., 2010). Spužve pružaju dobar uvid u svojstva gena pretka svih životinja, a dosadašnja istraživanja pokazala su značajnu evolucijsku očuvanost homologa proteina povezanih s rakom između spužve i čovjeka (Ćetković i sur., 2018a; Ćetković i sur., 2018b; Harcet i sur., 2010). Primjer je homolog supresora metastaziranja Nme1 iz spužve *S. domuncula*, koji u tumorskim stanicama čovjeka pokazuje potencijal supresije metastaziranja, iako su se tumori i metastaze pojavili tek kasnije u evoluciji životinja (Perina i sur., 2011). Također, analiza homologa tumor supresora FAU iz spužve *S. domuncula* pokazala je kako se biokemijska i biološka funkcija ovog proteina pojavila vrlo rano u evoluciji životinja, prije pojave pravih tkiva i organa (Perina i sur., 2015). Istraživanja su pokazala i visoku očuvanost strukture i funkcije proteina DRG1 između spužve i čovjeka, te je uočeno kako homolog DRG1 iz spužve *E. subterraneus* značajno povećava razinu proliferacije i migracije u tumorskim stanicama čovjeka, kao i protein DRG1 iz čovjeka (Beljan i sur., 2022).

Unatoč prisutnosti homologa gena povezanih s rakom, kod spužvi još uvijek nije dokumentirana pojava raka. Međutim, uočene su promjene u stanicama spužvi koje najčešće nastaju u stresnim uvjetima. Također, spužve izlučuju bioaktivne tvari koje pokazuju protutumorsko djelovanje na stanice čovjeka *in vitro* (Hasan i Ozeki, 2019; Andersen, 2017; Sharma i sur., 2017).

U sklopu ove disertacije analizirani su evolucijski očuvani homolozi onkogena R-RAS2 i supresora metastaziranja BRMS1 iz slatkovodne spiljske spužve *E. subterraneus*. Protein R-RAS2 (engl. *Ras-related protein 2*) pripada obitelji Ras malih GTPaza te ima važnu ulogu u regulaciji stanične signalizacije. Mutacije u genu *r-ras2*, kao i prekomjerna ekspresija divljeg tipa proteina, povezani su s razvojem brojnih tipova raka kod čovjeka (Clavaín i sur., 2022; Zhang i sur., 2017; Larive i sur., 2014; Graham i sur., 1994). R-RAS2 pokazuje onkogeni potencijal usporediv s klasičnim proteinima Ras (H-, K- i N-Ras), s kojima dijeli značajnu strukturnu sličnost (Hortal i sur., 2022). Protein BRMS1 (engl. *breast cancer metastasis suppressor 1*) dio je kromatin remodelirajućeg mSin3 kompleksa (engl. *chromatin remodeling mammalian switch-independent 3 complex*) (Zimmermann i Welch, 2020). Ima ulogu supresora metastaziranja bez utjecaja na rast primarnog karcinoma u nekoliko tipova raka kod čovjeka, uključujući rak dojke (Chen i sur., 2011), rak jajnika, melanom i karcinom nemalih stanica pluća (Cho i sur., 2015).

Cilj ove doktorske disertacije je razjasniti osnovne fiziološke funkcije onkogena R-RAS2 i supresora metastaziranja BRMS1 kod čovjeka na modelu spužve *Eunapius subterraneus* 

(Porifera, Spongillidae), jedine poznate slatkovodne spiljske spužve na svijetu i endemske vrste za podzemne vode Hrvatske, osobito u okolici Ogulina (Sket i Velikojna, 1984). U tu svrhu analizirat ćemo evolucijsku prošlost proteina R-RAS2 i BRMS1 te dobiti uvid u međusobne odnose ovih proteina između različitih koljena Metazoa. Također ćemo biokemijski i biološki okarakterizirati spužvine proteine te ih usporediti s njihovim homolozima u čovjeka. Na ovaj način dobit ćemo bolji uvid u funkciju proteina R-RAS2 i BRMS1 prije diverzifikacije i specijalizacije kod ljudi, što može pridonijeti razumijevanju njihova onkogenog/supresorskog potencijala te ukazati na nove mogućnosti prevencije i liječenja raka.

#### 2. LITERATURNI PREGLED

#### 2.1. Spužve (Porifera)

Spužve (Porifera) predstavljaju jednu od najstarijih skupina životinja, koja se odvojila pri bazi razvojnog stabla Metazoa prije više od 600 milijuna godina (Srivastava i sur., 2010). Spužve i rebraši (Ctenophora) odvojili su se rano u evoluciji životinja, prije pojave plošnjaka (Placozoa), žarnjaka (Cnidaria) i životinja s bilateralnom simetrijom (Bilateria) (Ryan i sur., 2010). Međutim, filogenetski odnosi između spužvi i rebraša još nisu konačno razriješeni te ostaje otvoreno pitanje koja je od tih dviju skupina najstarija unutar Metazoa. Premda su spužve morfološki jednostavnije od rebraša, koji imaju diferencirane strukture poput gonada, živčanih stanica i mišića, gubitak složenijih struktura kod spužvi mogao bi se objasniti evolucijskom prilagodbom filtracijskom načinu prehrane. U tom kontekstu, moguće je da su molekularni mehanizmi za razvoj kompleksnih tkiva očuvani u genomu spužvi, unatoč njihovoj jednostavnoj morfologiji (Riesgo i sur., 2014). Novija paleontološka otkrića (Turner, 2021) ukazuju na mogućnost znatno starijeg podrijetla spužvi. U sedimentima starima oko 890 milijuna godina opisane su mikroskopske kalcitne strukture morfološki slične proteinskom skeletu suvremenih spužvi, no još uvijek nije potvrđeno pripadaju li ti fosili doista spužvama (Turner, 2021).

Spužve su podijeljene u četiri glavna razreda: Hexactinellida (staklače), Demospongiae (kremenorožnjače), Calcarea (vapnenjače) i Homoscleromorpha (Wörheide i sur., 2012). Pokazuju specifične morfološke značajke koje ih razlikuju od drugih Metazoa. Iako nemaju pravu tkivnu organizaciju ni simetriju, spužve se sastoje od različitih tipova stanica. Stanice spužvi raspoređene su oko središnjeg sloja zvanog mezohil, koji je bogat kolagenom i sadrži različite tipove stanica, uključujući arheocite (totipotentne stanice) i sklerocite (stanice odgovorne za stvaranje spikula) (Van Soest i sur., 2012; Simpson, 1984). Vanjski sloj spužve čini pinakođerm, građen od pinakocita, dok je unutrašnjost obložena hoanodermom koji sadrži hoanocite, bičaste stanice koje filtriraju vodu i hvataju čestice hrane (Schippers, 2013; Simpson, 1984). Temeljna funkcionalna jedinica tijela spužve je kanalni sustav, kroz koji voda ulazi putem ostija, struji kroz unutrašnjost tijela i izlazi kroz oskulum. Ovisno o složenosti kanalnog sustava, razlikuju se tri morfološka tipa spužvi: askonski, sikonski i leukonski (Van Soest i sur., 2012). Skelet spužvi može biti izgrađen od vapnenastih ili silikatnih spikula te kolagenskih vlakana (spongin), a kod nekih vrsta uopće nije prisutan (Van Soest i sur., 2012). Spužve se

razmnožavaju spolno (uz razvoj ličinke) i nespolno (pupanjem, fragmentacijom i gemulama) (Schippers, 2013).

Unatoč jednostavnoj morfologiji i odsustvu diferenciranih tkiva i organa, spužve posjeduju iznimno složen genom. U njemu je identificiran velik broj gena koji sudjeluju u osnovnim staničnim procesima, uključujući regulaciju staničnog ciklusa, apoptozu, adheziju stanica i imunološki odgovor (Adamska, 2016; Riesgo i sur., 2014; Srivastava i sur., 2010).

#### 2.2. Spužve kao modelni organizam

Prvi potpuno sekvencirani genom spužve pripada vrsti *Amphimedon queenslandica*, morskoj spužvi iz razreda Demospongiae. Genom ove vrste ima veličinu od približno 166 milijuna baza (Mb) i sadrži oko 40000 gena koji kodiraju za proteine. Ovo je sekvenciranje bilo iznimno važno jer je pružilo uvid u genom jedne od evolucijski najstarijih skupina životinja. Očuvanost strukture gena i pozicija introna u genomu *A. queenslandica* upućuje na duboku evolucijsku povezanost spužvi i životinja s bilateralnom simetrijom (Bilateria) (Srivastava i sur., 2010).

Genomska istraživanja spužvi značajno su napredovala tijekom posljednjih desetljeća, čime je omogućeno bolje razumijevanje njihove evolucijske prošlosti i taksonomske raznolikosti. Sekvenciranje genoma slatkovodne spužve *Ephydatia muelleri* (Kenny i sur., 2020) pokazalo je da genom ove vrste posjeduje organizaciju karakterističnu za složenije životinje. Također je uočeno da je prilagodba spužvi na ekstremne uvjete slatkovodnih staništa povezana s čestim duplikacijama gena, što može biti ključno za bolje razumijevanje adaptivnih mehanizama kod jednostavnijih višestaničnih organizama (Kenny i sur., 2020).

Spužve pokazuju izrazitu plastičnost fenotipa i mogućnost regeneracije stanica. Posebno je zanimljiva prisutnost arheocita, totipotentnih stanica koje mogu diferencirati u sve ostale tipove stanica u tijelu spužve (Wulff, 2024; Finoshin i sur., 2020; Funayama, 2018). Regeneracija stanica kod spužvi može uključivati epitelno-mezenhimsku tranziciju (EMT), pri čemu epitelne stanice (uglavnom pinakociti i hoanociti) transdiferenciraju u druge tipove stanica kako bi se obnovilo tijelo spužve, kao i mezenhimsko-epitelnu tranziciju, tijekom koje arheociti i druge somatske stanice transdiferenciraju u epitelne stanice. Proces regeneracije stanica kod spužvi uključuje proliferaciju i migraciju matičnih stanica, što ih čini dobrim modelom za proučavanje bolesti čovjeka, poput raka (Riesgo i sur., 2022; prema Ereskovsky i sur., 2021).

Nadalje, mnoge vrste spužvi žive u ekstremnim ili specifičnim okolišnim uvjetima, uključujući dubokomorska staništa, podzemne vode, termalne izvore, područja s niskom koncentracijom kisika ili zagađenim ekosustavima, što ih čini pogodnim modelima za istraživanje molekularnih mehanizama odgovora na okolišni stres (Glasl i sur., 2024; Koutsouveli i sur., 2020; Guzman i Conaco, 2016). Guzman i Conaco (2016) pokazali su kako dulja izloženost spužvi termalnom stresu utječe na ekspresiju gena uključenih u popravak staničnih oštećenja, apoptozu, signalizaciju i transkripciju. Novija istraživanja pokazala su da simbiotski mikroorganizmi koji nastanjuju spužve i izlučuju metaboličke enzime imaju važnu ulogu u njihovom preživljenju u ekstremnim uvjetima (Vargas i sur., 2023; Nnaji i sur., 2022; Taylor i sur., 2021).

Dug životni vijek spužvi i kontinuirano obnavljanje somatskih stanica smatra se razlogom za povećan rizik od razvoja raka zbog nakupljanja mutacija. No ipak, kod spužvi nije zabilježen razvoj raka, što upućuje na postojanje iznimno djelotvornih mehanizama zaštite genoma, uključujući sprječavanje oštećenja DNA, popravak DNA i regulaciju tkivne homeostaze (Fortunato i sur., 2025; Aktipis i sur., 2015; Alexander i sur., 2014). Fortunato i sur. (2025) uočili su da spužva *Tethya wilhelma* pokazuje otpornost na iznimno visoke doze rendgenskog zračenja, bez razvoja tumora, što potvrđuje postojanje učinkovitih mehanizama za prevenciju raka kod ove vrste.

Iako kod spužvi nije zabilježen razvoj raka, poznato je da izlučuju bioaktivne supstance, od kojih neke pokazuju protutumorsku aktivnost na stanicama čovjeka *in vitro* (Hasan i Ozeki, 2019; Andersen, 2017; Sharma i sur., 2017). Zbog svoje jednostavne morfologije i nedostatka pravih tkiva pretpostavka je da spužve nemaju sposobnost stvaranja raka, iako su u genomima spužvi prisutni homolozi mnogih gena/proteina povezanih s rakom. Uočena je njihova visoka očuvanost s homolozima kod kralježnjaka, uključujući i čovjeka (Beljan i sur., 2020; Ćetković i sur., 2018a; Ćetković i sur., 2018b; Harcet i sur., 2010; Ćetković i sur., 2004). Dosadašnja istraživanja pokazala su evolucijsku očuvanost strukture i funkcije homologa supresora metastaziranja Nme1 i tumor supresora Fau iz spužve *Suberites domuncula* i čovjeka (Perina i sur., 2011; Perina i sur., 2015). Nadalje, analizirani su homolozi proteina DRG1 i R-RAS2 iz spužve *E. subterraneus*. Rezultati su pokazali očuvanost njihove strukture, biokemijskih svojstava, staničnog smještaja i uloge u procesima povezanim s rakom, odnosno ukazali su na onkogeni potencijal navedenih proteina koji se pojavio vrlo rano u evoluciji Metazoa (Beljan i sur., 2022; Talajić i sur., 2024).

#### 2.3. Slatkovodna spiljska spužva Eunapius subterraneus

*Eunapius subterraneus*, endemska vrsta koja naseljava podzemne vode Hrvatske, jedini je predstavnik slatkovodnih spiljskih spužvi na svijetu (Sket i Velikonja, 1984) i prema kriterijima IUCN-a (engl. *International Union for Conservation of Nature*) registrirana je kao ugrožena vrsta. Svrstava se u razred kremenorožnjača (Demospongiae, podred Spongilina). Do danas je pronađena na šest lokaliteta u spiljama blizu Ogulina (Tounjčica, Mikašinovića, Rudnica VI, Mandelaja, Crnačka i Izvor spilja Gojak) (Bilandžija i sur., 2007). Pokazuje značajnu plastičnost fenotipa ovisno o uvjetima okoliša, a može biti od jajolikog do cilindričnog oblika, veličine od 1 do 8 cm i naborane površine tijela (Slika 1.A) ili imati široku korastu bazu koja prijanja uz stjenovitu podlogu, sa središnjom konusnom izbočinom na vrhu koje je oskulum, glatke površine tijela (Slika 1.B).



Slika 1. Ogulinska spiljska spužva *Eunapius subterraneus*. A) Fenotip s naboranom površinom tijela pronađen u spilji Tounjčica. B) Fenotip s glatkom površinom tijela pronađen u spilji Gojak. Preuzeto i prilagođeno iz Bilandžija i sur. (2007) (fotografija: I. Čukušić).

Ova spužva je potpuno depigmentirana i svi do sada poznati lokaliteti su podzemni, a živi pri relativno stabilnim temperaturnim uvjetima (7,2–11 °C). Tijelo spužve je rahlo i mekano, mikrosklera nema, dok su silikatne megasklere igličaste i vidljive golim okom (Bedek i sur., 2008). Na temelju morfoloških karakteristika *E. subterraneus* ranije je svrstana u rod *Eunapius*, no rezultati analize molekularnih biljega (18S rDNA, ITS2 i mitohondrijske citokrom oksidaze I) pokazali su da je *E. subterraneus* filogenetski bliže skupini s pripadnicima roda *Ephydatia* i nekoliko drugih vrsta slatkovodnih spužvi (Harcet i sur., 2010). Ovo je dodatno potvrđeno analizom Pleše i sur. (2012), koji su smjestili *E. subterraneus* u zajedničku skupinu s *Ephydatia mulleri* i *Lubomirska baikalenskiis* na temelju usporedbe mitohondrijske DNA spužve *E. subterraneus* s ostalim predstavnicima Porifera.

#### 2.4. Protein R-RAS2 (Ras-related protein 2)

#### 2.4.1. Superobitelj proteina Ras

Superobitelj Ras predstavlja jednu od najranije opisanih skupina onkogena, čije je otkriće značajno utjecalo na razumijevanje biologije raka. Onkogeni Ras (engl. *Rat sarcoma virus*) najprije su identificirani kao virusna komponenta koja je inducirala nastanak sarkoma u štakora (Harvey, 1964; Kirsten, 1967), a tek je kasnije otkriveno da su to normalni dijelovi genoma čovjeka, sposobni transformirati stanice čovjeka *in vitro* (Gimple i Wang, 2019). Superobitelj Ras sastoji se od preko 100 malih GTPaza koje sudjeluju regulaciji složenih signalnih puteva u stanici. Podijeljeni su u pet obitelji: Ras, Rho, Rab, Arf i Ran (Colicelli i Jun, 2004).

Proteini obitelji Ras reguliraju važne signalne puteve povezane s kontrolom proliferacije, diferencijacije i preživljenja stanica (Rojas i sur., 2012; Cox i Der, 2010). Proteini Rho sudjeluju u regulaciji organizacije citoskeleta, staničnog ciklusa, proliferacije i preživljenja (Heasman i Ridley, 2008). Proteini obitelji Rab i Arf sudjeluju u regulaciji endocitoze, vezikularnog transporta i transporta proteina (Sztul i sur., 2019; Grosshans i sur., 2006; Zerial i McBride, 2001). Proteini Ran uključeni su u regulaciju organizacije diobenog vretena i razvoja jezgrine ovojnice, kao i prijenos molekula RNA i proteina između jezgre i citoplazme (Kalab i Heald, 2008). Zbog svojih važnih uloga u razvoju tumora, najviše su proučavani tzv. klasični proteini Ras: H-Ras, N-Ras i K-Ras koji ima dvije izoforme, K-Ras4A i K-Ras4B (Weber i Carroll, 2021; Cox i Der, 2010).

Proteini superobitelji Ras dijele osnovnu biokemijsku aktivnost, vezanje i hidrolizu molekule GTP-a (gvanozin-trifosfata). U svojoj strukturi sadrže pet karakterističnih motiva G (engl. *G box*) i dvije regije *switch* koje su važne za GTPaznu aktivnost, a evolucijski su očuvane u svih proteina superobitelji Ras. Proteini GEF (engl. *guanine nucleotide exchange factors*) kataliziraju otpuštanje GDP-a, čime potiču vezanje GTP-a i aktivaciju proteina Ras (Slika 2). Proteini Ras u svom aktivnom, GTP-veznom obliku imaju visok afinitet za vezanje efektorskih proteina i reguliraju nizvodne signalne puteve u stanici (Vetter i Wittinghofer, 2001). Hidrolizom molekule GTP-a u molekulu GDP-a (gvanozin-difosfata) dolazi do konformacijskih promjena u regijama *switchI* i *switchII*, što uzrokuje prijelaz proteina u inaktivan, GDP-vezni oblik sa smanjenim afinitetom za vezanje efektorskih proteina. Intrinzična GTPazna aktivnost proteina Ras obično je niska, što bi moglo dovesti do produljenog prijenosa signala u stanici. Međutim, hidroliza GTP-a znatno se ubrzava

djelovanjem proteina GAP (engl. *GTPase activating proteins*) (Qu i sur., 2019; Colicelli i Jun, 2004).



Slika 2. Shema regulacije GTPazne aktivnosti proteina Ras. U aktivnom, GTP-veznom obliku protein Ras veže efektorske proteine i omogućuje prijenos signala i regulaciju nizvodnih signalnih puteva u stanici. Proteini GAP potiču hidrolizu GTP-a u GDP što uzrokuje prijelaz proteina Ras u inaktivan, GDP-vezni oblik. Proteini GEF potiču otpuštanje GDP-a te omogućuju vezanje GTP-a, čime dolazi do aktivacije proteina Ras. Preuzeto i prilagođeno iz Qu i sur. (2019).

#### 2.4.2. Podobitelj Ras-srodnih proteina (Ras-related protein subfamily)

Obitelj proteina Ras uključuje nekoliko podobitelji proteina: Ras, R-Ras, Ral, Rap, Rad, Rheb i Rit (Reuther i Der, 2000). Među njima, proteini podobitelji Ras-srodnih proteina (R-Ras) pokazuju najveću sličnost aminokiselinskih sekvenci s klasičnim proteinima Ras (55–60 %). Podobitelj R-Ras sastoji se od triju članova: R-RAS1, R-RAS2 i M-RAS, koji imaju važne uloge u regulaciji stanične morfologije, adhezije i migracije (Weber i Carroll, 2021).

R-RAS1 smješten je u fokalnim adhezijama, gdje regulira funkcije integrina i potiče stvaranje fokalnih adhezija, adheziju stanica i njihovo širenje (Colicelli i Jun, 2004; Furuhjelm i Peränen 2003; Zhang i sur., 1996). R-RAS2 smješten je u staničnoj membrani i unutarstaničnim membranama (Talajić i sur., 2024; Capri i sur., 2019), a novija istraživanja pokazala su i njegov smještaj u fokalnim adhezijama (Clavaín i sur., 2023). Ima ulogu u regulaciji važnih signalnih puteva u stanici te potencijalne uloge u transportu endoplazmatskim vezikulama i u sekreciji proteina (Capri i sur., 2019; Zhang i sur., 2017). Protein M-RAS smješten je u staničnoj membrani i unutarstaničnim membranama, a ima važnu ulogu u remodeliranju citoskeleta,

migraciji stanica, diferencijaciji osteoblasta i neurona, stvaranju dendrita te adheziji limfocita (Young i Rodriguez-Viciana, 2018; Watanabe-Takano i sur., 2010). Svi članovi podobitelji R-RAS potiču transformaciju stanica, no jedino protein R-RAS2 ima transformirajuću aktivnost sličnu klasičnim proteinima Ras (Hortal i sur., 2022).

Proteini podobitelji R-Ras pokazuju visoku strukturnu sličnost, osobito u domenama ključnima za vezanje i hidrolizu molekule GTP-a, a najvećim se dijelom razlikuju u regijama koje se nalaze na N- i C-terminalnim krajevima proteina. Proteini R-RAS1, R-RAS2 i M-RAS na svojim N-terminalnim krajevima imaju specifične domene koje nisu pronađene u klasičnim proteinima Ras, dok se na C-terminalnom kraju proteina nalazi hipervarijabilna regija (HVR). Posttranslacijske modifikacije aminokiselina unutar HVR utječu na različit unutarstanični smještaj proteina i njihove različite stanične funkcije (Hortal i sur., 2022; Weber i Carroll, 2021; Colicelli i Jun, 2004).

#### 2.4.3. Struktura proteina R-RAS2

Protein R-RAS2 sastoji se od 204 aminokiseline i dio je obitelji Ras malih GTPaza. Kao što je već spomenuto, protein R-RAS2 sadrži evolucijski očuvanu GTPaznu domenu koju čini pet motiva G (G1–G5) i dvije regije *switch*, dok se na C-terminalnom kraju nalazi HVR, motiv bogat aminokiselinom prolinom i motiv CaaX.

Unutarstanični smještaj proteina R-RAS2 posredovan je posttranslacijskim modifikacijama aminokiselina koje se nalaze unutar HVR na C-terminalnom kraju proteina. R-RAS2 može biti enzimski izopreniliran dodatkom farnezilne skupine na cistein u motivu CaaX, kao što je slučaj kod klasičnih proteina Ras (Slika 3). Proteini koji su samo izoprenilirani ne pokazuju visok afinitet vezanja za staničnu membranu (Silvius i l'Heureux, 1994), stoga često dolazi do sekundarne modifikacije palmoitilacijom cisteina (Cys201) koji se nalazi uzvodno od motiva CaaX (Nakhaei-Rad i sur., 2018; Zhang i sur., 2017; Furuhjelm i Peränen, 2003; Reuther i Der, 2000).

Protein R-RAS2 također sadrži nekoliko lizina (Lys192, 194, 196, 197) unutar HVR, koji su pronađeni i u proteinu K-Ras4b (Slika 3). Smatra se kako acetilacija lizina utječe na translokaciju proteina R-RAS2 u staničnu membranu, što omogućuje aktivaciju signalnog puta PI3K i dovodi do povećane proliferacije stanica (Reuther i Der, 2000). Tumor supresor SIRT6 regulira aktivnost proteina R-RAS2 deacetilacijom lizina na C-terminalnom kraju proteina,

čime smanjuje smještaj proteina R-RAS2 u staničnoj membrani te dolazi do smanjene aktivacije signalnog puta PI3K (Zhang i sur., 2017).

Protein R-RAS2 na C-terminalnom kraju ima motiv bogat aminokiselinom prolinom. Ovaj motiv opisan je kod paraloga R-RAS1 te sadrži vezno mjesto za domenu SH3, koja utječe na aktivaciju integrina posredovanu proteinom R-RAS1 (Wang i sur., 2000). Unutar motiva bogatog aminokiselinom prolinom proteina R-RAS2 nalazi se serin (Ser186) koji može biti posttranslacijski modificiran (Slika 3). Ovaj serin pronađen je i u proteinu R-RAS1 (Ser201), a pokazano je da se njihova fosforilacija odvija pomoću MAP kinaze ERK1/2 (engl. *extracellular signal-regulated kinase*). Fosforilacija Ser201 i Ser186 ne utječe na promjenu smještaja proteina, već dovodi do povećane aktivacije proteina R-RAS1 i R-RAS2. Postranslacijska modifikacija fosforilacije serina prethodno je opisana kod proteina K-Ras (Ser181) kao ključni uvjet za onkogenu transformaciju stanica (Wang i Casey, 2016; Ahearn i sur., 2018; Frémin i sur., 2016).

H-Ras	HKLRKLNPPDESGPGCMS-CKOVIS
N-Ras	YRMKKLNSSDDGTQGCMG-LPCVVM
K-Ras4A	YRLKKI <mark>S</mark> K-EE <u>K</u> TPGCVKI <u>KK</u> CIIM
K-Ras4B	-HKEKM <mark>S</mark> K-DG <u>KKKKKK</u> SKTK <mark>CVI</mark> M
R-RAS1	QELPPSP-PSAPRKKGGG-CPCVLL
R-RAS2	QECPP <mark>S</mark> PEPT <mark>R<u>K</u>E<u>K</u>D<u>KK</u>G-<mark>C</mark>H<mark>CVI</mark>F</mark>
M-RAS	QKKKKKKKKWRGDRATGTHKLQCV1L

Slika 3. Hipervarijabilna regija (HVR) na C-terminalnom kraju klasičnih proteina Ras (H-Ras, N-Ras, K-Ras4A, K-Ras4B) te Ras-srodnih proteina (R-RAS1, R-RAS2, M-RAS). Cistein koji podliježe posttranslacijskoj modifikaciji palmoitilacije označen je plavom bojom, cistein koji podliježe modifikaciji izoprenilacije uokviren je ružičastim okvirom, a lizini koji podliježu modifikaciji acetilacije podcrtani su. Motiv bogat aminokiselinom prolinom uokviren je žutim okvirom, a serini važni za postranslacijsku modifikaciju fosforilacije označeni su narančastom bojom. Za izradu slike korišten je CorelDRAW Graphic Suite (Alludo).

#### 2.4.4. Signalni putevi proteina R-RAS2

S obzirom da protein R-RAS2 pokazuje visoku strukturnu sličnost s klasičnim proteinima Ras, velik broj regulatora GTPaznog ciklusa proteina Ras može djelovati i na R-RAS2. Neki od zajedničkih proteina GAP su p120GAP/Rasa1 i NF1-GFR (Graham, 1996), a proteina GEF RasGRF1 i RasGRF2 (Ohba i sur., 2000; Movilla, 1999; Ehrhardt, 1999).

Sukladno tome, protein R-RAS2 sudjeluje u regulaciji signalnih puteva karakterističnih za proteine Ras, poput signalnog puta mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK, odnosno put RAS/RAF/MAPK) i fosfoinozitol-3-kinaze (PI3K, odnosno put PI3K/AKT/mTOR) (Hortal i sur., 2022; Larive i sur., 2014; Erdogan i sur., 2007; Movilla i sur., 1999).

U signalnom putu MAP kinaze (Slika 4), vezanjem faktora rasta na receptore tirozin kinaza (RTK) koji se nalaze na površini stanice dolazi do aktivacije GTPaze Ras, te se zatim pokreće kaskada reakcija RAS/RAF/MEK/ERK. Aktivirani ERK1/2 ulazi u jezgru i regulira aktivnost različitih transkripcijskih faktora odgovornih za ekspresiju gena uključenih u proliferaciju, diferencijaciju i preživljenje stanica (Larive i sur., 2014). Pokazano je da R-RAS2 stupa u interakcije sa svim izoformama proteina RAF (RAF1, A-RAF i B-RAF) te tako sudjeluje u aktivaciji signalnog puta MAPK (Rodriguez-Viciana i sur., 2004; Rosario i sur., 1999).

Također, R-RAS2 može stupiti u interakcije i aktivirati PI3K (Slika 4) putem izravnog vezanja specifične katalitičke podjedinice p110δ te aktivirati njene nizvodne signalne efektore, među kojima su i serin/treoninska kinaza Akt (poznate i kao protein kinaza B) te mTOR (ciljna molekula rapamicina u sisavaca). mTOR povezan je s regulacijom staničnog metabolizma, proliferacije i preživljenja stanica (Hortal i sur., 2022; Larive i sur., 2014, Rosário i sur., 2001).



Slika 4. Signalni putevi mitogenom akrivirane protein kinaze (MAPK) i fosfoinozitol-3-kinaze (PI3K) u kojima protein R-RAS2 sudjeluje. Preuzeto i prilagođeno iz Nussinov i sur. (2014).

Uz navedeno, pokazano je da R-RAS2 može potaknuti aktivaciju čimbenika NF-κB (Hasan i sur., 2012; Rong i sur., 2002; Graham i sur., 1994), TNF- $\beta$  (Erdogan i sur., 2007) te ciklina D (Hasan i sur., 2012; Patmore i sur., 2012), no nije poznato je li ta aktivacija izravna ili posredovana drugim efektorima.

#### 2.4.5. Uloga proteina R-RAS2 u raku

Mutirane verzije ili prekomjerna ekspresija divljeg tipa proteina R-RAS1, R-RAS2 i M-RAS mogu uzrokovati onkogenu transformaciju stanica, pri čemu R-RAS2 pokazuje najveći transformacijski potencijal, sličan klasičnim proteinima Ras (Hortal i sur., 2022; Colicelli i Jun, 2004; Barker i Crompton, 1998; Clark i sur., 1996; Huang i sur., 1995; Chan i sur., 1994; Graham i sur., 1994).

U karcinomu dojke gen *r-ras2* rijetko je mutiran (Barker i Crompton, 1998), no prekomjerna ekspresija divljeg tipa proteina R-RAS2 značajno utječe na razvoj raka dojke i klinički ishod bolesti, najvjerojatnije aktivacijom signalnog puta PI3K/Akt. Prekomjerna ekspresija R-RAS2 još je viša u trostruko negativnom raku dojke te nakon perioda trudnoće i postpartuma. Nadalje, identificiran je polimorfizam u promotorskoj regiji gena *r-ras2* koji je povezan s nepovoljnim ishodom liječenja tamoksifenom, dok utišavanje gena *r-ras2* pojačava osjetljivost stanične linije karcinoma dojke na tamoksifen (Cifuentes i sur., 2024; Mendes-Pereira, 2012; Rokavec i sur., 2008).

Brojna istraživanja na miševima pokazala su da je R-RAS2 važan čimbenik u razvoju i homeostazi imunološkog sustava. Ovaj protein veže se na antigenske receptore limfocita B (engl. *B-cell receptor*, BCR) i T (engl. *T-cell receptor*, TCR) prepoznavanjem aktivacijskih motiva ITAM (engl. *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*), te sudjeluje u konstitutivnoj signalizaciji najvećim dijelom putem PI3K. Pokazano je da R-RAS2, kao antigenski receptor limfocita B, regulira metabolizam stanica B, a njegova prekomjerna ekspresija dovodi do razvoja kronične limfocitne leukemije (engl. *chronic lymphocytic leukemia*, CLL) (Cifuentes i sur., 2024; Hortal i sur., 2022; Mendoza i sur., 2018; Delgado i sur., 2009; Rong i sur., 2002).

Osim navedenih primjera, prekomjerna ekspresija divljeg tipa R-RAS2 uočena je i u karcinomu jednjaka (Sharma i sur., 2005), oralnim karcinomima (Macha i sur., 2010), melanomu (Lee i sur., 2011), hepatocelularnom karcinomu (Luo i sur., 2010) i tumorima središnjeg živčanog sustava (Gutierrez-Erlandsson i sur., 2013) kod čovjeka.

Prije pojave sekvenciranja nove generacije (engl. *next generation sequencing*, NGS), otkrivanje mutacija koje dovođe do stjecanja funkcije (engl. *gain of function*) gena *r-ras2* u različitim tipovima raka kod čovjeka bilo je tehnički ograničeno. No ipak, određene mutacije gena *r-ras2*, poput Q72L, identificirane su u Noonanovom sindromu, rijetkoj razvojnoj bolesti koja je povezana s deregulacijom signalnih puteva uzrokovanom proteinima Ras (Capri i sur., 2019). Opsežno sekvenciranje tumorskih genoma tijekom proteklog desetljeća otkrilo je da su najčešće mutacije gena *r-ras2* Q72L i Q72H. Mutacije glutamina na 72. poziciji (Q72) induciraju onkogeni učinak jer onemogućuju hidrolizu vezanog GTP-a, čime se protein zadržava u aktivnom stanju (Clavaín i sur. 2023; Fernández-Pisonero i sur., 2022; Bailey i sur., 2018; Chang i sur., 2016; Buhrman i sur., 2010).

Clavaín i sur. (2023) pokazali su kako je ekspresija endogenog proteina R-RAS2^Q72L nužna za preživljenje i proliferaciju stanica raka koje istodobno nose mutacije u genima koji kodiraju za proteine poput BRAF, RAF1 te PI3Kα. Navedeno istraživanje sugerira da R-RAS2 vjerojatno djeluje sinergijski s proteinima Ras u prijenosu signala signalnim putevima u stanici. Osim toga, pokazali su smještaj endogenog proteina R-RAS2 i mutirane verzije R-RAS2^Q72L u fokalnim adhezijama staničnih linija različitog podrijetla (stanice raka jajnika, dojke i fibrosarkom) i različitih vrsta (stanice čovjeka i miša). Povezanost proteina R-RAS2 s fokalnim adhezijama funkcionalno je značajna, budući da eliminacija endogenog R-RAS2^Q72L dovodi do smanjenog broja fokalnih adhezija te do poremećaja u staničnoj adheziji, invaziji i kemotaktičkim odgovorima u analiziranim stanicama (Clavaín i sur., 2023).

#### 2.5. Protein BRMS1 (Breast cancer metastasis suppressor 1)

#### 2.5.1. Protein BRMS1 kao dio kompleksa Sin3-HDAC

Protein BRMS1 dio je kompleksa Sin3-HDAC koji sudjeluje u remodulaciji kromatina i regulaciji transkripcije gena (Meehan i sur., 2004). Kompleksi Sin3-HDAC evolucijski su očuvani od kvasca do čovjeka, a imaju uloge u brojnim staničnim procesima, uključujući staničnu proliferaciju, diferencijaciju, starenje i apoptozu. Osim toga, predstavljaju važne terapijske ciljeve za liječenje različitih bolesti, poput trostruko negativnog karcinoma dojke i karcinoma gušterače (Guo i sur., 2023; Adams i sur., 2018; Kwon i sur., 2015; Kandoth i sur., 2013).

Protein Sin3 negativni je regulator transkripcije, a kod sisavaca su pronađena dva paraloga, SIN3A i SIN3B, koji tvore dva različita kompleksa (Slika 5) (Guo i sur., 2023; Adams i sur.,

2020). Histon deacetilaze (HDAC) imaju važne uloge u epigenetičkoj regulaciji, organizaciji kromatina i regulaciji transkripcije određenih gena. Na temelju sličnosti s homolozima iz kvasca, podijeljene su u četiri razreda. HDAC1 i HDAC2 pripadaju razredu I histon deacetilaza i smještene su u jezgri stanica gdje sudjeluju u stvaranju ko-represorskih kompleksa, uključujući i one s proteinom SIN3, te posreduju u deacetilaciji histona što dovodi do kondenzacije kromatina i supresije transkripcije ciljnih gena (Zimmermann i Welch, 2021; Barneda-Zahonero i Parra, 2012).

Istraživanja su pokazala kako protein BRMS1 sudjeluje u kompleksima Sin3-HDAC zajedno sa sljedećim proteinima: SIN3A/B, HDAC1/2, SAP30/SAP30L, ARID4A/B, RBBP4/7, BRMS1L (p40), SUDS3, ING1b/ING2, SAP130a/b, FAM60A i SAP25 (paralozi su odvojeni znakom /) (Marcum i sur., 2022; Meehan i sur., 2004). BRMS1 ima mogućnost direktnog vezanja na dva od ovih proteina, SUDS3 i ARID4A (Hurst i sur., 2008; Hurst i sur., 2006; Meehan i sur., 2004).



Slika 5. Shematski prikaz kompleksa Sin3A-HDAC i Sin3B-HDAC koji imaju uloge u jezgri stanice. Preuzeto i prilagođeno iz Adams i sur. (2019).

#### 2.5.2. Proteini obitelji BRMS1

Protein BRMS1 sadrži evolucijski očuvanu domenu sličnu domeni Sds3 (engl. *Sds3-like domain*), koja je pronađena i u proteinima SUDS3 (engl. *Suppressor of Defective Silencing 3*, poznat i kao Sds3/mSds3) te BRMS1-like, zbog čega se ova tri proteina često smatraju članovima iste obitelji proteina (Cho i sur., 2015; Gong i sur., 2014; Hurst i Welch, 2011; Silveira i sur., 2009). Aminokiseline 60–177 proteina BRMS1 određene su kao domena slična domeni Sds3 (*NCBI Conserved Domain Database*, Wang i sur., 2023), koja ima moguću ulogu u protein-protein interakcijama (Gong i sur., 2014).

Sva tri proteina obitelji BRMS1 dio su Sin3-HDAC kompleksa te dijele određene strukturne sličnosti, pa tako protein BRMS1 dijeli strukturnu sličnost od 49 % s proteinom SUDS3, a 79

% s proteinom BRMS1-like. Proteini BRMS1 i BRMS1-like imaju slične uloge u stanici te su povezani s metastaziranjem nekoliko vrsta karcinoma. Za razliku od njih, protein SUDS3 ne pokazuje sposobnost supresije metastaziranja (Marcum i sur., 2022; Zimmermann i Welch, 2021; Silveira i sur., 2009, Meehan i sur., 2004).

Protein SUDS3 ima ključnu ulogu u razvoju zametka neposredno nakon implantacije, a njegova ekspresija i povezanost s kompleksom SIN3A neophodna je za stvaranje pericentričnih heterokromatina i pravilnu segregaciju kromosoma (David i sur., 2003; Heppner, 1984). Uz navedeno, pretpostavlja se da SUDS3 pridonosi stabilnosti i/ili aktivnosti kompleksa Sin3-HDAC, budući da niske razine SUDS3 koleriraju sa smanjenom aktivnošću HDAC1 (Alland i sur., 2002). Također je pokazano da SUDS3 može stvarati homodimere, a za dimerizaciju su odgovorne superzavijene domene proteina. Utjecaj stvaranja homodimera na aktivnost proteina SUDS3 još nije u potpunosti razjašnjena, no pretpostavlja se da dimeri SUDS3 povezuju i stabiliziraju dva kompleksa Sin3-HDAC koji djeluju na suprotnim nukleosomima (Banks i sur., 2020; Clark i sur., 2015).

Protein BRMS1-like (poznat i kao p40) djeluje kao supresor metastaziranja u nekoliko vrsta tumora. Gen koji kodira za protein BRMS1-like nalazi se na lokusu 14q13.2, na kojem je uočena visoka učestalost delecija (64 %) u uznapredovalim kolonorektalnim karcinomima i njihovim metastazama kod čovjeka (Nikolaev i sur., 2004; Mourra i sur., 2007). Prekomjerna ekspresija proteina BRMS1-like inhibira rast stanica raka pluća čovjeka H1299 (Nikolaev i sur., 2004). Nadalje, pokazano je kako BRMS1-like djeluje kao epigenetički regulator signalizacije putem Wnt što dovodi do inhibicije epitelno-mezenhimalne tranzicije (EMT) i supresije metastaziranja raka dojke. U normalnim tkivima dojke uočena je visoka razina ekspresije proteina BRMS1-like, dok je njegova ekspresija u raku dojke niska, pri čemu se postepeno smanjuje i gubi u skladu s pojavom udaljenih metastaza (Gong i sur., 2014). Koyama i sur. (2017) pokazali su da BRMS1-like može djelovati nizvodno od transkripcijskog faktora p53 u stanicama raka pluća H1299 što dovodi do inhibicije metastaziranja, a Cao i sur. (2024) su na različitim staničnim linijama raka pluća (A549, H358, H460 i H1299) pokazali da protein BRMS1-like inhibira proliferaciju i metastaziranje karcinoma pluća nemalih stanica (engl. *non-small cell lung cancer*, NSCLC).

Proteini BRMS1-like i SUDS3 na svom C-terminalnom kraju imaju domenu nalik Tudor domeni (engl. *capped Tudor domain*, CTD), koja nije prisutna u proteinu BRMS1. Pokazano je da domena CTD sadrži motiv sličan β-bačvastom naboru SH3 (engl. *SH3-like β-barrel fold*),

koji je pronađen u transkripcijskim faktorima koji se vežu na kromatin. Međutim, domena CTD proteina SUDS3 ne pokazuje mogućnost vezanja na kromatin, već pokazuje sposobnost vezanja na nukleinske kiseline DNA i RNA. Domena CTD stoga pokazuje veću sličnost s varijantom Tudor domene (engl. *knotted Tudor domain*) koja je prisutna u histon acetiltransferazi Esa1, za koju je prethodno pokazano da se veže na jednolančanu RNA. Nadalje, pokazano je kako se domena CTD proteina SUDS3 ne veže na nukleosome, nego prepoznaje G-kvadriplekse. Budući da se G-kvadripleksi nalaze na heterokromatinu, a SUDS3 ima ulogu u pravilnom stvaranju pericentričnog heterokromatina, postoji mogućnost da domena CTD ima ulogu u promicanju utišavanja gena i stvaranju heterokromatina na centromerama. Iako SUDS3 i BRMS1-like dijele domenu CTD, te domene vjerojatno posjeduju različitu specifičnost prema ciljnim molekulama, s obzirom na različite uloge ovih proteina u stanici (Marcum i sur., 2022).

#### 2.5.3. Struktura i regulacija proteina BRMS1

Protein BRMS1 sadrži 246 aminokiselina te karakteristične domene i motive: domenu bogatu aminokiselinom glutamatom (engl. *glutamate rich region*), dvije superzavijene domene (engl. *coiled-coil*), dvije signalne domene za smještaj u jezgri (engl. *nuclear localization signal*, NLS), nekoliko nepotpuno uređenih leucinskih zatvarača (engl. *imperfect leucine zippers*), te signalnu domenu za translokaciju iz jezgre u citoplazmu (engl. *nuclear export signal*, NES). Položaj i funkcije navedenih domena naznačene su u Tablici 1.

Domena	AK ostaci	Funkcija	Referenca
Regija bogata glutamatom	1–50	Regulacija transkripcije	Zimmerman i sur., 2020.
Superzavijene domene	51–81 147–180	Protein-protein interakcije	Zimmerman i Welch, 2020.
Signalna domena za translokaciju iz jezgre u citoplazmu (NES)	74–91	Translokacija iz jezgre u citoplazmu	Rivera i sur., 2009.
Signalna domena za smještaj u jezgri 1 (NLS1)	198–205	Nužna za smještaj proteina u jezgri	Rivera i sur., 2009.
Nepotpuno uređeni leucinski zatvarači	67–88, 131–152, 138–159, 153–174, 160–181	Ukazuju na sudjelovanje BRMS1 u protein-protein interakcijama	Zimmerman i Welch, 2020.
Signalna domena za smještaj u jezgri 2 (NLS2)	239–245	Moguća uloga u supresiji metastaziranja	Rivera i sur., 2009.; Hurst i sur., 2013.

Tablica 1. Ključne domene i motivi proteina BRMS1.

Gen *brms1* smješten je na kromosomu 11q13. U genomu pacijenata oboljelih od nekoliko vrsta raka, uključujući rak dojke i melanom, česte su delecije na kromosomu 11 koje su povezane sa smanjenom stopom preživljenja (Zimmermann i Welch, 2020; Seraj i sur., 2000). Osim delecije gena *brms1*, ekspresija proteina BRMS1 regulirana je na nekoliko razina: tijekom transkripcije, posttranskripcijski, posttranslacijski te razgradnjom (Varshavsky, 2005; Jaenisch i Bird, 2003; Li, 2002). Svaka od ovih faza strogo je regulirana kako bi se osigurala pravilna ekspresija i funkcija proteina. Međutim, u patološkim stanjima takva precizna regulacija može biti narušena, što dovodi do promjena u ekspresiji proteina ključnih za staničnu homeostazu (Zimmermann i Welch, 2020).

Ekspresija BRMS1 u brojnim je tipovima raka inhibirana na razini transkripcije hipermetilacijom promotorske regije u CpG dinukleotidima, odnosno CpG otocima. Na posttranskripcijskoj razini, ekspresija BRMS1 regulirana je molekulama miRNA. U hepatocelularnom karcinomu uočeno je kako se miR-423 veže unutar 3' netranslatirane regije (engl. *3' untranslated region*, UTR) gena *brms1* te negativno korelira s razinama BRMS1 (Sun i sur., 2017; Lin i sur., 2011), a u osteosarkomu je pokazano kako vezanje miR-3200-5p na navedenu regiju gena *brms1* dovodi do sniženih razina proteina BRMS1 i povećane invazivnosti stanica (Li i sur., 2018). Za razliku od toga, prekomjerna ekspresija miR-125-a-5p dovodi do povećane razine BRMS1 te smanjene migracije i invazivnosti stanica (Cao i sur., 2018). Na posttranslacijskoj razini, ekspresija BRMS1 najčešće je regulirana fosforilacijom i glikozilacijom, na primjer fosforilacija serina na 30. poziciji (Ser30) u proteinu BRMS1 dovodi do njegove translokacije iz jezgre u citoplazmu. Zatim dolazi do ubikvitinacije proteina BRMS1 i njegove degradacije pomoću kazein kinaze 2  $\alpha$  (CK2 $\alpha$ ) (Liu i sur., 2016).

Protein BRMS1 primarno je smješten u jezgri stanica, budući da sadrži signalne domene za smještaj u jezgri (NLS1 i NLS2), te je dio kromatin remodelirajućeg kompleksa Sin3-HDAC. Osim toga, pronađen je i u citoplazmi stanica, gdje bi mogao imati dodatne funkcije povezane s regulacijom citoskeleta i staničnom signalizacijom. Pretpostavlja se kako unutarstanični smještaj proteina BRMS1 između jezgre i citoplazme ima utjecaj na njegovu sposobnost supresije metastaziranja, no to je još uvijek nedovoljno istraženo (Rieker i Samant, 2012; Rivera i sur., 2010; Rivera i sur., 2009).

#### 2.5.4. Signalni putevi proteina BRMS1

Istraživanja su pokazala kako BRMS1 sudjeluje u regulaciji važnih signalnih puteva u stanici, uključujući signalni put kinaze fokalne adhezije (engl. *focal adhezion kinase*, FAK), receptora epidermalnog faktora rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*, EGFR) te nuklearnog faktora κB (engl. *nuclear factor kappa B*, NF-κB) (Zimmermann i Welch, 2020).

Pokazano je kako ekspresija proteina BRMS1 dovodi do smanjene razine proteina FAK i Src, kao i do smanjenja stvaranja kompleksa proteina FAK s citoskeletnim proteinima (Khotskaya i sur., 2014). U stanicama koje eksprimiraju BRMS1 zabilježene su i snižene razine proteina fascina, koji sudjeluje u povezivanju aktinskih vlakana (Shevde i sur., 2002). Navedene promjene upućuju na to da BRMS1, osim što utječe na staničnu pokretljivost, može imati ulogu i u regulaciji mikrotubula, procesa koji je često narušen u tumorskim stanicama (Zimmermann i sur., 2020).

U signalnom putu EGFR/PI3K/Akt, povećana ekspresija BRMS1 dovodi do smanjenja razine EGFR-a, što dovodi do inhibicije fosforilacije i aktivacije serin/treoninske kinaze Akt (Vaidya i sur., 2008). Osim toga, BRMS1 smanjuje razinu aneksina I, poznatog supstrata EGFR-a (Cicek i sur., 2004), te razinu fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfata (PIP2), što dovodi do smanjene razine unutarstaničnog kalcija i inhibicije signalnog puta PI3K/Akt (DeWald i sur., 2005; Zimmerman i Welch, 2020).

U signalnom putu NF-κB, BRMS1 može djelovati na više različitih načina. Pokazano je da BRMS1 inhibira fosforilaciju i razgradnju IκBα, koji djeluje kao inhibitor proteina NF-κB sprječavajući njegovu translokaciju u jezgru, gdje NF-κB djeluje kao faktor transkripcije (Cicek i sur., 2005). Nadalje, BRMS1 regulira ekspresiju urokinaze uPA (engl. *Urokinase-type plasminogen activator*), enzima koji razgrađuje izvanstanični matriks (engl. *extracellular matrix*, ECM) i time povećava invazivnost stanica (Andreasen i sur., 1997). Budući da signalni put NF-κB izravno sudjeluje u regulaciji uPA, BRMS1 se zajedno s HDAC1 veže na vezno mjesto za NF-κB unutar promotorske regije gena *uPA*, čime inhibira njegovu transkripciju (Cicek i sur., 2009; Cicek i sur., 2005). Također, BRMS1 inhibira ekspresiju kemokinskog receptora CXCR4, koji je povezan sa signalnim putem NF-κB. Na taj način dolazi do smanjene osjetljivosti tumorskih stanica na signalizaciju posredovanu SDF-1α i smanjene migracije stanica (Yang i sur., 2008). BRMS1 utječe i na ekspresiju osteopontina (OPN), budući da se kao dio kompleksa histon deacetilaza veže na vezno mjesto za NF-κB u genu *OPN* čime se smanjuje razina mRNA i proteina OPN u stanici (Samant i sur., 2007; Hedley i sur., 2008; Zimmermann i sur., 2020).

Pretpostavlja se da BRMS1 dodatno regulira signalni put NF-κB putem dvaju mehanizama: razgradnjom koaktivatora NF-κB p300 pomoću E3 ubikvitin-ligazne aktivnosti, što smanjuje ekspresiju nizvodnih efektorskih gena poput *uPA* (Liu i sur., 2013; Mukherjee i sur., 2013), te modulacijom mikroRNA povezanih s metastazama, posebice povećanjem razine ekspresije miR-146a, koja inhibira aktivaciju signalnog puta NF-κB te doprinosi smanjenju ekspresije EGFR-a (Ma i sur., 2007; Hurst i sur., 2009; Zimmermann i sur., 2020).

#### 2.5.5. Uloga proteina BRMS1 u raku

Protein BRMS1 identificiran je kao supresor metastaziranja 2000. godine korištenjem staničnih linija raka dojke čovjeka MDA-MB-231 i melanoma čovjeka MDA-MB-435 (Seraj i sur., 2000). Od tada je pokazano kako BRMS1 može suprimirati metastaziranje u različitim vrstama raka, bez značajnog utjecaja na rast primarnog karcinoma (Feldheim et. al., 2023; Zimmermann i sur., 2020, Khotskaya i sur., 2014). BRMS1 utječe na nekoliko koraka kompleksne kaskade metastaziranja, a to su: invazija, migracija i adhezija stanica te stvaranje kolonija na novom mjestu (Slika 6) (Feldheim i sur., 2023).



Slika 6. Protein BRMS1 sudjeluje u nekoliko koraka kompleksne kaskade metastaziranja, uključujući invaziju, migraciju, adheziju stanica i stvaranje kolonija. Preuzeto i prilagođeno iz Feldheim i sur. (2023).

U tumorima je često narušena homeostatska regulacija, a stanice raka moraju se prilagoditi promijenjenom mikrookolišu te proizvesti signale koji im omogućuju preživljenje i rast. U normalnim stanicama postoji nekoliko razina stanične komunikacije: međustanična komunikacija putem propusnih veza (engl. *gap junctions*) između dviju stanica, izvanstanična komunikacija kao odgovor na signale iz okoliša (hormoni, faktori rasta, citokini) te unutarstanična komunikacija (Ca<sup>2+</sup>, regulacija staničnog metabolizma, prijenos signala u stanici). Narušavanjem stanične komunikacije dolazi do nekontrolirane proliferacije i preživljenja stanica (Zimmermann i sur., 2020; Trosko i Ruch, 1998).

Pokazano je kako ekspresija proteina BRMS1 u metastatskim stanicama ima utjecaj na sve tri razine stanične komunikacije (Yang i sur., 2013; Vaidya i sur., 2008; Saunders i sur., 2001). Protein BRMS1 pokazuje sposobnost obnavljanja međustanične komunikacije putem propusnih veza između metastatskih stanica raka dojke čovjeka MDA-MB-231 koje eksprimiraju BRMS1 i nemetastatskih stanica raka dojke čovjeka Hs578Bst. Obnavljanje međustanične komunikacije posredovano je ponovnom ekspresijom koneksina Cx26 i Cx43, transmembranskih proteina koji tvore kanale između stanica i omogućuju prijenos malih molekula (Zimmermann i sur., 2020; Su i Lau, 2014; Yang i sur., 2013; Saunders i sur., 2001). Na razini izvanstanične i unutarstanične komunikacije stanica, BRMS1 djeluje na ekspresiju faktora rasta EGFR, aktivatora signalnog puta PI3K/Akt, kao što je opisano u prethodnom poglavlju. U stanicama raka dojke čovjeka MDA-MB-231 uočeno je kako su ekspresija BRMS1 i EGFR međusobno isključive, odnosno protein EGFR nije prisutan u stanici kada je eksprimiran protein BRMS1, i obrnuto (Vaidya i sur., 2008).

Uloga proteina BRMS1 kao supresora metastaziranja pokazana je u brojnim vrstama raka kod čovjeka, uključujući rak dojke (Khotskaya i sur., 2014), rak nemalih stanica pluća (NSCLC) (Smith i sur., 2009), rak jajnika (Sheng i sur., 2012; Zhang i sur., 2006) i melanom (Shevde i sur., 2002) gdje smanjuje migraciju i invazivnost stanica raka, najčešće putem signalnog puta NF-κB (Zimmermann i Welch, 2020). U stanicama raka dojke uočen je utjecaj proteina BRMS1 na procese povezane sa staničnom adhezijom putem signalnog puta FAK/Src. Pokazano je da BRMS1 može djelovati na reorganizaciju aktinskog citoskeleta, ali i spriječiti smještaj integrina β1 u staničnim protruzijama, čime onemogućuje učinkovitu adheziju i invaziju stanica (Khotskaya i sur., 2014; Howe i Addison, 2012). BRMS1 utječe i na povećanje razina PARP i kaspaze-3, što upućuje na njegovu ulogu u regulaciji apoptoze stanica (Phadke i sur., 2008). Zhao i sur. (2024) pokazali su kako BRMS1 ima ulogu i u glioblastomu. Glioblastomi rijetko metastaziraju izvan središnjeg živčanog sustava, no unatoč tome dijele brojne karakteristike s metastatskim stanicama, poput invazivnog rasta, migracije stanica i neovaskularizacije (Feldheim i sur., 2023). Pokazano je da BRMS1 potiče M2 polarizaciju mikroglija i aktivira signalni put PI3K/Akt. To dovodi do inhibicije apoptoze stanica i potiče se njihova proliferacija, migracija i invazija. Ovo istraživanje pokazuje funkciju proteina BRMS1 u glioblastomima koja je suprotna njegovoj funkciji zabilježenoj u drugim vrstama raka, gdje ima ulogu supresora metastaziranja (Zhao i sur., 2024).

Moguća je i uloga proteina BRMS1 u regulaciji imunološkog sustava, pri čemu se pretpostavlja njegov mogući utjecaj na prezentaciju antigena na površini stanica, razinu citokinske signalizacije ili na interakcije stanica raka sa stanicama imunološkog sustava u promijenjenom, tumorskom mikrookolišu, što bi moglo doprinijeti supresiji metastaziranja, no ne postoje eksperimentalni dokazi za navedene hipoteze (Zimmermann i Welch, 2020).

#### **3. MATERIJALI I METODE**

#### 3.1. Animalni model

Ogulinska spiljska spužvica *Eunapius subterraneus* korištena je kao modelni organizam u ovom istraživanju, a prikupljena je na lokalitetu spilja Tounjčica (Tounj, Ogulin).

#### 3.2. Stanični modeli

3.2.1. Stanične linije čovjeka u kulturi

U ovom doktorskom radu korištene su sljedeće komercijalno dostupne tumorske stanične linije čovjeka:

- a) stanična linija adenokarcinoma vrata maternice čovjeka, HeLa (ATCC: CCL-2),
- b) stanična linija adenokarcinoma dojke čovjeka, MCF-7 (ECACC: 86012803) i
- c) stanična linija trostruko negativnog adenokarcinoma dojke čovjeka, MDA-MB-231 (ATCC: HTB-26),

te imortalizirana stanična linija fibroblasta embrija čovjeka MJ90 dobivena ljubaznošću dr. Olivie M. Pereira-Smith (University of Texas, Health Science Center, San Antonio, TX, USA).

Tumorske stanične linije čovjeka uzgajane su u uvjetima *in vitro* u tekućoj hranjivoj podlozi bogatoj glukozom DMEM (4,05–4,95 g/L glukoze, Sigma-Aldrich) uz dodatak 10 % seruma goveđeg fetusa (engl. *Fetal Bovine Serum*, FBS; Sigma-Aldrich), 1 % otopine neesencijalnih aminokiselina (Sigma-Aldrich) i 1 % otopine antibiotika/antimikotika (Capricon Scientific) u vlažnoj atmosferi pri 37 °C i 5 % CO<sub>2</sub>. Uvjeti uzgoja fibroblasta embrija čovjeka MJ90 bili su jednaki prethodno navedenim uvjetima, jedino u hranjivu podlogu DMEM nije dodana 1 % otopina neesencijalnih aminokiselina. Sve stanične linije rasle su u plastičnim T-bocama površine 75 cm<sup>2</sup> (Sigma-Aldrich) te su održavane u kulturi redovitim presađivanjem nakon odvajanja od podloge pomoću otopine 0,25 % tripsina s dodatkom 0,02 % EDTA (Sigma-Aldrich). Stanice su nasađene za određene pokuse u odgovarajuće sterilne posude za uzgoj kulture stanica različitih veličina (Sigma-Aldrich), a broj stanica određen je na brojaču stanica LUNA-II<sup>TM</sup> (Logos Biosystems).

#### 3.2.2. Primarna kultura stanica spužve

Ogulinska spiljska spužva *E. subterraneus* prikupljena je na lokalitetu Tounj te je u spiljskoj vodi transportirana u laboratorij i smještena u inkubator pri 8 °C uz povremenu aeraciju. Kultura stanica spužve pripremljena je metodom mehaničke disocijacije stanica. Spužva je homogenizirana pomoću ručnog homogenizatora u laminaru, a zatim je slijedio postupak izolacije stanica spužve. Stanice spužve odvojene su od spikula i ostalih dijelova spužve korištenjem sita s porama veličine 200  $\mu$ m, zatim 100  $\mu$ m i na kraju 40  $\mu$ m (Falcon). Sita su dodatno isprana filtriranom spiljskom vodom, a prikupljene stanice ostavljene su da se istalože na dno epruvete u trajanju od 30 minuta pri 4 °C. Nakon što su se stanice istaložile, supernatant je pažljivo uklonjen te je dodana nova filtrirana spiljska voda. Postupak ispiranja stanica ponavljan je sve dok supernatant nije postao bistar. Supernatant je na kraju pažljivo uklonjen te je l×10<sup>6</sup> stanica nasađeno i podijeljeno u Petrijevu zdjelicu koja sadrži četiri odvojena bunarića (Petrijeva zdjelica veličine 35 mm sa staklenim dnom koje prekriva površinu od 20 mm podijeljena u 4 odjeljka, Cellvis). Dobivena primarna kultura stanica spužve smještena je u inkubator na 8 °C do transfekcije.

#### 3.3. Bakterijski sojevi i plazmidi

#### 3.3.1. Sojevi bakterije E. coli

One Shot® TOP10 Electrocomp<sup>™</sup> (genotip: *hsdR, mcrA, lacZ*Δ*M15, endA1, recA13*) rutinski je korišten u svrhu kloniranja zbog visoke učinkovitosti transformacije i stabilnog umnažanja velikog broja kopija plazmidne DNA.

BL21 CodonPlus (DE3) (genotip: F<sup>-</sup> *ompT hsdS*(rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>)  $dcm^+$  Tet<sup>r</sup> gal  $\lambda$ (DE3) endA Hte [argU proL Cam<sup>r</sup>) rutinski je korišten za prekomjernu ekspresiju gena ukloniranih u ekspresijski vektor koji sadrži promotor T7. Soj sadrži gen za RNA polimerazu T7 integriran u bakterijski kromosom koji je pod kontrolom promotora lacUV5, koji se inducira dodatkom IPTG-a (engl. isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside).

#### 3.3.2. Komercijalno dostupni plazmidi

pET28b – plazmidni vektor koji se koristi za prekomjernu ekspresiju rekombinantnog proteina pod kontrolom inducibilnog promotora polimeraze T7 (T7lac). Plazmid je niskog broja kopija
i nosi otpornost na antibiotik kanamicin. Omogućava proizvodnju rekombinantnog proteina s heksahistidinskim privjeskom na N- ili C-terminalnom kraju proteina s ciljem pročišćavanja afinitetnom kromatografijom na TALON ili Ni-NTA agarozi.

pEGFP-N1/pEGFP-C1 – plazmidni vektor koji se koristi za ekspresiju gena pod kontrolom promotora citomegalovirusa čovjeka (CMV). Plazmid sadrži gen za otpornost na kanamicin za uzgoj u bakterijama te gen za otpornost na neomicin za uzgoj u stanicama čovjeka. Dizajniran je za ekspresiju proteina koji će na C-/N-terminalnom kraju nositi proteinski privjesak EGFP (engl. *green fluorescent protein*). EGFP je fluorescentni protein iz meduze *Aequorea victoria* koji omogućuje analizu smještaja proteina *in vivo*.

pmCherry-C1 – plazmidni vektor koji se koristi za ekspresiju gena pod kontrolom promotora citomegalovirusa čovjeka (CMV). Plazmid nosi gen za otpornost na kanamicin za uzgoj u bakterijama te gen za otpornost na neomicin za uzgoj u stanicama čovjeka. Dizajniran je za ekspresiju proteina koji će na N-terminalnom kraju nositi proteinski privjesak mCherry. mCHERRY je crveni fluorescentni protein koji omogućuje analizu smještaja proteina *in vivo*.

pcDNA3.1 – plazmidni vektor rutinski korišten za ekspresiju gena pod kontrolom promotora citomegalovirusa čovjeka (CMV) i ne posjeduje proteinski privjesak. Plazmid nosi gen za otpornost na ampicilin za uzgoj u bakterijama te gen za otpornost na neomicin za uzgoj u stanicama čovjeka. Dizajniran je za ekspresiju proteina u stanicama čovjeka.

# 3.4. Izolacija RNA i sinteza cDNA iz spužve E. subterraneus

Za izolaciju ukupne RNA iz stanica spužve *E. subterraneus* korišten je komercijalno dostupan komplet Qiagen RNeasy Kit (Qiagen) prema uputama proizvođača, uz dodatnu optimizaciju protokola za stanice spužve. Izolacija ukupne RNA provedena je u kabinetu za rad u sterilnim uvjetima u okruženju s minimalnom mogućnosti kontaminacije uzorka ribonukleazama (RNAazama) sa sterilnim priborom ili priborom koji je prethodno očišćen reagensom za uklanjanje RNAaza (RNaseZAP, Sigma-Aldrich). Uspješnost izolacije RNA provjerena je elektroforezom u 1 % agaroznom gelu.

Također je provjereno je li došlo do kontaminacije izolirane RNA genomskom DNA, a tu svrhu korištena je lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) s početnicama za gen koji kodira za citokrom c oksidazu. Gen za citokrom c oksidazu kodira za protein koji sudjeluje u mitohondrijskom respiratornom lancu, zbog čega je konstitutivno izražen u većini

stanica. Budući da nije provedena reverzna transkripcija, takav PCR produkt mogao bi nastati samo iz prisutne genomske DNA. Odsutnost umnoženog fragmenta citokrom c oksidaze nakon elektroforeze u agaroznom gelu stoga je potvrdila da RNA nije bila kontaminirana genomskom DNA.

Za reverznu transkripciju, odnosno sintezu cDNA prema kalupu izolirane RNA, korišten je komercijalno dostupan komplet SuperScript IV VILO Master Mix (Invitrogen) prema uputama proizvođača. Uspješnost sinteze cDNA provjerena je reakcijom PCR korištenjem početnica za citokrom c oksidazu. U ovom slučaju, prisutnost umnoženog fragmenta citokrom c oksidaze nakon elektroforeze u agaroznom gelu dokazala je uspješnost sinteze cDNA.

### 3.4.1. Elektroforeza nukleinskih kiselina u agaroznom gelu

Za elektroforezu u gelu korišten je 0,8–1 % agarozni gel (ovisno o veličini fragmenata) u puferu TAE (1 mM Tris baza, 1 mM octena kiselina, 1 mM EDTA, pH 8,0) uz dodatak etidijevog bromida (0,005 µg/mL). Razdvajanje nukleinskih kiselina provedeno je pri naponu 30–50 V na uređaju PowerPac 300 (Bio-Rad). DNA je vizualizirana pod UV-svjetlom (312 nm) na uređaju Syngene G:BOX (Syngene).

## 3.5. Bioinformatičke metode

Homolozi protoonkogena *r-ras2* i supresora metastaziranja *brms1* identificirani su korištenjem neobjavljene baze genoma i transkriptoma spužve *E. subterraneus* (prof. dr. sc. Kristian Vlahoviček, Grupa za bioinformatiku, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu). Analizirana je struktura spužvinih gena te je uspoređena s homolozima iz predstavnika Metazoa čije su nukleotidne sekvence preuzete iz javno dostupne baze genoma NCBI (engl. *NCBI's genomic database*, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/). Provedena je analiza i usporedba duljina, pozicija i faza introna navedenih gena spužve s homolozima kod viših organizama kako bi se proučila njihova evolucijska očuvanost, pri čemu su relevantni podaci o duljinama, pozicijama i fazama introna preuzeti iz navedenih baza podataka te su potom ručno uneseni u samostalno izrađenu shemu introna.

Uz navedeno, napravljena je detaljna bioinformatička analiza proteina R-RAS2 i BRMS1 iz spužve. Homolozi iz odabranih predstavnika životinja i drugih organizama identificirani su pretraživanjem baze NCBI (engl. *National Center for Biotechnology Information database*,

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) pomoću algoritma BLASTp (engl. *protein Basic Local Alignment Search Tool*). BLASTp korišten je za pretraživanje sveobuhvatne baze podataka proteina (engl. *non-redundant protein sequences*, nr) pomoću proteinske sekvence kao upita, pri čemu su korišteni standardni parametri definirani unutar programa. Za višestruko poravnanje aminokiselinskih sekvenci korišteni su neki od standardnih programskih paketa i servera (ClustalX 2.0, Larkin i sur., 2007; MUSCLE, Edgar, 2004), pri čemu su korišteni zadani parametri bez dodatnih modifikacija. Ključne domene i motivi proteina R-RAS2 i BRMS1 definirani su korištenjem bioinformatičkih alata i servera InterPro (engl. *Integrative protein signature* database, Blum i sur., 2025), SMART (engl. *Simple Modular Architecture Research Tool*, Letunic i sur., 2020) i baze konzerviranih domena NCBI CDD (engl. *Conserved Domain Database*, Wang i sur., 2023). Naša analiza pokazala je jesu li proteinske sekvence i ključne domene i motivi evolucijski očuvani između spužve i čovjeka. Postoci sličnosti i identičnosti proteinskih sekvenci dobiveni su korištenjem programskog paketa MatGAT 2.01 (Campanella i sur., 2003) prema matrici BLOSUM62, a vizualizirani pomoću toplinske karte (engl. *heatmap*) u programskom paketu Morpheus (https://software.broadinstitute.org/morpheus).

Kako bi se utvrdili međusobni evolucijski odnosi između različitih koljena Metazoa, provedene su sveobuhvatne filogenetske analize metodom "*maximum likelihood*" u programu MEGA7 (Kumar i sur., 2016) s 1000 replikata *bootstrap* prema najboljem supstitucijskom modelu određenom u programskom kompletu ProtTest (Darriba i sur., 2011). U programskom kompletu ProtTest testirani su standardni modeli evolucije proteina (Jones-Taylor-Thornton, JTT; Whelan and Goldman, WAG; Le and Gascuel, LG; Dayhoff; VT; Blosum62; i dr.) uz dodatne varijacije modela (uključivanje nepromjenjivih mjesta, +I; gama-distribuciju za promjenjivost među mjestima, +G; korištenje empirijskih frekvencija aminokiselina iz višestrukog poravnanja sekvenci, +F). Najbolji supstitucijski model odabran je na temelju najniže vrijednosti BIC (engl. *Bayesian Information Criterion*). U filogenetsku analizu proteina R-RAS2 uključeni su i paralozi BRMS1-like iz kralježnjaka.

## 3.6. Kloniranje gena od interesa u ekspresijske vektore

S ciljem izolacije i biokemijske karakterizacije proteina R-RAS2 i BRMS1, cDNA iz spužve *E. subterraneus* umnožena je pomoću specifično osmišljenih početnica i klonirana u ekspresijski vektor pET28b. Također je klonirana i cDNA koja kodira za proteine R-RAS2 i

BRMS1 iz čovjeka s komercijalno dostupnih plazmidnih vektora (R-RAS2, cat. no. RC204591, OriGene; BRMS1, cat. no. RC203428; Origene) u ekspresijski vektor pET28b. Dobiveni plazmidi korišteni su za ekspresiju rekombinantnih proteina spužve i čovjeka u bakterijskom soju *E. coli*.

Kako bi se odredio unutarstanični smještaj proteina R-RAS2, BRMS1 i BRMS1-like (HsaBRMS1-like, cat. no. RC202645, OriGene) iz spužve i čovjeka, cDNA koja sadrži gene od interesa klonirana je u ekspresijski vektor koji sadrži neki od fluorescentnih biljega, pmCherry ili pEGFP. Dobiveni plazmidi korišteni su za prekomjernu ekspresiju proteina spužve i čovjeka u tumorskim stanicama čovjeka MCF-7 i HeLa, stanicama fibroblasta čovjeka MJ90 te primarnoj kulturi stanica spužve. S ciljem određivanja biološke funkcije navedenih proteina iz spužve i čovjeka, cDNA koja sadrži gene od interesa klonirana je u ekspresijski vektor pcDNA3 uz dodatak biljega flag. Dobiveni plazmidi korišteni su za prekomjernu ekspresiju proteina spužve i čovjeka u tumorskim stanicama čovjeka MDA-MB-231.

# 3.6.1. Izrada početnica

Dizajnirane su specifično osmišljene početnice za umnažanje cDNA koja kodira za proteine R-RAS2 i BRMS1 iz spužve metodom PCR korištenjem sintetizirane cDNA spužve *E. subterraneus* kao kalupa. Također su dizajnirane i specifične početnice za umnažanje cDNA koja kodira za proteine R-RAS i BRMS1 iz spužve s ciljem ugradnje u ekspresijski vektor pET, kao i u komercijalno dostupne vektore koji sadrže neki od fluorescentnih biljega (pmCherry ili pEGFP) te vektor pcDNA3 uz dodatak biljega flag. Budući da nam je cilj bio usporediti funkciju proteina iz spužve s homolozima iz čovjeka, dizajnirane su i specifične početnice za umnažanje komercijalno dostupne cDNA koja kodira za proteine R-RAS2, BRMS1 te BRMS1-like iz čovjeka s ciljem ugradnje u gore navedene vektore. Početnice za kloniranje u ekspresijske vektore dizajnirane su tako da sadrže mjesta za razgradnju restrikcijskim endonukleazama. Dizajnirane početnice naručene su od komercijalnog proizvođača (Gorea Plus), a prikazane su u Tablicama 2 i 3.

Tablica 2. Početnice korištene za kloniranje gena *r-ras2* iz spužve i čovjeka u plazmide od interesa (Esu – *Eunapius subterraneus*, Hsa – *Homo sapiens*).

Gen	Plazmid/ biljeg	Početnice/ restrikcijska mjesta
r-ras2	/	5'-ACGATGGCGGCCAACAAAGACCTAAC-3'
(Esu)		5'-GGAGCTCACAGAATTACACATTTCTTC-3'

r-ras2	pET28b	NdeI: 5'-GTCTAGCATATGGCGGCCAACAAAGACCTAACCG-3'
(Esu)	6×His (N-kraj)	BamHI: 5'-CTAGACGGATCCTCACAGAATTACACATTTCTTC-3'
r-ras2	pET28b	NdeI: 5'-GTCTAGCATATGGCCGCGGCCGGCTGGCG-3'
(Hsa)	6×His (N −kraj)	XhoI: 5'-CTAGACCTCGAGTTAGAAAATGACACAATGGCAG-3'
r-ras2	pEGFP-C1	XhoI: 5'-GTCTAGCTCGAGGCATGGCGGCCAACAAAGAC-3'
(Esu)	GFP (N-kraj)	BamHI: 5'-CTAGACGGATCCTCACAGAATTACACATTTCTTC-3'
r-ras2	pEGFP-C1	XhoI: 5'-GTCTAGCTCGAGGCATGGCCGCGGCCGGCTGGCG-3'
(Hsa)	GFP (N-kraj)	BamHI: 5'-CTAGACGGATCCTTAGAAAATGACACAATGGC-3'
r-ras2	pmCherry-C1	XhoI: 5'-GTCTAGCTCGAGGCATGGCGGCCAACAAGACCTAACCG-3'
(Esu)	CHERRY (N-kraj)	BamHI: 5'-CTAGACGGATCCTCACAGAATTACACATTTCTTC-3'
r-ras2	pmCherry-C1	XhoI: 5'-GTCTAGCTCGAGGCATGGCCGCGGCCGGCTGGCG-3'
(Hsa)	CHERRY (N-kraj)	BamHI: 5'-CTAGACGGATCCTTAGAAAATGACACAATGGCAG-3'
r-ras2	pcDNA3.1	EcoRI: 5'-
(Esu)	flag (N-kraj)	GTCTAGGAATTCACGAGATGGACTACAAGGACGACGACGATAAGATGG
		CGGCCAACAAAGAC-3'
		XhoI: 5'-CTAGACCTCGAGTCACAGAATTACACATTTCTTC-3'
r-ras2	pcDNA3.1	EcoRI: 5'-
(Hsa)	flag (N-kraj)	GTCTAGGAATTCATGGACTACAAGGACGACGACGATAAGATGGCCGCG
		GCCGGCTGGCGG-3'
		XhoI: 5'-CTAGACCTCGAGTTAGAAAATGACACAATGGCAG-3'

Tablica 3. Početnice korištene za kloniranje gena *brms1* iz spužve i čovjeka te gena *brms1-like* iz čovjeka u plazmide od interesa (Esu – *Eunapius subterraneus*, Hsa – *Homo sapiens*).

Gen	Plazmid/ biljeg	Početnice/ restrikcijska mjesta
brms1	/	5'-ATGCCGGTCAACAGTACAACGAAAAG-3'
(Esu)		5'-GTTACAGTTCTACCACCTTTCTGTG-3'
brms1	pET28b	NdeI: 5'-GTCTAGCATATGATGCCGGTCAACAG-3'
(Esu)	6×His (N-kraj)	BamHI: 5'-CTAGACGGATCCTTACAGTTCTACCAC-3'
brms1	pET28b	NdeI: 5'-GTCTAGCATATGATGCCTGTCCAGCCTCCAAGC-3'
(Hsa)	6×His (N-kraj)	XhoI: 5'-CTAGACCTCGAGTTAAGGTCCATCCGATTTTCTC-3'
brms1	pEGFP-N1	EcoRI: 5'-GTCTAGGAATTCATGCCGGTCAACAG-3'
(Esu)	GFP (C-kraj)	BamHI: 5'-CTAGACGGATCCCGGGACAGTTCTACCAC-3'
brms1	pEGFP-N1	XhoI: 5'-GTCTAGCTCGAGATGCCAGTCCATTCCCGAGGGG-3'
(Hsa)	GFP (C-kraj)	EcoRI: 5'-CTAGACGAATTCCGGATGAATGTTTAATTGAATATTTCC-3'
brms1	pmCherry-C1	XhoI: 5'-GTCTAGCTCGAGGCATGCCTGTCCAGCCTCCAAGC-3'
(Hsa)	CHERRY (N-kraj)	EcoRI: 5'-CTAGACGAATTCTTAAGGTCCATCCGATTTTCTCTCTC-3'
brms1-like	pmCherry-C1	XhoI: 5'-GTCTAGCTCGAGGCATGCCAGTCCATTCCCGAGG-3'
(Hsa)	CHERRY (N-kraj)	EcoRI: 5'-CTAGACGAATTCTTATGAATGTTTAATTGAATATTTTCC-3'
brms1	pcDNA3.1	BamHI: 5'-
(Esu)	flag (N-kraj)	GTCTAGGGATCCATGGACTACAAGGACGACGACGATAAGATGCCGG
		TCAACAGTACAACG-3'
		EcoRI: 5'-CTAGACGAATTCTTACAGTTCTACCACCTTTCTG-3'
brms1	pcDNA3.1	EcoRI: 5'-
(Hsa)	flag (N-kraj)	GTCTAGGAATTCATGGACTACAAGGACGACGACGATAAGATGCCTG
		TCCAGCCTCCAAGC-3'
		XhoI: 5'-CTAGACCTCGAGTTAAGGTCCATCCGATTTTCTC-3'
brms1-like	pcDNA3.1	KpnI: 5'-
(Hsa)	flag (N-kraj)	GTCTAGGGTACCATGGACTACAAGGACGACGACGATAAGATGCCAG
		TCCATTCCCGAGGGGATAAGAAGGAGA-3'
		XhoI: 5'-
		CTAGACCTCGAGTTATGAATGTTTAATTGAATATTTTCCTTTCTGTAG
		CTG-3'

## 3.6.2. Umnažanje DNA lančanom reakcijom polimeraze

Za umnažanje gena od interesa (*r-ras2* iz spužve i čovjeka, *brms1* iz spužve i čovjeka te *brms1-like* iz čovjeka) korištena je metoda PCR. U reakcijsku smjesu dodane su specifične početnice (konačna koncentracija svake početnice 0,5  $\mu$ M), DNA kalup (1–50 ng) te komercijalno dostupan komplet koji sadrži polimerazu Q5 i pufer s dodanim nukleotidima i magnezijem (*Q5 High-Fidelty DNA Polymerase*, BioLabs) prema uputama proizvođača do ukupnog volumena od 25  $\mu$ L. Reakcija PCR provedena je na uređaju T100 Thermal Cycler (Bio-rad) kroz 35 termalnih ciklusa denaturacije, sparivanja početnica i produljenja, uz uvjete prikazane u Tablici 4. Uspješnost reakcije PCR provjerena je elektoforezom u 0,8 % agaroznom gelu.

Temperatura	Vrijeme	Korak	Broj ciklusa
98 °C	30 s	Početna denaturacija	1
98 °C	10 s	Denaturacija	
66 °C	20 s	Sparivanje početnica	35
72 °C	20 s	Produljenje	
72 °C	2 min	Završno produljenje	1
10 °C	Zadržavanje	Očuvanje produkta nakon reakcije	

Tablica 4. Uvjeti reakcije PCR za umnažanje gena od interesa.

## 3.6.3. Razgradnja DNA fragmenata i vektora restrikcijskim endonukleazama

Kako bi se specifično pocijepali DNA fragmenti dobiveni reakcijom PCR i odgovarajući ekspresijski vektori, korištene su restrikcijske endonukleaze navedene u Tablicama 2 i 3. Reakcijska smjesa za razgradnju DNA fragmenata ili vektora sadržavala je 1 µg DNA od interesa, komercijalni pufer FastDigest Buffer (10×) (Thermo Fisher Scientific) i po 1 µL svakog od dva restrikcijska enzima. Reakcijska smjesa inkubirana je 1 sat pri 37 °C. Nakon razgradnje DNA, smjesa razgrađenog vektora nanesena je na agarozni gel te je linearni produkt odgovarajuće veličine izrezan iz gela i pročišćen pomoću komercijalnog kompleta QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) prema uputama proizvođača. Isti je komplet korišten i za pročišćavanje PCR produkta razgrađenog restrikcijskim endonukleazama iz otopine (bez potrebe za provođenjem gel elektroforeze). Reakcijom razgradnje dobiveni su plazmidni vektori i PCR produkti sa stršećim 5'- i 3'- krajevima koji omogućuju njihovo sparivanje i ligaciju s ciljem konstrukcije rekombinantnih vektora.

### 3.6.4. Ligacija DNA pomoću DNA-ligaze

Pročišćeni PCR produkti (inserti) i vektori pocijepani istim restrikcijskim endonukleazama ligirani su u molarnom omjeru 3:1 korištenjem DNA ligaze T4 (ElectroLigase, BioLabs) prema uputama proizvođača. Masa vektora iznosila je 60 ng, dok je masa inserta izračunata prema formuli:

$$m(\text{insert})/ng = \frac{m(\textit{vektor})/\textit{pb} \times \textit{duljina}(\textit{insert})/\textit{pb}}{\textit{duljina}(\textit{vektor})/\textit{pb}} \times \text{molarni omjer insert/vektor}.$$

Reakcijska smjesa inkubirana je na sobnoj temperaturi (25 °C) tijekom 60 minuta, a zatim je DNA ligaza inaktivirana inkubacijom na 65 °C tijekom 15 minuta.

# 3.7. Transformacija odabranih sojeva bakterije E. coli

## 3.7.1. Transformacija elektrokompetentnog soja OneShot TOP10 elektroporacijom

Komercijalno dostupnim elektrokompetentim stanicama OneShot TOP10 (Thermo Fisher Scientific) dodano je 50 ng plazmidne DNA te je proveden postupak elektroporacije na uređaju GenePulser (Bio-Rad) pri naponu od 2500 V uz nadzor pulsa na uređaju Pulse Controller (Bio-Rad) s otporom od 200 Ω. Vrijeme pražnjenja kondenzatora bilo je 4–4,5 milisekundi. Korištena je kiveta za elektroporaciju s razmakom između elektroda od 0,2 cm. Neposredno nakon elektroporacije stanicama je dodan medij SOC (engl. *super optimal broth*) te je slijedila inkubacija na 37 °C u trajanju od 60 minuta. Odgovarajući volumen bakterijske suspenzije nasađen je na krute hranjive podloge LB (Luria-Bertani, BD Difco) s dodatkom odgovarajućeg antibiotika te su bakterijske stanice rasle na 37 °C preko noći (16 sati).

#### 3.7.2. Kemijska transformacija ekspresijskog soja BL21 CodonPlus (DE3) pLysS

Provedena je kemijska transformacija ekspresijskog soja bakterije *E. coli* BL21 CodonPlus (DE3) pLysS (Invitrogen) korištenjem pufera za transformaciju koji sadrži CaCl<sub>2</sub> (sastav pufera: 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl<sub>2</sub> i 10 mM CaCl<sub>2</sub>). U smjesu kemijski kompetentnih stanica BL21 CodonPlus volumena 100 µL dodano je 50 µL pufera za kemijsku transformaciju i do 50 ng DNA. Smjesa je inkubirana na ledu 5 minuta, a zatim je slijedio temperaturni šok pri 42 °C u trajanju od 30 sekundi nakon čega su stanice ponovno inkubirane na ledu 2 minute. Neposredno nakon kemijske transformacije stanicama je dodan medij SOC

te je slijedila inkubacija na 37 °C u trajanju od 60 minuta. Odgovarajući volumen bakterijske suspenzije nasađen je na krute hranjive podloge LB s dodatkom odgovarajućeg antibiotika te su bakterijske stanice rasle na 37 °C preko noći (16 sati).

Nakon prekonoćnog rasta transformiranih bakterijskih stanica na krutim LB pločama, nasumično su odabrane kolonije za PCR reakciju umnažanja kako bi se provjerilo koje su bakterije primile plazmid s genom od interesa. Korištene su početnice specifične za pojedini vektor (koncentracija početnica 0,4  $\mu$ M), polimeraza Ex Taq (TaKaRa) prema uputama proizvođača te DNA iz odabranih kolonija uzeta nastavkom mikropipete. Reakcija PCR provedena je na uređaju T100 Thermal Cycler (Bio-rad) kroz 35 termalnih ciklusa denaturacije, sparivanja početnica i produljenja, uz uvjete prikazane u Tablici 5. Uspješnost reakcije PCR provjerena je elektroforezom u 0,8 % agaroznom gelu.

Temperatura	Vrijeme	Korak	Broj ciklusa
95 °C	3 min	Početna denaturacija	1
95 °C	30 s	Denaturacija	
55 °C	45 s	Sparivanje početnica	35
72 °C	75 s	Produljenje	
72 °C	5 min	Završno produljenje	1
10 °C	Zadržavanje	Očuvanje produkta nakon reakcije	

Tablica 5. Uvjeti reakcije PCR na kolonijama.

# 3.7.3. Izolacija plazmidne DNA iz bakterijskih kolonija

Odabrane bakterijske kolonije za koje je PCR reakcijom utvrđeno da sadrže rekombinantni plazmid stavljene su na prekonoćni uzgoj u tekuću hranjivu podlogu LB s dodatkom odgovarajućeg antibiotika. Nakon prekonoćnog uzgoja pri 37 °C, izolacija plazmidne DNA iz bakterijskih kolonija provedena je tehnikom alkalne lize bakterijskih stanica korištenjem komercijalnog kompleta QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) prema uputama proizvođača. Koncentracija izolirane plazmidne DNA izmjerena je na uređaju DeNovix DS-11 pri valnoj duljini od 260 nm.

#### 3.7.4. Provjera rekombinantnog plazmida restrikcijskim enzimima i sekvenciranjem

Uspješnost ugradnje cDNA koja kodira za protein od interesa u odgovarajuće vektore provjerena je restrikcijskom analizom rekombinantnih plazmida izoliranih iz odabranih bakterijskih kolonija, te dodatno analizom nukleotidnih sljedova sekvenciranjem. Restrikcijska analiza provedena je pomoću odgovarajućih restrikcijskih endonukleaza koje su korištene za kloniranje specifičnih fragmenata u odgovarajuće vektore (Tablice 2 i 3). Reakcijska smjesa sadržavala je plazmidnu DNA mase do 1 µg te po 10 U svakog od dvaju restrikcijskih enzima (FastDigest, Thermo Fisher Scientific) uz odgovarajući pufer prema uputama proizvođača. Reakcijska smjesa inkubirana je 60 minuta na 37 °C, a dobiveni produkti analizirani su gelelektroforezom. Konačna provjera konstruiranih plazmida provedena je sekvenciranjem po Sangeru na uređaju ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer (Zavod za molekularnu biologiju, Institut Ruđer Bošković, Zagreb). Za provjeru ugradnje cDNA koja kodira za protein od interesa u odgovarajuće vektore (pET28b, pmCherry-C1, pEGFP-N1, pEGFP-C1 i pcDNA3) postupkom sekvenciranja, korištene su komercijalno dostupne početnice komplementarne sljedovima uzvodno i nizvodno od mjesta ugradnje inserata pojedinih vektora.

## 3.8. Metode izolacije proteina i biokemijski testovi

## 3.8.1. Pročišćavanje proteina metodom afinitetne kromatografije

## 3.8.1.1. Prekomjerna ekspresija proteina od interesa

Za određivanje optimalnih uvjeta prekomjerne ekspresije proteina R-RAS2 i BRMS1 iz spužve i čovjeka u plazmidu pET28b, napravljena je indukcija u malom volumenu pri različitim uvjetima (različite koncentracije IPTG-a, vrijeme indukcije i temperature). Tekuće hranjive podloge LB i TB (BD Difco) s antibiotikom kanamicinom ( $35 \mu g/mL$ ) inokulirane su kolonijom ekspresijskog soja *E. coli* BL21 CodonPlus koja sadrži plazmid od interesa te su stavljene na prekonoćni uzgoj na 37 °C uz trešnju (220 okretaja u minuti). Nakon prekonoćnog uzgoja, kultura bakterijskih stanica razrijeđena je u svježoj hranjivoj podlozi s kanamicinom u omjeru 1:100 i nastavljen je uzgoj pri istim uvjetima do postizanja optičke gustoće (OD<sub>600</sub>) od 0,6 do 0,8 (eksponencijalna faza rasta). S ciljem usporedbe različitih uvjeta uzgoja na ekspresiju rekombinantnih proteina, svaka bakterijska kultura uzgajana je na 30 °C tijekom 3 sata dodatkom 0,8 mM IPTG-a i na 16 °C preko noći uz dodatak 0,1 mM IPTG-a. Nakon završetka indukcije, bakterijske kulture centrifugirane su pri 15900 × g 60 sekundi na 4 °C (Centrifuge 5415 R, Eppendorf), a talozi su resuspendirani u 1 mL pufera za proteine (25 mM Tris-HCl (pH 7,4), 500 mM NaCl). Supernatanti i talozi izloženi su djelovanju ultrazvuka na ledu 4 puta po 30 sekundi pri amplitudi 40 na uređaju Ultrasonic processor 130 watt (Cole-Parmer) te centrifugirani pri 15900 × g 30 minuta pri 4 °C (Centrifuge 5415R, Eppendorf). Zatim su odvojeni supernatanti i talozi, a talozima je dodano po 1 mL pufera za proteine. Dobiveni uzorci analizirani su natrij dodecil sulfat-elektroforezom u poliakrilamidnom gelu (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE). Optimalni uvjeti prekomjerne ekspresije pojedinih gena u plazmidu pET28b određeni indukcijom u malom volumenu navedeni su u Tablici 6.

Gen za ekspresiju	Uvjeti optimalne prekomjerne ekspresije proteina	Optimalna hranjiva podloga
EsuRRAS2	Uzgoj pri 16 °C preko noći uz dodatak 0,1 mM IPTG-a	LB
HsaRRAS2	Uzgoj pri 30 °C tijekom 3 sata uz dodatak 0,8 mM IPTG-a	LB
EsuBRMS1	Uzgoj pri 30 °C tijekom 3 sata uz dodatak 0,8 mM IPTG-a	LB
HsaBRMS1	Uzgoj pri 30 °C tijekom 3 sata uz dodatak 0,8 mM IPTG-a	LB

Tablica 6. Optimalni uvjeti prekomjerne ekspresije gena u ekspresijskom soju E.coli.

S ciljem izolacije i pročišćavanja proteina R-RAS2 i BRMS1 iz spužve i čovjeka, napravljena je prekomjerna ekspresija navedenih proteina u velikom volumenu s dodatkom IPTG-a u uvjetima koji su određeni probnom indukcijom. Nakon završetka indukcije, bakterijska kultura centrifugirana je 30 minuta pri  $3000 \times g$  na 4 °C (Centra Mp4R Centrifuge, International Equipment Company, IEC). Talog je pohranjen pri -80 °C do korištenja.

# 3.8.1.2. Priprema proteinskog ekstrakta za izolaciju

Talog bakterijskih stanica resuspendiran je u 50 mL pufera WA (25 mM Tris-HCl (pH 7,5), 500 mM NaCl, 10 mM imidazol). Nakon toga dodan je inhibitor proteaza (cOmplete Protease Inhibitor Cocktail, Roche) i lizozim koncentracije 1 mg/mL (Sigma-Aldrich), te je slijedila inkubacija na ledu u trajanju od 10 minuta. Bakterijske stanice sonicirane su na ledu 3–5 puta po 3 minute na amplitudi 40 (uz puls od 3 sekunde s 3 sekunde pauze) na uređaju Ultrasonic processor 130 watt (Cole-Parmer). Razmaci između svakog ponavljanja soniciranja bili su najmanje 60 sekundi na ledu. Dobiveni stanični lizat centrifugiran je 30 minuta pri 10000 × g na 4 °C (Biofuge Primo R, Heraeus), a dobiveni supernatant (proteinski ekstrakt) profiltriran je

kroz sterilni filtar veličine pora 0,22 μm te podvrgnut pročišćavanju na TALON agarozi pomoću histidinskog privjeska.

## 3.8.1.3. Pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom na TALON agarozi

Prekomjerno eksprimirani proteini obilježeni su nizom od šest histidinskih ostataka (His<sub>6</sub>) na N-terminalnom kraju te su pročišćeni na Co<sup>2+</sup>-NTA agarozi (TALON Metal Affiniti Resin, TaKaRa). Metalni ligand Co<sup>2+</sup> vezan na NTA-agarozu ima sposobnost stvaranja reverzibilnih interakcija s polihistidinskim privjeskom rekombinantnog proteina što omogućava njegovo zadržavanje na kromatografskoj koloni. Elucija proteina postiže se ispiranjem kolone puferom koji sadrži visoke koncentracije imidazola, budući da kompetitivnim vezanjem imidazola na ione Co<sup>2+</sup> dolazi do otpuštanja vezanog proteina.

Za ispiranje kolone i eluciju proteina korišteni su puferi istog osnovnog sastava (25 mM Tris-HCl (pH 7,5), 500 mM NaCl) s rastućim koncentracijama imidazola (10, 20, 40 i 300 mM). Najprije je na kolonu nanesen proteinski ekstrakt s ciljem vezanja proteina od interesa na ione Co<sup>2+</sup>. Zatim je kolona isprana puferima za ispiranje (10, 20, 40 mM imidazol) kako bi se uklonili nespecifično vezani proteini, a nakon ispiranja slijedila je elucija proteina od interesa puferom koji sadrži 300 mM imidazol (E). Pročišćeni proteini analizirani su metodom SDS-PAGE.

## 3.8.1.4. Ukoncentriravanje proteina i izmjena pufera ultrafiltracijom

Pročišćeni uzorci proteina ukoncentrirani su za daljnju biokemijsku analizu metodom ultrafiltracije centrifugiranjem pri 4000 × g na 4 °C (Biofuge Primo R, Heraeus). Ultrafiltracija je provedena korištenjem centrikona Amicon® Ultra centrifugal filters (Milipore, Merck) s porama kroz koje prolaze čestice manje od 10 ili 30 kDa, ovisno o veličini proteina, prema uputama proizvođača. Ukoncentriranom proteinu zatim je dodan pufer za pohranjivanje (25 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 10% glicerol) te su uzorci pohranjeni pri -80 °C.

## 3.8.2. Natrij dodecil sulfat-elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)

Za analizu izoliranih proteina korištena je metoda SDS-PAGE u denaturirajućim uvjetima pri čemu su proteini razdvojeni na temelju razlike u molekulskoj masi. Gelovi za elektroforezu sastojali su se od 4 % gela za sabijanje i 8–12 % gela za razdvajanje proteina, ovisno o molekulskoj masi proteina od interesa. Sastav korištenog gel za sabijanje uzoraka je: 4 % akrilamid-bisakrilamid (29:1), 0,125 mol/L Tris-HCl (pH 6,8), 0,1 % SDS, 0,7 μg/mL APS, 0,05 % TEMED; a gela za razdvajanje proteina: 8–12 % akrilamid-bisakrilamid (29:1), 0,375 mol/L Tris-HCl (pH 8,8), 0,1 % SDS, 0,7 μg/mL APS, 0,05 % TEMED.

Uzorci proteina izoliranih afinitetnom kromatografijom pripremljeni su dodatkom 4×SDS pufera za nanošenje na gel (sastav 4×SDS pufera: 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 12,5 mM β-merkaptoetanol, 6,25 % glicerol, 1,25 % SDS; 0,002 % bromfenolno plavilo) te su denaturirani tijekom 5 minuta pri 95 °C u termobloku. Postupak elektroforeze proveden je na sobnoj temperaturi u puferu SDS (14,4 g/L glicin, 3,03 g/L Tris-HCl (pH 8,3), 0,1 % SDS) u trajanju od 15 minuta pri 120 V s ciljem sabijanja proteina, a zatim 45 min pri 180 V s ciljem razdvajanja proteina. Uzorci su vizualizirani bojenjem gela u otopini boje CBB R-250 (2,5 g/L CBB R-250, 10 % octena kiselina, 45 % etanol) u trajanju od 15 minuta na tresilici. Višak boje uklonjen je inkubacijom gela u puferu za odbojavanje (25 % metanol, 7 % octena kiselina, dH<sub>2</sub>0) tijekom 20 minuta na tresilici.

# 3.8.3. Određivanje koncentracije proteina na spektrofotometru

Koncentracija proteina određena je na spektrofotometru DeNovix DS-11 mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 280 nm. Koncentracija proteina određuje se iz 1 µL uzorka te je u program instrumenta potrebno unijeti teoretski izračunat molarni ekstinkcijski koeficijent i molekulsku masu ispitivanog proteina. Kao slijepa proba za nuliranje instrumenta koristi se pufer u kojem je protein pohranjen. Molarni ekstinkcijski koeficijent proteina R-RAS2 i BRMS1 iz spužve i čovjeka izračunat je pomoću mrežno dostupnog programa ProtParam (https://web.expasy.org/protparam/), prikazano u Tablici 7.

Tablica 7. Molekulska masa i ekstinkcijski koeficijent rekombinantnih proteina obilježenih heksahistidinskim privjeskom.

Naziv proteina	Molekulska masa (Dalton, Da)	Ekstincijski koeficijent (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )
6×His-EsuRRAS2	23939,42	13535
6×His-HsaRRAS2	25331,68	16180
6×His-EsuBRMS1	29048,82	9065
6×His-HsaBRMS1	30392,76	32555

## 3.8.4. Test određivanja GTPazne aktivnosti proteina

Za određivanje intrinzične GTPazne aktivnosti proteina R-RAS2 iz spužve i čovjeka korišten je komercijalno dostupni komplet GTPase-Glo<sup>TM</sup> Assay (Promega) prema uputama proizvođača.

S ciljem optimizacije koncentracije enzima, pročišćeni EsuRRAS2-like i HsaRRAS2 serijski su razrijeđeni u puferu GTPaza/GAP s dodatkom 1  $\mu$ M GTP-a te je reakcijska smjesa inkubirana 120 minuta na sobnoj temperaturi (25 °C). Zatim je dodano 10  $\mu$ L reagensa GTPase-Glo te je slijedila inkubacija tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi uz miješanje. Nakon toga je dodano 20  $\mu$ L detekcijskog reagensa uz inkubaciju od 5 do 10 minuta na sobnoj temperaturi te je luminiscencija izmjerena korištenjem bijele mikroploče s 384 bunarića (Greiner) na uređaju Infinite M200 plate reader (Tecan).

Za određivanje intrinzične GTPazne aktivnosti EsuRRAS2 i HsaRRAS2, reakcijska smjesa za svaki od navedenih proteina sadržavala je enzim koncentracije 6,25  $\mu$ M (791,875 ng), prethodno određeno enzimskom titracijom. Kao kontrola najveće vrijednosti luminiscencije uzeta je otopina 1  $\mu$ M GTP-a u puferu GTPaza/GAP bez dodatka enzima. Reakcija određivanja i mjerenja GTPazne aktivnosti provedena je u istim uvjetima kao što je prethodno opisano.

## 3.8.5. Test vezanja proteina na molekulu RNA

Sposobnost nespecifičnog vezanja proteina na molekulu RNA ispitana je metodom opisanom u znanstvenim radovima (Beljan i sur., 2020; prema Kim i sur., 2003). U tu svrhu, proteini od interesa (EsuRRAS2-like i HsaRRAS2) inkubirani su sa poliuridilnom kiselinom vezanom na matriks agaroze (poli(U) agaroza) ili slobodnom poli(U) (Sigma-Aldrich).

Reakcijska smjesa sadržavala je 5  $\mu$ g proteina i 100  $\mu$ L hladnog reakcijskog pufera (10 mM HEPES (pH 7,4), 100 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 % Triton X-100 i 3 mM DTT) s dodatkom slobodne poli(U) u rastućim koncentracijama od 0, 0,1 i 1 mg/mL. Nakon dodatka slobodne poli(U), reakcijska smjesa inkubirana je 20 minuta na 4 °C uz miješanje. Zatim je u reakcijsku smjesu dodano 10  $\mu$ L 50 % poli(U) agaroze otopljene u reakcijskom puferu te je slijedila inkubacija 30 minuta na 4 °C uz miješanje. Nakon inkubacije, reakcijska smjesa centrifugirana je 1 minutu pri 9300 × g na 4 °C (Centrifuge 5415 R, Eppendorf). Talog je zatim ispran šest puta u reakcijskom puferu te centrifugiran u navedenim uvjetima. Proteini vezani na poli(U) agarozu eluirani su dodatkom 10  $\mu$ L 6×pufera za nanošenje uzoraka na SDS-poliakrilamidni

gel (sastav 6×pufera: 6 mL glicerola, 1,2 g SDS, 0,31 g DTT, 1,25 mL 0,5 M pufera Tris (pH 6,8), boja bromfenol modro, dH<sub>2</sub>O do ukupnog volumena 10 mL) i denaturirani 10 minuta na 70 °C. Uzorci su analizirani gel-elektroforezom u 12 % poliakrilamidnom gelu i vizualizirani bojanjem u otopini boje CBB R-250. Kao negativna kontrola korišten je albumin iz goveđeg seruma (BSA) koji ne pokazuje sposobnost vezanja na molekulu RNA, a kao pozitivna kontrola korišten je protein HsaDRG1 za koji je pokazano kako ima mogućnost vezanja na RNA.

## 3.9. Metode biološke karakterizacije proteina

## 3.9.1. Prolazna transfekcija staničnih linija čovjeka i primarnih stanica spužve

Stanice su za određene pokuse nasađene u odgovarajuće sterilne posude za uzgoj kulture stanica te je broj stanica određen na brojaču stanica LUNA-II<sup>TM</sup> (Logos Biosystems). Nakon 24 sata, tumorske stanične linije čovjeka i stanice fibroblasta embrija čovjeka MJ90 transficirane su plazmidom od interesa korištenjem transfekcijskog reagensa Lipofectamine 3000 (Invitrogen) prema uputama proizvođača te su inkubirane na 37 °C tijekom iduća 24 sata. Primarna kultura stanica spužve *E. subterraneus* transficirana je plazmidom od interesa pomoću transfekcijskog reagensa Turbofect (Thermo Fisher Scientific) prema uputama proizvođača, nakon čega je slijedila inkubacija 24 sata pri 8 °C.

## 3.9.2. Određivanje razine ekspresije proteina metodom Western blot

## 3.9.2.1. Priprema staničnog lizata

Za analizu proteina metodom *Western blot*,  $5 \times 10^5$  tumorskih stanica čovjeka (MCF-7 ili MDA-MB-231) nasađeno je u 2 mL sterilne hranjive podloge DMEM sa serumom (DMEM-FBS) u sterilne posude za uzgoj kulture stanica sa šest bunarića. Stanice su transficirane kao što je prethodno opisano (poglavlje 3.9.1.). Svi koraci u pripremi staničnog lizata provedeni su na ledu. 24 sata nakon transfekcije, stanice su tri puta isprane u hladom puferu PBS te im je dodano po 300 µL pufera RIPA (50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % NP40, 0,1 % SDS, 0,5 % natrijev deoksilat) s dodatkom inhibitora proteaza (*cOmplet Protease Inhibitor Cocktail*, Roche). Stanice su zatim pažljivo odvojene od površine posude za uzgoj na kojoj su rasle pomoću gumene strugalice (engl. *Policeman, cell scraper*; Sarstedt), a prikupljeni stanični lizati prebačeni su u mikroepruvete volumena 1,5 mL i inkubirani 20 minuta na ledu uz povremeno vorteksiranje. Uzorci su zatim centrifugirani (Centrifuge 5415 R, Eppendorf) pri

 $15900 \times g$ , 10 minuta, 4 °C. Supernatant u kojemu se nalaze stanični proteini odvojen je u nove mikroepruvete te je određena koncentracija proteina. Lizati su nakon toga pripremljeni za analizu metodom *Western blot* ili pohranjeni na -80 °C do daljnje analize.

#### 3.9.2.2. Određivanje koncentracije proteina u staničnim lizatima

Za određivanje koncentracije proteina u staničnim lizatima korišten je komercijalno dostupan komplet Pierce BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific) prema uputama proizvođača. Koncentracija proteina određena je u mikrotitarskim plastičnim pločicama s 96 bunarića, a kao standard korišten je BSA u rastućim koncentracijama od 0 do 2 mg/mL. U bunarić je ispipetirano 25 µL standarda ili uzorka te mu je dodano 200 µL otopine reagensa iz kompleta (A:B=50:1) te je reakcijska smjesa inkubirana 30 minuta pri sobnoj temperaturi (25 °C) u mraku. Apsorbancija je izmjerena pri 570 nm na spektrofotometru (Labsystems Multiskan EX, Thermo Fisher Scientific).

Nakon određivanja koncentracije proteina, smjesa proteina u staničnim lizatima razdvojena je metodom SDS-PAGE kao što je prethodno opisano (poglavlje 3.8.2.), a uzorci su pripremljeni dodatkom 6×pufera za nanošenje uzoraka na SDS-poliakrilamidni gel i denaturirani 10 minuta na 70 °C. Gelovi korišteni za SDS-PAGE sastojali su se od 4 % gela za sabijanje uzoraka te 8 %, 10 % ili 12 % gela za razdvajanje proteina, ovisno o molekularnoj masi razdvajanih proteina. Na gel je naneseno po 10 µg proteina staničnog lizata.

#### 3.9.2.3. Vizualizacija proteina metodom Western blot

Proteini razdvojeni pomoću SDS-PAGE preneseni su na membranu PVDF (Roche) pomoću sustava Mini-PROTEAN. Prijenos proteina na membranu odvijao se pri konstantnoj jakosti struje od 100 mA, tijekom 16 h na 4 °C u puferu za prijenos (25 mM Tris, 192 mM glicin, 20 % metanol, pH 8,4). Kontrola prijenosa proteina na membranu i nanošenja jednake količine proteina na gel provjerena je bojenjem membrane bojom Amido Black. Nakon prijenosa proteina na membranu, membrana je isprana u puferu PBS tijekom 10 minuta te inkubirana u otopini boje Amido Black (0,1 % Amido Black 10B, 20 % metanol, 2 % octena kiselina, dH<sub>2</sub>O) tijekom 60 sekundi. Membrani je zatim dodana otopina za odbojavanje (45 % metanol, 7 % octena kiselina, dH<sub>2</sub>O) dva puta po 30 minuta te je isprana u reH<sub>2</sub>0. Membrana je zatim fotografirana te isprana u puferu za ispiranje TBST (engl. *Tris-Buffered Saline*; 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), i 0,1 % Tween-20).

S ciljem identifikacije proteina na membrani primarnim i sekundarnim protutijelima, membrana je inkubirana 45 minuta u 0,2 % otopini reagensa I-Block (Tropix) u PBS-u. Nakon blokiranja, membrana je inkubirana u otopini primarnog protutijela razrijeđenog u otopini za blokiranje preko noći na 4 °C na tresilici. Sljedeći dan membrana je isprana tri puta po 10 minuta u puferu za ispiranje TBST te inkubirana 60 minuta u otopini sekundarnog protutijela konjugiranog s peroksidazom hrena (1:5000 v/v) na tresilici pri sobnoj temperaturi. Nakon toga membrana je isprana tri puta po 10 minuta u puferu TBST. Korištena primarna i sekundarna protutijela navedena su u Tablici 8. Proteini na koje su se vezala specifična protutijela vizualizirani su metodom kemiluminiscencije pomoću komercijalno dostupnog kompleta (BM Chemiluminescence Western Blotting Substrate, Roche) prema uputama proizvođača na uređaju Uvitec Alliance Q9. Svi uzorci rađeni su biološkom duplikatu i ponovljeni u najmanje tri pokusa. Kvantitativna analiza dobivenih signala kemiluminiscencije napravljena je korištenjem računalnog programa ImageJ (National Institutes of Health, NIH).

Protutijelo	Izvor (vrsta	Antigen/ Organel	WB	ICC	Proizvođač/
	životinje)				Kat. broj
Protu-6×His	Miš	6×His	1:1000		Takara bio
					(#631212)
Protu-FLAG	Miš	flag	1:1000		Sigma- Aldrich
					(#F1804)
Protu-TC21	Miš	HsaRRAS2	1:1000		Abcam
		EsuRRAS2-like			(ab234145)
Protu-BRMS1	Kunić	HsaBRMS1	1:1000		Abcam
		HsaBRMS1-like			(ab134968)
Protu-EEA1	Miš	Rani endosomi	1:250	1:100	<b>BD</b> Biosciences
					(#610457)
Protu-TfR	Miš	Reciklirajući	1:500	1:100	Invitrogen
		endosomi			(#13-6890)
Protu-Rab7	Kunić	Kasni endosomi	1:1000	1:100	Abcam
					(ab137029)
Protu-LAMP1	Kunić	Lizosomi	1:1000	1:100	Sigma-Aldrich
					(#L1418)
Protu-miš-HRP	Konj	IgG miša	1:5000		Cell Signaling
					Technology
					(#7076S)
Protu-kunić-HRP	Konj	IgG kunića	1:5000		Invitrogen
					(#31460)
Alexa Fluor 594	Majmun	IgG miša		1:500	Invitrogen
protu-miš IgG					(#A21203)
Alexa Fluor 594	Majmun	IgG kunića		1:500	Invitrogen
protu-kunić IgG	-	-			(#21207)

TT 11' O D '	1 1	4 4 ** 1	· · · ·	• 1•	4 1
Lablica & Popis	Koristenin	profittiela	1 razriedenia	za poledinu	metodu
raomea or ropio	norioteinni	provacijena	i iazijeaenja	za pojeania	11101044

#### 3.9.3. Određivanje protein-protein interakcija metodom koimunoprecipitacije

Koimunoprecipitacija je provedena kako bi se ispitala sposobnost proteina HsaBRMS1 za tvorbu homodimera ili heterodimera s proteinima EsuBRMS1 i HsaBRMS1-like. Ukratko, tumorske stanice čovjeka MDA-MB-231 ko-transficirane su plazmidom pcDNA3 koji nosi cDNA koja kodira za za HsaBRMS1 ili EsuBRMS1 obilježen biljegom flag i plazmidom pEGFP-N1 koji nosi cDNA koja kodira za HsaBRMS1, EsuBRMS1 ili HsaBRMS1-like obilježen biljegom GFP. Provedena je i transfekcija stanica plazmidom pcDNA3 koji nosi cDNA koja kodira za EsuBRMS1 obilježen biljegom flag kako bi se vidjelo može li spužvin homolog tvoriti heterodimer s endogeno eksprimiranim HsaBRMS1. Kontrolne stanice ko-transficirane su praznim plazmidima pcDNA3 i pEGFP-N1.

Stanice su prikupljene 24 sata nakon transfekcije, lizirane u puferu za koimunoprecipitaciju (50 mM Tris (pH 7,4),150 mM NaCl, 2 mM EDTA; 1 % NP40, 0,5 % Triton X-100) s dodatkom inhibitora proteaza te pažljivo odvojene od površine posude za uzgoj kulture stanica na kojoj su rasle pomoću gumene strugalice. Uzorci su zatim centrifugirani na mikrocentrifugi (Centrifuge 5415 R, Eppendorf) pri 15900 × g, 10 minuta pri 4 °C. Supernatant u kojemu se nalaze stanični proteini odvojen je u nove mikroepruvete te je određena koncentracija proteina kao što je prethodno opisano (poglavlje 3.9.2.2.).

Imunoprecipitacija HsaBRMS1 i EsuBRMS1 obilježenih biljegom flag provedena je korištenjem protu-flag agaroze (*ANTI-FLAG M2 Affinity Gel*, Sigma-Aldrich). 200  $\mu$ g proteina inkubirano je s 40  $\mu$ L protu-flag agaroze koja je prethodno tri puta isprana u puferu za ispiranje sastava: 50 mM Tris (pH 7,6), 500 mM NaCl, 2 mM EDTA, te je slijedila inkubacija na rotatoru pri 4 °C preko noći. Sljedeći dan uzorci su centrifugirani pri 800 × g tijekom 15 minuta pri 4 °C, a proteini vezani na protu-flag agarozu isprani su dva puta u puferu za ispiranje te dva puta u puferu za ispiranje jednakog sastava sa smanjenom koncentracijom soli (150 mM NaCl). Između svakog koraka ispiranja, uzorci su centrifugirani pri 800 × g tijekom 1 minute pri 4 °C. Proteini vezani na protu-flag agarozu analizirani su metodom SDS-PAGE i metodom *Western blot* korištenjem specifičnog protutijela protu-BRMS1, koje prepoznaje proteine HsaBRMS1 i HsaBRMS1-like.

## 3.9.4. Određivanje unutarstaničnog smještaja proteina

Za analizu unutarstaničnog smještaja proteina, tumorske stanične linije čovjeka HeLa i MCF-7  $(2 \times 10^4 \text{ stanice/bunariću})$  te stanična linija fibroblasta čovjeka MJ90  $(7,5 \times 10^4/\text{bunariću})$ 

nasađene su u 500  $\mu$ L hranjive podloge DMEM-FBS na stakalca promjera 12 mm (VWR) smještena u sterilne posude za uzgoj kulture stanica s 24 bunarića. Stakalca su prethodno sterilizirana u laminaru provlačenjem kroz plamen te smještena u bunariće. Nakon 24 sata, stanice su transficirane plazmidom koji sadrži gen od interesa obilježen fluorescentnim biljegom (pmCherry ili pEGFP) kao što je prethodno opisano (poglavlje 3.9.1.). Stanice spužve (1×10<sup>6</sup>) nasađene su u Petrijevu zdjelicu koja sadrži četiri odvojena bunarića (Petrijeva zdjelica veličine 35 mm sa staklenim dnom). Primarna kultura stanica spužve transficirana je odabranim plazmidom (pEGFP koji sadrži cDNA koja kodira za protein od interesa) kao što je prethodno opisano (poglavlje 3.9.1.).

# 3.9.4.1. Određivanje unutarstaničnog smještaja fluorescentno obilježenih proteina

Metodom konfokalne mikroskopije analiziran je unutarstanični smještaj proteina R-RAS2 i BRMS1 iz spužve i čovjeka te proteina BRMS1-like iz čovjeka obilježenih fluorescentnim biljegom (pmCherry ili pEGFP) u prolazno transficiranim tumorskim stanicama čovjeka (HeLa i MCF-7), stanicama fibroblasta embrija čovjeka MJ90 i stanicama spužve *E. subterraneus* (primarna kultura stanica spužve).

Tumorske stanične linije čovjeka i stanice fibroblasta su 24 sata nakon transfekcije isprane tri puta u PBS-u te fiksirane u otopini 4 % paraformaldehida u 4 % saharozi (Sigma-Aldrich) u PBS-u tijekom 20 min. Stanice su zatim isprane tri puta u PBS-u. Stanice spužve nisu fiksirane jer nisu niti bile pričvršćene za podlogu. Hoechst (Sigma-Aldrich) je korišten za bojenje jezgri. Uvjeti bojenja bili su sljedeći: HeLa i MJ90 stanice bojene su s 1 mg/mL boje Hoechst u PBSu tijekom 10 minuta na sobnoj temperaturi, dok su stanice spužve bojene s 35 µg/mL boje Hoechst u svježoj spiljskoj vodi tijekom 30 minuta na 8 °C. Slike su snimljene pomoću laserskog konfokalnog mikroskopa Leica TCS SP8 (Zavod za molekularnu biologiju, Institut Ruđer Bošković, Zagreb). Dodatna obrada slika provedena je pomoću računalnog programa ImageJ (NIH) i CorelDRAW Graphic Suite (Alludo).

# 3.9.4.2. Određivanje smještaja proteina metodom imunofluorescencije

Kako bi se odredio smještaj proteina R-RAS2 i BRMS1 iz spužve i čovjeka te proteina BRMS1like iz čovjeka obilježenih biljegom flag (u plazmidu pcDNA3) u prolazno transficiranim tumorskim stanicama čovjeka MCF-7, korištena je metoda imunofluorescencije. Ova je metoda također korištena prilikom određivanja kolokalizacije proteina R-RAS2 iz spužve i čovjeka s biljezima staničnih organela.

Stanice su 24 sata nakon transfekcije isprane tri puta u PBS-u te fiksirane u otopini 4 % paraformaldehida u 4 % saharozi (Sigma-Aldrich) u PBS-u tijekom 20 min. Stanice su zatim isprane tri puta u PBS-u te analizirane metodom imunofluorescencije. Fiksirane stanice permeabilizirane su u 0,2 % otopini saponina (Sigma-Aldrich) u PBS-u tijekom 10 min. Zatim su isprane tri puta u PBS-u te blokirane na sobnoj temperaturi 1 h u 4 % otopini magarećeg seruma (engl. donkey serum). Nakon blokiranja, stanice su obilježene primarnim protutijelima razrijeđenima u otopini za blokiranje. Obilježavanje protutijelima odvijalo se u vlažnoj komori. U čvrstu zatamnjenu posudu stavljen je vlažni papir (Whatman, Sigma-Aldrich) te parafilm na koji je ispipetirano 60 µL otopine primarnog protutijela (primarna protutijela i njihova razrjeđenja nalaze se u Tablici 8). Svako stakalce je pincetom izvađeno iz bunarića te okrenuto naopako da stanice budu uronjene u otopinu protutijela. Stakalca su inkubirana u primarnom protutijelu preko noći pri 4 °C. Nakon inkubacije stakalca su isprana tri puta u PBS-u te inkubirana u otopini sekundarnog protutijela konjugiranog s fluorokromom razrijeđenog u korištenoj otopini za blokiranje (1:500 v/v) tijekom 1 h pri sobnoj temperaturi u tamnoj vlažnoj komori. Korištena su sekundarna protutijela navedena su u Tablici 8. Stakalca su isprana 3 puta u PBS-u te su jezgre bojene s 1 mg/mL boje Hoechst u PBS-u tijekom 10 minuta na sobnoj temperaturi. Stakalca su zatim isprana tri puta u PBS-u, dva puta u mQ-H2O te uklopljena na predmetna stakalca (VWR) koristeći medij za uklapanje Fluoromount (Sigma-Aldrich). Fluorescentni signali su vizualizirani pomoću konfokalnog laserskog mikroskopa Leica SP8 X FLIM (Zavod za molekularnu biologiju, Institut Ruđer Bošković, Zagreb). Dodatna obrada slika provedena je pomoću računalnog programa ImageJ (NIH) i CorelDRAW Graphic Suite (Alludo).

# 3.9.5. Određivanje biološke funkcije proteina u procesima povezanima s rakom

Kako bi se odredila uloga proteina R-RAS2 i BRMS1 u procesima stanične proliferacije, migracije i stvaranja kolonija, tumorske stanice čovjeka transficirane su proteinima R-RAS2 i BRMS1 iz spužve i čovjeka te proteinom BRMS1-like iz čovjeka obilježenim biljegom flag u plazmidu pcDNA3. Kontrolne stanice transficirane su praznim plazmidom pcDNA3. Svi pokusi rađeni su u biološkom duplikatu i ponovljeni u najmanje tri pokusa te je napravljena statistička analiza dobivenih rezultata.

## 3.9.5.1. Ispitivanje uloge proteina u procesu stanične proliferacije

Za analizu proliferacije stanica proveden je kolorimetrijski test MTT ((3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid) (Millipore). Ukratko, 4×10<sup>3</sup> stanica MDA-MB-231 nasađeno je u 150 µL hranjive podloge DMEM-FBS u sterilne ploče za uzgoj kulture stanica s 96 bunarića te su stanice transficirane plazmidom od interesa kao što je prethodno opisano (poglavlje 3.9.1.). Četrdeset osam sati nakon transfekcije, sa stanica je uklonjena tekuća hranjiva podloga te je dodan reagens 1×MTT (0,5 mg/mL MTT u hranjivoj podlozi DMEM) i slijedila je inkubacija na 37 °C u trajanju od 4 sata. Stanicama je nakon inkubacije dodan dimetil sulfoksid te su stanice inkubirane na sobnoj temperaturi tijekom 15 minuta na miješalici. Apsorbancija je izmjerena na 570 nm pomoću spektrofotometra (Labsystems Multiskan EX, Thermo Fisher Scientific).

# 3.9.5.2. Ispitivanje uloge proteina u procesu stanične migracije Test zacjeljivanja rana

Tumorske stanice čovjeka MDA-MB-231 (5×10<sup>4</sup> stanica/bunariću) nasađene su u 500 µL hranjive podloge DMEM-FBS u sterilne posude za uzgoj kulture stanica s 24 bunarića i transficirane (opisano u poglavlju 3.9.1.). Dvadeset četiri sata nakon transfekcije, stanice su zagrebane sterilnim nastavkom mikropipete od 100 µL kako bi se napravila dva okomita pravca. Stanice su zatim isprane svježom hranjivom podlogom DMEM-FBS i inkubirane 24 sata pri 37 °C. Migracija stanica praćena je mjerenjem udaljenosti stanica od jedne do druge strane "ogrebotine" na četiri mjesta u svakom bunariću pomoću 100× invertnog mikroskopa (Olympus CKX41). Udaljenosti su kvantificirane usporedbom početnih vrijednosti udaljenosti stanica i vrijednosti nakon 24 sata na istome mjestu u bunariću korištenjem računalnog programa ImageJ (NIH).

Test migracije stanica korištenjem Boydenovih komorica

Za test migracije stanica korištenjem Boydenovih komorica,  $5 \times 10^5$  tumorskih stanica čovjeka MDA-MB-231 nasađeno je u 2 mL sterilne hranjive podloge DMEM-FBS u sterilne posude za uzgoj kulture stanica sa 6 bunarića i transficirane kao što je prethodno opisano (poglavlje 3.9.1.). Stanice su 24 sata nakon transfekcije podvrgnute gladovanju uklanjanjem hranjive podloge DMEM-FBS i dodatkom hranjive podloge DMEM u trajanju od 12 sati. Nakon transfekcije i gladovanja stanica, stanice su resuspendirane u hranjivoj podlozi DMEM uz dodatak 1% otopine neesencijalnih aminokiselina, 1 % otopine antibiotika/antimikotika i 0,1 %

BSA te su nasađene u Boydenove komorice (*Transwell Cell Culture Inserts, pore size 8 mm,* Corning) pri gustoći od  $2,5 \times 10^4$  stanica/komorici. Komorice su zatim uronjene u bunariće sterilne posude za uzgoj kulture stanica s 24 bunarića u koji je dodana hranjiva podloga DMEM-FBS te su ostavljene da migriraju prema kemotaksičnom agensu (hranjiva podloga DMEM-FBS) tijekom 24 sata pri 37 °C. Nakon 24 sata, Boydenove komorice isprane su tri puta u PBSu te su stanice koje nisu migrirale i nalazile su se na gornjoj membrani komorice pažljivo uklonjene plastičnim štapićem s vatom namočenom u PBS. Stanice koje su migrirale na donju membranu fiksirane su u 4% otopini paraformaldehida/saharoze tijekom 10 minuta na sobnoj temperaturi, isprane tri puta u PBS-u te bojene 1 % otopinom boje kristalno ljubičaste (engl. *crystal violet*) tijekom 60–90 minuta pri sobnoj temperaturi. Membrana sa stanicama koje su migrirale snimljena je mikroskopom (Olympus BX51) pri povećanju od 200×. Stopa migracije stanica kvantificirana je korištenjem računalnog programa ImageJ (NIH).

## 3.9.5.3. Ispitivanje uloge proteina u procesu stvaranja kolonija

Za test stvaranja kolonija, 5×10<sup>5</sup> tumorskih stanica čovjeka MDA-MB-231 nasađeno je u 2 mL sterilne hranjive podloge DMEM-FBS u sterilne posude za uzgoj kulture stanica sa 6 bunarića i transficirano plazmidima pcDNA3 koji sadrže gene od interesa te praznim plazmidom pcDNA3 kao kontrolom (opisano u poglavlju 3.9.1.). Dvadeset i četiri sata nakon transfekcije, stanice su resuspendirane i nasađeno je po 5×10<sup>4</sup> stanica u plastične Petrijeve zdjelice. Stanicama je dodano po 5 mL hranjive podloge DMEM-FBS s dodatkom antibiotika geniticina G418 (Neomicin, Sigma-Aldrich) koncentracije 2000 mg/mL za selekciju kolonija koje su primile plazmid od interesa. Stanice su inkubirane u trajanju od 7 do 14 dana na 37 °C kako bi se omogućilo stvaranje kolonija, a hranjiva podloga s antibiotikom mijenjana je prema potrebi. Nakon inkubacije, kolonije su isprane tri puta u PBS-u, fiksirane dodatkom 100 % metanola tijekom 10 minuta na sobnoj temperaturi. Obojene kolonije fotografirane su mobitelom, a brojanje stvorenih kolonija provedeno je pomoću softvera ImageJ (NIH).

# 3.10. Statistička obrada podataka

Statistička analiza podataka provedena je korištenjem statističkog paketa SPSS za Windows (v17.0). Svi biološki eksperimenti izvedeni su u 2 ili 3 biološke replike i ponovljeni najmanje tri puta kako bi se osigurala pouzdanost rezultata. Rezultati analize *Western blot* i bioloških

eseja kvantificirani su pomoću programskog paketa ImageJ (NIH). Za usporedbu srednjih vrijednosti dviju nezavisnih skupina i utvrđivanje njihove međusobne razlike korišten je Studentov t-test ili analiza varijacije ANOVA, uz razinu statističke značajnosti p<0,05.

# 4. REZULTATI

U genomu spužve *E. subterraneus*, modelnog organizma korištenog u ovoj doktorskoj disertaciji, identificirani su homolozi gena koji kodiraju za onkoprotein R-RAS2 i supresor metastaziranja BRMS1 kod čovjeka. Kako bi se omogućilo kloniranje navedenih gena u ekspresijske vektore i njihova funkcionalna analiza, izolirana je ukupna RNA te je sintetizirana cDNA iz spužve *E. subterraneus*. Provedena je sveobuhvatna bioinformatička, biokemijska i biološka analiza proteina R-RAS2-like i BRMS1 iz spužve te njihova usporedba s odgovarajućim homolozima iz čovjeka. Poglavlje *Rezultati* stoga je strukturirano u tri potpoglavlja:

- Izolacija RNA i sinteza cDNA iz spužve Eunapius subterraneus,
- *Karakterizacija homologa proteina R-RAS2 iz spužve i usporedba s proteinom R-RAS2 iz čovjeka* te
- *Karakterizacija homologa proteina BRMS1 iz spužve i usporedba s proteinima BRMS1 i BRMS1-like iz čovjeka.*

# 4.1. Izolacija RNA i sinteza cDNA iz spužve Eunapius subterraneus

S ciljem kloniranja cDNA koja kodira za proteine R-RAS2-like i BRMS1 iz spužve u odgovarajuće ekspresijske vektore, najprije je izolirana ukupna RNA iz spužve *E. subterraneus*. Kvaliteta i čistoća izolirane RNA provjerena je elektroforezom u agaroznom gelu (Slika 7.A). Reakcijom PCR s početnicama za citokrom c oksidazu potvrđeno je da izolirana RNA nije kontaminirana genomskom DNA.

Reakcijom PCR sintetizirana je cDNA spužve *E. subterraneus*, pri čemu je kao kalup korištena prethodno izolirana RNA. Uspješnost sinteze cDNA provjerena je reakcijom PCR korištenjem novosintetizirane cDNA kao kalupa i početnica za citokrom c oksidazu. Prisutnost umnoženog fragmenta citokrom c oksidaze u svim testnim uzorcima (1–4) nakon elektroforeze u agaroznom gelu dokazala je uspješnost sinteze cDNA (Slika 7.B). Kao negativna kontrola korištena je reakcija bez dodanog kalupa, odnosno bez dodane cDNA (NK).

Novosintetizirana cDNA spužve *E. subterraneus* poslužila je kao kalup za umnažanje slijeda nukleotida koji kodira za proteine BRMS1 (Slika 7.C) i R-RAS2-like (Slika 7.D) metodom

PCR, korištenjem početnica dizajniranih na temelju transkriptoma spužve *E*. subterraneus (Tablica 2 i 3).



Slika 7. A) Izolirana ukupna RNA iz spužve *E. subterraneus* razdvojena elektroforezom u agaroznom gelu. (M) biljeg MassRuler, (1–2) uzorci izolirane RNA komercijalno dostupnim kompletom Rneasy Mini Kit (Qiagen). B) Uspješnost sinteze cDNA provjerena reakcijom PCR pomoću početnica za citokrom c oksidazu. (M) biljeg MassRuler, (1–4) uzorci sintetizirane cDNA reakcijom PCR, (NK) negativna kontrola. C) Umnoženi fragment cDNA koji kodira za protein BRMS1 (694 bp) i D) R-RAS2-like (584 bp) iz spužve *E. subterraneus*. Na slici desno naznačene su veličine vrpci u biljegu MassRuler izražene u parovima baza (bp).

4.2. Karakterizacija homologa proteina R-RAS2 iz spužve i usporedba s proteinom R-RAS2 iz čovjeka

4.2.1. Bioinformatička analiza evolucijske prošlosti proteina podobitelji R-Ras

Kako bi se razjasnila evolucija proteina podobitelji R-Ras, provedena je sveobuhvatna filogenetska analiza koja je uključivala predstavnike podobitelji R-Ras (R-RAS1, R-RAS2 i M-RAS) iz Metazoa, ali i njihovih najbližih jednostaničnih srodnika (Protista). Kod Protista i jednostavnih životinja bez bilateralne simetrije (Porifera i Cnidaria) pronađen je samo jedan predstavnik ove podobitelji proteina, ancestralni protein koji je postojao prije duplikacija koje su se dogodile tijekom evolucije životinja. Budući da je provedena bioinformatička analiza pokazala da je taj homolog najsličniji proteinu R-RAS2 iz čovjeka, nazvan je R-RAS2-like. Provedena je i evolucijska analiza strukture gena *r-ras2* iz odabranih predstavnika Metazoa kako bi se usporedile duljine, pozicije i faze introna.

## 4.2.1.1. Filogenetska analiza proteina podobitelji R-Ras

Filogenetsko stablo konstruirano je metodom najveće vjerojatnosti u programu MEGA7 prema evolucijskom modelu JTT+G+I (ProtTest). Dobiveno filogenetsko stablo (Slika 8) pokazalo je da je M-RAS nastao iz ancestralnog R-RAS2-like nespecifičnom duplikacijom koja se najvjerojatnije dogodila tijekom prijelaza na životinje s bilateralnom simetrijom. To potvrđuje prisutnost proteina M-RAS u svim koljenima od kolutićavaca (Annelida) do svitkovaca (Chordata). Proteini M-RAS formirali su jasno definiranu zajedničku granu (vrijednost bootstrap 100 %), odvojenu od ostalih predstavnika podobitelji R-Ras, što ukazuje na njihovu zasebnu evoluciju. Evolucijska analiza sugerira da su R-RAS1 i R-RAS2 nastali iz ancestralnog R-RAS2-like duplikacijom do koje je došlo kasnije tijekom evolucije životinja, prilikom prijelaza na koštunjače (Odtrichthyes), što ukazuje na moguću funkcionalnu specijalizaciju ovih dvaju paraloga u kralježnjaka (Vertebrata). Između predstavnika paraloga R-RAS1 i R-RAS2 jasno je definirano grananje (vrijednosti bootstrap 99 % i 100 %), što podupire pretpostavku divergentne evolucije ovih dvaju paraloga u kralježnjaka. Proteini R-RAS2-like iz spužvi (Porifera) grupirali su se u zajedničku dobro podržanu granu s predstavnicima iz Protista (vrijednost bootstrap 75 %), a formiraju sestrinsku granu s predstavnicima iz žarnjaka (Cnidaria), također bazalnih životinja bez bilateralne simetrije. Predstavnici R-RAS2-like iz životinja s bilateralnom simetrijom formirali su nezavisnu granu, s kladama koje uglavnom odgovaraju taksonomskim skupinama kojima pripadaju.



0.1

Slika 8. Filogenetska analiza proteina podobitelji R-Ras iz životinja i protista. Filogenetsko stablo konstruirano je metodom najveće vjerojatnosti prema modelu JTT+G+I u programu MEGA7. Vrijednosti *bootstrap* dobivene su na temelju 1000 *bootstrap* replikacija (vrijednosti *bootstrap* veće od 50 % prikazane su na čvorovima evolucijskog stabla). Analiza uključuje 77 aminokiselinskih sekvenci. Predstavnici proteina R-RAS2-like i R-RAS2 prikazani su žutom

bojom, s navedenim taksonomskim skupinama, a predstavnici proteina R-RAS i M-RAS bijelom bojom. Protein R-RAS2-like iz spužve *E. subterraneus* i homolog R-RAS2 iz čovjeka označeni su podebljanim slovima. Kratice latinskih naziva organizama objašnjene su u Prilogu.

Kako bi se pružio bolji uvid u duplikacije ancestralnog proteina R-RAS2-like tijekom evolucije životinja, izrađena je Tablica 9. U tablici je prikazano koje skupine životinja u svom genomu sadrže pojedine članove proteina podobitelji R-Ras te vremenski okvir duplikacijskih događaja koji su rezultirali nastankom proteina R-RAS1, R-RAS2 i M-RAS iz ancestralnog R-RAS2-like.

Tablica 9. Prikaz pojedinih proteina podobitelji R-Ras u određenim skupinama Metazoa. Kratice latinskih naziva organizama objašnjene su u Prilogu.

		Hsa	R-RAS1	R-RAS2	M-RAS
	ata	Gga	/	R-RAS2	M-RAS
	rtebr	Gev	R-RAS1	R-RAS2	M-RAS
	Ve	Xtr	R-RAS1	R-RAS2	M-RAS
teria		Dre	R-RAS1	R-RAS2	M-RAS
Bilater		Bbe		R-RAS2-like	M-RAS
		Cin		R-RAS2-like	M-RAS
		Spu		R-RAS2-like	M-RAS
		Aro		R-RAS2-like	M-RAS
		Cgi		R-RAS2-like	M-RAS
Non-		Nve		R-RAS2-like	
bilater	ia	Esu		R-RAS2-like	

## 4.2.1.2. Analiza evolucijske očuvanosti ključnih domena i motiva proteina R-RAS2

\_

Protein R-RAS2-like iz spužve (GenBank: WDZ04215.1) identificiran je pretraživanjem neobjavljene baze genoma i transkriptoma endemske spužve *E. subterraneus* (prof. dr. sc. Kristian Vlahoviček, Grupa za bioinformatiku, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu), a ima 191 aminokiselinu. Napravljen je shematski prikaz proteina R-RAS2-like s označenim ključnim domenama i motivima (Slika 9.A), a nukleotidna i proteinska sekvenca spužvinog R-RAS2-like prikazana je na slici 9.B.

A)			G		G	2	C	33					G4	L.		G5				Caa
					Swi	itchl		Swi	tchll										(	IVR
B)	<mark>atg</mark>	gcg	gcc	aac	aaa	gac	cta	acc	gaa	tat	aag	ttg	gtt	gtg	gtt	ggt	gga	ggt	gga	gtt
	M	A	A	N	K	D	L	T	E	Y	K	L	V	V	V	G	G	G	G	V
	ggc	aaa	tcg	gcg	ctt	act	att	cag	ttc	att	cag	agt	cat	ttc	gtc	gaa	gag	tat	gac	ccc
	G	K	S	A	L	T	I	Q	F	I	Q	S	H	F	V	E	E	Y	D	P
	acg	ata	gaa	gac	tct	tat	cgg	aag	cag	tgc	gtg	att	gat	gat	gaa	gtg	gca	gtc	ttg	gac
	T	I	E	D	S	Y	R	K	Q	C	V	I	D	D	E	V	A	V	L	D
	atc	ctg	gac	aca	gct	ggg	cag	gag	gag	ttt	agc	gcg	atg	agg	gag	caa	tac	atg	cac	acg
	I	L	D	T	A	G	Q	E	E	F	S	A	M	R	E	Q	Y	M	H	T
	gga	gag	gga	ttt	ctg	ctg	gtc	tat	tcg	att	atc	gac	cgg	aac	agc	ttt	gat	gag	atc	cac
	G	E	G	F	L	L	V	Y	S	I	I	D	R	N	S	F	D	E	I	H
	aag	ttt	tac	aga	caa	att	cta	agg	gta	aag	gac	aga	tcc	gag	ttt	ccg	atg	att	ttg	gtt
	K	F	Y	R	Q	I	L	R	V	K	D	R	S	E	F	P	M	I	L	V
	gcc	aac	aag	gcc	gat	ttg	gag	agc	gaa	aga	gtg	gta	cat	tat	cct	gag	ggt	gaa	gag	ctt
	A	N	K	A	D	L	E	S	E	R	V	V	H	Y	P	E	G	E	E	L
	gct	gca	caa	ctg	aag	atc	aag	tac	att	gag	aca	agt	gcc	aaa	cac	aag	gtg	cat	gtc	gac
	A	A	Q	L	K	I	K	Y	I	E	T	S	A	K	H	K	V	H	V	D
	aag K aag	gca A gag	ttt F aag	cat H	gac D aag	cta L aag	gtg V aaa	agg R tat	gtc V gta	ata I att	aga R	aag K	tat Y	cag Q	aaa K	cct P	ggt G	cca P	gac D	aag K
	K	E	K	K	K	K	K	C	V	I	L	-								

Slika 9. Protein R-RAS2-like iz spužve *E. subterraneus* (GenBank: WDZ04215.1). A) Shematski prikaz proteina R-RAS2-like iz spužve s označenim ključnim domenama i motivima. Za izradu slike korišten je CorelDRAW Graphic Suite (Alludo). B) Usporedni prikaz nukleotidne i proteinske sekvence proteina R-RAS2-like iz spužve *E. subterraneus*. Startni i stop kodon označeni su žutom bojom, pet motiva G koji zajedno čine G-domenu označeni su zelenom bojom, dvije regije *switch* ljubičastom bojom, HVR crvenom bojom, a motiv CaaX narančastom bojom. Za izradu slike korišten je bioinformatički alat Expasy Translate (https://web.expasy.org/translate/).

Budući da spužve imaju samo jednog predstavnika podobitelji R-Ras, provedena je usporedba proteinskih sekvenci proteina R-RAS2-like iz spužvi sa sva tri predstavnika iz čovjeka (R-RAS1, R-RAS2 i M-RAS) (Slika 10). Pokazano je da homolog iz spužve *E. subterraneus* pokazuje najveću sličnost u primarnoj strukturi s proteinom R-RAS2 (78,4 %), zatim sa M-RAS (71,6 %) te najmanju sličnost sa R-RAS1 (64,2 %) iz čovjeka. Zatim je analizirana očuvanost ključnih domena i motiva važnih za vezanje i hidrolizu molekule GTP-a, prisutna kod svih predstavnika superobitelji proteina Ras. Uočeno je kako je svih pet motiva G evolucijski očuvano između spužvi i čovjeka, a jedina razlika primijećena je u motivima G1 (GDGGVGKS umjesto GGGGVGKS) i G4 (NKVD umjesto NKAD) proteina M-RAS iz čovjeka (Slika 10). Ove razlike u skladu su s rezultatima filogenetske analize i dodatno

potvrđuju da se protein M-RAS vjerojatno zasebno evolucijski razvijao od proteina R-RAS1 i R-RAS2. Uz navedeno, analizirana je i evolucijska očuvanost dviju regija *switch* koje mijenjaju konformaciju uslijed vezanja i hidrolize molekule GTP-a. Analizom je pokazano da je regija *switchI* visoko evolucijski očuvana između svih analiziranih predstavnika (identičnost 100 %), dok je regija *switchII* također evolucijski očuvana, ali s nešto manjim postotkom identičnosti (78–100 %). Važna razlika između predstavnika podobitelji proteina R-Ras je u hipervarijabilnoj regiji (engl. *hypervariable region*, HVR) koja se nalazi na C-terminalnom kraju analiziranih proteina. Unutar HVR paralozi R-RAS1 i R-RAS2 iz čovjeka imaju očuvan motiv bogat aminokiselinom prolinom, koji nije prisutan kod proteina M-RAS iz čovjeka niti homologa R-RAS2-like iz spužvi. Na C-terminalnom kraju svih analiziranih proteina nalazi se motiv CaaX, važan za smještaj proteina u staničnoj membrani (Furuhjelm i Peränen, 2003).

				G	1		
	*	20	*	40	)	*	60
HsaRRAS	MSSGAASGTGRG	RPRGGGPGPG	DPPPSETH	KLVVVGGGGV	GKSALTIQF	IQS <mark>Y</mark> FV	/SDYDP
HsaRRAS2		MAAAGWI	RDGSGQEK	REVVVGGGGV	GKSALTIQF	IQSYF\	/TDYDP
HsaMRAS		MATSAVI	SDN-LPTY	KLVVVG <mark>D</mark> GGV	GKSALTIQF	FQKIFV	PDYDP/
AquRRAS2L		MATN	KELTEY	KLVVVG <mark>G</mark> GGV	GKSALTIQF	IQS <mark>H</mark> F\	/EEYDP
EsuRRAS2L		MAAN	KDLTEY	KLVVVG <mark>G</mark> GGV	GKSALTIQF	IQS <mark>H</mark> FV	/EEYDP
SdoRRAS2L		MAAS	KDLTEY	KLVVVG <mark>GGGV</mark>	GKSALTIQF	IQS <mark>H</mark> F\	/EEYDP
OmiRRAS2L		MSRE	NQTREY	<b>KLVVVGGGGV</b>	GKSALTIQF	IQS <mark>Q</mark> FV	/EDYDP
	~~						Switch I
	<u>G2</u> *	80	<u> </u>	100	)	*	120
HsaRRAS	TIEDSYTKICSV	DGIP <mark>A</mark> RIDII	DTAGQEEF	AMREQYMRA	GHGFLLVFA	INDRQS	SENEVG
HsaRRAS2	TIEDSY <mark>TK</mark> QCVI	IDDRAARLDII	LDTAGQEEF	AMREQYMR	GEGFLLVFS	VIDRGS	SFEEIY
HsaMRAS	TIEDSY <mark>LK</mark> HTEI	DNQWAILDVI	LDTAGQEEF	SAMREQYM <mark>R</mark> I	GDGFLIVYS	VTDKAS	SFEHVD
AquRRAS2L	TIEDSY <mark>RK</mark> QCVI	DDEVAVLDII	DTAGQEEF	SAMREQYMHT	GEGFLLVYS	IIDRNS	SEDEIP
EsuRRAS2L	TIEDSYRKQCVI	DDEVAVLDII	DTAGQEEF	SAMREQYMH1	GEGFLLVYS	IIDRNS	SEDE IH
SdoRRAS2L	TIEDSYRKQCVI	DDEVAVLDII	DTAGQEEF	SAMREQYMH1	<b>GEGFLLVY</b> S	IIDRNS	SFEEIP
OmiRRAS2L	TIEDSYRKNGVI	DDEVAILDII	DTAGQEEF	SAMREQYMHE	GEGFLLVYS	IVDRNS	SFEEIP
	A				_		
	Switch I			Switch II			
	Switch I	140 _	<b>G4</b> *	Switch II 160	)	* <u>G5</u>	180
HsaRRAS	Switch I * KLFTQILRVKDE	140 _ RDDFPVVLVC	G4 *	Switch II 160 VPRSEASAE	) 'Gashh <mark>v</mark> ayf	* <u>G5</u> DASAKI	180 <b>R-INV</b>
HsaRRAS <b>HsaRRAS2</b>	Switch I * KLFTQILRVKDF KFQRQILRVKDF	140 - DDFPVVLVGN RDEFPMILIGN	G4 * NKADLESQRO NKADLDHQRO	Switch II 160 VPRSEASAE VTQEECQOI	GASHHVAYF ARQLKVTYM	* <u>G5</u> Easaki Easaki	180 R-INV R-MNV
HsaRRAS <b>HsaRRAS2</b> HsaMRAS	Switch I * KLFTQILRVKDF KFQRQILRVKDF RFHQLILRVKDF	140 - DDFPVVLVG DEFPMILIG ESFPMILVAN	G4 * WADLESOR WADLDHOR WVDLMHLR	Switch II 160 VPRSEASAE VTQEECQOI VTQEECQOI	GASHHVAYF ARQLKVTYM ATKHNIPYI	* <u>G5</u> Pasaki Pasaki Ptsaki	180 R-LNV R-MNV PPLNV
HsaRRAS <b>HsaRRAS2</b> HsaMRAS AquRRAS2L	Switch I * KLFTQILRVKDF KFQRQILRVKDF RFHQLILRVKDF KFHKQILRVKDF	140 - RDDFPVVLVG RDEFPMILIG RESFPMILVAN SEFPMILVAN	G4 * VKADLESQRQ VKADLDHQRQ VKVDLMHLRP VKADLETDRV	Switch II 160 VPRSEASAE VTQEECQOI VTQEECQOI VITREQCKEM VSYQECEEI	GASHHVAYF ARQLKVTYM ATKHNIPYI AKTLKIGYV	* <u>G5</u> BASAKI BASAKI BTSAKI BASAKI	180 LR-LNV IR-MNV DPPLNV IR-VHV
HsaRRAS HsaRRAS2 HsaMRAS AquRRAS2L EsuRRAS2L	Switch I KLFTQILRVKDF KFQRQILRVKDF RFHQIILRVKDF KFHKQILRVKDF KFYRQILRVKDF	140 - RDDFPVVLVG RDEFPMILIG ESFPMILVAN SEFPMILVAN SEFPMILVAN	G4 * VKADLESOR VKADLDHOR VKVDLMHLRI VKADLETDRV VKADLESER	Switch II 160 VPRSEASAE VTQEE COI (ITREOCKEN VSYOE CE II VHYPE CE II	GASHHVAYF ARQLKVTYM ATKHNIPYI AKTLKIGYV AQLKIKYI	* <u>G5</u> BASAKI BASAKI BTSAKI BASAKI BTSAKI	180 LR-LNV IR-MNV DPPLNV IR-VHV IR-VHV
HsaRRAS HsaRRAS2 HsaMRAS AquRRAS2L EsuRRAS2L SdoRRAS2L	Switch I KLFTQILRVKDF KFQRQILRVKDF RFHQIILRVKDF KFHKQILRVKDF KFYRQILRVKDF KFHKQILRVKDF	140 RDDFPVVLVG RDEFPMILIG ESFPMILVAN SEFPMILVAN SEFPMILVAN GDFPMILVAN	G4	Switch II 16( VPRSEASAE VTQEE-QOI (ITREQ-K-M VSYQE-E-I VHYPE-E-I VYTLSE-E-I	GASHHVAYF ←RQLKVTY ←TKHNIPYI ←KTLKIGY ←AQLKIKYI ←QQLKIKY	* <u>G5</u> BASAKI BASAKI ETSAKI BASAKI ETSAKI ETSAKI	180 R-INV R-MNV DPPLNV IR-VHV IK-VHV IR-VHV
HsaRRAS HsaRRAS2 HsaMRAS AquRRAS2L EsuRRAS2L SdoRRAS2L OmiRRAS2L	Switch I KLFTQILRVKDF KFQRQILRVKDF RFHQIILRVKDF KFHKQILRVKDF KFYRQILRVKDF KFHKQILRVKDF KLCKTILRVKEF	140 RDDFPVVLVG RDEFPMILIG SEFPMILVAN SEFPMILVAN GDFPMILVAN RSFPMILVAN	G4	Switch II 16( VPRSPASAE VTQEP-QOI (ITREQ-K-M VSYQE-E-I VYTLSPCE-I VVTLSPCE-I VVTLSPCE-I	GASHHVAYF - RQLKVTY - TKHNIPY - KTLKIGY - AQLKIKY - QQLKIKY - QSLNIKY	* <u>G5</u> BASAKI EASAKI ETSAKI EASAKI ETSAKI ETSAKI ETSAKI	180 R-LNV R-MNV DPPLNV IR-VHV IR-VHV IR-VHV IR-INV
HsaRRAS HsaRRAS2 HsaMRAS AquRRAS2L EsuRRAS2L SdoRRAS2L OmiRRAS2L	*   KLFTQILRVKDF   KFQRQILRVKDF   RFHQILRVKDF   KFHKQILRVKDF   KFYRQILRVKDF   KFHKQILRVKDF   KFHKQILRVKDF   KFHKQILRVKDF   KLCKTILRVKEF	140 - RDDFPVVLVG RDEFPMILIG ESFPMILVAN SEFPMILVAN SEFPMILVAN GDFPMILVAN RPSFPMILVG	G4 * IKADLESOR IKADLDHOR IKADLETDR IKADLESER IKADLESER IKADLESER	Switch II 16( VPRSPASAE VTQEP QOI (ITREQ KOM VSYQE ED IVHYPE ED IVTLSP ED IVSYQE ED	GASHHVAYF - RQLKVTY - TKHNIPY - KTLKIGY - AQLKIKY - QQLKIKY - QSLNIKY - QSLNIKY - QSLNIKY	* <u>G5</u> EASAKI EASAKI ETSAKI ETSAKI ETSAKI ETSAKI ETSAKI	180 IR-INV IR-MNV DPPINV IR-VHV IR-VHV IR-VHV IR-INV
HsaRRAS HsaRRAS2 HsaMRAS AquRRAS2L EsuRRAS2L SdoRRAS2L OmiRRAS2L	Switch I KLFTQILRVKDF KFQRQILRVKDF RFHQIILRVKDF KFHKQILRVKDF KFYRQILRVKDF KFHKQILRVKDF KLCKTILRVKEF	140 - DDFPVVLVG DEFPMILIG ESFPMILVA SEFPMILVA SEFPMILVA GDFPMILVA CDFPMILVA 200	G4 * IKADLESOR IKADLDHOR IKADLETDR IKADLETDR IKADLESER IKADLESER IKADLEYER	Switch II 16( VPRSPASAE VTQEP QOI (ITREQ KOM VSYQE PE II VYTLSP PE I VYTLSP PE I VYSYQE PE I VSYQE PE I	GASHHVAYF - RQLKVTY - TKHNIPY - KTLKIGY - AQLKIKY - QQLKIKY - QSLNIKY - QSLNIKY - QSLNIKY	* <u>G5</u> EASAKI EASAKI ETSAKI ETSAKI ETSAKI ETSAKI ETSAKI	180 R-LNV R-MNV PPLNV R-VHV R-VHV R-VHV R-INV
HsaRRAS HsaRRAS2 HsaMRAS AquRRAS2L EsuRRAS2L SdoRRAS2L OmiRRAS2L HsaRRAS	*   KLFTQILRVKDF   KFQRQILRVKDF   RFHQIILRVKDF   KFHKQILRVKDF   KFYRQILRVKDF   KFHKQILRVKDF   KFHKQILRVKDF   KELCKTILRVKEF   *   DEAEEQUVRAVE	140 - DDFPVVLVG DEFPMILIG ESFPMILVA SEFPMILVA GDFPMILVA GDFPMILVA PSFPMILVG 200 XYQEQELPPS	G4 * IKADLESOR IKADLDHOR IKADLETDR IKADLETDR IKADLESER IKADLESER IKADLESER IKADLESER IKADLESER	Switch II 16( VPRSPASAE VTQEPOI ITREOKIM VSYQEOEI VYTLSPEEI VSYQEOEO 22( KKGGG	GASHHVAYF RQLKVTYM TKHNIPYI KTLKIGYV AQLKIKYI QQLKIKYI QSLNIKYI C C	* <u>G5</u> BASAKI BASAKI BASAKI BASAKI BTSAKI ETSAKI ETSAKI <u>aaX</u> *	180 R-INV PPINV IR-VHV IR-VHV IR-VHV IR-INV 218
HsaRRAS HsaRRAS2 HsaMRAS AquRRAS2L EsuRRAS2L SdoRRAS2L OmiRRAS2L HsaRRAS HsaRRAS2	XLFTQILRVKDF KFQRQILRVKDF RFHQIILRVKDF KFHKQILRVKDF KFHKQILRVKDF KFHKQILRVKDF KLCKTILRVKEF X DEAFEQLVRAVF QASHELVRVIF	140 - DDFPVVLVG DEFPMILIG ESFPMILVAN SEFPMILVAN GDFPMILVAN GDFPMILVAN PSFPMILVGN 200 KYQEQELPPS KFQEQECPPS	G4 * KADLESOR KADLDHOR KADLETDR KADLETDR KADLESER	Switch II 16( VPRSPASAE VTQEPOI TTREOCKIM VSYQECEDI VYTLSPEEDI VSYQECEOC 22( KKGGG	GASHHVAYF RQLKVTYM TKHNIPYI KTLKIGYV AQLKIKYI QQLKIKYI QSLNIKYI C C	* <u>G5</u> DASAKI DASAKI DTSAKI DTSAKI DTSAKI DTSAKI DTSAKI DTSAKI ZAKI TSAKI ZAKI DTSAKI DTSAKI	180 IR-LNV IR-MNV DPPLNV IR-VHV IR-VHV IR-VHV IR-LNV 218 204
HsaRRAS HsaRRAS2 HsaMRAS AquRRAS2L EsuRRAS2L SdoRRAS2L OmiRRAS2L HsaRRAS HsaRRAS2 HsaMRAS	Switch I * KLFTQILRVKDF KFQRQILRVKDF RFHQIILRVKDF KFHKQILRVKDF KFHKQILRVKDF KLCKTILRVKEF * DEAFEQLVRAVF DQA5HELVRVIF DKA5HDLVRVIF	140 DDFPVVLVG DEFPMILIG ESFPMILVAN SEFPMILVAN GDFPMILVAN GDFPMILVAN CDFPMILVAN 200 XYQEQELPPS XFQEQECPPS QQIP	G4 * KADLESOR KADLDHOR KADLETDR KADLETDR KADLESER KADLESER KADLESER KADLESER KADLESER KADLESER KADLESER KADLESER * *	Switch II 16( VPRSPASAE VTQEP QOI (ITREQ KOM VSYQE PE II VTLSP PE I VTLSP PE I VSYQE PE I 22( RKGGG KKGGG KKGGG	GASHHVAYF RQLKVTYM TKHNIPYT KTLKIGYV AQLKIKYT QQLKIKYT QSLNIKYT QSLNIKYT C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	* <u>G5</u> DASAKI DASAKI DTSAKI DTSAKI DTSAKI DTSAKI DTSAKI DTSAKI ZAKI TSAKI ZAKI DTSAKI ZAKI DTSAKI ZAKI DTSAKI ZAKI ZAKI ZAKI ZAKI ZAKI ZAKI ZAKI Z	180 IR-LNV IR-MNV DPPLNV IR-VHV IR-VHV IR-VHV IR-UHV IR-INV 218 204 208
HsaRRAS HsaRRAS2 HsaMRAS AquRRAS2L EsuRRAS2L SdoRRAS2L OmiRRAS2L HsaRRAS HsaRRAS2 HsaMRAS AquRRAS2L	Switch I * KLFTQILRVKDF KFQRQILRVKDF RFHQIILRVKDF KFHKQILRVKDF KFHKQILRVKDF KFHKQILRVKDF KLCKTILRVKEF * DEASEQLVRAVF DQASHELVRVIF DKASHDLVRVIF DKASHDLVRAIF	140 DDFPVVLVG DEFPMILIG ESFPMILVAN SEFPMILVAN GDFPMILVAN GDFPMILVAN CDFPMILVAN COFPMILVAN 200 200 200 200 200 200 200 20	G4 * IKADLESOR IKADLDHOR IKADLETDR IKADLESER IKADL	Switch II 16( VPRSPASAE VTQEP QOI (ITREQ KOM VSYQE E II VHYPE E I VYTLSP E I VSYQE E Q 22( KKGGG	GASHHVAYF RQLKVTYM TKHNIPYI KTLKIGYV AQLKIKYI QQLKIKYY QSLNIKYI QSLNIKYI C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	* <u>G5</u> DASAKI DASAKI DTSAKI DTSAKI DTSAKI DTSAKI DTSAKI CTTSAKI TTT TTT TTT	180 IR-LNV IR-MNV DPPLNV IR-VHV IR-VHV IR-VHV IR-INV 218 204 208 191
HsaRRAS HsaRRAS2 HsaMRAS AquRRAS2L EsuRRAS2L SdoRRAS2L OmiRRAS2L HsaRRAS HsaRRAS2 HsaMRAS AquRRAS2L EsuRRAS2L	Switch I * KLFTQILRVKDF KFQRQILRVKDF RFHQIILRVKDF KFHKQILRVKDF KFYRQILRVKDF KFHKQILRVKDF KLCKTILRVKEF * DEASEQLVRAVF DQASHELVRVIF DKASHDLVRVIF DKASHDLVRVIF	140 DDFPVVLVG DEFPMILIG ESFPMILVAN SEFPMILVAN GDFPMILVAN GDFPMILVAN 200 200 200 200 200 200 200 20	G4 * IKADLESOR IKADLDHOR IKADLETDR IKADLESER IKADL	Switch II 16( VPRSPASAE VTQEP QOI (TTREQ KOM VSYQE E I VHYPE E I VYTLSP E I VSYQE E Q 22( KKGGG	GASHHVAYF RQLKVTYM TKHNIPYI KTLKIGYV AQLKIKYI QQLKIKYY QSLNIKYI QSLNIKYI C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	* <u>G5</u> DASAKI DASAKI DTSAKI DTSAKI DTSAKI DTSAKI DTSAKI OTTSAKI TTTSAKI TTTSAKI TTTSAKI TTTSAKI	180 IR-LNV IR-MNV DPPLNV IR-VHV IR-VHV IR-VHV IR-INV 218 204 208 191 191
HsaRRAS HsaRRAS2 HsaMRAS AquRRAS2L EsuRRAS2L SdoRRAS2L OmiRRAS2L HsaRRAS HsaRRAS2 HsaMRAS AquRRAS2L EsuRRAS2L SdoRRAS2L	Switch I * KLFTQILRVKDF KFQRQILRVKDF RFHQIILRVKDF KFHKQILRVKDF KFYRQILRVKDF KFYRQILRVKDF KLCKTILRVKEF * DEASEQLVRAVF DQASHELVRVIF DKASHDLVRVIF DKASHDLVRVIF EKASHDLVRVIF	140 DDFPVVIVG DEFPMILIG ESFPMILVAN SEFPMILVAN GDFPMILVAN GDFPMILVAN 200 200 200 200 200 200 200 20	G4 * KADLESOR KADLDHOR KADLETDR KADLETDR KADLESER	Switch II 16( VPRSPASAE VTQEP QOI TTREQ KOM VSYQE E I VHYPE E I VYTLSP E I VSYQE E Q 22( KKGGG	GASHHVAYF RQLKVTYM TKHNIPYI KTLKIGYV AQLKIKYI QQLKIKYY QSLNIKYI QSLNIKYI C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	* <u>G5</u> DASAKI DASAKI DTSAKI DASAKI DTSAKI DTSAKI DTSAKI DTSAKI TTTSAKI TTTSAKI TTTSAKI TTTSAKI TTTSAKI	180 R-LNV R-NV PPLNV R-VHV R-VHV R-VHV R-VHV R-UHV
HsaRRAS HsaRRAS2 HsaMRAS AquRRAS2L EsuRRAS2L SdoRRAS2L OmiRRAS2L HsaRRAS HsaRRAS2 HsaMRAS AquRRAS2L EsuRRAS2L SdoRRAS2L OmiRRAS2L	Switch I * KLFTQILRVKDF KFQRQILRVKDF RFHQIILRVKDF KFHKQILRVKDF KFYRQILRVKDF KFYRQILRVKDF KLCKTILRVKEF * DEASEQLVRAVF DQASHELVRVIF DKASHDLVRVIF DKASHDLVRVIF DKASHDLVRVIF DKASHDLVRVIF DKASHDLVRVIF DKASHDLVRVIF DKASHDLVRVIF DKASHDLVRVIF	140 DDFPVVLVG DEFPMILIG ESFPMILVAN SEFPMILVAN GDFPMILVAN GDFPMILVAN CDFPMILVAN COFPMILVAN 200 200 200 200 200 200 200 20	G4 * KADLESOR KADLDHOR KADLETDR KADLETDR KADLESER	Switch II 16( VPRSPASAE VTQEP QOI TTREQ KOM VSYQE E I VHYPE E I VSYQE E I VSYQE E Q 22( KKGGG	GASHHVAYF RQLKVTYM TKHNIPYI KTLKIGYV AQLKIKYI QQLKIKYY QSLNIKYI QSLNIKYI C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	* <u>G5</u> PASAKI	180 R-LNV R-MNV PPLNV R-VHV R-VHV R-VHV R-VHV R-VHV R-UHV 1R-1NV 218 204 208 191 191 191

Slika 10. Višestruko poravnanje aminokiselinskih sekvenci proteina R-RAS2-like iz spužvi i proteina podobitelji R-Ras iz čovjeka. Na slici su označene karakteristične domene i motivi: pet motiva G označeno je zelenom bojom, dvije regije *switch* ljubičastom bojom, HVR crvenom bojom, a motiv CaaX narančastom bojom. Višestruko poravnanje aminokiselinskih sekvenci

napravljeno je u programu ClustalX 2.0 (Larkin i sur., 2007). Protein R-RAS2-like iz spužve *E. subterraneus* i homolog R-RAS2 iz čovjeka označeni su podebljanim slovima. Kratice latinskih naziva organizama objašnjene su u Prilogu.

Na temelju višestrukog poravnanja proteinskih sekvenci R-RAS2-like i R-RAS2 iz odabranih predstavnika Metazoa i Protista (Talajić i sur., 2024; Additional file 2: Figure S1.), dobiveni su postoci sličnosti i identičnosti aminokiselinskih ostataka. Dobivena toplinska mapa pokazala je najveću sličnost između proteina R-RAS2 iz kralježnjaka (75–100 %), a postotak sličnosti je između svih analiziranih sekvenci bio visok (72,5–100 %), što ukazuje na visoku evolucijsku očuvanost ovog proteina i njegovu važnu ulogu u stanici (Slika 11).



Slika 11. Toplinska mapa na kojoj su prikazani postoci sličnosti (donji lijevi trokut ispod sive dijagonale) i identičnosti (gornji desni trokut iznad sive dijagonale) aminokiselinskih sekvenci proteina RRAS2-like i R-RAS2 iz odabranih predstavnika životinja i protista, a izrađena je u

programskom paketu Morpheus. Visoki udjeli sličnosti i identičnosti aminokiselina (>50 %) prikazani su toplim bojama (žutom i crvenom), dok su niski udjeli (<50 %) prikazani hladnim bojama (zelenom i plavom). Homologija (u postocima) između sekvenci R-RAS2-like i R-RAS2 iz različitih vrsta pretvorena je u nijanse boja prema skali intenziteta toplinske mape prikazanoj ispod matrice. Protein R-RAS2-like iz spužve *E. subterraneus* i homolog R-RAS2 iz čovjeka označeni su podebljanim slovima. Kratice latinskih naziva organizama objašnjene su u Prilogu.

# 4.2.1.3. Analiza strukture gena r-ras2

U svrhu analize strukture gena r-ras2, identificirani su introni u genima r-ras2 pripadnika Metazoa odabranih na temelju taksonomskog položaja i dostupnosti genomskih podataka korištenjem javno dostupne baze genomskih podataka NCBI. Budući da su geni r-ras i m-ras nastali iz ancestralnog *r-ras2-like* tijekom evolucije životinja, u analizu strukture gena uključeni su i navedeni geni iz čovjeka. Nadalje, introni u genu *r-ras2-like* identificirani su i kod spužve E. subterraneus korištenjem neobjavljene baze genomskih i transkriptomskih podataka spužve (prof. dr. sc. Kristian Vlahoviček, Grupa za bioinformatiku, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu). Rezultati provedene analize pokazali su da gen r-ras2 iz čovjeka ima jednake položaje i faze svih introna kao i gen r-ras iz čovjeka, sugerirajući na divergenciju koja se dogodila relativno nedavno tijekom evolucije životinja (Slika 12). Uočeno je da gen *m-ras* iz čovjeka dijeli samo dva introna s drugim paralozima iz čovjeka. Preostala dva introna gena *m-ras* prisutna su u genu *r-ras2-like* iz životinja bez bilateralne simetrije, a nisu pronađeni u genu r-ras2-like životinja s bilateralnom simetrijom. Navedeno potvrđuje prijašnju hipotezu da je gen *m-ras* nastao divergencijom iz ancestralnog *r-ras2-like* tijekom prijelaza na životinje s bilateralnom simetrijom. Analiza strukture gena također je pokazala da gen *r-ras2* iz čovjeka sadrži svih pet introna koji su bili prisutni u ancestralnom genu *r-ras2*like pronađenom kod životinja bez bilateralne simetrije. Od navedenih introna, tri su zajednička spužvama i čovjeku, što ukazuje na očuvanost strukture gena između ovih evolucijski udaljenih skupina životinja. Dobiveni rezultati pridonose boljem razumijevanju evolucijske dinamike i očuvanja strukture gena unutar podobitelji gena *R-Ras*.

		<b>0</b>	\ <b>1</b> /	2	0	2
HsaRRAS			<u></u>	27	 \\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\	27
HsaRRAS2		- Ÿ	<u> </u>	7		
				¥	V	¥
GaaRRAS2		$\bigvee$	1	2	0	2
Ogarti V-OZ		$\bigtriangledown$	17	₹	0	2⁄
XtrRRAS2		0	17	2	\ <b>0</b> /	2
DreRRAS2				<u>v</u>		V \
BbeRRAS2-like	7	<u> </u>		<u> </u>	<u> </u>	
	/	0	1	2	V	2
		Ŷ	$\mathbf{V}$	2	Ŵ	2
Spurrasz-like		0	17		0/	
AroRRAS2-like		0	17	2	\ <b>0</b> /	2
CelRRAS2-like			V \17	V \2/		V
CgiRRAS2-like		<u> </u>		<u> </u>	<u> </u>	
NveRRAS2-like				2 2	$\vee$ $\vee$	2
			10	2 2	0	2
HvuRRAS2-like $\bigtriangledown$		0	1/0/	2/	0/	V
AquRRAS2-like		V V 07	$\sqrt{17}$	2		1
EsuRRAS2-like		V	V	$\nabla$	V V	

Slika 12. Shematski prikaz strukture gena podobitelji *R-Ras* iz odabranih predstavnika Metazoa. Pozicije introna prikazane su trokutima pri čemu broj unutar trokuta označava fazu introna. Introni koji se nalaze ispred početnog kodona označeni su praznim trokutom. Crnim isprekidanim linijama označeni su introni koji se nalaze u istim fazama i pozicijama nakon višestrukog poravnanja aminokiselinskih sekvenci. Za izradu sheme korišten je CorelDRAW Graphic Suite (Alludo). Nukleotidne sekvence i informacije o položajima i fazama introna gena iz odabranih predstavnika Metazoa koje su korištene u ovoj analizi preuzete su iz javno dostupne baze genomskih podataka NCBI. Gen *r-ras2-like* iz spužve *E. subterraneus* i homolog *r-ras2* iz čovjeka označeni su podebljanim slovima. Kratice latinskih naziva organizama objašnjene su u Prilogu.

#### 4.2.2. Biokemijska analiza proteina R-RAS2 iz spužve i čovjeka

#### 4.2.2.1. Pročišćavanje rekombinantnih proteina R-RAS2 iz spužve i čovjeka

Probnom indukcijom u malom volumenu određeni su optimalni uvjeti za uzgoj i izolaciju proteina R-RAS2-like iz spužve i homologa R-RAS2 iz čovjeka. Pokazano je kako je ekspresija proteina iz spužve najbolja u tekućoj hranjivoj podlozi LB, dodatkom 0,1 mM IPTG-a te uzgojem na temperaturi od 16 °C preko noći, a homologa iz čovjeka u tekućoj hranjivoj podlozi LB dodatkom 0,8 mM IPTG-a te uzgojem na 30 °C tijekom 3 sata. Prema optimalnim uvjetima

utvrđenim probnom indukcijom, proizvedeni su i pročišćeni proteini EsuRRAS2-like i HsaRRAS2 obilježeni histidinskim privjeskom metodom afinitetne kromatografije na TALON agarozi. Uspješnost pročišćavanja navedenih proteina potvrđena je pomoću SDS-PAGE. Uzorci pročišćenih proteina ukoncentrirani su metodom ultrafiltracije te su analizirani metodom SDS-PAGE (Slika 13).



Slika 13. Pročišćene i ukoncentrirane frakcije proteina EsuRRAS2-like i HsaRRAS2 obilježenih histidinskim privjeskom analizirane metodom SDS-PAGE. (M) proteinski biljeg Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Standards, (EsuRRAS2L) protein R-RAS2-like iz spužve i (HsaRRAS2) protein R-RAS2 iz čovjeka. Lijevo su naznačene veličine vrpci u biljegu Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Standards (Bio-Rad), izražene u kilodaltonima (kDa).

Nakon provedene ultrafiltracije, na uređaju DeNovix izmjerena je koncentracija proteina EsuRRAS2-like s histidinskim privjeskom koja je iznosila 1,598 mg/mL (molekulska masa Mr=23939,42 Da i ekstincijski koeficijent  $\varepsilon$ =13535 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) te proteina HsaRRAS2 s histidinskim privjeskom koja je iznosila 1,835 mg/mL (molekulska masa Mr=25331,68 Da i ekstincijski koeficijent  $\varepsilon$ =16180 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). Izolirani proteini korišteni su za daljnje biokemijske analize.

## 4.2.2.2. GTPazna aktivnost proteina R-RAS2 iz spužve i čovjeka

Za određivanje intrinzične GTPazne aktivnosti proteina EsuRRAS2-like i usporedbu sa intrinzičnom GTPaznom aktivnosti proteina HsaRRAS2 korišten je GTPase-Glo<sup>TM</sup> Assay (Promega). Optimalna količina enzima za reakciju određena je enzimskom titracijom EsuRRAS2-like i HsaRRAS2 u prisutnosti 1  $\mu$ M GTP-a, a iznosila je 791,875 ng (koncentracija enzima 6,25  $\mu$ M) (Slika 14.A).

Zatim je analizirana intrinzična GTPazna aktivnost proteina R-RAS2 iz spužve i čovjeka pri optimalnoj koncentraciji enzima od 6,25 µM. Uočeno je značajno smanjenje signala

luminiscencije za oba proteina u usporedbi s kontrolnim uzorkom (pufer GTPaza/GAP s dodatkom 1 µM GTP-a bez enzima), što potvrđuje njihovu intrinzičnu GTPaznu aktivnost (Slika 14.B). Dobiveni rezultati za protein R-RAS2 iz čovjeka u skladu su s podacima iz literature iz kojih je poznato da navedeni protein ima intrinzičnu GTPaznu aktivnost (Weber i Carroll, 2021). Slična aktivnost uočena je kod proteina R-RAS2-like iz spužve, što sugerira da je ancestralni protein R-RAS2-like već imao intrinzičnu GTPaznu aktivnost. To upućuje na očuvanu ulogu ovog proteina u regulaciji sličnih signalnih puteva i staničnih procesa kod spužve i čovjeka.



Slika 14. Intinzična GTPazna aktivnost proteina R-RAS2 iz spužve i čovjeka. A) Titracija proteina EsuRRAS2-like i HsaRRAS2 u puferu GTPase/GAP pri 1  $\mu$ M koncentraciji GTP-a. Optimalna koncentracija enzima od 6,25  $\mu$ M (791,875 ng) određena titracijom uokvirena je crvenom bojom. B) Test GTPazne aktivnosti proteina R-RAS2-like iz spužve i homologa R-RAS2 iz čovjeka pri 6,25  $\mu$ M koncentraciji enzima. Luminiscencija je mjerena nakon inkubacije u trajanju od 2 sata. Svaki od rezultata uspoređen je s kontrolnim uzorkom (kontrolni uzorak sadržavao je 1  $\mu$ M GTP u puferu GTPaza/GAP bez dodatka enzima) koristeći studentov t-test gdje je razina statističke značajnosti postavljena na p<0,05. Statistički značajna razlika prikazana je kao \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001. Standardna devijacija naznačena je na stupićima (srednja vrijednost ± SD, n = 3). RLU (engl. *relative light unit*).

## 4.2.2.3. Sposobnost vezanja proteina R-RAS2 iz spužve i čovjeka na molekulu RNA

Kako bi se analizirala sposobnost vezanja EsuRRAS2-like i HsaRRAS2 na molekulu RNA, korištena je poli(U) agaroza kao što je prethodno opisano (Beljan i sur., 2020; prema Kim i sur., 2003). Dobiveni rezultati pokazali su da se EsuRRAS2-like i HsaRRAS2 vežu na poli(U) agarozu, dok se protein BSA, koji je korišten kao negativna kontrola, ne veže (Slika 15). Kako

bi se dodatno analizirala specifičnost vezanja proteina na molekulu RNA, dodana je slobodna poli(U) u rastućim koncentracijama kao vezni kompetitor. Dodatkom slobodne poli(U) uočeno je smanjenje mogućnosti vezanja EsuRRAS2-like i HsaRRAS2 na poli(U) agarozu, koje je ovisno o koncentraciji dodane slobodne poli(U). To upućuje na specifičnost interakcije proteina R-RAS2 iz spužve i čovjeka s molekulom RNA.



Slika 15. Test vezanja proteina R-RAS2-like iz spužve i homologa R-RAS2 iz čovjeka na molekulu RNA. Proteini R-RAS2 iz spužve i čovjeka (po 5 µg svakog proteina) inkubirani su s rastućim koncentracijama slobodne poli(U), nakon čega je slijedila inkubacija s 50 %-tnom poli(U) agarozom. DRG1 korišten je kao pozitivna kontrola, a BSA kao negativna kontrola. Uzorci su analizirani metodom SDS-PAGE te bojeni bojom Coomassie Brilliant Blue.

## 4.2.3. Biološka analiza proteina R-RAS2 iz spužve i čovjeka

## 4.2.3.1. Unutarstanični smještaj proteina R-RAS2 iz spužve i čovjeka

S ciljem određivanja unutarstaničnog smještaja proteina R-RAS2 u tumorskim stanicama čovjeka, stanične linije MCF-7 i HeLa kotransficirane su proteinom HsaRRAS2 obilježenim fluorescentnim biljegom GFP i proteinom EsuRRAS2-like obilježenim fluorescentnim biljegom Cherry. Uočeno je da su proteini R-RAS2 iz spužve i čovjeka smješteni u citoplazmi stanica MCF-7 i HeLa (Slika 16), ali ne i u jezgri, budući da ne kolokaliziraju s bojom Hoechst kojom su bojene stanične jezgre. Uz navedeno, raspršeni signal u citoplazmi stanica MCF-7 i HeLa ukazuje na smještaj proteina HsaRRAS2 i EsuRRAS2-like u staničnoj membrani, ali i drugim unutarstaničnim membranama, vjerojatno membranama vezikula endosomalno-lizosomalnog puta. Također, vidljivo je kako je kolokalizacija proteina R-RAS2 iz spužve i čovjeka djelomična, pri čemu je R-RAS2 iz čovjeka smješten većim dijelom u staničnoj

membrani, dok je homolog iz spužve smješten većim dijelom u unutarstaničnim membranama stanica MCF-7 i HeLa.



Slika 16. Unutarstanični smještaj EsuRRAS2-like i HsaRRAS2 u citoplazmi stanica A) MCF7 i B) HeLa. HsaRRAS2 obilježen je biljegom GFP (zeleno), a EsuRRAS2-like biljegom Cherry (crveno). Kolokalizacija proteina prikazana je žutom bojom. Za bojenje jezgri korišten je Hoechst (plavo). Stanice su analizirane metodom konfokalne mikroskopije. Skala iznosi 10 μm.

Kako bi se dodatno analizirao smještaj proteina R-RAS2-like iz spužve i homologa R-RAS2 iz čovjeka, stanična linija fibroblasta čovjeka MJ90 transficirana je proteinom EsuRRAS2-like
obilježenim fluorescentnim biljegom GFP ili proteinom HsaRRAS2 obilježenim fluorescentnim biljegom Cherry. Rezultati su pokazali smještaj homologa R-RAS2 iz spužve i čovjeka u citoplazmi fibroblasta (Slika 17). Uočena je raspršena morfologija u citoplazmi fibroblasta kao što je prethodno uočeno kod stanica MCF-7 i HeLa, što ukazuje na moguć smještaj proteina R-RAS2 u staničnoj membrani i membranama vezikula endosomalno-lizosomalnog puta u fibroblastima.



Slika 17. Unutarstanični smještaj EsuRRAS2-like i HsaRRAS2 u citoplazmi stanične linije fibroblasta čovjeka MJ90. EsuRRAS2-like obilježen je biljegom GFP (zeleno), a HsaRRAS2 biljegom Cherry (crveno). Za bojenje jezgri korišten je Hoechst (plavo). Stanice su analizirane metodom konfokalne mikroskopije. Skala iznosi 10 µm.

S ciljem određivanja unutarstaničnog smještaja homologa R-RAS2 iz spužve i čovjeka u stanicama spužve *E. subterraneus*, stanice spužve transficirane su proteinom EsuRRAS2-like obilježenim fluorescentnim biljegom GFP ili proteinom HsaRRAS2 obilježenim fluorescentnim biljegom Cherry. Unatoč niskoj učinkovitosti transfekcije stanica spužve, uspješno je određen smještaj homologa R-RAS2 iz spužve i čovjeka u citoplazmi, a ne u jezgri stanica spužve, budući da nije uočena kolokalizacija s bojom Hoechst (Slika 18). Zbog neujednačenog intenziteta signala GFP i Cherry nije moguće utvrditi točan smještaj homologa R-RAS2 iz spužve i čovjeka u citoplazmi, a ne u jezgri stanica spužve, budući da nije uočena kolokalizacija s bojom Hoechst (Slika 18). Zbog neujednačenog intenziteta signala GFP i Cherry nije moguće utvrditi točan smještaj homologa R-RAS2 iz spužve i čovjeka u citosolu ili membranama stanica spužve, no pretpostavlja se da bi smještaj proteina R-RAS2 mogao biti u staničnim membranama, kao što je prethodno uočeno u tumorskim stanicama čovjeka MCF-7 i HeLa te stanicama fibroblasta čovjeka MJ90.



Slika 18. Unutarstanični smještaj EsuRRAS2-like i HsaRRAS2 u citoplazmi stanica spužve *E. subterraneus*. EsuRRAS2-like obilježen je biljegom GFP (zeleno), a HsaRRAS2 biljegom Cherry (crveno). Za bojenje jezgri korišten je Hoechst (plavo). Stanice su analizirane metodom konfokalne mikroskopije. Skala iznosi 3 µm.

# 4.2.3.2. Kolokalizacija proteina R-RAS2 iz spužve i čovjeka s biljezima endosomalnog puta

Nakon uočenog raspršenog signala proteina R-RAS2 iz spužve i čovjeka u citoplazmi tumorskih stanica čovjeka, dodatno je analiziran njihov unutarstanični smještaj prateći kolokalizaciju s biljezima staničnih organela. Stanice MCF-7 transficirane su proteinom EsuRRAS2-like ili HsaRRAS2 obilježenim fluorescentnim biljegom GFP te su bojene biljezima staničnih organela. Rezultati su pokazali djelomičnu kolokalizaciju EsuRRAS2-like s biljegom ranih endosoma (engl. *early endosome antigen 1*, EEA1), koja nije pokazana za HsaRRAS2 (Slika 19.A). Oba proteina, EsuRRAS2-like i HsaRRAS2, kolokaliziraju s reciklirajućim (biljeg TfR, od engl. *transferrin receptor*) (Slika 19.B) i kasnim endosomima (biljeg Rab7) (Slika 19.C), a nije primijećena kolokalizacija s lizosomima (biljeg LAMP1, od engl. *lysosomal associated membrane protein 1*) (Slika 19.D).



Slika 19. Kolokalizacija (žuto) EsuRRAS2-like i HsaRRAS2 fluorescentno obilježenih biljegom GFP (zeleno) s biljezima (crveno): A) ranih endosoma (EEA1), B) reciklirajućih endosoma (TfR), C) kasnih endosoma (Rab7) i D) lizosoma (LAMP1) u tumorskim stanicama čovjeka MCF-7. Za bojenje jezgri korišten je Hoechst (plavo). Stanice su analizirane metodom konfokalne mikroskopije. Skala iznosi 10 μm.

S ciljem određivanja uloge homologa R-RAS2 iz spužve i čovjeka u endosomalnom putu, dodatno je analiziran njihov smještaj unutar staničnih organela u tumorskim stanicama čovjeka MCF-7. Stanice su kotransficirane proteinom EsuRRAS2-like ili HsaRRAS2 obilježenim fluorescentnim biljegom Cherry i biljegom ranih (Rab5) ili kasnih endosoma (Rab7) obilježenim fluorescentnim biljegom GFP. Uočena je samo djelomična kolokalizacija analiziranih proteina s ranim endosomima, pri čemu EsuRRAS2-like pokazuje značajniju kolokalizaciju s biljegom Rab5 nego protein HsaRRAS2 (Slika 20.A). Dobiveni rezultati potvrdili su kolokalizaciju oba proteina s kasnim endosomima, odnosno biljegom Rab7 (Slika 20.B).



Slika 20. Kolokalizacija (žuto) kotransficiranih EsuRRAS2-like ili HsaRRAS2 fluorescentno obilježenih biljegom Cherry (crveno), s biljezima: A) ranih endosoma (Rab5) i B) kasnih endosoma (Rab7) fluorescentno obilježenih biljegom GFP (zeleno) u tumorskim stanicama čovjeka MCF-7. Za bojenje jezgri korišten je Hoechst (plavo). Stanice su analizirane metodom konfokalne mikroskopije. Skala iznosi 10 µm.

S obzirom na kolokalizaciju homologa R-RAS2 iz spužve i čovjeka s biljezima određenih staničnih organela, analiziran je utjecaj prekomjerne ekspresije proteina EsuRRAS2-like i HsaRRAS2 na razinu proteina povezanih s ranim, reciklirajućim i kasnim endosomima te lizosomima (EEA1, TfR, Rab7 i LAMP1). Stanice MCF-7 transficirane su proteinom EsuRRAS2-like ili HsaRRAS2 obilježenim biljegom flag i analizirane metodom Western blot. Rezultati su pokazali da prekomjerna ekspresija EsuRRAS2-like i HsaRRAS2 značajno smanjuje proteinsku razinu biljega reciklirajućih endosoma TfR (Slika 21.A i B), u odnosu na kontrolnu transfekciju praznim vektorom pcDNA3. Nadalje, prekomjerna ekspresija HsaRRAS2 utjecala je na povećanu proteinsku razinu biljega ranih endosoma EEA1 i smanjenu proteinsku razinu biljega lizosoma LAMP1 (Slika 21.A), dok isto nije uočeno pri prekomjernoj ekspresiji EsuRRAS2-like (Slika 21.B). Prekomjerna ekspresija EsuRRAS2-like i HsaRRAS2 nije utjecala na promjenu proteinske razine biljega kasnih endosoma Rab7 (Slika 21.A i B). Endogena razina biljega endosomalno-lizosomalnog puta pri prekomjernoj ekspresiji proteina HsaRRAS2 i EsuRRAS2-like u odnosu na kontrolnu transfekciju praznim vektorom (pcDNA3) dobivena metodom Western blot kvantificirana je i prikazana grafički kao relativna koncentracija biljega ranih, reciklirajućih i kasnih endosoma te lizosoma (Slika 21.C i D). Dobiveni rezultati ukazuju na to da proteini RRAS2 iz spužve i čovjeka utječu na dinamiku endosomalno-lizosomalnog puta u tumorskim stanicama čovjeka MCF-7.



Slika 21. Utjecaj prekomjerne ekspresije HsaRRAS2 i EsuRRAS2-like na endogene razine biljega vezikula endosomalno-lizosomalnog puta. Razine prekomjerno eksprimiranog proteina R-RAS2 iz A) čovjeka ili B) spužve obilježenog biljegom flag i endogene razine biljega: ranih endosoma (EEA1), lizosoma (LAMP1), reciklirajućih endosoma (TfR) i kasnih endosoma (Rab7) analizirane metodom *Western blot* i detektirane korištenjem specifičnih primarnih protutijela. Svi uzorci naneseni su u šest bioloških replikata, a rezultati su kvantificirani korištenjem računalnog programa ImageJ (NIH). Amido Black korišten je kao kontrola unošenja jednake količine proteina na gel. Kvantifikacija endogene razine biljega endosomalno-lizosomalnog puta pri prekomjernoj ekspresiji proteina R-RAS2 iz C) čovjeka ili D) spužve u odnosu na transfekciju praznim vektorom (pcDNA3) dobivenih metodom *Western blot* u šest bioloških replikata ponovljeno u tri neovisna pokusa, prikazana grafički kao relativna koncentracija biljega ranih endosoma, lizosoma, reciklirajućih endosoma i kasnih endosoma. Razina statističke značajnosti postavljena na p<0,05. Statistički značajna razlika prikazana je kao \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001. Standardna devijacija naznačena je na stupićima (srednja vrijednost  $\pm$  SD, n = 3).

### 4.2.3.3. Uloga proteina R-RAS2 iz spužve i čovjeka u procesima povezanima s rakom

Budući da je iz literature poznato da protein R-RAS2 iz čovjeka ima ulogu u procesima stanične proliferacije, migracije i stvaranja kolonija (Zhang i sur., 2017; Larive i sur., 2014; Graham i

sur., 1994), ispitana je uloga homologa iz spužve u navedenim procesima u tumorskim stanicama čovjeka MDA-MB-231 koje pokazuju visoku invazivnost i sposobnost migracije. Stanice MDA-MB-231 transficirane su genom koji kodira za protein EsuRRAS2-like ili HsaRRAS2 obilježenim biljegom flag, a transfekcija praznim plazmidom pcDNA3 korištena je kao kontrola.

Rezultati MTT testa koji je korišten za ispitivanje uloge homologa R-RAS2 iz spužve i čovjeka u procesu stanične proliferacije pokazali su da oba proteina statistički značajno povećavaju razinu proliferacije (p<0.001) u usporedbi s transfekcijom praznim vektorom (Slika 22) u tumorskim stanicama čovjeka MDA-MB-231.



Slika 22. Utjecaj prekomjerne ekspresije EsuRRAS2-like i HsaRRAS2 na razinu stanične proliferacije u tumorskim stanicama čovjeka MDA-MB-231. Svi eksperimenti ponovljeni su tri puta u biološkim duplikatima. Svaki od rezultata uspoređen je s kontrolnim stanicama (pcDNA3) koristeći studentov t-test gdje je razina statističke značajnosti postavljena na p<0,05. Statistički značajna razlika prikazana je kao \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001. Standardna devijacija naznačena je na stupićima (srednja vrijednost  $\pm$  SD, n = 3).

Uloga EsuRRAS2-like i HsaRRAS2 u procesu stanične migracije analizirana je pomoću testa zacjeljivanja rane i testa pokretljivosti stanica korištenjem Boydenovih komorica. Test zacjeljivanja rane pokazao je statistički značajno povećanje migracije stanica i brže zacjeljivanje rane nakon 24 sata za EsuRRAS2-like i HsaRRAS2 u usporedbi s transfekcijom praznim plazmidom (p<0,001) (Slika 23).



Slika 23. Utjecaj prekomjerne ekspresije EsuRRAS2-like i HsaRRAS2 na staničnu migraciju ispitan pomoću testa zacjeljivanja rane u tumorskim stanicama čovjeka MDA-MB-231. Gornja slika prikazuje stanice slikane invertnim mikroskopom pri povećanju od 100× neposredno nakon stvaranja rane (0 h) i nakon inkubacije u trajanju od 24 h za transfekciju praznim plazmidom pcDNA3, EsuRRAS2-like te HsaRRAS2. Crvenim linijama označena je površina gdje stanice nisu migrirale nakon stvaranja rane. Ukupna površina u koju su stanice migrirale nakon 24 sata u odnosu na početnu površinu (0 h) kvantificirana je korištenjem računalnog programa ImageJ (NIH) i prikazana grafički u postocima, pri čemu 100 % označava potpuno zacjeljivanje rane. Svaki od rezultata uspoređen je s kontrolnim stanicama (pcDNA3) koristeći studentov t-test gdje je razina statističke značajnosti postavljena na p<0,05. Statistički značajna razlika prikazana je kao \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001. Standardna devijacija naznačena je na stupićima (srednja vrijednost  $\pm$  SD, n = 3).

Test pokretljivosti stanica korištenjem Boydenovih komorica pokazao je statistički značajno povećanje migracije stanica za EsuRRAS2-like (p=0,00136) i HsaRRAS2 (p=0,00112) u usporedbi s transfekcijom praznim plazmidom (Slika 24).



Slika 24. Utjecaj prekomjerne ekspresije EsuRRAS2-like i HsaRRAS2 na staničnu migraciju ispitan pomoću testa pokretljivosti stanica (Boydenove komorice) u tumorskim stanicama čovjeka MDA-MB-231. Gornja slika prikazuje membrane Boydenove komorice slikane invertnim mikroskopom pri povećanju od 200× nakon migracije stanica prema FBS-u u trajanju od 24 sata za transfekciju praznim plazmidom pcDNA3, EsuRRAS2-like te HsaRRAS2. Broj stanica koje su migrirale nakon 24 sata kvantificiran je korištenjem računalnog programa ImageJ (NIH) i prikazan grafički pomoću stupića. Svaki od rezultata uspoređen je s kontrolnim stanicama (pcDNA3) koristeći studentov t-test gdje je razina statističke značajnosti postavljena na p<0,05. Statistički značajna razlika prikazana je kao \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001. Standardna devijacija naznačena je na stupićima (srednja vrijednost  $\pm$  SD, n = 3).

Nadalje, pomoću testa stvaranja kolonija pokazano je da prekomjerna ekspresija proteina R-RAS2-like iz spužve i homologa R-RAS2 iz čovjeka statistički značajno utječe na povećanje broja stvorenih kolonija (p<0.001) u odnosu na transfekciju praznim plazmidom pcDNA3 koji je korišten kao kontrola (Slika 25).



Slika 25. Utjecaj prekomjerne ekspresije EsuRRAS2-like i HsaRRAS2 na broj stvorenih kolonija u tumorskim stanicama čovjeka MDA-MB-231. Svi eksperimenti ponovljeni su tri puta u biološkim duplikatima, a rezultati su kvantificirani korištenjem računalnog programa ImageJ (NIH). Svaki od rezultata uspoređen je s kontrolnim stanicama (pcDNA3) koristeći studentov t-test gdje je razina statističke značajnosti postavljena na p<0,05. Statistički značajna razlika prikazana je kao \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001. Standardna devijacija naznačena je na stupićima (srednja vrijednost  $\pm$  SD, n = 3).

Dobiveni rezultati ukazuju da je biološka funkcija proteina R-RAS2 u procesima povezanima s nastankom i razvojem raka (stanična proliferacija, migracija i stvaranje kolonija) vjerojatno evolucijski očuvana od spužve do čovjeka. Nadalje, ukazuju na to da je ancestralni protein R-RAS2-like imao onkogeni potencijal koji se pojavio vrlo rano tijekom evolucije životinja, još prije pojave diferenciranih tkiva i organa.

4.3. Karakterizacija homologa proteina BRMS1 iz spužve i usporedba s proteinima BRMS1 i BRMS1-like iz čovjeka

4.3.1. Bioinformatička analiza evolucijske prošlosti proteina BRMS1

Kako bi se razjasnila evolucijska prošlost proteina BRMS1, provedena je filogenetska analiza koja je uključivala predstavnike BRMS1 i BRMS1-like iz Fungi, Protista i Metazoa. U genomima drugih eukariota i prokariota nisu pronađeni geni koji kodiraju za proteine BRMS1 i BRMS1-like. Kod Fungi, Protista, životinja bez bilateralne simetrije i životinja s bilateralnom simetrijom do taksonomske skupine Vertebrata (kralježnjaci) pronađen je jedan predstavnik ove obitelji proteina, dok su kod kralježnjaka prisutna dva paraloga – BRMS1 i BRMS1-like.

Analizirana je očuvanost ključnih domena i motiva proteina BRMS1 te je provedena evolucijska analiza strukture gena *brms1* kako bi se usporedile duljine, pozicije i faze introna.

### 4.3.1.1. Analiza evolucijske očuvanosti ključnih domena i motiva proteina BRMS1

Protein BRMS1 iz spužve identificiran je pretraživanjem neobjavljene baze genoma i transkriptoma endemske spužve *E. subterraneus* (prof. dr. sc. Kristian Vlahoviček, Grupa za bioinformatiku, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu), a sadrži 230 aminokiselina. Napravljen je shematski prikaz proteina BRMS1 iz spužve s označenim ključnim domenama i motivima (Slika 26.A), a nukleotidna i proteinska sekvenca spužvinog BRMS1 prikazana je na slici 26.B.



atg	ccg	gtc	aac	agt	aca	acg	aaa	agc	gaa	cgt	cat	ttg	aga	gag	cct	tct	cga	gac	gcc
М	Ρ	V	N	S	Т	Т	K	S	Е	R	Η	L	R	Е	Р	S	R	D	A
aaa	agc	aat	gaa	gaa	gac	tcg	att	aac	tca	gaa	gat	tac	tct	tcg	tct	tac	gac	gat	gac
K	S	Ν	Е	Е	D	S	I	N	S	Е	D	Y	S	S	S	Y	D	D	D
cta	ctg	gac	aga	agg	aaa	gta	gat	tgc	ttg	aat	gat	ata	caa	ttc	tta	gaa	cag	caa	ttc
L	L	D	R	R	K	V	D	С	L	Ν	D	I	Q	F	L	Е	Q	Q	F
gtg	gac	ctg	aag	gag	cgt	ctt	tat	cat	gag	aga	att	gcg	gac	att	gac	cag	aag	att	caa
V	D	L	Κ	Е	R	L	Y	Н	Е	R	I	A	D	I	D	Q	Κ	I	Q
cac	ata	cag	gac	gaa	act	gca	cag	gag	tac	cta	att	CCC	cta	aaa	gaa	ctc	gag	gaa	gcg
Н	I	Q	D	Е	Т	A	Q	Е	Y	L	I	P	L	K	Е	L	Ε	Е	A
ttt	caa	agc	aga	cta	gag	aca	gtc	gct	ttg	ctg	cac	caa	tgc	agg	tta	caa	aac	atc	acc
F	Q	S	R	L	Е	Т	V	А	L	L	Н	Q	С	R	L	Q	N	I	Т
aat	aaa	tat	gaa	gaa	gag	gtg	cag	gca	gcc	aca	cag	gac	ctt	gaa	gaa	atg	ggc	aaa	gtg
Ν	K	Y	Ε	Е	Е	V	Q	A	A	Т	Q	D	L	Ε	Е	М	G	K	V
acc	ctg	ctc	aaa	atg	aag	cag	gag	gca	gag	gag	aaa	ctt	cga	agg	ctt	cag	gag	gac	aaa
Т	L	L	Κ	М	K	Q	Е	А	Е	Е	K	L	R	R	L	Q	Е	D	K
gtc	ata	gct	gac	ctt	aca	agt	gaa	tct	gcc	tcc	agg	aaa	cgc	aag	tca	aaa	cct	сса	gag
V	I	A	D	L	Т	S	Е	S	A	S	R	K	R	K	S	K	Ρ	Ρ	Е
ttc	cag	cta	cca	gat	aag	agg	aag	aaa	cca	gtc	aca	gtg	ata	ggc	cct	tgt	gtg	atc	tac
F	Q	L	Р	D	K	R	K	K	Р	V	Т	V	I	G	Р	С	V	I	Y
atg	ctg	cga	gat	atg	gag	atc	atg	gaa	gac	cta	aac	gac	att	cga	agg	gga	aga	gca	atg
M	L	R	D	М	E	I	М	E	D	L	Ν	D	I	R	R	G	R	A	М
ttq	gaq	gtc	cac	aga	aaq	gtq	gta	gaa	ctq	<mark>taa</mark>									
L	E	V	Η	R	K	V	V	E	L	-									

Slika 26. Protein BRMS1 iz spužve *E. subterraneus*. A) Shematski prikaz proteina BRMS1 iz spužve s označenim ključnim domenama i motivima: domena bogata glutamatom označena je crvenom bojom, dvije superzavijene domene označene su ljubičastom bojom, signalna domena za translokaciju iz jezgre u citoplazmu (NES) označena je narančastim okvirom, a dvije signalne domene za smještaj u jezgri (NLS1 i NLS2) označene su zelenom bojom. Za izradu

slike korišten je CorelDRAW Graphic Suite (Alludo). B) Usporedni prikaz nukleotidne i proteinske sekvence proteina BRMS1 iz spužve *E. subterraneus*. Startni i stop kodon označeni su žutom bojom, domena bogata glutamatom označena je crvenom bojom, dvije superzavijene domene označene su ljubičastom bojom, signalna domena za translokaciju iz jezgre u citoplazmu označena je narančastim okvirom, a dvije signalne domene za smještaj u jezgri označene su zelenom bojom. Nepotpuno uređeni leucinski zatvarači nisu označeni na slici radi jasnoće prikaza. Za izradu slike korišten je bioinformatički alat Expasy Translate (https://web.expasy.org/translate/).

Pomoću algoritma ClustalX 2.0 (Larkin i sur., 2007) napravljeno je višestruko poravnanje aminokiselinskih sekvenci proteina BRMS1 iz spužvi *Amphimedon queenslandica* (Aqu) i *E. subterraneus* (Esu), žarnjaka *Nematostella vectensis* (Nve), *Pocillopora damicornis* (Pda) i *Stylophora pistillata* (Spi) te paraloga BRMS1 i BRMS1-like iz čovjeka (*Homo sapiens*, Hsa). Na višestrukom poravnanju aminokiselinskih sekvenci (Slika 27) označene su domene karakteristične za protein BRMS1: domena bogata glutamatom, dvije superzavijene domene, signalna domena za translokaciju iz jezgre u citoplazmu (NES), te dvije signalne domene za smještaj u jezgri (NLS1 i NLS2). Nekoliko nepotpuno uređenih leucinskih zatvarača nije označeno na višestrukom poravnanju aminokiselinskih sekvenci radi jasnoće prikaza. Protein BRMS1-like iz čovjeka na C-terminalnom kraju ima domenu nalik Tudor domeni (CTD), koja nije pronađena kod proteina BRMS1 iz čovjeka ni homologa BRMS1 iz spužvi. Za razliku od spužvi, proteini BRMS1 iz žarnjaka na C-terminalnom kraju imaju domenu nalik Tudor domenu nalik Nagu domenu nalik Tudor domenu nalik nagu domenu nalik

Rezultati višestrukog poravnanja aminokiselinskih sekvenci pokazuju kako proteinska sekvenca nije visoko očuvana između proteina BRMS1 iz organizama bez bilateralne simetrije i čovjeka, no ključne domene i motivi ipak su očuvani između ovih evolucijski udaljenih skupina životinja (Slika 27). Očuvanost ključnih domena ukazuje na njihovu važnost u regulaciji kromatina i stupanju u interakcije s određenim veznim partnerima, procesa za koje se pretpostavlja da su bili prisutni i kod jednostavnijih životinja bez bilateralne simetrije. Ključne domene i motivi također su očuvani između paraloga BRMS1 i BRMS1-like iz čovjeka. Mogući razlog je što su proteini BRMS1 i BRMS1-like dio istog kromatin remodelirajućeg kompleksa te stoga imaju zajedničke vezne partnere i moguće slične funkcije u stanici.





Slika 27. Višestruko poravnanje aminokiselinskih sekvenci proteina BRMS1 iz spužvi i žarnjaka te proteina BRMS1 i BRMS1-like iz čovjeka. Na slici su označene karakteristične domene i motivi: domena bogata glutamatom označena je crvenom bojom, dvije superzavijene domene označene su ljubičastom bojom, domena NES označena je narančastom bojom, domene NLS1 i NLS2 označene su zelenom bojom, a domena CTD označena je plavom bojom. Višestruko poravnanje aminokiselinskih sekvenci napravljeno je u programu ClustalX 2.0 (Larkin i sur., 2007). Protein BRMS1 iz spužve *E. subterraneus* i proteini BRMS1 i BRMS1-like iz čovjeka označeni su podebljanim slovima.

Na temelju sravnjivanja aminokiselinskih sekvenci proteina BRMS1 i BRMS1-like iz odabranih predstavnika Metazoa i Protista određen je udio sličnih i identičnih aminokiselina, prikazan pomoću toplinske mape (Slika 28). Analiza je pokazala najveću sličnost između proteina BRMS1-like iz kralježnjaka (72–100 %) te nešto nižu između proteina BRMS1 iz kralježnjaka (50,7–98,8 %). Protisti i ostale taksonomske skupine životinja imaju samo jedan protein iz obitelji BRMS1, koji pokazuje gotovo jednaku homologiju s oba paraloga (BRMS1 i BRMS1-like) iz kralježnjaka. Paralozi BRMS1 i BRMS1-like iz čovjeka međusobno su slični 56 %. Homolozi BRMS1 iz spužvi pokazali su veću sličnost s proteinom BRMS1 iz čovjeka (*A. queenslandica* 49 %, *E. subterraneus* 52 %) nego s proteinom BRMS1-like iz čovjeka (*A. queenslandica* 38 %, *E. subterraneus* 41 %). To je u skladu s očekivanjima, budući da proteini BRMS1 iz šovjeka (HsaBRMS1 246 AK), dok protein BRMS1-like iz čovjeka sadrži 323 aminokiseline. Također, kao što je već prethodno uočeno, proteini BRMS1 iz spužvi i čovjeka (HsaBRMS1 246 AK), neke druge životinje bez bilateralne simetrije, poput žarnjaka, imaju dužu proteinsku sekvencu i domenu nalik Tudor domeni te pokazuju veću sličnost s proteinom BRMS1-like iz čovjeka.

Dobivena toplinska mapa također pokazuje kako aminokiselinske sekvence proteina BRMS1 između različitih taksonomskih skupina nisu dobro očuvane (sličnost 26,6–86,5 %), unatoč njegovoj važnoj ulozi kao supresora metastaziranja u tumorskim stanicama čovjeka.



Slika 28. Toplinska mapa na kojoj su prikazani postoci sličnosti (donji lijevi trokut ispod sive dijagonale) i identičnosti (gornji desni trokut iznad sive dijagonale) aminokiselinskih sekvenci proteina BRMS1 i BRMS1-like iz odabranih predstavnika Metazoa i Protista, a izrađena je u programskom paketu Morpheus. Visoki udjeli sličnosti i identičnosti aminokiselina (>50 %) prikazani su toplim bojama (žutom i crvenom), dok su niski udjeli (<50 %) prikazani hladnim bojama (zelenom i plavom). Homologija (u postocima) između sekvenci BRMS1-like i BRMS1 iz različitih vrsta pretvorena je u nijanse boja prema skali intenziteta toplinske mape prikazanoj ispod matrice. Protein BRMS1 iz spužve *E. subterraneus* i proteini BRMS1 i BRMS1-like iz čovjeka označeni su podebljanim slovima. Kratice latinskih naziva organizama objašnjene su u Prilogu.

### 4.3.1.2. Filogenetska analiza proteina BRMS1 i BRMS1-like

Na temelju sravnjivanja aminokiselinskih sekvenci iz odabranih predstavnika Metazoa, Prostista i Fungi, napravljena je filogenetska analiza evolucijske prošlosti proteina BRMS1 i BRMS1-like (Slika 29). Filogenetsko stablo konstruirano je u programu MEGA7 metodom najveće vjerojatnosti prema evolucijskom modelu LG+G+I (ProtTest) i ukorijenjeno je proteinima BRMS1 iz predstavnika Fungi. Dobiveno filogenetsko stablo (Slika 29) pokazuje kako gljive, protisti i sve životinjske skupine osim kralježnjaka imaju samo jedan protein BRMS1, dok kod kralježnjaka dolazi do jasno definiranog grananja između paraloga BRMS1 i BRMS1-like (vrijednosti *bootstrap* 99 %). Navedeno ukazuje na divergenciju uzrokovanu duplikacijom gena koja se vjerojatno dogodila prilikom pojave kralježnjaka. Filogenetski odnosi dobro su razriješeni, a spužve (Porifera) su smještene u podnožju stabla životinja te tvore susjedne grane s predstavnicima ostalih životinja bez bilateralne simetrije (Cnidaria i Placozoa), što je u skladu s očekivanjima. Provedena evolucijska analiza pokazuje da sekvence proteina BRMS1 iz Fungi, Protista i beskralježnjaka potječu od zajedničkog pretka, a njegovom duplikacijom u kralježnjaka došlo je do pojave dvaju paraloga, BRMS1 i BRMS1-like.

Predstavnici proteina BRMS1 iz skupina Fungi, Protista i Metazoa odvojeni su u zasebne, dobro podržane grane unutar filogenetskog stabla (vrijednosti *bootstrap*: 100 %, 100 % i 99 %). Unutar Metazoa, predstavnici proteina BRMS1 iz životinja bez bilateralne simetrije i životinja s bilateralnom simetrijom do skupine kralježnjaka, smješteni su u grane koje uglavnom odgovaraju taksonomskim skupinama kojima pripadaju. Kao što je već spomenuto, paralozi BRMS1 i BRMS1-like iz kralježnjaka tvore dvije jasno odvojene, dobro definirane grane. Iznimka su paralozi BRMS1 i BRMS1-like iz organizma *Petromyzon marinus*, koji ne pripadaju jasno definiranim granama ostalih kralježnjaka. Ovo je vjerojatno rezultat toga što *P. marinus* pripada skupini Agnatha, koja se odvojila od ostatka kralježnjaka prije više od 500 milijuna godina, a svojim biološkim svojstvima značajno se razlikuje od modernih kralježnjaka (Smith i sur., 2013).



Slika 29. Filogenetska analiza proteina BRMS1 i BRMS1-like iz Metazoa, Protista i Fungi. Filogenetsko stablo konstruirano je metodom najveće vjerojatnosti prema modelu LG+G+I u programu MEGA7. Vrijednosti *bootstrap* dobivene su na temelju 1000 *bootstrap* replikacija (vrijednosti *bootstrap* veće od 50 % prikazane su na čvorovima evolucijskog stabla). Analiza uključuje 61 aminokiselinsku sekvencu. Predstavnici iz Fungi označeni su narančastom bojom, iz Protista zelenom bojom, a iz Metazoa plavom bojom. Unutar skupine Metazoa proteini

BRMS1 označeni su ljubičastom bojom, a proteini BRMS1-like ružičastom bojom. Proteini BRMS1 iz spužvi *A. queenslandica* i *E. subterraneus* te proteini BRMS1 i BRMS1-like iz čovjeka označeni su podebljanim slovima. Kratice latinskih naziva organizama objašnjene su u Prilogu.

### 4.3.1.3. Analiza strukture gena brms1

U svrhu analize strukture gena *brms1*, identificirani su introni u genima *brms1* i *brms1-like* iz odabranih predstavnika Metazoa i njihovih najbližih jednostaničnih srodnika Protista, te su uspoređene pozicije, faze i duljine introna. Informacije o intronima analiziranih gena *brms1* i *brms1-like* prikupljene su iz dostupnih genomskih baza podataka (NCBI), uključujući i neobjavljenu bazu genomskih i transkriptomskih podataka endemske spužve *E. subterraneus* (prof. dr. sc. Kristian Vlahoviček, Grupa za bioinformatiku, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu).

Rezultati pokazuju da je svih osam introna prisutnih u genu *brms1* iz čovjeka pronađeno i u homolognim genima životinja bez bilateralne simetrije, pri čemu je sedam introna prisutno kod homologa iz spužvi (Slika 30). Intron smješten ispred početnog kodona otkriven je isključivo u genima *brms1* iz kralježnjaka. Iznimku predstavlja gen *brms1* iz organizma *P. marinus*, koji ne sadrži ovaj intron, što je u skladu s prethodnim opažanjima s obzirom na to da pripada evolucijski najprimitivnijoj skupini kralježnjaka. Analizom je utvrđeno da paralozi *brms1* i *brms1-like* iz kralježnjaka sadrže po devet introna, pri čemu dijele pozicije i faze osam introna. Očuvanost strukture gena *brms1* i *brms1-like* ukazuje na divergenciju koja se dogodila relativno nedavno tijekom evolucije životinja. Važno je istaknuti da intron smješten ispred početnog kodona, prisutan u genu *brms1* iz kralježnjaka, nije pronađen kod paraloga *brms1-like* iz kralježnjaka. Također, gen *brms1-like* sadrži intron smješten na 3'-kraju, koji nije prisutan u genima *brms1* imaju produženu 3'-regiju u usporedbi s ostalim analiziranim kralježnjacima, unutar koje se nalazi i dodatni intron.

Gen *brms1* iz Protista *Capsaspora owczarzaki* sadrži šest introna, od kojih je pet prisutno u genima životinja bez bilateralne simetrije, dok su tri introna prisutna i kod kralježnjaka. Ovi rezultati ukazuju na to da je kompozicija gena, odnosno sadržaj introna i egzona, evolucijski očuvan i vjerojatno potječe od homologa zajedničkog pretka svih životinja.

Heal IKF	$\overline{\mathbf{V}}$	2		1	<b>0</b>	1	1	0	1	
	1	2		V	0	1	1	0	V	2
MMUSLIKE	17	2/		17	0/	1	1	0	17	
XIaLIKE	<u> </u>	<u>,</u> 2/		<u> </u>	<u>v</u>	V I	<u></u>	<u> </u>	<u>v</u> 17	
PmarLIKE	, <u> </u>			<u> </u>		<u> </u>	<u> </u>		V v	
Hsa	<u> </u>				<u> </u>			<u> </u>	<u> </u>	
Mmus		2			<b>V</b>	1	1	0	<u> </u>	
XIa	<u> </u>	2		<b>V</b>	V	1	1	V	V	<u>2</u>
Pmar		2		Ť	Ŵ	1	Ĭ	0	Ý	
Pho	1	2		1	V	1	1	<b>0</b>	V	10
DDe	V	2			0	T/	1	0	Ŵ	<u> </u>
Sko	1	2			0/	(1)	1/	0	v t	( <u>)                                    </u>
Spu	,V	2/		1/	 \0/	<u> </u>	 \1/	 \\(\)	<u> </u>	
Cvi	, V	<u> </u>	1			V I	<u> </u>		<u>.</u>	27 2207
Nve	,¥	¥	<u>V</u>	VV	<u> </u>		<u> </u>	<u> </u>	<u>V</u>	
Pda	, <b>!</b>	2/	<u> </u>	1/0/			1	<b>0</b>	<u> </u>	
Spi	<u>_</u>	2	V	10	V	1	1	0	V	
Bmi			V	V	Ŵ	Ĭ	1	Ŵ		<u>2</u> 2
Aau		Ź	Ŵ	100	Ý	Ť	Í	Ŵ	_	
E ou	$\nabla$	2	Ī		V	1	1	0		
Esu	1	2	Ŵ		0	¥			T.	0
Cow	V	V	V		V				<u> </u>	()

Slika 30. Shematski prikaz pozicija i faza introna gena *brms1* i *brms1-like* iz odabranih predstavnika Metazoa i Protista. Pozicije introna prikazane su trokutima, pri čemu broj unutar trokuta označava fazu introna. Introni koji se nalaze ispred početnog kodona označeni su praznim bijelim trokutom. Crnim isprekidanim linijama označeni su introni koji se nalaze u istim fazama i pozicijama nakon višestrukog poravnanja aminokiselinskih sekvenci. Za izradu slike korišten je CorelDRAW Graphic Suite (Alludo). Nukleotidne sekvence i informacije o položajima i fazama introna gena iz odabranih predstavnika Metazoa koje su korištene u ovoj analizi preuzete su iz javno dostupne baze genoma NCBI. Geni *brms1* iz spužvi *A. queenslandica* i *E. subterraneus* te geni *brms1* i *brms1-like* iz čovjeka označeni su podebljanim slovima. Kratice latinskih naziva organizama objašnjene su u Prilogu.

# 4.3.2. Biokemijska analiza proteina BRMS1 iz spužve i čovjeka

# 4.3.2.1. Pročišćavanje rekombinantnih proteina BRMS1 iz spužve i čovjeka

S ciljem izolacije i pročišćavanja proteina BRMS1 iz spužve i čovjeka, odgovarajući soj bakterija *E. coli* transformiran je plazmidom pET28b koji nosi gen koji kodira za EsuBRSM1 ili HsaBRMS1 s histidinskim privjeskom na N-terminalnom kraju proteina. Kako bi se utvrdili

optimalni uvjeti ekspresije proteina, napravljena je probna indukcija za EsuBRMS1 i HsaBRMS1 pri 30°C tijekom 3 sata dodatkom 0,8 mM IPTG-a i 16°C preko noći dodatkom 0,1 mM IPTG-a, te je uočeno kako se u oba slučaja protein najvećim dijelom nalazi u talogu, što daje minimalne šanse za pročišćavanje proteina (Slika 31).



Slika 31. Prekomjerna ekspresija proteina HsaBRMS1 u malom volumenu u tekućoj hranjivoj podlozi LB. (M) biljeg Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Standards, (1) talog bakterija prije indukcije, (2) supernatant prije indukcije, (3) supernatant nakon indukcije na 30°C tijekom 3 sata, (4) talog nakon indukcije 30°C tijekom 3 sata, (5) supernatant nakon indukcije na 16°C preko noći, (6) talog nakon indukcije na 16°C preko noći. Na slici desno naznačene su veličine vrpci u biljegu Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Standards izražene u kilodaltonima (kDa) (Bio-Rad).

Kako bi se udio netopljivih proteina sveo na minimum, ekspresija proteina BRMS1 iz spužve i čovjeka provedena je pri različitim uvjetima u tekućoj hranjivoj podlozi LB ili TB. Za izolaciju proteina korišteni su puferi različitog sastava te su korištene bakterijske stanice ArcticExpress (koje omogućuju ekpsresiju i pravilno smatanje proteina pri uvjetima duge indukcije i niske temperature), no i dalje je najveći dio prekomjerno eksprimiranog proteina odlazio u talog. Najbolji rezultati dobiveni su korištenjem bakterijskih stanica *E. coli* BL21 CodonPlus (DE3), uzgojem u tekućoj hranjivoj podlozi LB i indukcijom pomoću 0,8 mM IPTG-a pri 30 °C tijekom 3 sata. Eksprimirani rekombinantni proteini pročišćeni su afinitetnom kromatografijom pri čemu je korištena TALON agaroza koja specifično veže proteine koji nose biljeg His. Proteini su eluirani u puferu sastava: 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl, 300 mM imidazol. Kako bi se ukoncentrirao pročišćeni protein, korišten je Amicon® Ultra Centrifugalni Filter 10 kDa (Milipore). Čistoća pročišćeni rekombinantni proteina HsaBRMS1-His i EsuBRMS1-His analizirana je metodom SDS-PAGE pri čemu je za vizualizaciju korišteno briljatno modrilo Coomassie, prikazano na Slici 32.



Slika 32. Pročišćene frakcije proteina HsaBRMS1-His i EsuBRMS1-His. (M) biljeg Precision Plus Protein<sup>™</sup> Standards, (1) pročišćena frakcija proteina HsaBRMS1-His, (2) frakcija proteina HsaBRMS1-His nakon postupka ukoncentriravanja, (3–5) pročišćene frakcije proteina EsuBRMS1-His. Lijevo su naznačene veličine vrpci u biljegu Precision Plus Protein<sup>™</sup> Standards (Bio-Rad) izražene u kilodaltonima (kDa).

Rekombinantni proteini BRMS1 iz spužve i čovjeka dobiveni su u malim količinama te je potrebna daljnja optimizacija postupka pročišćavanja proteina s ciljem povećanja prinosa. Primijećeno je da prilikom postupka ukoncentriravanja proteina HsaBRMS1 i EsuBRMS1 dolazi do velikih gubitaka proteina. Iz literature je poznato kako HsaBRMS1 ima neuređenu tercijarnu strukturu, a predviđanje strukture EsuBRMS1 pomoću mrežno dostupnog programa AlphaFold2 (Jumper i sur., 2021) potvrdilo je isto i za homolog iz spužve (Slika 33). Neuređena tercijarna struktura proteina vjerojatno dovodi do njegove agregacije te gubitaka prilikom ukoncentriravanja.



Slika 33. Predviđena 3D struktura proteina BRMS1 iz spužve *E. subterraneus*. Bojama od hladnih prema toplim prikazana je vjerojatnost predviđene pozicije pojedinih atoma, od najveće vjerojatnosti (tamno plavo) prema najmanjoj (crveno). Za predviđanje strukture korišten je AlphaFold2 (Jumper i sur., 2021).

Budući da proteini HsaBRMS1 i EsuBRMS1 nisu uspješno izolirani i pročišćeni, daljnja biokemijska karakterizacija tih proteina nije bila moguća. Rekombinantni protein BRMS1 iz čovjeka do sada nije uspješno pročišćen u stabilnoj i funkcionalnoj konformaciji, a 3D kristalna struktura proteina nije razriješena. Međutim, postoje naznake da BRMS1 u svojoj kvaternoj strukturi stvara dimere kao najstabilniji oblik, dok su mogućnosti za stvaranje tetramera ili heksamera manje vjerojatne. Iako nije eksperimentalno potvrđeno da BRMS1 stvara dimere, računalna modeliranja, poput onih temeljenih na AlphaFoldu, podržavaju ovu pretpostavku. BRMS1 sadrži dvije superzavijene domene koje se smatraju ključnima za oligomerizaciju proteina, a daljnja istraživanja potrebna su kako bi se potvrdila njegova stvarna kvaterna struktura. Raniji radovi, primjerice Meehan i sur. (2004), pokazali su ko-pročišćavanje proteina BRMS1 unutar multimernog kompleksa SIN3A-HDAC, no budući da protein nije pročišćen izvan ovog kompleksa, nije se mogla definirati njegova kvaterna struktura (dimer, tetramer ili heksamer).

Zbog neuspješne izolacije rekombinantnih proteina HsaBRMS1 i EsuBRMS1, metodom koimunoprecipitacije ispitana je sposobnost dimerizacije proteina BRMS1 iz čovjeka, uključujući mogućnost tvorbe homodimera ili heterodimera s proteinom BRMS1 iz spužve te proteinom BRMS1-like iz čovjeka. Također, provjereno je može li protein BRMS1 iz spužve tvoriti heterodimere s proteinom BRMS1-like iz čovjeka. Ovaj pristup omogućava postavljanje temelja za daljnje ispitivanje kvaterne strukture proteina BRMS1, uključujući njegovu dimerizaciju ili oligomerizaciju.

### 4.3.2.2. Ispitivanje interakcija proteina BRMS1 metodom koimunoprecipitacije

Koimunoprecipitacija je provedena kako bi se ispitala sposobnost proteina HsaBRMS1 za tvorbu homodimera ili heterodimera s proteinom EsuBRMS1 ili HsaBRMS1-like, te sposobnost proteina EsuBRMS1 za tvorbu heterodimera s proteinom HsaBRMS1-like. Ukratko, tumorske stanice čovjeka MDA-MB-231 ko-transficirane su plazmidom pcDNA3 koji kodira za protein od interesa obilježen biljegom flag i plazmidom pEGFP-N1 koji kodira za protein od interesa obilježen biljegom GFP. Stanice su 24 sata nakon transfekcije inkubirane s protu-flag agaroznim zrncima preko noći, a proteini koji su se vezali na protu-flag agarozu analizirani su metodom *Western blot* korištenjem specifičnog protutijela za protein BRMS1 koje prepoznaje proteine HsaBRMS1 i HsaBRMS1-like.

Rezultati su pokazali da prekomjerno eksprimirani protein BRMS1 iz spužve obilježen biljegom flag može tvoriti heterodimere s prekomjerno eksprimiranim proteinom BRMS1 iz čovjeka obilježenim biljegom GFP (Slika 34, linija 3). Protein BRMS1 iz spužve nije pokazao sposobnost vezanja na endogeni protein BRMS1 iz čovjeka, a razlog tomu može biti niska količina endogenog proteina u tumorskim stanicama čovjeka MDA-MB-231, što je moglo otežati detekciju ove interakcije (Slika 34, linija 2). Također je uočeno kako prekomjerno eksprimirani protein BRMS1 iz čovjeka obilježen biljegom flag može tvoriti homodimere s prekomjerno eksprimirani protein BRMS1 iz čovjeka obilježen biljegom flag može tvoriti homodimere s prekomjerno eksprimiranim proteinom BRMS1 iz čovjeka obilježenim biljegom GFP, što je u skladu s očekivanjima (Slika 34, linija 5). S druge strane, nije uočeno stvaranje heterodimera između proteina BRMS1 iz spužve i čovjeka s proteinom BRMS1-like iz čovjeka (Slika 34, linije 4 i 6). Ipak, potrebno je provesti dodatne eksperimente koimunoprecipitacije kako bi se istražile ove interakcije i potvrdilo da proteini BRMS1 iz spužve i čovjeka ne stvaraju heterodimere s proteinom BRMS1-like iz čovjeka, uzimajući u obzir mogući utjecaj nedovoljne ekspresije proteina HsaBRMS1-like na rezultate.



Slika 34. Koimunoprecipitacija proteina od interesa korištenjem protu-flag agaroznih zrnaca. (M) označava proteinski biljeg Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Standards, (1) kontrolne stanice kotransficirane praznim plazmidima pcDNA3 i pEGFP-N1, (2) EsuBRMS1-flag + endogeni HsaBRMS1, (3) EsuBRMS1-flag + HsaBRMS1-GFP, (4) EsuBRMS1-flag + HsaBRMS1-like-GFP, (5) HsaBRMS1-flag + HsaBRMS1-GFP, (6) HsaBRMS1-flag + HsaBRMS1-like-GFP. Proteini su detektirani metodom *Western blot* korištenjem protutijela protu-BRMS1. Na slici desno naznačene su veličine vrpci u biljegu Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Standards izražene u kilodaltonima (kDa) (Bio-Rad).

4.3.3. Biološka analiza proteina BRMS1 iz spužve te proteina BRMS1 i BRMS1-like iz čovjeka

# 4.3.3.1. Unutarstanični smještaj proteina BRMS1 iz spužve te proteina BRMS1 i BRMS1-like iz čovjeka

S ciljem određivanja unutarstaničnog smještaja proteina BRMS1 iz spužve i čovjeka te proteina BRMS1-like iz čovjeka u tumorskim stanicama čovjeka, stanična linija MCF-7 ko-transficirana je različitim kombinacijama proteina EsuBRMS1, HsaBRMS1 i HsaBRMS1-like obilježenim fluorescentnim biljegom GFP ili Cherry koji se nalazi na N-terminalnom kraju proteina.

Uočeno je kako su proteini EsuBRMS1, HsaBRMS1 i HsaBRMS1-like smješteni u jezgri stanica MCF-7, budući da kolokaliziraju s bojom Hoechst kojom su bojene stanične jezgre (Slika 35). Uz navedeno, prisutan je signal i u citoplazmi analiziranih stanica, što ukazuje na djelomičan smještaj navedenih proteina u citoplazmi stanica MCF-7. Budući da je signal u citoplazmi slabiji od onoga u jezgri, možemo zaključiti kako je razina analiziranih proteina u citoplazmi niska te da je njihov primarni smještaj u jezgri stanica MCF-7. Metodom ko-transfekcije pokazana je potpuna kolokalizacija proteina EsuBRMS1 s proteinima HsaBRMS1 i HsaBRMS1-like, te proteina HsaBRMS1 s proteinom HsaBRMS1-like. Dobiveni rezultat potvrđuje identičan smještaj proteina BRMS1 iz spužve i čovjeka te proteina BRMS1-like iz čovjeka primarno u jezgri te djelomično u citoplazmi tumorskih stanica čovjeka MCF-7.



Slika 35. Unutarstanični smještaj proteina EsuBRMS1, HsaBRMS1 i HsaBRMS1-like je najvećim dijelom u jezgri, ali i u citoplazmi tumorskih stanica čovjeka MCF-7. A) EsuBRMS1 obilježen biljegom GFP (zeleno), a HsaBRMS1 biljegom Cherry (crveno), B) EsuBRMS1 obilježen biljegom GFP (zeleno), a HsaBRMS1-like biljegom Cherry (crveno), te C) HsaBRMS1 obilježen biljegom GFP (zeleno), a HsaBRMS1-like biljegom Cherry (crveno), te C) Kolokalizacija proteina prikazana je žutom bojom. Za bojenje jezgri korišten je Hoechst (plavo). Stanice su analizirane metodom konfokalne mikroskopije. Skala iznosi 10 µm.

Kako bi se dodatno analizirao smještaj homologa BRMS1 iz spužve i čovjeka u tumorskim stanicama čovjeka, stanična linija HeLa transficirana je proteinom EsuBRMS1 ili HsaBRMS1 obilježenim fluorescentnim biljegom GFP. Rezultati su pokazali smještaj homologa BRMS1 iz spužve i čovjeka najvećim dijelom u jezgri, ali i u citoplazmi stanica HeLa (Slika 36). Ovaj rezultat potvrđuje jednak smještaj navedenih proteina u tumorskim staničnim linijama čovjeka MCF-7 i HeLa.



Slika 36. Unutarstanični smještaj proteina EsuBRMS1 i HsaBRMS1 najvećim dijelom u jezgri, ali i u citoplazmi tumorskih stanica čovjeka HeLa. EsuBRMS1 (lijevo) i HsaBRMS1 (desno) obilježeni su biljegom GFP (zeleno). Za bojenje jezgri korišten je Hoechst (plavo). Stanice su analizirane metodom konfokalne mikroskopije. Skala iznosi 10 µm.

S ciljem određivanja unutarstaničnog smještaja homologa BRMS1 iz spužve i čovjeka u stanicama spužve *E. subterraneus*, provedena je transfekcija stanica spužve proteinom EsuBRMS1 ili HsaBRMS1 obilježenim fluorescentnim biljegom GFP. Unatoč niskoj učinkovitosti transfekcije, uspješno su identificirane stanice s vidljivim signalom GFP (zeleno obojenje), što potvrđuje ekspresiju proteina BRMS1 u dijelu stanica spužve. Rezultati upućuju na to da su proteini EsuBRMS1 i HsaBRMS1 smješteni i u citoplazmi i u jezgi stanica spužve (Slika 37). Ovakav smještaj u skladu je s prethodno određenim smještajem proteina BRMS1 iz spužve i čovjeka u tumorskim staničnim linijama čovjeka MCF-7 i HeLa.

U promatranim stanicama spužve uočena je specifična morfologija jezgri – prisutno je više signala boje Hoechst kojom su bojene jezgre unutar pojedine stanice, koji izgledaju poput odvojenih točkica. Prema literaturi, stanice nekih morskih spužvi mogu sadržavati više jezgri, osobito u slučajevima sincicijalne organizacije (npr. Hexactinellida) (Reiswig i Mackie, 1983; Leys, 2003). Međutim, takva morfologija do sada nije opisana ni potvrđena kod slatkovodne spiljske spužve *E. subterraneus*, koja pripada razredu Demospongiae (Borchiellini i sur., 2004). Stoga je moguće da zapaženi višestruki signali boje Hoechst unutar jedne stanice upućuju na: (1) prisutnost nekoliko stanica u vrlo bliskom kontaktu, (2) stanice u fazi mitoze, ili (3)

ograničenja u optičkoj rezoluciji mikroskopa. Iako zasad nema dokaza o postojanju stanica s više jezgri u *E. subterraneus*, ta mogućnost ne može biti u potpunosti isključena bez dodatnih morfoloških i funkcionalnih analiza.



Slika 37. Unutarstanični smještaj EsuBRMS1 i HsaBRMS1 u stanicama spužve *E. subterraneus*. EsuBRMS1 (gore) i HsaBRMS1 (dolje) obilježeni su biljegom GFP (zeleno). Za bojenje jezgri korišten je Hoechst (plavo). Stanice su analizirane metodom konfokalne mikroskopije. Skala iznosi 3 µm.

# 4.3.3.2. Uloga proteina BRMS1 iz spužve te proteina BRMS1 i BRMS1-like iz čovjeka u procesima povezanima s rakom

Budući da je iz literature poznato da protein BRMS1 iz čovjeka ima ulogu u procesima stanične migracije i stvaranja kolonija (Zimmermann i Welch, 2020; Khotskaya i sur., 2014), ispitana je uloga proteina BRMS1 iz spužve i paraloga BRMS1-like iz čovjeka u navedenim procesima u tumorskim stanicama čovjeka MDA-MB-231. Stanice MDA-MB-231 transficirane su

proteinom EsuBRMS1, HsaBRMS1 ili HsaBRMS1-like obilježenim biljegom flag, a transfekcija praznim plazmidom pcDNA3 korištena je kao kontrola.

Rezultati mjerenja proliferacije stanica MDA-MB-231 nakon prekomjerne ekspresije proteina EsuBRMS1, HsaBRMS1 i HsaBRMS1-like pomoću testa MTT pokazali su da sva tri proteina statistički značajno smanjuju razinu proliferacije u usporedbi s transfekcijom praznim plazmidom (p<0.01) (Slika 38) u tumorskim stanicama čovjeka MDA-MB-231.



Slika 38. Utjecaj prekomjerne ekspresije proteina EsuBRMS1, HsaBRMS1 i HsaBRMS1-like na razinu stanične proliferacije u tumorskim stanicama čovjeka MDA-MB-231. Svi eksperimenti ponovljeni su tri puta u biološkim duplikatima. Svaki od rezultata uspoređen je s kontrolnim stanicama (pcDNA3) koristeći studentov t-test gdje je razina statističke značajnosti postavljena na p<0,05. Statistički značajna razlika prikazana je kao \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001. Standardna devijacija naznačena je na stupićima (srednja vrijednost  $\pm$  SD, n = 3).

Uloga proteina EsuBRMS1, HsaBRMS1 i HsaBRMS1-like u procesu stanične migracije analizirana je pomoću testa zacjeljivanja rane i testa pokretljivosti stanica korištenjem Boydenovih komorica. Test zacjeljivanja rane pokazao je statistički značajno smanjenje migracije stanica i sporije zacjeljivanje rane nakon 24 sata za EsuBRMS1 (p<0,001), HsaBRMS1 (p<0,05) i HsaBRMS1-like (p<0,001) u usporedbi s transfekcijom praznim plazmidom (Slika 39) u tumorskim stanicama čovjeka MDA-MB-231.



Slika 39. Utjecaj prekomjerne ekspresije proteina EsuBRMS1, HsaBRMS1 i HsaBRMS1-like na staničnu migraciju ispitan pomoću testa zacjeljivanja rane u tumorskim stanicama čovjeka MDA-MB-231. Gornja slika prikazuje stanice slikane invertnim mikroskopom pri povećanju od 100× neposredno nakon stvaranja rane (0 h) i nakon inkubacije u trajanju od 24 h za transfekciju praznim plazmidom pcDNA3, EsuBRMS1, HsaBRMS1 te HsaBRMS1-like. Crvenim linijama označena je površina gdje stanice nisu migrirale nakon stvaranja rane. Ukupna površina u koju su stanice migrirale nakon 24 sata u odnosu na početnu površinu (0 h) kvantificirana je korištenjem računalnog programa ImageJ (NIH) i prikazana grafički u postocima, pri čemu 100 % označava potpuno zacjeljivanje rane. Svaki od rezultata uspoređen je s kontrolnim stanicama (pcDNA3) koristeći studentov t-test gdje je razina statističke značajnosti postavljena na p<0,05. Statistički značajna razlika prikazana je kao \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001. Standardna devijacija naznačena je na stupićima (srednja vrijednost  $\pm$ SD, n = 3).

Test pokretljivosti stanica korištenjem Boydenovih komorica pokazao je statistički značajno smanjenje migracije stanica za EsuBRMS1, HsaBRMS1 i HsaBRMS1-like u usporedbi s transfekcijom praznim plazmidom (p<0,001) (Slika 40) u tumorskim stanicama čovjeka MDA-MB-231.



Slika 40. Utjecaj prekomjerne ekspresije proteina EsuBRMS1, HsaBRMS1 i HsaBRMS1-like na staničnu migraciju ispitan pomoću testa pokretljivosti stanica (Boydenove komorice) u tumorskim stanicama čovjeka MDA-MB-231. Gornja slika prikazuje membrane Boydenove komorice slikane invertnim mikroskopom pri povećanju od 200× nakon migracije stanica prema FBS-u u trajanju od 24 sata za transfekciju praznim plazmidom pcDNA3, EsuBRMS1, HsaBRMS1 te HsaBRMS1-like. Broj stanica koje su migrirale nakon 24 sata kvantificiran je korištenjem računalnog programa ImageJ (NIH) i prikazan grafički pomoću stupića. Svaki od rezultata uspoređen je s kontrolnim stanicama (pcDNA3) koristeći studentov t-test gdje je razina statističke značajnosti postavljena na p<0,05. Statistički značajna razlika prikazana je kao \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001. Standardna devijacija naznačena je na stupićima (srednja vrijednost  $\pm$  SD, n = 3).

Nadalje, pomoću testa stvaranja kolonija pokazano je da prekomjerna ekspresija proteina BRMS1 iz spužve te proteina BRMS1 i BRMS1-like iz čovjeka statistički značajno utječe na smanjenje broja stvorenih kolonija u odnosu na transfekciju praznim plazmidom pcDNA3 (p<0.05) koji je korišten kao kontrola (Slika 41) u tumorskim stanicama čovjeka MDA-MB-231.



Slika 41. Utjecaj prekomjerne ekspresije proteina EsuBRMS1, HsaBRMS1 i HsaBRMS1-like na broj stvorenih kolonija u tumorskim stanicama čovjeka MDA-MB-231. Svi eksperimenti ponovljeni su tri puta u biološkim duplikatima, a rezultati su kvantificirani korištenjem računalnog programa ImageJ (NIH). Svaki od rezultata uspoređen je s kontrolnim stanicama (pcDNA3) koristeći studentov t-test gdje je razina statističke značajnosti postavljena na p<0,05. Statistički značajna razlika prikazana je kao \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001. Standardna devijacija naznačena je na stupićima (srednja vrijednost  $\pm$  SD, n = 3).

Dobiveni rezultati potvrđuju da je biološka funkcija proteina BRMS1 u procesima povezanima s metastaziranjem tumora (stanična proliferacija, migracija i stvaranje kolonija) evolucijski očuvana od spužve do čovjeka. Nadalje, ukazuju na to da je protein BRMS1 iz spužve pokazivao sposobnost supresije metastaziranja, iako su se tumori i metastaziranje pojavili tek kasnije tijekom evolucije životinja. Također, rezultati su pokazali da paralozi BRMS1 i BRMS1-like iz čovjeka, koji su dio istog kromatin remodelirajućeg kompleksa, imaju jednaku ulogu u procesima stanične proliferacije, migracije i stvaranja kolonija.

### 5. RASPRAVA

Iako se dugo smatralo da su mnogi geni povezani s nastankom i progresijom raka specifični za kralježnjake, novija istraživanja ukazuju na njihovu prisutnost već u genomima evolucijski jednostavnijih životinja bez bilateralne simetrije, poput spužvi (Ćetković i sur., 2018a; Ćetković i sur., 2018b; Harcet i sur., 2010; Srivastava i sur., 2010). U ovoj doktorskoj disertaciji provedena je bioinformatička, biokemijska i biološka karakterizacija homologa proteina R-RAS2-like i BRMS1 iz spužve *E. subterraneus* te njihova usporedba s onkogenom R-RAS2 i supresorom metastaziranja BRMS1 iz čovjeka. Korištenje spužve kao modelnog organizma pružilo je uvid u osnovne stanične funkcije proteina R-RAS2 i BRMS1, što pomaže u razjašnjenju složenijih funkcija i interakcija njihovih homologa u višim organizmima, uključujući i čovjeka.

### 5.1. Protein R-RAS2

Od svih članova podobitelji Ras srodnih proteina, protein R-RAS2 (poznat i kao TC21) najviše je proučavan zbog svog izraženog onkogenog potencijala, sličnog klasičnim proteinima Ras (Fernández-Pisonero i sur., 2022; Colicelli i Jun, 2004; Chan i sur., 1994; Graham i sur., 1994). R-RAS2 sudjeluje u regulaciji važnih staničnih procesa, poput sinteze DNA, transkripcije i translacije te utječe na proliferaciju i preživljenje stanica (Zhang i sur., 2017; Larive i sur., 2014). U skladu s navedenim, mutacije u genu *r-ras2* povezane su s onkogenom transformacijom stanica u brojnim tipovima raka. Osim onkogenih mutacija, prekomjerna ekspresija divljeg tipa R-RAS2 zabilježena je u raku dojke (Clark i sur., 1996), melanomu (Lee i sur., 2011), limfomima (Delgado i sur., 2009), hepatocelularnom karcinomu (Luo i sur., 2010) i tumorima središnjeg živčanog sustava (Gutierrez-Erlandsson i sur., 2013) kod čovjeka. Prvi otkriveni signalni putevi povezani s proteinom R-RAS2 bili su signalni put mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK, odnosno put RAS/RAF/MAPK) i signalni put fosfoinozitol-3-kinaze (PI3K, odnosno put PI3K/AKT/mTOR) (Movilla i sur., 1999).

Protein R-RAS2 sadrži evolucijski očuvane domene važne za vezanje i hidrolizu molekule GTP-a, koje su pronađene kod svih članova obitelji proteina Ras. Aminokiselinske nužne za GTPaznu aktivnost grupirane su u pet motiva G, a dvije domene *switch* ključne su za prijelaz između aktivnog i inaktivnog konformacijskog stanja. Proteini obitelji Ras razlikuju se u hipervarijabilnoj regiji (HVR) koja se nalazi na C-terminalnom kraju proteina, a pokazano je

da te razlike utječu na njihov specifičan unutarstanični smještaj i aktivaciju različitih signalnih puteva u stanici (Weber i Carroll, 2021; Reuther i Der, 2000).

Brojna istraživanja pokazala su smještaj prekomjerno eksprimiranog R-RAS2 u staničnoj membrani, Golgijevom aparatu i endoplazmatskom retikulumu normalnih i tumorskih stanica čovjeka (Talajić i sur., 2024; Dominko i sur., 2023; Capri i sur., 2019; Zhang i sur., 2017). Nedavno istraživanje (Clavaín i sur., 2023) pokazalo je smještaj endogenog proteina R-RAS2 u fokalnim adhezijama staničnih linija raka jajnika (A2780 i COV362) i raka dojke (CAL-51) čovjeka. Također je utvrđeno da prekomjerna ekspresija proteina R-RAS2 utječe na smanjenje broja i veličine fokalnih adhezija, što dovodi do povećane migracije tumorskih stanica. U istraživanju Talajić i sur. (2024) nije uočen smještaj prekomjerno eksprimiranih proteina R-RAS2 iz spužve i čovjeka u fokalnim adhezijama, no uočena je njihova uloga u regulaciji fokalnih adhezija u staničnim linijama raka dojke čovjeka MDA-MB-231 i melanoma čovjeka MDA-MB-435S. Pokazano je da prekomjerno eksprimirani proteini R-RAS2 iz čovjeka i spužve povećavaju količinu biljega fokalnih adhezija vinkulina te talina 1, za kojeg je poznato da je ključan za aktivaciju integrina (Goult i sur., 2021), no potrebna su dodatna istraživanja kako bi se utvrdio mehanizam regulacije fokalnih adhezija uzrokovane proteinom R-RAS2.

### 5.1.1. Struktura proteina R-RAS2 evolucijski je očuvana od spužve do čovjeka

U ovoj disertaciji provedena je prva sveobuhvatna analiza evolucijske prošlosti proteina podobitelji R-Ras. Pokazano je kako je tijekom evolucije Metazoa došlo do dviju nespecifičnih duplikacija ancestralnog proteina R-RAS2-like (Slika 8), tijekom prijelaza na životinje s bilateralnom simetrijom (Bilateria) pri čemu je nastao protein M-RAS te tijekom prijelaza na kralježnjake (Vertebrata) pri čemu su nastali proteini R-RAS1 i R-RAS2. Pretpostavlja se da je divergentna evolucija utjecala na stjecanje jedinstvenih svojstava proteina R-RAS1, R-RAS2 i M-RAS, što im je omogućilo sudjelovanje u specifičnim staničnim procesima. Iz literature je poznato da R-RAS1 ima ulogu u fokalnim adhezijama (Colicelli i Jun, 2004), gdje potiče adheziju stanica i aktivira integrine, R-RAS2 sudjeluje u prijenosu signala u stanici (Capri i sur., 2019), dok je M-RAS uključen u reorganizaciju aktinskog citoskeleta i fiziološke funkcije poput diferencijacije neurona i osteoblasta (Watanabe-Takano i sur., 2010).

Filogenetskom analizom pokazano je da ptice (Aves) u svom genomu nemaju gen koji kodira za protein R-RAS1, koji je prisutan u gotovo svih ostalih kralješnjaka (Slika 8 i Tablica 9). To je u skladu s brojnim istraživanjima koja su pokazala da genomi ptica imaju smanjen broj

protein-kodirajućih gena u odnosu na druge životinje iz skupine kralješnjaka (Hughes i Friedman, 2008). Također, genomi ptica sadrže manji broj gena iz određenih genskih obitelji, pa tako u njihovim genomima nisu pronađeni homolozi brojnih gena koji kod čovjeka imaju važne tkivno-specifične biološke funkcije ili sudjeluju u razvoju različitih bolesti (Wu i sur., 2021; Lovell i sur., 2014).

### 5.1.2. Proteini R-RAS2 iz spužve i čovjeka pokazuju mogućnost vezanja na RNA

U ovoj doktorskoj disertaciji prvi puta je pokazana mogućnost vezanja proteina R-RAS2 iz spužve i čovjeka na molekulu RNA (Slika 15). Budući da u primarnoj strukturi proteina R-RAS2 nije pronađena domena karakteristična za vezanje na molekulu RNA, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se otkrio mehanizam vezanja i potencijalna funkcija navedenih interakcija. No ipak, iz literature je poznato da protein K-Ras iz čovjeka, koji također pripada superobitelji proteina Ras i dijeli značajnu strukturnu sličnost s proteinom R-RAS2, pokazuje mogućnost vezanja na molekulu RNA. Protein K-Ras stupa u interakcije sa specifičnim proteinima SNARE (engl. *Soluble N-ethylmaleimide attachment protein receptor*), što utječe na njegov unutarstanični smještaj između reciklirajućih endosoma i stanične membrane. Male nekodirajuće molekule RNA mogu se kompetitivno vezati na protein K-Ras te na taj način onemogućuju interakciju K-Ras s proteinima SNARE. Interakcije proteina K-Ras s malim nekodirajućim molekulama RNA utječu na njegov unutarstanični smještaj, što ima ulogu u tumorigenezi uzrokovanoj proteinom K-Ras (Che i sur., 2019).

### 5.1.3. Utjecaj hipervarijabilne regije na unutarstanični smještaj proteina R-RAS2

Dosadašnja istraživanja pokazala su da je smještaj prekomjerno eksprimiranog proteina R-RAS2 u staničnoj membrani, Golgijevom aparatu ili endoplazmatskom retikulumu u različitim staničnim linijama (Capri i sur., 2019; Zhang i sur., 2017; Dominko i sur., 2023; Talajić i sur., 2024), dok je endogeni protein R-RAS2 smješten u fokalnim adhezijama (Clavaín i sur., 2023). U ovoj doktorskoj disertaciji analiziran je i uspoređen smještaj prekomjerno eksprimiranih proteina R-RAS2 iz spužve i čovjeka u tumorskim stanicama čovjeka MCF-7 i HeLa i fibroblastima čovjeka MJ90.

Rezultati su pokazali da su proteini R-RAS2 iz spužve i čovjeka smješteni u unutarstaničnim membranama i staničnoj membrani tumorskih staničnih linija čovjeka MCF-7 i HeLa (Slika

16) te fibroblasta čovjeka MJ90 (Slika 17). Uočeno je kako je protein R-RAS2-like iz spzžve smješten većim dijelom u unutarstaničnim membranama, dok je homolog R-RAS2 iz čovjeka smješten većim dijelom u staničnoj membrani (Slika 16). Navedena razlika u smještaju proteina R-RAS2 iz spužve i čovjeka između stanične membrane i unutarstaničnih membrana vjerojatno je posljedica razlike u strukturi proteina, točnije u HVR koja se nalazi na C-terminalnom kraju proteina. Za smještaj proteina R-RAS2 iz čovjeka u staničnoj membrani najvećim su dijelom odgovorne posttranslacijske modifikacije palmitoilacije cisteina Cys199 (nalazi se uzvodno od motiva CaaX) i izoprenilacije cisteina Cys201 (dio motiva CaaX na C-terminalnom kraju proteina) (Zhang i sur., 2017; Furuhjelm i Peränen, 2003; Reuther i Der, 2000). Kako bi se potvrdila očuvanost navedenih domena i motiva unutar HVR, napravljeno je višestruko poravnanje C-terminalnog kraja proteina R-RAS2-like iz spužve te proteina R-RAS1, R-RAS2 i M-RAS iz čovjeka. Uočeno je kako protein R-RAS2-like iz spužve ima evolucijski očuvan motiv CaaX važan za izoprenilaciju, ali nema cistein važan za sekundarnu modifikaciju palmitoilacije koji je prisutan kod homologa iz čovjeka (Slika 42). Dosadašnjim istraživanjima (Furuhjelm i Peränen, 2003) istaknuta je važnost sekundarne modifikacije palmitoilacije cisteina Cys201 i strukture HVR za transport proteina od unutrašnjih membrana prema staničnoj membrani (od Golgijevog aparata nadalje). Budući da protein R-RAS2-like iz spužve nema navedeni cistein i ima kraću HVR, to može objasniti njegovo nakupljanje i smještaj većim dijelom u unutarstaničnim membranama.

Reuther i Der (2000) pokazali su da protein R-RAS2 iz čovjeka na svom C-terminalnom kraju ima nekoliko lizina (Lys192, 194, 196, 197), te se pretpostavlja da acetilacija lizina utječe na smještaj proteina u staničnoj membrani. Lizini na C-terminalnom kraju pronađeni su i kod proteina K-Ras4b iz čovjeka, a smatra se da utječu na prijenos proteina od endoplazmatskog retikuluma do stanične membrane putem koji ne uključuje Golgijev aparat. Za razliku od proteina K-Ras4b, proteini H- i N-Ras nemaju navedene lizine te se transportiraju od Golgijevog aparata do stanične membrane. Još uvijek nije poznato utječu li razlike u načinu transporta proteina obitelji Ras do stanične membrane na njihove različite stanične funkcije. Zhang i sur. (2017) također su uočili da acetilacija lizina na C-terminalnom kraju proteina R-RAS2 omogućuje njegovu translokaciju u staničnu membranu, što dovodi do ubrzane diobe stanica. Pokazali su da tumor supresor SIRT6 deacetilira lizine proteina R-RAS2, čime smanjuje njegov smještaj u staničnoj membrani te posljedično inhibira aktivaciju signalnog puta PI3K i proliferaciju stanica. Na Slici 42 vidljivo je da su lizini na C-terminalnom kraju proteina R-RAS2 iz čovjeka bili prisutni i u homologu R-RAS2-like iz spužve, a nisu pronađeni u proteinima R-RAS1 i M-RAS iz čovjeka. Prisutnost navedenih lizina u homologu R-RAS2like iz spužve upućuje na njihovu evolucijski očuvanu ulogu u regulaciji unutarstaničnog smještaja, ali i moguće uloge u regulaciji procesa povezanih s rakom.

Na višestrukom poravnanju HVR analiziranih proteina također je uočeno kako samo proteini R-RAS1 i R-RAS2 iz čovjeka imaju motiv bogat aminokiselinom prolinom, koji nije pronađen u proteinu M-RAS iz čovjeka i homologu R-RAS2-like iz spužve. Motiv bogat aminokiselinom prolinom sadrži vezno mjesto za domenu SH3, ključno za aktivaciju integrina posredovanu proteinom R-RAS1 (Wang i sur., 2000). Budući da je navedeni motiv prisutan i u proteinu R-RAS2 iz čovjeka, to bi moglo dodatno objasniti njegovu ulogu u regulaciji fokalnih adhezija uočenu u istraživanjima Clavaín i sur. (2023) te Talajić i sur. (2024).

HsaRRAS	176:	RLNVDEAFEQLVRAVRKY <mark>QEQELPPSPPS</mark> APRKKGGGCPCVLL	:	218
HsaRRAS2	161:	RMNVDQAFHELVRVIRKF <mark>QEQECPPSPEP</mark> TRKEKDKKGCHCVIF	:	204
HsaMRAS	161:	PLNVDKAFHDLVRVIRQQIPEKSQKKKKKKTKWRGDRATGTHKLQCVIL	:	208
EsuRRAS2L	156:	KVHVDKAFHDLVRVIRKYQKPGPDKKEKKKKKCVIL	:	191

Slika 42. Hipervarijabilna regija na C-terminalnom kraju proteina R-RAS2-like iz spužve te proteina R-RAS1, R-RAS2 i M-RAS iz čovjeka. Žutom bojom označena je regija bogata aminokiselinom prolinom prisutna kod proteina R-RAS1 i R-RAS2 iz čovjeka, zelenom bojom označeni su lizini unutar HVR očuvani između homologa R-RAS2 iz spužve i čovjeka, narančastom bojom označen je cistein važan za palmitoilaciju (Cys201), a ružičastom bojom označen je motiv CaaX. Preuzeto i prilagođeno iz Talajić i sur. (2024).

5.1.4. Biološke funkcije proteina R-RAS2 evolucijski su očuvane

Protein R-RAS2 iz čovjeka poznat je po svojim ulogama u procesima povezanim s nastankom i progresijom tumora (Clavaín i sur., 2022; Zhang i sur., 2017; Larive i sur., 2014; Graham i sur., 1994). U okviru ove disertacije pokazano je da homolog R-RAS2-like iz spužve, kao i protein R-RAS2 iz čovjeka, smanjuje proliferaciju, migraciju i sposobnost stvaranja kolonija u tumorskim stanicama čovjeka MDA-MB-231 (Slika 22-25). Dobiveni rezultati ukazuju na evolucijski očuvanu biološku funkciju proteina R-RAS2 između spužve i čovjeka.

#### 5.2. Protein BRMS1

Protein BRMS1 važan je supresor metastaziranja koji sudjeluje u nekoliko važnih koraka kompleksne kaskade procesa metastaziranja, uključujući migraciju, invaziju i adheziju stanica te interakcije stanica s izvanstaničnim matriksom (Zimmermann i sur., 2021; Zimmermann i Welch, 2020; Khotskaya i sur., 2014). Dio je kromatin remodelirajućeg kompleksa Sin3-HDAC koji ima ulogu u regulaciji transkripcije ciljnih gena. U stanicama raka često je promijenjena razina i aktivnost proteina kompleksa mSin3, uključujući BRMS1, što može doprinijeti progresiji bolesti (Zimmermann i Welch, 2020). BRMS1 najvećim je dijelom smješten u jezgri, no pronađen je i u citoplazmi stanica HeLa, gdje bi mogao imati dodatne funkcije povezane s citoskeletom i signalizacijom (Rivera et al., 2010). BRMS1 specifično suprimira metastaziranje bez značajnog utjecaja na rast primarnog karcinoma, što ga čini potencijalno zanimljivim terapijskim ciljem (Zimmermann i Welch, 2020).

BRMS1 sudjeluje u regulaciji nekoliko važnih signalnih puteva u stanici. Njegova najvažnija funkcija je inhibicija signalnog puta NF-κB, čime se smanjuje razina ekspresije metastatskih proteina poput uPA, CXCR4 i OPN-a, koji utječu na migraciju i invaziju stanica (Chen i sur., 2011; Samant i sur., 2007; Cicek i sur., 2005). Osim toga, BRMS1 negativno regulira signalni put EGFR/PI3K/Akt, što dovodi do smanjene pokretljivosti stanica i sposobnosti metastaziranja (Vaidya i sur., 2008; Cicek i sur., 2004). Uz navedeno, BRMS1 smanjuje razine kemokinskog receptora CXCR4 i osjetljivost tumorskih stanica na signale SDF-1α, odnosno dovodi do smanjenja migracije uzrokovane kemotaksijom (Yang i sur., 2008). Moguć je i utjecaj proteina BRMS1 na signalni put FAK/Src, koji je važan za regulaciju fokalnih adhezija, iako mehanizam nije u potpunosti razjašnjen (Zimmermann i sur., 2020).

Važan paralog ovog proteina je protein BRMS1-like, koji je također dio kromatin remodelirajućeg kompleksa Sin3-HDAC. BRMS1-like pokazuje 56 % sličnosti aminokiselina s proteinom BRMS1, a njegova uloga u raku još je uvijek nedovoljno istražena. Uočeno je da protein BRMS1-like dovodi do smanjenog metastaziranja i invazije stanica raka dojke, inhibirajući EMT. Pretpostavlja se da može omogućiti funkcionalnu kompenzaciju kada je protein BRMS1 epigenetički utišan (Gong i sur., 2014).

### 5.2.1. Evolucijska prošlost proteina BRMS1 i BRMS1-like

U ovoj doktorskoj disertaciji prvi je puta provedena sveobuhvatna filogenetska analiza evolucijske prošlosti proteina BRMS1 i BRMS1-like. Protein BRMS1 često se u literaturi
svrstava u obitelj proteina koji sadrže domenu sličnu domeni Sds3 zajedno s proteinima SUDS3 i BRMS1-like (Cho i sur., 2015; Hurst i Welch, 2011; Silveira i sur., 2008). Homolog proteina SUDS3 bio je prisutan već u genomu kvasca (protein SDS3, Vannier i sur., 1996), dok je BRMS1 pronađen tek u genomima nekih gljiva i protista te u gotovo svim taksonomskim skupinama Metazoa. Filogenetska analiza provedena u ovoj doktorskoj disertaciji pokazala je da su BRMS1 i BRMS1-like nastali nespecifičnom duplikacijom iz ancestralnog proteina BRMS1 koja se najvjerojatnije dogodila tijekom prijelaza na kralježnjake (Vertebrata). Protein SUDS3 evolucijski je povezan s proteinima BRMS1 i BRMS1-like, no nije potvrđeno da je ancestralni BRMS1 nastao njegovom izravnom divergencijom, što upućuje na evolucijski udaljenog zajedničkog pretka. Također, protein SUDS3, iako dio istog mSin3 kompleksa, ne suprimira metastaziranje tumorskih staničnih linija čovjeka (Silviera i sur., 2008). Zbog svega navedenog, protein SUDS3 nije uključen u filogenetsku analizu zajedno s proteinima BRMS1 i BRMS1-like.

Paralozi BRMS1 i BRMS1-like pronađeni su u genomima svih analiziranih kralježnjaka te su svrstani u dvije dobro podržane, jasno definirane grane u filogenetskom stablu (Slika 29). Iznimka je organizam *Petromyzon marinus*, čiji se paralozi nisu smjestili unutar tih dviju grana zajedno s ostalim kralježnjacima. Mogući razlog za ovo odstupanje je to što je *P. marinus* najstariji predstavnik kralježnjaka i evolucijski jedinstven jer pripada skupini Agnatha, koja se odvojila od ostatka kralježnjaka prije više od 500 milijuna godina. Ove ribe nemaju čeljusti, zbog čega se značajno razlikuju od modernih kralježnjaka (skupina Gnathostomes). Evolucijski gledano, *P. marinus* je primitivni kralježnjak koji je zadržao mnoge karakteristike svojih ranih predaka. Moguća je ubrzana evolucija proteina unutar ovog organizma, što može biti rezultat prilagodbe na specifične uvjete životnog okoliša, ili genom koji nije dobro složen zbog postojanja složenih genomskih struktura (Smith i sur., 2013). Također, uočeno je kako *P. marinus* prolazi kroz programiranu preraspodjelu genoma tijekom ranog razvoja što može dovesti do gubitka genskih regija pojedinih gena, uključujući i one povezane s regulacijom transkripcije, staničnom proliferacijom i prijenosom signala (Bryant i sur., 2016).

# 5.2.2. Tehničke poteškoće prilikom izolacije rekombinantnih proteina BRMS1 iz spužve i čovjeka

U ovom su doktorskom radu pročišćeni rekombinantni proteini BRMS1 iz spužve i čovjeka korištenjem ekspresijskog sustava bakterije *E. coli*. Iako su istraženi različiti uvjeti ekspresije

proteina, uključujući varijacije temperature, koncentracije IPTG-a, sastava hranjive podloge i korištenih bakterijskih sojeva, proteini BRMS1 taložili su se u netopljivoj frakciji stanica, što je otežalo njihovo pročišćavanje. Najpovoljniji rezultati postignuti su uporabom soja *E. coli* BL21 CodonPlus (DE3) i indukcijom pri 30 °C tijekom 3 sata uz dodatak 0,8 mM IPTG-a, no i tada je prinos topljivog, pročišćenog proteina bio nizak. Dodatni izazov predstavljali su gubitci proteina tijekom postupka ukoncentriravanja, što se najvjerojatnije može pripisati njihovoj neuređenoj tercijarnoj strukturi (Slika 33).

Rezultati ovog istraživanja u skladu su s ranije opisanim poteškoćama pri izolaciji i pročišćavanju proteina BRMS1 iz čovjeka. Smith i sur. (2009) opisali su agregaciju HsaBRMS1 u netopljivim inkluzijskim tijelima (engl. *inclusion bodies*) prilikom ekspresije u *E. coli*. Provedeni su postupci ponovnog savijanja polipeptidnog lanca kako bi se protein doveo u stabilnu konformaciju, međutim, postignut je nizak prinos funkcionalnog proteina. Iako je BRMS1 uspješno izoliran kao dio proteinskog kompleksa mSin3A-HDAC koristeći metodu koimunoprecipitacije (Meehan i sur., 2004), izolacija samostalnog, funkcionalnog proteina BRMS1 u čistom obliku ostaje tehnički izazov.

## 5.2.3. Protein BRMS1 iz čovjeka tvori homodimere i heterodimere s homogom iz spužve

Iz literature je poznato da protein SUDS3 može stvarati homodimere, a pretpostavlja se da na taj način utječe na stabilizaciju kompleksa Sin3-HDAC (Banks i sur., 2020; Clark i sur., 2015; Alland i sur., 2002). Također, pretpostavlja se da SUDS3 može stupiti u direktne interakcije s proteinom BRMS1 (Silveira i sur., 2009; Hurst i sur., 2008). Budući da proteini BRMS1 i BRMS1-like dijele strukturne sličnosti sa SUDS3, ispitana je mogućnost proteina HsaBRMS1 u stvaranju homodimera i heterodimera s proteinima EsuBRMS1 i HsaBRMS1-like. Rezultati preliminarnog pokusa pokazali su da HsaBRMS1 može tvoriti homodimere i heterodimere s homologom iz spužve (Slika 34). Međutim, nije uočena interakcija proteina HsaBRMS1 i EsuBRMS1 s proteinom HsaBRMS1-like. Na temelju ove analize možemo zaključiti da je domena važna za dimerizaciju proteina BRMS1 evolucijski očuvana od spužve do čovjeka, budući da homolozi BRMS1 iz spužve i čovjeka mogu stupiti u direktnu interakciju. No ipak, ne možemo donijeti zaključak o očuvanosti domene važne za dimerizaciju kod proteina HsaBRMS1-like. Postoji mogućnost da HsaBRMS1-like stupa u interakcije s proteinima HsaBRMS1, no da ih nije bilo moguće zabilježiti u ovom pokusu metodom koimunoprecipitacije radi nedovoljne razine eksprimiranog proteina BRMS1-like obilježenog

biljegom GFP u analiziranim stanicama. Potrebna su daljnja istraživanja interakcija proteina obitelji BRMS1 radi boljeg razumijevanja njihovih staničnih funkcija.

## 5.2.4. Biološka funkcija proteina BRMS1 evolucijski je očuvana

Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da protein BRMS1 iz spužve te proteini BRMS1 i BRMS1-like iz čovjeka značajno utječu na smanjenje stanične proliferacije, migracije i stvaranja kolonija tumorskih stanica čovjeka MDA-MB-231 (Slike 38–41). U literaturi je opisana uloga proteina BRMS1 iz čovjeka u procesima migracije stanica i stvaranja kolonija, no naglašeno je da BRMS1 ne utječe na rast primarnog karcinoma (Zimmermann i Welch, 2020). Tako su Khotskaya i sur. (2014) pokazali da BRMS1 ne utječe na proliferaciju tumorskih staničnih linija čovjeka MDA-MB-231 i MBA-MB-435. Suprotno tome, u ovoj je disertaciji uočeno da protein BRMS1 iz spužve te proteini BRMS1 i BRMS1-like iz čovjeka značajno smanjuju staničnu proliferaciju tumorskih stanica čovjeka MDA-MB-231 (Slika 38). Jedno od mogućih objašnjenja dobivenog rezultata je da tumorske stanice tijekom procesa metastaziranja, nakon cirkulacije u krvotoku, migriraju na nova mjesta gdje je potrebna njihova proliferacija kako bi stvorile kolonije (Massagué i Obenauf, 2016).

Rezultati su pokazali i utjecaj proteina BRMS1-like iz čovjeka na smanjenje migracije i stvaranje kolonija u tumorskim stanicama čovjeka MDA-MB-231. Dobiveni rezultati u skladu su s literaturom budući da je pokazano kako BRMS1-like inhibira rast stanične linije raka pluća čovjeka H1299 (Nikolaev i sur., 2004) te suprimira invazivnost i metastaziranje raka dojke putem inhibicije EMT (Gong i sur., 2014). S obzirom na dosadašnja saznanja i rezultate ovog istraživanja, daljnja funkcionalna analiza proteina BRMS1-like proteina nužna je za bolje razumijevanje njegove uloge u raku.

Također, jednaka uloga proteina BRMS1 i BRMS1-like iz čovjeka u procesima stanične proliferacije, migracije i stvaranja kolonija pokazana u ovoj disertaciji ukazuje na moguću funkcionalnu kompenzaciju proteina BRMS1 i BRMS1-like u tumorskim stanicama čovjeka, kada je jedan od njih utišan ili suprimiran.

### 5.3. Uspješno je određen smještaj proteina u stanicama spužve E. subterraneus

Unatoč tome što još uvijek ne postoje standardizirani protokoli za transfekciju stanica spužve niti komercijalno dostupne stanične linije spužve, prethodna istraživanja pokazala su da je moguće eksprimirati heterologne proteine u primorfima, tkivnim rezovima, pupovima ili gemulama različitih vrsta spužvi, iako s vrlo niskom učinkovitošću (Pfannkuchen i Brümmer, 2009; Grasela i sur., 2012; Rocher i sur., 2020; Revilla-i-Domingo i sur., 2018). U novijem istraživanju (Dominko i sur., 2023) uspješno je provedena transfekcija primarne kulture stanica spužve *E. subterraneus* i određen je unutarstanični smještaj nekoliko onkoproteina (MYC, RRAS2 i DRG1), unatoč niskoj učinkovitosti transfekcije. Također je testirano nekoliko komercijalno dostupnih transfekcijskih reagensa (Lipofectamine 2000/3000, TurboFect, DharmaFECT, CaCl<sub>2</sub>, saponin) za transfekciju stanica spužve *E. subterraneus*, no pokazano je da izbor transfekcijskog reagensa ne utječe značajno na učinkovitost transfekcije.

U okviru ovog istraživanja određen je unutarstanični smještaj proteina R-RAS2 i BRMS1 iz spužve i čovjeka u primarnoj kulturi stanica spužve *E. subterraneus* (Slika 43), korištenjem transfekcijskog reagensa TurboFect i filtrirane spiljske vode, prema metodologiji opisanoj u radu Dominko i sur. (2023).



Slika 43. Primarna stanična kultura spužve *E. subterraneus*. Za bojenje jezgri korišten je Hoechst (plavo). Preuzeto i prilagođeno iz Dominko i sur. (2023).

Zbog nemogućnosti postizanja adhezije stanica spužve na podlogu, čak ni nakon tretmana spojevima koji potiču adheziju (poput poli-L-lizina, laminina ili fibronektina), precizno određivanje unutarstaničnog smještaja proteina bilo je otežano. Unatoč tome i niskoj učinkovitosti transfekcije, smještaj proteina EsuRRAS2-like i HsaRRAS2 uspješno je određen u citoplazmi ili membranama stanica spužve. Zbog neujednačenog intenziteta signala GFP i CHERRY, pretpostavlja se da su proteini R-RAS2 iz spužve i čovjeka smješteni u citoplazmatskim vezikulama, a ne ravnomjerno raspodijeljeni unutar citoplazme stanica spužve (Slika 18). Smještaj proteina EsuBRMS1 i HsaBRMS1 uočen je i u jezgri i u citoplazmi stanica spužve (Slika 37). Budući da stanice nisu bile adherirane za podlogu, tijekom konfokalne mikroskopije dolazilo je do pomicanja stanica u vidnom polju, što je otežavalo precizno određivanje unutarstaničnog smještaja proteina BRMS1 iz spužve i čovjeka.

Unatoč tehničkim ograničenjima, dobiveni rezultati potvrđuju uspješnu transfekciju stanica spužve *E. subterraneus* te pružaju dodatne dokaze o evolucijskoj očuvanosti unutarstaničnog smještaja analiziranih proteina u stanicama spužve, koji najvjerojatnije odgovara njihovom smještaju u normalnim i tumorskim stanicama čovjeka. Budući da do danas nijedna istraživačka skupina nije uspjela razviti optimiziran protokol za transfekciju stanica spužve, ovi rezultati predstavljaju značajan korak u uspostavi funkcionalnih modelnih sustava za proučavanje stanične biologije i molekularnih mehanizama kod bazalnih metazoa.

## 6. ZAKLJUČCI

Na temelju bioinformatičke, biokemijske i biološke analize homologa R-RAS2-like iz spužve i usporedbe s proteinom R-RAS2 iz čovjeka, donose se sljedeći zaključci:

- I. Protein R-RAS2-like iz spužve *E. subterraneus* vjerojatno odražava svojstva ancestralnog proteina R-RAS, čijim su duplikacijama tijekom evolucije Metazoa nastali svi članovi podobitelji R-Ras prisutni u genomu čovjeka;
- II. Velik broj introna pronađen u genu *r-ras2* iz čovjeka bio je prisutan već i u homolozima iz životinja bez bilateralne simetrije, što sugerira da je ancestralni gen *r-ras2-like* bio bogat intronima;
- III. Struktura proteina R-RAS2, uključujući i ključne domene i motive, visoko je očuvana od spužve do čovjeka, što ukazuje na njegovu važnu funkciju u stanici;
- IV. Proteini R-RAS2 iz spužve i čovjeka imaju sposobnost nespecifičnog vezanja na molekulu RNA, no mehanizam i funkcija ovih interakcija nisu poznati;
- V. Unutarstanični smještaj proteina R-RAS2 u staničnoj membrani i endosomalnim vezikulama evolucijski je očuvan između spužve i čovjeka, što ukazuje na očuvanost biološke funkcije ovog proteina;
- VI. Protein R-RAS2-like iz spužve potiče proliferaciju, migraciju i stvaranje kolonija tumorskih stanica čovjeka MDA-MB-231, slično proteinu R-RAS2 iz čovjeka, što upućuje na to da je onkogeni potencijal ovog proteina postojao vrlo rano u evoluciji Metazoa, prije razvoja pravih tkiva.

Usporedbom strukture i funkcije proteina BRMS1 iz spužve *E. subterraneus* s proteinima BRMS1 i BRMS1-like iz čovjeka doneseni su sljedeći zaključci:

- I. Sveobuhvatna filogenetska analiza pokazuje da su paralozi BRMS1 i BRMS1-like iz čovjeka nastali nespecifičnom duplikacijom ancestralnog proteina BRMS1, koja se najvjerojatnije dogodila tijekom prijelaza na kralježnjake (Vertebrata);
- II. Struktura proteina BRMS1 nije evolucijski očuvana između različitih taksonomskih skupina Metazoa, unatoč njegovoj važnoj funkciji kao supresora metastaziranja.
  Ipak, ključne domene i motivi proteina BRMS1 evolucijski su očuvani unutar Metazoa;

- III. Usporedba pozicija i faza introna pokazuje da je sedam introna očuvano između gena brms1 iz spužve i čovjeka, što ukazuje na to da je ancestralni gen bio bogat intronima. Sličnost strukture gena između paraloga brms1 i brms1-like iz čovjeka (imaju 8 od 9 zajedničkih introna) ukazuje na njihovu relativno nedavnu divergenciju;
- IV. Metodom koimunoprecipitacije pokazano je da protein BRMS1 iz čovjeka može stvarati homodimere i heterodimere s homologom BRMS1 iz spužve, što ukazuje na evolucijsku očuvanost domene ključne za ovu interakciju;
- V. Analiza unutarstaničnog smještaja pokazala je da su proteini BRMS1 iz spužve i čovjeka smješteni prvenstveno u jezgri, a djelomično i u citoplazmi stanica, što upućuje na očuvanost njihove biološke funkcije;
- VI. Protein BRMS1 iz spužve smanjuje proliferaciju, migraciju i sposobnost stvaranja kolonija tumorskih stanica čovjeka MDA-MB-231, kao i protein BRMS1 iz čovjeka, što upućuje na njegovu sposobnost supresije metastaziranja. Protein BRMS1-like iz čovjeka pokazuje sličan utjecaj na navedene procese kao i protein BRMS1 iz čovjeka, što sugerira njihove slične uloge u stanici.

Ova disertacija ukazuje na strukturne i funkcionalne sličnosti proteina R-RAS2-like i BRMS1 iz spužve *E. subterraneus* s njihovim homolozima iz čovjeka, uključujući očuvan unutarstanični smještaj i sudjelovanje u procesima povezanima s razvojem i progresijom raka. Dobiveni rezultati upućuju na to da su temeljne stanične funkcije ovih proteina bile prisutne još prije pojave pravih tkiva i nastanka tumora tijekom evolucije Metazoa.

## 7. LITERATURA

Adams MK, Banks CAS, Thornton JL, Kempf CG, Zhang Y, i sur. (2020). Differential Complex Formation via Paralogs in the Human Sin3 Protein Interaction Network. *Mol Cell Proteomics* 19(9):1468–1484.

Adams GE, Chandru A, Cowley SM (2018). Co-repressor, co-activator and general transcription factor: the many faces of the Sin3 histone deacetylase (HDAC) complex. *Biochem* J 475(24): 3921–3932.

Adamska M (2016). Sponges as models to study emergence of complex animals. *Curr Opin Genet Dev* 39: 21–28.

Ahearn I, Zhou M, Philips MR (2018). Posttranslational Modifications of RAS Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Med* 8(11): a031484.

Alexander BE, Liebrand K, Osinga R, van der Geest HG, Admiraal W, i sur. (2014). Cell turnover and detritus production in marine sponges from tropical and temperate benthic ecosystems. *PLoS One* 9(10): e109486.

Alland L, David G, Shen-Li H, Potes J, Muhle R, i sur. (2002). Identification of mammalian Sds3 as an integral component of the Sin3/histone deacetylase corepressor complex. *Mol Cell Biol* 22(8): 2743–2750.

Andersen RJ (2017). Sponging off nature for new drug leads. Biochem Pharmacol 139: 3-14.

Andreasen PA, Kjøller L, Christensen L, Duffy MJ (1997). The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer* 72(1): 1–22.

Aktipis CA, Boddy AM, Jansen G, Hibner U, Hochberg ME, i sur. (2015). Cancer across the tree of life: cooperation and cheating in multicellularity. *Philos T R Soc B* 370.

Aktipis CA, Nesse RM (2013). Evolutionary foundations for cancer biology. *Evol Appl* 6: 144–159.

Bailey MH, Tokheim C, Porta-Pardo E, Sengupta S, Bertrand D, i sur. (2018). Comprehensive Characterization of Cancer Driver Genes and Mutations. *Cell* 173(2):371–385.

Banks CAS, Zhang Y, Miah S, Hao Y, Adams MK, i sur. (2020). Integrative Modeling of a Sin3/HDAC Complex Sub-structure. *Cell Rep* 31(2): 107516.

Barker KT, Crompton MR (1998). Ras-related TC21 is activated by mutation in a breast cancer cell line, but infrequently in breast carcinomas in vivo. *Br J Cancer* 78(3): 296–300.

Barneda-Zahonero B, Parra M (2012). Histone deacetylases and cancer. *Mol Oncol* 6(6): 579–589.

Beljan S, Dominko K, Talajić A, Hloušek-Kasun A, Škrobot Vidaček N, i sur. (2022). Structure and function of cancer-related developmentally regulated GTP-binding protein 1 (DRG1) is conserved between sponges and humans. *Sci Rep* 12(1): 11379.

Bedek, J, Bilandžija, H, Jalžić, B (2008). Ogulinska špiljska spužvica Eunapius subterraneus Sket et Velikonja, 1984, rasprostranjenost i ekologija vrste i staništa. *Modruški zbornik* 2(2), 103–130.

Beljan S, Herak Bosnar M, Ćetković H (2020). Rho Family of Ras-Like GTPases in Early Branching Animals. *Cells* 9: 1–26.

Bilandžija H, Bedek J, Jalžić B, Gottstein S (2007). The morphological variability, distribution patterns and endangerment in the Ogulin cave sponge Eunapius subterraneus Sket & Velikonja, 1984 (Demospongiae, Spongillidae). *Natura Croatica* 16: 1–17.

Blum M, Andreeva A, Florentino LC, Chuguransky SR, Grego T, i sur. (2025). InterPro: the protein sequence classification resource in 2025. *Nucleic Acids Res* 53(D1): D444–D456.

Borchiellini C, Chombard C, Manuel M, Alivon E, Vacelet J, Boury-Esnault N (2004). Molecular phylogeny of Demospongiae: implications for classification and scenarios of character evolution. *Mol Phylogenet Evol* 32(3): 823–837.

Bryant SA, Herdy JR, Amemiya CT, Smith JJ (2016). Characterization of Somatically-Eliminated Genes During Development of the Sea Lamprey (Petromyzon marinus). *Mol Biol Evol* 33(9): 2337–2344.

Buhrman G, Holzapfel G, Fetics S, Mattos C (2010). Allosteric modulation of Ras positions Q61 for a direct role in catalysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(11): 4931–4936.

Camougrand, N, Vigié, P, Dompierre, J, Massoni-Laporte, A, Lasserre, JP, Bhatia-Kiššová, I (2022). The Dep1 protein: A new regulator of mitophagy in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 635: 218–226.

Campanella JJ, Bitincka L, Smalley J (2003). MatGAT: an application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences. *BMC Bioinformatics* 4: 29.

Cao P, Gu J, Liu M, Wang Y, Chen M, i sur. (2024). BRMS1L confers anticancer activity in non-small cell lung cancer by transcriptionally inducing a redox imbalance in the GPX2-ROS pathway. *Transl Oncol* 41: 101870.

Capri Y, Flex E, Krumbach OHF, Carpentieri G, Cecchetti S, i sur. (2019). Activating mutations of RRAS2 are a rare cause of noonan syndrome. *Am J Hum Genet* 104: 1223–1232.

Chan AML, Miki T, Meyers KA, Aaronson SA (1994). A human oncogene of the RAS superfamily unmasked by expression cDNA cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:7558–7562.

Chang MT, Asthana S, Gao SP, Lee BH, Chapman JS, i sur. (2016). Identifying recurrent mutations in cancer reveals widespread lineage diversity and mutational specificity. *Nat Biotechnol* 34(2): 155–163.

Che Y, Siprashvili Z, Kovalski JR, Jiang T, Wozniak G, i sur. (2019). KRAS regulation by small non-coding RNAs and SNARE proteins. *Nat Commun* 10: 5118.

Chen X, Xu Z, Wang Y (2011). Recent advances in breast cancer metastasis suppressor 1. *Int J Biol Markers* 26(1): 1–8.

Cho, KH, Yu, SL, Cho, DY, Cho, DY, Park, CG, Lee, HY (2015). Breast cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1) attenuates TGF- $\beta$ 1-induced breast cancer cell aggressiveness through downregulating HIF-1 $\alpha$  expression. *BMC Cancer* 15, 829.

Cicek M, Fukuyama R, Cicek MS, Sizemore S, Welch DR, i sur. (2009). BRMS1 contributes to the negative regulation of uPA gene expression through recruitment of HDAC1 to the NF-kappaB binding site of the uPA promoter. *Clin Exp Metastasis* 26(3): 229–237.

Cicek M, Fukuyama R, Welch DR, Sizemore N, Casey G (2005). Breast cancer metastasis suppressor 1 inhibits gene expression by targeting nuclear factor-kappaB activity. *Cancer Res* 65(9): 3586–3595.

Cicek M, Samant RS, Kinter M, Welch DR, Casey G (2004). Identification of metastasisassociated proteins through protein analysis of metastatic MDA-MB-435 and metastasissuppressed BRMS1 transfected-MDA-MB-435 cells. *Clin Exp Metastasis* 21(2): 149–157. Cifuentes C, Oeste CL, Fernández-Pisonero I, Hortal AM, García-Macías C, i sur. (2024). Unmutated RRAS2 emerges as a key oncogene in post-partum-associated triple negative breast cancer. *Mol Cancer* 23(1): 142.

Clark MD, Zhang Y, Radhakrishnan I (2015). Solution NMR Studies of an Alternative Mode of Sin3 Engagement by the Sds3 Subunit in the Histone Deacetylase-Associated Sin3L/Rpd3L Corepressor Complex. *J Mol Biol* 427(24): 3817–3823.

Clark RM, Whelan T, Levine M, Roberts R, Willan A, i sur. (1996). Randomized clinical trial of breast irradia tion following lumpectomy and axillary dissection for node-negative breast cancer: an update. *J Natl Cancer Inst* 88: 1659–1964.

Clavaín L, Fernández-Pisonero I, Movilla N, Lorenzo-Martín LF, Nieto B, i sur. (2023). Characterization of mutant ver sions of the R-RAS2/TC21 GTPase found in tumors. *Oncogene* 42: 389–405.

Colicelli J, Jun Y (2004). Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci STKE* 250: 255–62.

Cox AD, Der CJ (2010). Ras history: The saga continues. Small GTPases 1(1): 2–27.

Ćetković, H, Halasz, M, Herak Bosnar, M (2018a). Sponges: A Reservoir of Genes Implicated in Human Cancer. *Mar Drugs* 16(1): 20.

Ćetković H, Harcet M, Roller M, Bosnar MH (2018b). A survey of metastasis suppressors in Metazoa. *Lab Invest* 98(5): 554–570.

Ćetkovic H, Grebenjuk VA, Muller WEG, Gamulin V (2004). Src proteins/src genes: from sponges to mammals. *Gene* 342: 251–261.

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2011). ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 27(8): 1164–1165.

David G, Turner GM, Yao Y, Protopopov A, DePinho RA (2003). mSin3-associated protein, mSds3, is essential for pericentric heterochromatin formation and chromosome segregation in mammalian cells. *Genes Dev* 17(19): 2396–2405.

Davies PCW, Lineweaver CH (2011). Cancer tumors as Metazoa 1.0: tapping genes of ancient ancestors. *Phys Biol* 8: 015001.

Delgado P, Cubelos B, Calleja E, Martínez-Martín N, Ciprés A, i sur. (2009). Essential function for the GTPase TC21 in homeostatic antigen receptor signaling. *Nat Immunol* 10: 880–888.

DeWald DB, Torabinejad J, Samant RS, Johnston D, Erin N, i sur. (2005). Metastasis suppression by breast cancer metastasis suppressor 1 involves reduction of phosphoinositide signaling in MDA-MB-435 breast carcinoma cells. *Cancer Res* 65(3): 713–717.

Domazet-Lošo T, Klimovich A, Anokhin B, Anton-Erxleben F, Hamm MJ, Lange C, Bosch TCG (2014). Naturally occurring tumours in the basal metazoan Hydra. *Nat Commun* 5.

Domazet-Lošo T, Tautz D (2010). Phylostratigraphic tracking of cancer genes suggests a link to the emergence of multicellularity in metazoa. *Bmc Biol* 8.

Domazet-Lošo T, Tautz D (2008). An Ancient Evolutionary Origin of Genes Associated with Human Genetic Diseases. *Mol Biol Evol* 25: 2699–2707.

Dominko K, Talajić A, Radić M, Vidaček NŠ, Vlahoviček K, i sur. (2023). Transfection of Sponge Cells and Intracellular Localization of Cancer-Related MYC, RRAS2, and DRG1 Proteins. *Mar Drugs* 21(2): 119.

Edgar RC (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32(5): 1792–1797.

Ehrhardt GR, Leslie KB, Lee F, Wieler JS, Schrader JW (1999). M-Ras, a widely expressed 29kD homologue of p21 Ras: expression of a constitutively active mutant results in factorindependent growth of an interleukin-3-dependent cell line. *Blood* 94(7): 2433–2444.

Erdogan M, Pozzi A, Bhowmick N, Moses HL, Zent R (2007). Signaling pathways regulating TC21-induced tumorigenesis. *J Biol Chem* 282(38): 27713–27720.

Ereskovsky A, Borisenko IE, Bolshakov FV, Lavrov AI (2021). Whole-Body Regeneration in Sponges: Diversity, Fine Mechanisms, and Future Prospects. *Genes (Basel)* 12(4): 506.

Feldheim J, Kessler AF, Feldheim JJ, Schmitt D, Oster C, i sur. (2023). BRMS1 in Gliomas-An Expression Analysis. *Cancers (Basel)* 15(11): 2907.

Fernández-Pisonero I, Clavaín L, Robles-Valero J, Lorenzo-Martín LF, Caloto R, i sur. (2022). A hotspot mutation targeting the R-RAS2 GTPase acts as a potent oncogenic driver in a wide spectrum of tumors. *Cell Rep* 38(11): 110522.

Finoshin AD, Adameyko KI, Mikhailov KV, Kravchuk OI, Georgiev AA, i sur. (2020). Iron metabolic pathways in the processes of sponge plasticity. *PLoS One* 15(2): e0228722.

Fortunato, A, Taylor, J, Scirone, J, Seyedi, S, Aktipis, A, Maley, CC (2025). Tethya wilhelma (Porifera) Is Highly Resistant to Radiation Exposure and Possibly Cancer. *Biology* 14(2): 171.

Frémin C, Guégan JP, Plutoni C, Mahaffey J, Philips MR, i sur. (2016). ERK1/2-induced phosphorylation of R-Ras GTPases stimulates their oncogenic potential. *Oncogene* 35(43): 5692–5698.

Funayama N (2018). The cellular and molecular bases of the sponge stem cell systems underlying reproduction, homeostasis and regeneration. *Int J Dev Biol* 62(6-7-8): 513–525.

Furuhjelm J, Peränen J (2003). The C-terminal end of R-Ras contains a focal adhesion targeting signal. *J Cell Sci* 116(18): 3729–3738.

Graham SM, Vojtek AB, Huff SY, Cox AD, Clark GJ, i sur. (1996). TC21 causes transformation by Raf-independent signaling pathways. *Mol Cell Biol* 16(11): 6132–6140.

Graham SM, Cox AD, Drivas G, Rush MG, D'Eustachio P, Der CJ (1994). Aberrant function of the Ras-related protein TC21/RRas2 triggers malignant transformation. *Mol Cell Biol* 14: 4108–4115.

Gimple RC, Wang X (2019). RAS: Striking at the Core of the Oncogenic Circuitry. *Front Oncol* 9: 965.

Glasl B, Luter HM, Damjanovic K, Kitzinger K, Mueller AJ, i sur. (2024). Co-occurring nitrifying symbiont lineages are vertically inherited and widespread in marine sponges. *ISME* J 18(1): wrae069.

Gong C, Qu S, Lv XB, Liu B, Tan W, i sur. (2014). BRMS1L suppresses breast cancer metastasis by inducing epigenetic silence of FZD10. *Nat Commun* 5: 5406.

Grosshans BL, Ortiz D, Novick P (2006). Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(32): 11821–11827.

Goult BT, Brown NH, Schwartz MA (2021). Talin in mechanotransduction and mechanomemory at a glance. *J Cell Sci* 134(20): jcs258749.

Grasela, JJ, Pomponi, SA, Rinkevich, B, Grima, J (2012). Efforts to develop a cultured sponge cell line: Revisiting an intractable problem. *Vitr Cell Dev Biol Anim* 48: 12–20.

Gutierrez-Erlandsson S, Herrero-Vidal P, Fernandez-Alfara M, Hernandez-Garcia S, i sur. (2013). R-RAS2 overexpression in tumors of the human central nervous system. *Mol Cancer* 12(1): 127.

Guo Z, Chu C, Lu Y, Zhang X, Xiao Y, i sur. (2023). Structure of a SIN3-HDAC complex from budding yeast. *Nat Struct Mol Biol* 30(6): 753–760.

Guzman C, Conaco C (2016). Gene Expression Dynamics Accompanying the Sponge Thermal Stress Response. *PLoS One* 11(10): e0165368.

Harcet M, Roller M, Ćetkovic H, Perina D, Wiens M, Muller WE, Vlahoviček K (2010). Demosponge EST Sequencing Reveals a Complex Genetic Toolkit of the Simplest Metazoans. *Mol Biol Evol* 27: 2747–2756.

Harvey, JJ (1964). An Unindentified Virus Which Causes the Rapid Production of Tumors in Mice. *Nature* 204: 1104–1105.

Hasan I, Ozeki Y. (2019). Histochemical localization of N-acetylhexosamine-binding lectin HOL-18 in Halichondria okadai (Japanese black sponge), and its antimicrobial and cytotoxic anticancer effects. *Int J Biol Macromol* 124: 819–827.

Hasan R, Chauhan SS, Sharma R, Ralhan R (2012). siRNA-mediated downregulation of TC21 sensitizes esophageal cancer cells to cisplatin. *World J Gastroenterol* 18(31): 4127–4135.

Heasman, SJ, Ridley, AJ (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 690–701.

Hedley BD, Welch DR, Allan AL, Al-Katib W, Dales DW, i sur. (2008). Downregulation of osteopontin contributes to metastasis suppression by breast cancer metastasis suppressor 1. *Int J Cancer* 123(3): 526–534.

Heppner GH (1984). Tumor heterogeneity. Cancer Res 44(6): 2259–2265.

Hortal AM, Oeste CL, Cifuentes C, Alcoceba M, Fernández-Pisonero I, i sur. (2022). Overexpression of wild type RRAS2, without oncogenic mutations, drives chronic lymphocytic leukemia. *Mol Cancer* 21: 1–24.

Howe GA, Addison CL (2012).  $\beta$ 1 integrin: an emerging player in the modulation of tumorigenesis and response to therapy. *Cell Adh Migr* 6(2): 71–77.

https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab 1 (pristupljeno 2.5.2025.)

Huang Y, Saez R, Chao L, Santos E, Aaronson SA, Chan AM (1995). A novel insertional mutation in the TC21 gene activates its transforming activity in a human leiomyosarcoma cell line. *Oncogene* 11(7): 1255–1260.

Hughes AL, Friedman (2008). Genome size reduction in the chicken has involved massive loss of ancestral protein-cod ing genes. *Mol Biol Evol* 25: 2681–2688.

Hurst DR, Xie Y, Thomas JW, Liu J, Edmonds MD, i sur. (2013). The C-terminal putative nuclear localization sequence of breast cancer metastasis suppressor 1, BRMS1, is necessary for metastasis suppression. *PLoS One* 8(2): e55966.

Hurst DR, Welch DR (2011). Unraveling the enigmatic complexities of BRMS1-mediated metastasis suppression. *FEBS Lett* 585(20): 3185–3190.

Hurst DR, Edmonds MD, Scott GK, Benz CC, Vaidya KS, Welch DR (2009). Breast cancer metastasis suppressor 1 up-regulates miR-146, which suppresses breast cancer metastasis. *Cancer Res* 69(4): 1279–1283.

Hurst DR, Xie Y, Vaidya KS, Mehta A, Moore BP, i sur. (2008). Alterations of BRMS1-ARID4A interaction modify gene expression but still suppress metastasis in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 283(12): 7438–7444.

Hurst DR, Mehta A, Moore BP, Phadke PA, Meehan WJ, i sur. (2006). Breast cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1) is stabilized by the Hsp90 chaperone. *Biochem Biophys Res Commun* 348(4): 1429–1435.

Jaenisch R, Bird A (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33.

Jumper, J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, i sur. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596: 583–589.

Kaczmarsky LT (2006). Coral disease dynamics in the central Philippines. *Dis Aquat Organ* 69: 9–21.

Kalab P, Heald R (2008). The RanGTP gradient - a GPS for the mitotic spindle. *J Cell Sci* 121(10): 1577–1586.

Kandoth C, Schultz N, Cherniack AD, Akbani R, Liu Y, i sur. (2013). Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature* 497(7447): 67–73.

Kenny NJ, Francis WR, Rivera-Vicéns RE, Juravel K, de Mendoza A, i sur. (2020). Tracing animal genomic evolution with the chromosomal-level assembly of the freshwater sponge Ephydatia muelleri. *Nature Communications* 11: 1–11.

Khotskaya YB, Beck BH, Hurst DR, Han Z, Xia W, i sur. (2014). Expression of metastasis suppressor BRMS1 in breast cancer cells results in a marked delay in cellular adhesion to matrix. *Mol Carcinog* 53(12): 1011–1126.

Kim YM, Watanabe T, Allen PB, Kim Young M, Lee SJ, i sur. (2003). PNUTS, a protein Phosphatase 1 (PP1) NUclear Targeting Subunit: Characterization of its PP1 and RNA-binding domains and regulation by phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 278: 13819–13828.

Kirsten, WH, Mayer LA (1967). Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus. *J Natl Cancer Inst* 39: 311–335.

Kortschak RD, Samuel G, Saint R, Miller DJ (2003). EST analysis of the cnidarian Acropora millepora reveals extensive gene loss and rapid sequence divergence in the model invertebrates. *Curr Biol* 13(24): 2190–2195.

Koutsouveli V, Cárdenas P, Santodomingo N, Marina A, Morato E, i sur. (2020). The Molecular Machinery of Gametogenesis in Geodia Demosponges (Porifera): Evolutionary Origins of a Conserved Toolkit across Animals. *Mol Biol Evol* 37(12): 3485–3506.

Koyama R, Tamura M, Nakagaki T, Ohashi T, Idogawa M, i sur. (2017). Identification and characterization of a metastatic suppressor BRMS1L as a target gene of p53. *Cancer Sci* 108(12): 2413–2421.

Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 33(7): 1870–1874.

Kwon YJ, Petrie K, Leibovitch BA, Zeng L, Mezei M, i sur. (2015). Selective Inhibition of SIN3 Corepressor with Avermectins as a Novel Therapeutic Strategy in Triple-Negative Breast Cancer. *Mol Cancer Ther* 14(8): 1824–1836.

Larive, R, Moriggi, G, Menacho-Márquez, M, Cañamero, M, Álava, E, i sur. (2014). Contribution of the R-Ras2 GTP-binding protein to primary breast tumorigenesis and late-stage metastatic disease. *Nat Commun* 5, 3881. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, i sur. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23(21): 2947–2948.

Lee JH, Pyon JK, Lee SH, Lee YJ, Kang SG, i sur. (2011). Greater expression of TC21/R-ras2 in highly aggressive malig nant skin cancer. *Int J Dermatol* 50: 956–960.

Letunic I, Khedkar S, Bork P (2020). SMART: recent updates, new developments and status in 2020. *Nucleic Acids Res* 49(D1): D458–D460.

Leys SP (2003). The significance of syncytial tissues for the position of the hexactinellida in the metazoa. *Integr Comp Biol* 43(1): 19–27.

Li G, Li L, Sun Q, Wu J, Ge W, i sur. (2018). MicroRNA-3200-5p Promotes Osteosarcoma Cell Invasion via Suppression of BRMS1. *Mol Cells* 41(6): 523–531.

Li, E (2002). Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* 3(9): 662–673.

Lin J, Huang S, Wu S, Ding J, Zhao Y, i sur. (2011). MicroRNA-423 promotes cell growth and regulates G(1)/S transition by targeting p21Cip1/Waf1 in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 32(11): 1641–1647.

Liu Y, Amin EB, Mayo MW, Chudgar NP, Bucciarelli PR, i sur. (2016). CK2α' Drives Lung Cancer Metastasis by Targeting BRMS1 Nuclear Export and Degradation. *Cancer Res* 76(9): 2675–2686.

Liu Y, Mayo MW, Nagji AS, Hall EH, Shock LS, i sur. (2013). BRMS1 suppresses lung cancer metastases through an E3 ligase function on histone acetyltransferase p300. *Cancer Res* 73(4): 1308–1317.

Lovell PV, Wirthlin M, Wilhelm L, Minx P, Lazar NH, i sur. (2014). Conserved syntenic clusters of protein coding genes are missing in birds. *Genome Biol* 15: 565.

Luo H, Hao X, Ge C, Zhao F, Zhu M, i sur. (2010). TC21 promotes cell motility and metastasis by regulating the expression of E-cadherin and N-cadherin in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 37: 853–859.

Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA (2007). Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* 449(7163): 682–688.

Macha MA, Matta A, Sriram U, Thakkar A, Shukla NK, i sur. (2010). Clinical significance of TC21 overexpression in oral cancer. *J Oral Pathol Med* 39(6): 477–485.

Marcum RD, Hsieh J, Giljen M, Justice E, Daffern N, i sur. (2022). A capped Tudor domain within a core subunit of the Sin3L/Rpd3L histone deacetylase complex binds to nucleic acid G-quadruplexes. *J Biol Chem* 298(2): 101558.

Massagué J, Obenauf AC (2016). Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature* 529(7586): 298–306.

Meehan WJ, Samant RS, Hopper JE, Carrozza MJ, Shevde LA, i sur. (2004). Breast cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1) forms complexes with retinoblastoma-binding protein 1 (RBP1) and the mSin3 histone deacetylase complex and represses transcription. *J Biol Chem* 279(2): 1562–1569.

Mendes-Pereira AM, Sims D, Dexter T, Fenwick K, Assiotis I, i sur. (2012). Genome-wide functional screen identifies a compendium of genes affecting sensitivity to tamoxifen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(8): 2730–2735.

Mendoza P, Martínez-Martín N, Bovolenta ER, Reyes-Garau D, Hernansanz-Agustín P, i sur. (2018). R-Ras2 is required for germinal center formation to aid B cells during energetically demanding processes. *Sci Signal* 11(532): eaal1506.

Mourra N, Zeitoun G, Buecher B, Finetti P, Lagarde A, i sur. (2007) High frequency of chromosome 14 deletion in early-onset colon cancer. *Dis Colon Rectum* 50(11): 1881–1886.

Movilla N, Crespo P, Bustelo XR (1999). Signal transduction elements of TC21, an oncogenic member of the R-Ras subfamily of GTP-binding proteins. *Oncogene* 18(43): 5860–5869.

Mukherjee SP, Behar M, Birnbaum HA, Hoffmann A, Wright PE, Ghosh G (2013). Analysis of the RelA:CBP/p300 interaction reveals its involvement in NF-κB-driven transcription. *PLoS Biol* 11(9): e1001647.

Nakhaei-Rad S, Haghighi F, Nouri P, Rezaei Adariani S, Lissy J, i sur. (2018). Structural fingerprints, interactions, and signaling networks of RAS family proteins beyond RAS isoforms. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 53(2): 130–156.

Nikolaev AY, Papanikolaou NA, Li M, Qin J, Gu W (2004). Identification of a novel BRMS1homologue protein p40 as a component of the mSin3A/p33(ING1b)/HDAC1 deacetylase complex. Biochem Biophys *Res Commun* 323(4): 1216–1222. Nnaji, PT, Morse, HR, Adukwu, E, Chidugu-Ogborigbo, RU (2022). Sponge–Microbial Symbiosis and Marine Extremozymes: Current Issues and Prospects. *Sustainability* 14(12): 6984.

Nussinov, R Jang, H, Tsai, CJ (2014). The structural basis for cancer treatment decisions. *Oncotarget* 5: 7285–7302.

Ohba Y, Mochizuki N, Yamashita S, Chan AM, Schrader JW, i sur. (2000). Regulatory proteins of R-Ras, TC21/R-Ras2, and M-Ras/R-Ras3. *J Biol Chem* 275(26): 20020–20026.

Patmore DM, Welch S, Fulkerson PC, Wu J, Choi K, i sur. (2012). In vivo regulation of TGF- $\beta$  by R-Ras2 revealed through loss of the RasGAP protein NF1. *Cancer Res* 72(20): 5317–5327.

Perina D, Korolija M, Hadžija MP, Grbeša I, Belužić R, i sur. (2015). Functional and Structural Characterization of FAU Gene/Protein from Marine Sponge Suberites domuncula. *Mar Drugs* 13: 4179–4196.

Perina D, Bosnar MH, Bago R, Mikol A, Harcet M, Deželjin M, Ćetkovic H (2011). Sponge non-metastatic Group I Nme gene/protein - structure and function is conserved from sponges to humans. *Bmc Evol Biol* 11.

Pfannkuchen, M, Brümmer, F (2009). Heterologous expression of DsRed2 in young sponges (Porifera). *Int J Dev Biol* 53: 1113–1117.

Phadke PA, Vaidya KS, Nash KT, Hurst DR, Welch DR (2008). BRMS1 suppresses breast cancer experimental metastasis to multiple organs by inhibiting several steps of the metastatic process. *Am J Pathol* 172(3): 809–817.

Pleše B, Lukić-Bilela L, Bruvo-Madarić B, Harcet M, Imešek M, i sur. (2012). The mitochondrial genome of stygobitic sponge Eunapius subterraneus: MtDNA is highly conserved in freshwater sponges. *Hydrobiologia* 687: 49–59.

Qu L, Pan C, He SM, Lang B, Gao GD, i sur. (2019). The Ras Superfamily of Small GTPases in Non-neoplastic Cerebral Diseases. *Front Mol Neurosci* 12: 121.

Reiswig, HM, Mackie, GO (1983). Studies on hexactinellid sponges. III. The taxonomic status of hexactinellida within the porifera. *Phil Trans R Soc Lond* 301: 419–428.

Reuther GW, Der CJ (2000). The Ras branch of small GTPases: Ras family members don't fall far from the tree. *Curr Opin Cell Biol* 12(2): 157–165.

Revilla-i-Domingo, R, Schmidt, C, Zifko, C, Raible, F (2018). Establishment of Transgenesis in the Demosponge. *Genetics* 210: 435–443.

Riker AI, Samant RS (2012). Location, location, location: the BRMS1 protein and melanoma progression. *BMC Med* 10: 19.

Riesgo, A, Santodomingo, N, Koutsouveli, V, Kumala, L, Leger, MM, i sur. (2022). Molecular machineries of ciliogenesis, cell survival, and vasculogenesis are differentially expressed during regeneration in explants of the demosponge *Halichondria panicea*. *BMC Genomics* 23: 858.

Riesgo A, Farrar N, Windsor PJ, Giribet G, Leys SP (2014). The Analysis of Eight Transcriptomes from All Poriferan Classes Reveals Surprising Genetic Complexity in Sponges. *Mol Biol Evol* 31: 1102–1120.

Rivera J, Megías D, Bravo J (2010). Sorting nexin 6 interacts with breast cancer metastasis suppressor-1 and promotes transcriptional repression. *J Cell Biochem* 111(6):1464–1472.

Rivera J, Megías D, Navas C, Bravo J (2009). Identification of essential sequences for cellular localization in BRMS1 metastasis suppressor. *PLoS One* 4(7): e6433.

Rocher C, Vernale A, Fierro-Constaín L, Séjourné N, Chenesseau S, i sur. (2024). The Buds of Oscarella lobularis (Porifera, Homoscleromorpha): A New Convenient Model for Sponge Cell and Evolutionary Developmental Biology. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 342(8): 503–528.

Rodriguez-Viciana P, Warne PH, Khwaja A, Marte BM, Pappin D, i sur. (2004). Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell* 89(3): 457–467.

Rojas AM, Fuentes G, Rausell A, Valencia A (2012). The Ras protein superfamily: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *J Cell Biol* 196(2): 189–201.

Rokavec M, Schroth W, Amaral SM, Fritz P, Antoniadou L, i sur. (2008). A polymorphism in the TC21 promoter associates with an unfavorable tamoxifen treatment outcome in breast cancer. *Cancer Res* 68(23): 9799–9808.

Rong R, He Q, Liu Y, Sheikh MS, Huang Y (2002). TC21 mediates transformation and cell survival via activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and NF-kappaB signaling pathway. *Oncogene* 21(7): 1062–1070.

Rosário M, Paterson HF, Marshall CJ (2001). Activation of the Ral and phosphatidylinositol 3' kinase signaling pathways by the ras-related protein TC21. *Mol Cell Biol* 21(11): 3750–3762.

Rosário M, Paterson HF, Marshall CJ (1999). Activation of the Raf/MAP kinase cascade by the Ras-related protein TC21 is required for the TC21-mediated transformation of NIH 3T3 cells. *EMBO J* 18(5): 1270–1279.

Ryan JF, Pang K, Mullikin JC, Martindale MQ, Baxevanis AD (2010). The homeodomain complement of the ctenophore Mnemiopsis leidyi suggests that Ctenophora and Porifera diverged prior to the ParaHoxozoa. *Evodevo* 1(1): 9.

Samant RS, Clark DW, Fillmore RA, Cicek M, Metge BJ, i sur. (2007). Breast cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1) inhibits osteopontin transcription by abrogating NF-kappaB activation. *Mol Cancer* 6: 6.

Saunders MM, Seraj MJ, Li Z, Zhou Z, Winter CR, i sur. (2001). Breast cancer metastatic potential correlates with a breakdown in homospecific and heterospecific gap junctional intercellular communication. *Cancer Res* 61(5): 1765–1767.

Schippers KJ (2013). Sponge cell culture. Wageningen University. Doctoral thesis.

Seraj MJ, Samant RS, Verderame MF, Welch DR (2000). Functional evidence for a novel human breast carcinoma metastasis suppressor, BRMS1, encoded at chromosome 11q13. *Cancer Res* 60(11): 2764–2769.

Sharma S, Guru SK, Manda S, Kumar A, Mintoo MJ, i sur. (2017). A marine sponge alkaloid derivative 4-chloro fascaplysin inhibits tumor growth and VEGF mediated angiogenesis by disrupting PI3K/Akt/mTOR signaling cascade. *Chem Biol Interact* 275: 47–60.

Sharma R, Sud N, Chattopadhyay TK, Ralhan R (2005). TC21/R-Ras2 upregulation in esophageal tumorigenesis: potential diagnostic implications. *Oncology* 69: 10–18.

Sheng XJ, Zhou YQ, Song QY, Zhou DM, Liu QC (2012). Loss of breast cancer metastasis suppressor 1 promotes ovarian cancer cell metastasis by increasing chemokine receptor 4 expression. *Oncol Rep* 27(4): 1011–1018.

Shevde LA, Samant RS, Goldberg SF, Sikaneta T, Alessandrini A, i sur. (2002). Suppression of human melanoma metastasis by the metastasis suppressor gene, BRMS1. *Exp Cell Res* 273(2): 229–239.

Silveira AC, Hurst DR, Vaidya KS, Ayer DE, Welch DR (2009). Over-expression of the BRMS1 family member SUDS3 does not suppress metastasis of human cancer cells. *Cancer Lett* 276(1): 32–37.

Simpson, TL (1984). Functional Morphology and Morphological Variation. In: The Cell Biology of Sponges. *Springer, New York, NY*.

Sket, B i Velikonja, M (1984). Prethodni izvje{taj o nalazima slatkovodnih spužvi (Proifera, Spongillidae) u spiljama Jugoslavije. *Zbornik predavanja, Deveti Jugoslavenski speleološki kongres.* 553–557.

Smith JJ, Kuraku S, Holt C, Sauka-Spengler T, Jiang N, i sur. (2013). Sequencing of the sea lamprey (Petromyzon marinus) genome provides insights into vertebrate evolution. *Nat Genet* 45(4): 415–421.

Smith J, Naseem R, Webb M. (2009). Purification and characterisation of the breast cancer metastasis suppressor, BRMS1. *Protein Expr Purif* 67(2): 70–75.

Srivastava M, Simakov O, Chapman J, Fahey B, Gauthier MEA, i sur. (2010). The Amphimedon queenslandica genome and the evolution of animal complexity. *Nature* 466: 720–723.

Su V, Lau AF (2014). Connexins: mechanisms regulating protein levels and intercellular communication. *FEBS Lett* 588(8): 1212–1220.

Sun X, Wang M, Liu H, Wang J (2017). MicroRNA-423 enhances the invasiveness of hepatocellular carcinoma via regulation of BRMS1. *Am J Transl Res* 9(12): 5576–5584.

Sztul E, Chen PW, Casanova JE, Cherfils J, Dacks JB, i sur. (2019). ARF GTPases and their GEFs and GAPs: concepts and challenges. *Mol Biol Cell* 30(11): 1249–1271.

Talajić A, Dominko K, Lončarić M, Ambriović-Ristov A, Četković H (2024). The ancestral type of the R-RAS protein has oncogenic potential. *Cell Mol Biol Lett* 29(1): 27.

Taylor JA, Díez-Vives C, Majzoub ME, Nielsen S, Thomas T (2021). Stress response of the marine sponge Scopalina sp.. Can microbial community composition predict sponge disease? *FEMS Microbiol Ecol* 97(8): fiab095.

Trosko JE, Ruch RJ (1998). Cell-cell communication in carcinogenesis. *Front Biosci* 3: d208– d236.

Turner, EC (2021). Possible poriferan body fossils in early Neoproterozoic microbial reefs. *Nature* 596, 87–91.

Vaidya KS, Harihar S, Phadke PA, Stafford LJ, Hurst DR, i sur. (2008). Breast cancer metastasis suppressor-1 differentially modulates growth factor signaling. *J Biol Chem* 283(42): 28354-28360.

Van Soest RW, Boury-Esnault N, Vacelet J, Dohrmann M, Erpenbeck D, i sur. (2012). Global diversity of sponges (Porifera). *PLoS One* 7(4): e35105.

Vannier D, Balderes D, Shore D (1996). Evidence that the transcriptional regulators SIN3 and RPD3, and a novel gene (SDS3) with similar functions, are involved in transcriptional silencing in S. cerevisiae. *Genetics* 144(4): 1343–1353.

Vargas S, Leiva L, Eitel M, Curdt F, Rohde S, i sur. (2023). Body-Plan Reorganization in a Sponge Correlates with Microbiome Change. *Mol Biol Evol* 40(6): msad138.

Varshavsky A (2005). Regulated protein degradation. Trends Biochem Sci 30(6): 283-286.

Vetter IR, Wittinghofer A (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 294(5545): 1299–1304.

Wang J, Chitsaz F, Derbyshire MK, Gonzales NR, Gwadz M, i sur. (2023). The conserved domain database in 2023. *Nucleic Acids Res* 51(D1): D384–D388.

Wang M, Casey PJ. (2016). Protein prenylation: unique fats make their mark on biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17(2): 110–122.

Wang B, Zou JX, Ek-Rylander B, Ruoslahti E. (2000). R-Ras contains a proline-rich site that binds to SH3 domains and is required for integrin activation by R-Ras. *J Biol Chem* 275(7): 5222–5227.

Watanabe-Takano H, Takano K, Keduka E, Endo T. (2010). M-Ras is activated by bone morphogenetic protein-2 and participates in osteoblastic determination, differentiation, and transdifferentiation. *Exp Cell Res* 316(3): 477–490.

Weber SM, Carroll SL (2021). The Role of R-Ras Proteins in Normal and Pathologic Migration and Morphologic Change. *Am J Pathol* 191(9): 1499–1510.

Wörheide G, Dohrmann M, Erpenbeck D, Larroux C, Maldonado M, i sur. (2012). Deep phylogeny and evolution of sponges (phylum Porifera). *Adv Mar Biol* 61: 1–78.

Wu L, Jiao X, Zhang D, Cheng Y, Song G, i sur. (2021). Comparative genomics and evolution of avian specialized traits. *Curr Genomics* 22: 496–511.

Wulff, J (2024). Parallel phenotypic plasticity and divergent ecological strategies in morphologically and molecularly similar sympatric sponge species. *Biological Journal of the Linnean Society* 142(4): 424–440.

Yang YL, Chen CZ, Jin LP, Ji QQ, Chen YZ, i sur. (2013). Effect and mechanism of the metastasis suppressor gene BRMS1 on the migration of breast cancer cells. *Int J Clin Exp Med* 6(10): 908–916.

Yang J, Zhang B, Lin Y, Yang Y, Liu X, Lu F (2008). Breast cancer metastasis suppressor 1 inhibits SDF-1alpha-induced migration of non-small cell lung cancer by decreasing CXCR4 expression. *Cancer Lett* 269(1): 46–56.

Young LC, Rodriguez-Viciana P (2018). Mras: a close but understudied member of the RAS family. *Cold Spring Harb Per spect Med* 8: 033621.

Zerial M, McBride H (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(2): 107–117.

Zhang X, Spiegelman NA, Nelson OD, Jing H, Lin H (2017). SIRT6 regulates Ras-related protein R-Ras2 by lysine defattyacylation. *Elife* 6: e25158.

Zhang Z, Vuori K, Wang HG, Reed JC, Ruoslahti E. (1996). Integrin activation by R-ras. *Cell* 85: 61–69.

Zhao S, Ni K, Xie J, Cheng C, Zhao N, i sur. (2024). Exploring the prognostic value of BRMS1+microglia based on single-cell anoikis regulator patterns in the immunologic microenvironment of GBM. *J Neurooncol* 170(1): 101–117.

Zimmermann RC, Sardiu ME, Manton CA, Miah MS, Banks CAS, i sur. (2021). Perturbation of BRMS1 interactome reveals pathways that impact metastasis. *PLoS One* 16(11): e0259128.

Zimmermann RC, Welch DR (2020). BRMS1: a multifunctional signaling molecule in metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 39(3): 755–768.

## 8. ŽIVOTOPIS

Antea Talajić rođena je u Zagrebu 8. lipnja 1995. godine. U Samoboru je završila osnovnu školu i opću gimnaziju Antuna Gustava Matoša. 2017. godine završila je Preddiplomski studij biotehnologije na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Zagrebu te je iste godine upisala Diplomski studij molekularne biotehnologije. Diplomirala je 5. lipnja 2020. godine na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Zagrebu s temom *Agrobacterium-mediated transformation of flax (Linum usitatissimum L. cv. Sara) with the phaCl gene*. Eksperimentalni dio svog diplomskog rada izradila je u Wrocławu (University of Environmental and Life Sciences) tijekom Erasmus stručne prakse. Od listopada 2020. do danas zaposlena je kao asistentica u Laboratoriju za molekularnu genetiku Instituta Ruđer Bošković na projektu "Geni spužvi povezani s nastankom raka". Tijekom izrade doktorata sudjelovala je u objavi četiriju znanstvenih članaka, od kojih su dva s dijeljenim prvim autorstvom. Prezentirala je svoje istraživanje u usmenom obliku na dvjema međunarodnim konferencijama: na 46.-om FEBS kongresu koji se održao u Lisabonu, Portugal, te na *11<sup>th</sup> World Sponge Conference* u Leidenu, Nizozemska. Dobitnica je godišnje nagrade Instituta Ruđer Bošković za znanstveni rad. Članica je Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju.

#### OBJAVLJENI ZNANSTVENI RADOVI

 Talajić, Antea\*; Dominko, Kristina\*; Lončarić, Marija; Ambriović-Ristov, Andreja; Ćetković, Helena

The ancestral type of the R-RAS protein has oncogenic potential // Cellular & molecular biology letters, 29 (2024), 27; 1-25. doi: 10.1186/s11658-024-00546-0 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni) \*dijeljeno prvo autorstvo

 Dominko, Kristina; Talajić, Antea; Radić, Martina; Škrobot Vidaček, Nikolina; Vlahoviček, Kristian; Herak Bosnar, Maja; Ćetković, Helena Transfection of Sponge Cells and Intracellular Localization of Cancer-Related MYC, RRAS2, and DRG1 Proteins // Marine drugs, 21 (2023), 2; 119, 21. doi: 10.3390/md21020119 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)  Beljan, Silvestar\*; Dominko, Kristina\*; Talajić, Antea\*; Hloušek-Kasun, Andrea; Škrobot Vidaček, Nikolina; Herak Bosnar, Maja; Vlahoviček, Kristian; Ćetković, Helena

Structure and function of cancer-related developmentally regulated GTP-binding protein 1 (DRG1) is conserved between sponges and humans // Scientific reports, 12 (2022), 11379, 20. doi: 10.1038/s41598-022-15242-2 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

\*dijeljeno prvo autorstvo

 Filić, Vedrana; Mijanović, Lucija; Putar, Darija; Talajić, Antea; Ćetković, Helena; Weber, Igor

Regulation of the Actin Cytoskeleton via Rho GTPase Signalling in Dictyostelium and Mammalian Cells: A Parallel Slalom // Cells, 10 (2021), 7; 1592, 39. doi: 10.3390/cells10071592 (međunarodna recenzija, pregledni rad, znanstveni)

## 9. PRILOG

Kratica	Latinski naziv
Aal	Alosa alosa
Aja	Anneissia japonica
Aro	Athalia rosae
Aru	Asterias rubens
Asa	Alosa sapidissima
Ate	Actinia tenebrosa
Aqu	Amphimedon queenslandica
Awo	Actinomortierella wolfii
Bbe	Branchiostoma belcheri
Bbu	Bufo bufo
Bfl	Branchiostoma floridae
Bmo	Bombyx mori
Bta	Bos taurus
Cab	Chelonoidis abingdonii
Cel	Caenorhabditis elegans
Cin	Ciona intestinalis
Cgi	Crassostrea gigas
Cmy	Chelonia mydas
Срі	Chrysemys picta bellii
Сро	Cavia porcellus
Cow	Capsaspora owczarzaki ATCC 30864
Cte	Capita teleta
Cvi	Crassostrea virginica
Dbu	Drosophila busckii
Dco	Dermochelys coriacea
Dme	Drosophila melanogaster
Dre	Danio rerio
Elu	Esox lucius

Popis latinskih naziva organizama i kratica korištenih u doktorskom radu.

Esu	Eunapius subterraneus
Fca	Felis catus
Gcy	Gryganskiella cystojenkinii
Gev	Gopherus evgoodei
Gga	Gallus gallus
Нар	Haplosporangium sp. Z 11
Hru	Haliotis rubra
Hsa	Homo sapiens
Hvu	Hydra vulgaris
Isc	Ixodes scapularis
Jja	Jaculus jaculus
Lsa	Lamellibrachia satsuma
Mbr	Monosiga brevicollis MX1
Мсо	Mytilus coruscus
Mme	Meles meles
Mmul	Macaca mulatta
Mmus	Mus musculus
Мро	Mortierella polycephala
Npa	Nanorana parkeri
Npe	Nothoprocta perdicaria
Nve	Nematostella vectensis
Oan	Ornithorhynchus anatinus
Omi	Oopsacas minuta
Osi	Octopus sinensis
Pab	Pongo abelii
Pan	Papio anubis
Pcl	Podila clonocystis
Pco	Propithecus coquereli
Pda	Pocillopora damicornis
Phu	Pseudopodoces humilis
Pmar	Petromyzon marinus
Pmax	Pecten maximus
Рра	Pan paniscus

Ptr	Pan troglodytes
Rno	Rattus norvegicus
Rte	Rana temporaria
Scl	Styela clava
Sdo	Suberites domuncula
Sko	Saccoglossus kowalevskii
Spi	Stylophora pistillata
Spu	Strongylocentrotus purpuratus
Sph	Sepia pharaonis
Ssc	Sus scrofa
Tad	Trichoplax sp. H2
Xla	Xenopus laevis
Xtr	Xenopus tropicalis