

# Drevni proteini kao termički stabilniji analozi postojećih proteina

---

**Viher, Marija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2017**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:702721>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-21**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Marija Viher

# **Drevni proteini kao termički stabilniji analozi postojećih proteina**

## **Diplomski rad**

predložen Kemijskom odsjeku  
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu  
radi stjecanja akademskog zvanja  
magistre kemije

Zagreb, 2017.



Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za biokemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom i neposrednim voditeljstvom doc. dr. sc. Marka Močiboba.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom Aminoacil-tRNA-sintetaze kao čuvari standardnog genetičkog koda (broj projekta: IP-2016-06-6272).



## Zahvale

Puno hvala mentoru doc. dr. sc. Marku Močibobu na savjetima i raspravama o brojnim problemima na koje smo naišli tijekom izvedbe eksperimentalnog dijela ovoga rada. Hvala Vam na spremnosti da pomognete i odgovorite na svako moje pitanje.

Hvala svim zaposlenicima Zavoda za biokemiju na poticajnim raspravama u ponedjeljak ujutro i na ugodnoj radnoj atmosferi.

Hvala svim inspirativnim profesorima tijekom mog sedamnaestogodišnjeg školovanja. Vaš trud je neprocjenjiv, vaš entuzijazam zarazan, a znanje koje ste prenijeli još i danas brižno čuvam.

Hvala kolegama s faksa, Ivici i Ani, na pozitivnom stavu i veselim razgovorima. Na podršci tijekom studiranja kad su nas mučile svakojake brige. Hvala svim mojim prijateljima. Uljepšavate moj život svojim karakternim različitostima, zajedničkim druženjima, izletima, razgovorima...

Veliko hvala mojoj obitelji, što ste bili uz mene tijekom cijelog mog školovanja, uz moje uspjehe i neuspjehe, radost i tugu. Posebno hvala roditeljima jer ste me naučili da budem uporna, da vjerujem u sebe i ne posustajem, čak ni kad je rezultat još daleko.

Hvala Marku, mojoj ljubavi, na svakodnevnoj motivaciji dok je ovaj diplomski bio tek u povojima. Uz tebe je svaki korak lakši i svaki osmijeh širi.



# Sadržaj

<b>SAŽETAK.....</b>	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XIII</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Evolucijska biokemija.....</b>	<b>3</b>
2.1.1. <i>Filogenetika .....</i>	<i>3</i>
2.1.2. <i>Rekonstrukcija drevnih gena.....</i>	<i>4</i>
<b>2.2. Aminoacil-tRNA-sintetaze.....</b>	<b>7</b>
2.2.1. <i>Mehanizam i uloga aminoacil-tRNA-sintetaza .....</i>	<i>7</i>
2.2.2. <i>Leucil-tRNA-sintetaza iz E. coli .....</i>	<i>9</i>
<b>2.3. Mutageneza.....</b>	<b>12</b>
2.3.1. <i>Nastanak mutacija u prirodi .....</i>	<i>12</i>
2.3.2. <i>Kružna mutageneza.....</i>	<i>12</i>
<b>2.4. Termička stabilnost proteina .....</b>	<b>15</b>
2.4.1. <i>Struktura i stabilnost proteina .....</i>	<i>15</i>
2.4.2. <i>Diferencijalna pretražna fluorimetrija .....</i>	<i>17</i>
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1. Materijali .....</b>	<b>20</b>
3.1.1. <i>Kemikalije .....</i>	<i>20</i>
3.1.2. <i>Instrumenti .....</i>	<i>21</i>
3.1.3. <i>Nukleotidi i nukleinske kiseline .....</i>	<i>21</i>
3.1.4. <i>Proteini.....</i>	<i>21</i>
3.1.5. <i>Komercijalni kompleti.....</i>	<i>21</i>
3.1.6. <i>Radioaktivno obilježeni spojevi.....</i>	<i>21</i>
3.1.7. <i>Hranjivi mediji za uzgoj bakterija.....</i>	<i>22</i>
3.1.8. <i>Bakterijski sojevi.....</i>	<i>22</i>
3.1.9. <i>Plazmidi .....</i>	<i>22</i>
3.1.10. <i>Ostalo .....</i>	<i>23</i>
<b>3.2. Metode rada s bakterijama .....</b>	<b>23</b>
3.2.1. <i>Elektroporacija i uzgoj prekončne kulture sojeva bakterije Escherichia coli .....</i>	<i>23</i>
3.2.2. <i>Uzgoj prekončne kulture sojeva bakterije Escherichia coli.....</i>	<i>24</i>
<b>3.3. Metode rada s nukleinskim kiselinama.....</b>	<b>24</b>



3.3.1. Veliki uzgoj i indukcija ekspresije $tRNA^{Leu}$ .....	24
3.3.2. Izolacija $tRNA^{Leu}_{UAA}$ .....	24
3.3.3. Deacilacija i odsoljavanje $tRNA^{Leu}$ .....	25
3.3.4. Metoda renaturacije $tRNA^{Leu}$ .....	25
3.3.5. Kružna mutageneza .....	25
3.3.6. Izolacija plazmidne DNA .....	27
3.3.7. Agarozna elektroforeza .....	27
3.3.8. Poliakrilamidna elektroforeza u prisutnosti ureje – provjera čistoće $tRNA^{Leu}$ .....	28
3.3.9. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije $tRNA^{Leu}$ i DNA .....	28
<b>3.4. Metode rada s proteinima .....</b>	<b>29</b>
3.4.1. Veliki uzgoj i indukcija ekspresije leucil-tRNA-sintetaze .....	29
3.4.2. Sonikacija stanica .....	29
3.4.3. Afinitetna kromatografija na Ni-NTA agarozu .....	30
3.4.4. Određivanje koncentracije proteina Bradfordovom metodom .....	30
3.4.5. Odsoljavanje proteina .....	30
3.4.6. Uklanjanje Leu-AMP iz aktivnog mjesta LeuRS .....	31
3.4.7. Odsoljavanje i koncentriranje proteina .....	31
3.4.8. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije proteina .....	31
3.4.9. Poliakrilamidna elektroforeza uz dodatak natrijeva dodecilsulfata .....	32
<b>3.5. Metode istraživanja termičke stabilnosti proteina .....</b>	<b>33</b>
3.5.1. Diferencijalna pretražna fluorimetrija .....	33
3.5.2. Termička denaturacija .....	34
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>36</b>
<b>4.1. Kružna mutageneza .....</b>	<b>36</b>
<b>4.2. Pročišćavanje <math>tRNA^{Leu}</math> .....</b>	<b>38</b>
<b>4.3. Pročišćavanje drevne leucil-tRNA-sintetaze i njezine mutirane inačice .....</b>	<b>40</b>
<b>4.4. Mjerenja termičke stabilnosti .....</b>	<b>43</b>
4.4.1. Diferencijalna pretražna fluorimetrija .....	43
4.4.2. Termička denaturacija .....	46
<b>4.5. Kinetička mjerenja .....</b>	<b>48</b>
4.5.1. Izmjena pirofosfata .....	48
4.5.2. Prijenos leucina na $tRNA^{Leu}$ .....	49
4.5.3. Ukupna reakcija aminoacilacije .....	52
4.5.4. Praćenje deacilacije Nva- $tRNA^{Leu}$ u uvjetima ustaljenog stanja .....	52
4.5.5. Provjera aktivnosti T252R/D345A drevne leucil-tRNA-sintetaze .....	53

---

4.5.6. <i>Paralelno praćenje hidrolize ATP-a i nastanka aminoacil-tRNA u enzimima s mutacijama T252R i D345A</i> .....	55
<b>§ 5. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>56</b>
<b>§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA</b> .....	<b>57</b>
<b>§ 7. LITERATURNI IZVORI</b> .....	<b>59</b>
<b>§ 8. ŽIVOTOPIS</b> .....	<b>XV</b>





Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
**Kemijski odsjek**

Diplomski rad

## SAŽETAK

### DREVNI PROTEINI KAO TERMIČKI STABILNIJI ANALOZI POSTOJEĆIH PROTEINA

Marija Viher

Aminoacil-tRNA-sintetaze kataliziraju spajanje aminokiseline s pripadnom tRNA. Leucil-tRNA-sintetaza sadrži dodatnu domenu za popravak pogreške za hidrolizu nepripadno sparenih supstrata. Računalno rekonstruirani drevni proteini često su termički stabilniji od proteina iz kojih su izvedeni. Međutim, do sada ih se istraživalo zbog proučavanja mehanizama evolucije, a ne zbog primjene njihove termičke stabilnosti. Predmet ovoga rada su drevna leucil-tRNA-sintetaza i njezina mutirana inačica s inaktiviranom domenom za popravak. Termička stabilnost drevne leucil-tRNA-sintetaze ispitana je dvjema različitim metodama: diferencijalnom pretražnom fluorimetrijom i mjerenjem aktivnosti enzima pri povišenoj temperaturi. Određeni su njezini kinetički parametri u uvjetima ustaljenog i predustaljenog stanja. Drevna leucil-tRNA-sintetaza je termostabilnija od leucil-tRNA-sintetaze iz *E. coli*, a enzimi su identični u reakcijama aktivacije, prijenosa aminokiseline i popravka pogreške. Drevni enzimi stoga mogu pronaći primjenu kao termički stabilniji analozi postojećih proteina u uvjetima gdje je poželjna veća stabilnost enzima.

(61 stranica, 32 slike, 8 tablica, 53 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: diferencijalna pretražna fluorimetrija, drevna leucil-tRNA-sintetaza, kinetika predustaljenog stanja, kinetika ustaljenog stanja, kružna mutageneza, termička stabilnost

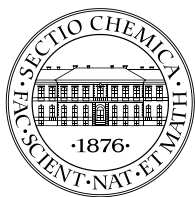
Mentor i neposredni voditelj: doc. dr. sc. Marko Močibob

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Marko Močibob
  2. doc. dr. sc. Marijana Đaković
  3. doc. dr. sc. Ivan Kodrin
- Zamjena: izv. prof. dr. sc. Ita Gruić Sovulj

Datum diplomskog ispita: 25. rujna 2017.





University of Zagreb  
Faculty of Science  
**Department of Chemistry**

Diploma Thesis

## ABSTRACT

### ANCESTRAL PROTEINS AS THERMOSTABLE ANALOGUES OF EXTANT PROTEINS

Marija Viher

Aminoacyl-tRNA synthetases catalyse coupling of amino acids with their cognate tRNAs. Leucyl-tRNA synthetase has additional editing domain in which hydrolysis of misactivated amino acids takes place. Inferred ancestral proteins often show greater thermostability than their extant descendant proteins. However, until now they were used in evolution mechanism research and not due to application of their thermal properties. Subject of this thesis are ancestral leucyl-tRNA synthetase and its mutant with inactivated editing domain. Thermostability of ancestral leucyl-tRNA-synthetase was monitored with two different methods: differential scanning fluorimetry and enzyme activity measurement. Its kinetical parameters were determined with steady state and pre-steady state kinetics. Ancestral leucyl-tRNA synthetase is more thermostable than *E. coli* leucyl-tRNA synthetase and both enzymes are kinetically identical in reactions of amino acid activation, transfer on tRNA and editing. Therefore, ancestral enzymes can be used as thermostable analogues of extant proteins in conditions that ask for greater stability.

(61 pages, 32 figures, 8 tables, 53 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: ancient leucyl-tRNA-synthetase, circular mutagenesis, differential scanning fluorimetry, pre-steady state kinetics, steady state kinetics, thermostability

Mentor: Dr. Marko Močibob, Assistant Professor

Reviewers:

1. Dr. Marko Močibob, Assistant Professor
  2. Dr. Marijana Đaković, Assistant Professor
  3. Dr. Ivan Kodrin, Assistant Professor
- Substitute: Dr. Ita Gruić Sovulj, Associate Professor

Date of exam: 25 September 2017

**Marija Viher**

*Diplomski rad*



## § 1. UVOD

Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) su enzimi koji kataliziraju stvaranje estera aminokiseline i pripadne tRNA (aa-tRNA<sup>aa</sup>) – supstrata za sintezu proteina na ribosomu.<sup>1</sup> Stvaranje aa-tRNA<sup>aa</sup> odvija se u dva koraka. U prvome nastaje aktivirani supstrat: aminoacil-adenilat, a u drugom dolazi do prijenosa aminokiseline na tRNA. S obzirom da je točna sinteza proteina vrlo važna za normalnu funkciju stanice, 10 od 24 poznatih aaRS sadrži dodatnu domenu za popravak pogreške u kojoj dolazi do hidrolize krivo sparenih aminokiselina i tRNA (popravak pogreške nakon prijenosa).<sup>2</sup> Osim popravka pogreške poslije prijenosa aminokiseline na tRNA, postoji i popravak pogreške prije prijenosa – hidroliza nepripadnog aminoacil-adenilata u aktivnom mjestu enzima.<sup>2</sup> Leucil-tRNA-sintetaza iz bakterije *E. coli* (EcLeuRS) sadrži domenu za popravak pogreške ponajprije zbog diskriminacije norvalina – neproteinogene ravnolančane aminokiseline.<sup>3</sup> EcLeuRS ne koristi popravak pogreške prije prijenosa u diskriminaciji nepripadnih aminokiselina.<sup>4</sup>

Usmjerena evolucija je laboratorijski postupak iterativnog uvođenja nasumičnih mutacija u neki protein kako bi se dobila varijanta proteina s boljim svojstvima.<sup>5</sup> S obzirom da brojne uvedene mutacije smanjuju stabilnost proteina, poželjno je istraživanja započeti sa stabilnijom verzijom enzima. Budućim istraživanjima nastojat će se metodom usmjerene evolucije otkriti može li EcLeuRS s inaktiviranom domenom za popravak pogreške razviti mogućnost popravka pogreške prije prijenosa. Kako bi se dobio stabilniji analog EcLeuRS, metodom maksimalne vjerojatnosti je rekonstruirana drevna leucil-tRNA-sintetaza (AncLeuRS).

Rekonstrukcija drevnih gena je metoda računalnog dobivanja sekvence drevnog proteina iz nekog od unutarnjih čvorova filogenetskog stabla.<sup>6</sup> Drevni proteini koriste se u istraživanjima evolucijskog razvitka strukture i funkcije pojedinih proteinskih obitelji.<sup>7</sup> Često pokazuju znatno veću termičku stabilnost od današnjih proteina.<sup>8-10</sup>

Cilj ovoga rada je odrediti termičku stabilnost i kinetičke parametre AncLeuRS i T252R/D345A AncLeuRS i usporediti s kontrolnim proteinima – EcLeuRS odnosno T252R/D345A EcLeuRS. Svrha rada je utvrditi je li AncLeuRS u dovoljnoj mjeri sličan EcLeuRS da bi se mogao koristiti kao njezin analog u istraživanjima temeljenim na usmjerenoj evoluciji.



Kako bi se odgovorilo na postavljena pitanja, u radu su korištene različite metode. Kružnom mutagenезom uzastopno su uvedene mutacije T252R i D345A u kodirajući slijed AncLeuRS. Navedene mutacije inaktiviraju domenu za popravak pogreške.<sup>11,12</sup> Mutirane i wt (engl. *wild type*) verzije AncLeuRS odnosno EcLeuRS su prekomjerno eksprimirane i pročišćene Ni-NTA kromatografijom. Termička stabilnost dobivenih enzima utvrđena je dvjema neovisnim metodama – diferencijalnom pretražnom fluorimetrijom i ispitivanjem aktivnosti enzima pri povišenoj temperaturi. U uvjetima ustaljenog i predustaljenog stanja određeni su kinetički parametri enzima u reakcijama aktivacije, prijenosa aminokiselina na tRNA, ukupne aminoacilacije i hidrolize norvalil-tRNA<sup>Leu</sup>.

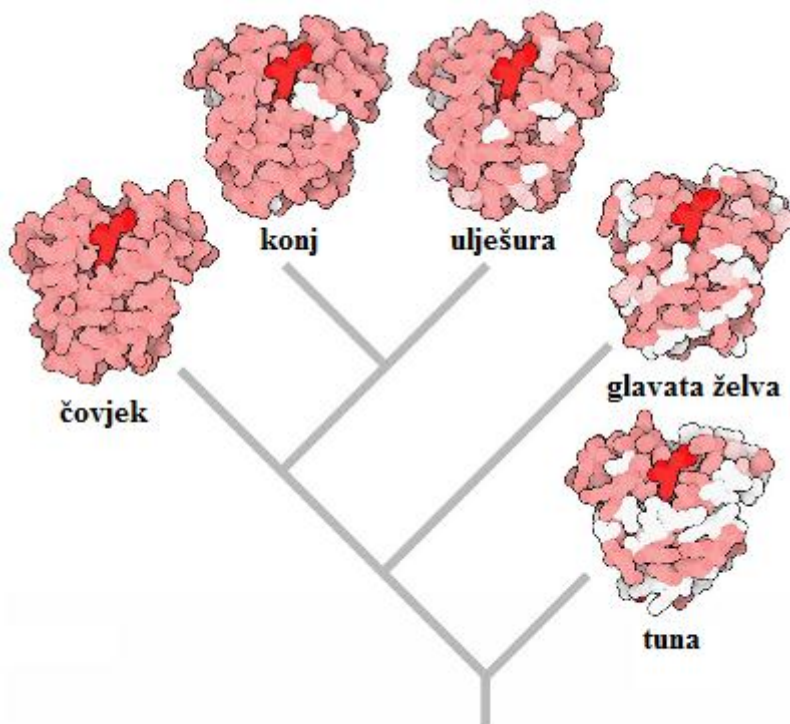
Budući da su sekvence AncLeuRS i EcLeuRS 89 % identične i da izmijenjene aminokiseline ne narušavaju važne interakcije AncLeuRS sa supstratima, očekuje se analogno ponašanje dvaju enzima u reakcijama aktivacije aminokiseline i aminoaciliranja. S obzirom na rezultate prethodno provedenih istraživanja na drevnim enzimima, očekuje se da je AncLeuRS termički stabilniji od EcLeuRS.

## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Evolucijska biokemija

#### 2.1.1. Filogenetika

Molekularna evolucija istražuje procese nastanka gena, odnosno proteina s novim funkcijama. Milijunima godina geni su se mijenjali, a procesima pozitivne, negativne ili neutralne selekcije promjena je zadržavana ili odbacivana.<sup>13</sup> Na taj način su se organizmi prilagođavali uvjetima okoliša. Kako bi se proučavali njihovi evolucijski međuodnosi, potrebno je analizirati i sistematizirati proteinske, RNA ili DNA sekvence. Grana znanosti koja se time bavi naziva se filogenetika. Filogenetsko stablo je sistematični prikaz evolucijskih međuodnosa (Slika 1).



*Slika 1* Filogenetsko stablo mioglobina iz čovjeka, konja, ulješure, glavate želve i jedne vrste tune (*Thunnus aquaticus*) čije su 3D strukture određene rendgenskom kristalografijom i odgovaraju PDB kôdovima: 3RGK, 1YMB, 1MBO, 1LHS odnosno 1NRL. Različitim bojama označeni su hem (crveno) i aminokiseline identične (roza), slične (svijetlo roza) odnosno različite (bijelo) odgovarajućim aminokiselinama u humanom mioglobinu. Preuzeto i prilagođeno iz ref. 14.

Odabir vrste sekvenci (DNA, RNA ili proteini) za filogenetsku analizu ovisi o tome koje informacije želimo dobiti. Sekvence DNA uspoređuju se primjerice ako nas zanima usporedba brzine nastanka neutralnih (ne dovode do promjene aminokiseline u proteinu) i točkastih

(dovode do promjene aminokiseline u krajnjem produktu) mutacija ili mehanizmi nastanka mutacija.<sup>13</sup> Isto tako, DNA je jedini izvor informacija za proučavanje evolucije nekodirajućih regija genoma.

Kod jako različitih gena, uspoređivanje sekvenci DNA jako je nepraktično jer se mogu toliko razlikovati da nikakva sličnost nije statistički značajna. U tom slučaju uspoređivanje proteinskih sekvenci daje bolje rezultate jer se u njima mogu opaziti samo one mutacije koje uzrokuju promjenu aminokiseline, a to može biti mutacija jednog, dva ili tri nukleotida. Tako je razlika između evolucijski udaljenijih (divergentnijih) sekvenci manja na razini proteina, nego DNA. S obzirom da je predmet ovoga rada drevni protein dobiven filogenetskom analizom proteinskih sekvenci, dalje u tekstu govorit će se isključivo o proteinskim filogenetskim stablima.

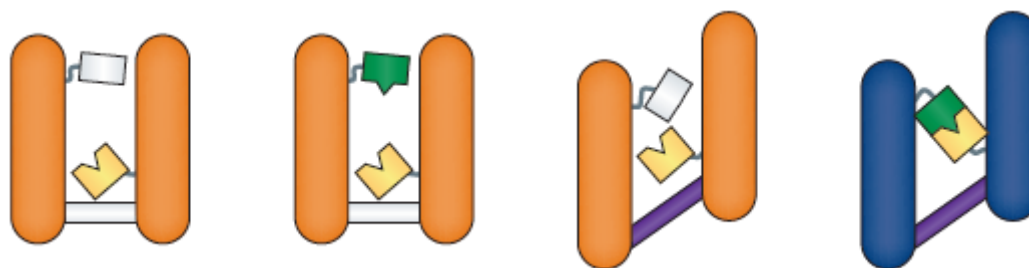
Svako filogenetsko stablo sastoji se od čvorova koji su povezani granama (Slika 1). Unutarnji čvorovi predstavljaju sekvence drevnih, a vanjski sekvence postojećih/sadašnjih proteina. Duljina grana može i ne mora biti korelirana s različitošću dvaju sekvenci. To ovisi o metodi koja je korištena za dobivanje filogenetskog stabla. Topologija stabla (raspored grana) pokazuje evolucijski međuodnos proteina. Proteine koji dijele zajedničkog pretka nazivamo homolognima.

### *2.1.2. Rekonstrukcija drevnih gena*

Većine nekadašnjih proteina više nema. Vrlo mali broj sekvenci gena izumrlih organizama dobiven je sekvenciranjem pronađenih i sačuvanih DNA iz njihovih ostataka ili fosila, međutim upravo sekvence drevnih proteina čuvaju tajnu mehanizama evolucije. Njihovo poznavanje bi dalo odgovor na pitanje koje su se proteinske funkcije i na koji način mijenjale kroz povijest.<sup>5</sup>

Donedavno se funkcija nekog proteina pokušavala promijeniti ciljanom mutagenezom aminokiseline koje sudjeluju u mehanizmu katalize. Takav pristup naziva se horizontalnim jer se u postojećem proteinu nastoji dobiti funkcija koja odgovara njegovom postojećem homologu.<sup>7</sup> Problem horizontalnog pristupa je što ne uzima u obzir niz mutacija koje su se dogodile u prošlosti prije mutacije odgovorne za nastanak nove funkcije. Jedan takav primjer su permisivne mutacije koje same po sebi ne mijenjaju funkciju proteina, ali predstavljaju nužan uvjet za nastanak mutacija koje ju mijenjaju (Slika 2).<sup>9</sup> Permisivne mutacije mogu se otkriti samo vertikalnim pristupom: praćenjem tijeka evolucije analizom niza uzastopnih drevnih proteina – prethodnika proteina s odgovarajućom funkcijom. Promjena funkcije između dva

uzastopna drevna proteina upućuje da je došlo do ključne mutacije, a analiza mutacija koje su joj prethodile može ukazati na odgovarajuće permisivne mutacije.



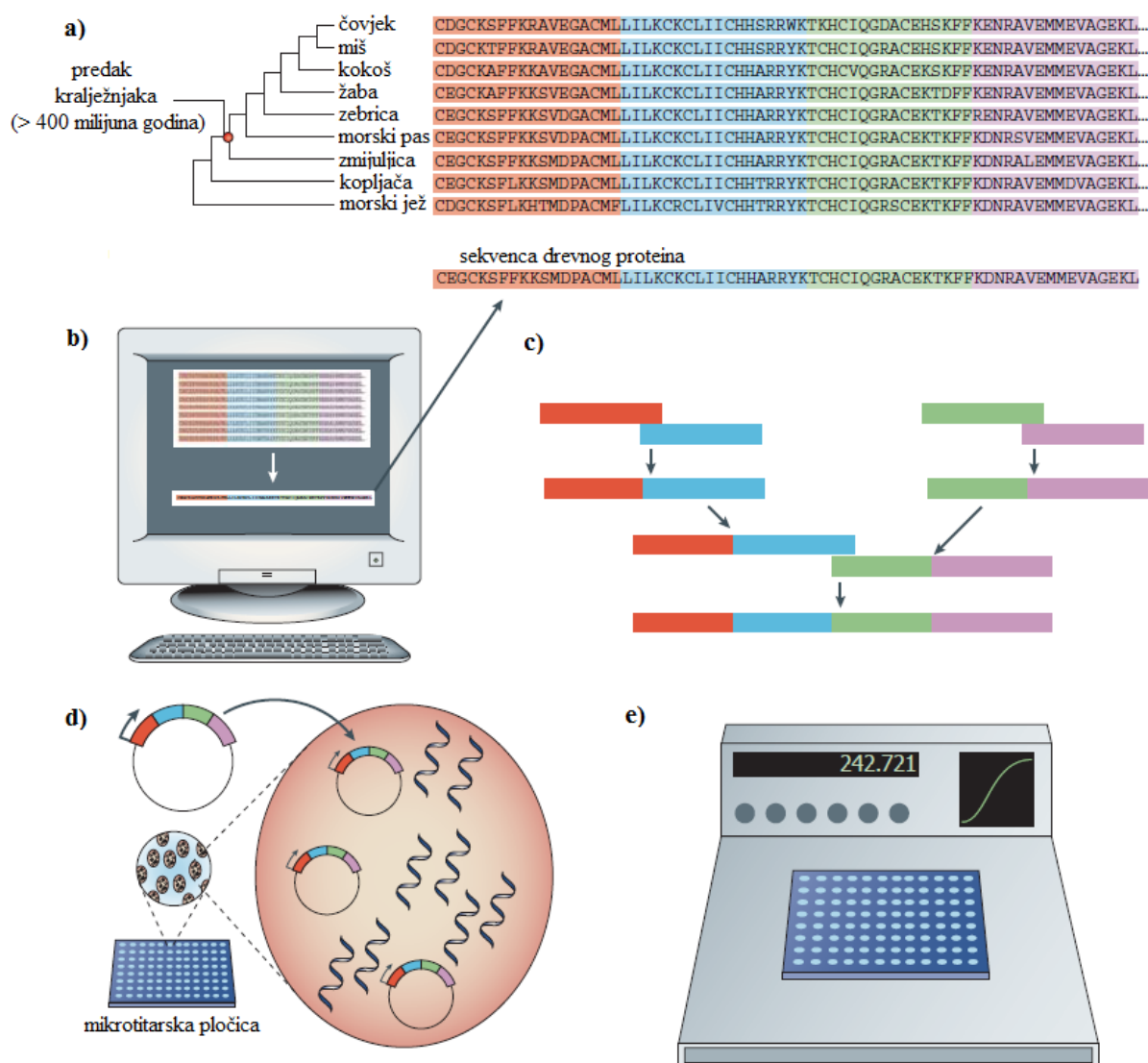
*Slika 2* Shematski prikaz epistaze – ovisnosti mutacija. Protein s funkcijom A (narančasto) mijenja funkciju u B (plavo) kad se dogode dvije mutacije shematski prikazane promjenom bijele u zelenu, odnosno bijele u ljubičastu boju. Prva mutacija odgovorna je za promjenu funkcije, ali sama promjena se ne može dogoditi bez druge mutacije koja mijenja konformaciju proteina i na taj način omogućuje djelovanje prve. Mutacija koja sama po sebi nije odgovorna za promjenu funkcije proteina, ali je nužan uvjet za nju naziva se permisivnom mutacijom. Preuzeto iz ref. 5.

Iako drevni proteini više ne postoje, razvoj matematičkih i računalnih metoda omogućio je pouzdano predviđanje sekvenci iz pradaвне prošlosti. Godine 1971. W. Fitch je metodom maksimalne parsimonije (minimiziranjem ukupnog broja supstitucija između sekvenci) konstruirao filogenetsko stablo i osmislio je prvi algoritam koji je omogućavao određivanje drevnih proteinskih sekvenci na temelju postojećih.<sup>6,15</sup>

Rekonstrukcija drevnih gena je naziv za niz koraka od računalnog dobivanja primarne strukture pretpostavljenog drevnog proteina do njegove ekspresije i ispitivanja njegove aktivnosti (Slika 3).<sup>6</sup>

Kako bi se dobila sekvenca drevnog proteina, najprije je potrebno odabrati proteinske sekvence pomoću kojih će se generirati filogenetsko stablo. Među njima trebaju biti kako sekvence proteina koji direktno proistječu iz nekog zajedničkog pretka, tako i one evolucijski udaljenije (engl. *outlier sequences*). Probir sekvenci vrlo je važan jer utječe na kvalitetu filogenetskog stabla i predviđanja drevnog proteina.

Izabrane sekvence se poravnaju u nekom programu za višestruko poravnavanje sekvenci (engl. *multiple sequence alignment*, MSA) kao što su *Muscle*, *ClustalW*, *Mafft* ili neki drugi.<sup>13</sup> Iz poravnatih sekvenci se metodom maksimalne parsimonije, maksimalne vjerojatnosti ili Bayesovom metodom može generirati filogenetsko stablo i dobiti sekvenca drevnog proteina s nekog od unutarnjih čvorova filogenetskog stabla. Računalnim prevođenjem aminokiselinskog slijeda u nukleotidni slijed moguće je dodatno pripaziti na to da se između više mogućih kodona koji kodiraju neku aminokiselinu biraju oni koji su učestaliji u organizmu u kojem će se vršiti ekspresija drevnog proteina (engl. *codon bias*).<sup>6</sup>



**Slika 3** Slijed koraka u rekonstrukciji drevnog gena: a) generiranje filogenetskog stabla iz seta poravnatih sekvenci, b) računalno dobivanje sekvence drevnog proteina naznačenog u filogenetskom stablu, c) kemijska sinteza kodirajućeg slijeda za drevni protein, d) kloniranje kodirajućeg slijeda u ekspresijski vektor, transformacija stanica domaćina i ekspresija drevnog proteina, e) ispitivanje aktivnosti drevnog proteina. Preuzeto i prilagođeno iz ref. 6.

Računalno dobiveni nukleotidni slijed moguće je kemijski sintetizirati tzv. stupnjevitom lančanom reakcijom polimeraze (engl. *stepwise polymerase chain reaction*, *stepwise PCR*) koja se sastoji se od sinteze pojedinačnih nukleotidnih sljedova i njihovog postupnog spajanja u sve veće cjeline. Nakon sinteze, kodirajući slijed se uklonira u ekspresijski vektor i njime transformiraju stanice domaćini. Drevni protein se prekomjerno ekspirira, pročisti i odredi njegova aktivnost.

Kao što je ranije spomenuto, rekonstrukcija drevnih gena omogućila je istraživanje mehanizama nastanka novih funkcija. Tako su primjerice rekonstrukcijom i funkcionalnom

karakterizacijom nekoliko uzastopnih predaka glukokortikoidnih receptora znanstvenici odredili između koja dva je došlo do mutacije koja je smanjila njihovu specifičnost za aldosteron.<sup>16</sup> Sličnim istraživanjima na precima proteina sličnih zelenom fluorescentnom proteinu (engl. *green fluorescent protein*, GFP) otkriveno je da je supstitucija jedne aminokiseline ključna za promjenu fluorescencije iz zelene u crvenu, međutim ako je pojedinačno uvedena nema efekta, nego tek nakon što su uvedene 3 druge, permisivne mutacije koje same po sebi ne mijenjaju fluorescenciju.<sup>17</sup> Istraživanja mehanizama molekularne evolucije otvaraju put za njihovu upotrebu u dizajnu proteina s novim funkcijama.

Rezultate dobivene rekonstrukcijom drevnih gena potrebno je analizirati s oprezom jer su drevni proteini generirani s određenom vjerojatnošću.<sup>6</sup> Primjera radi, uzmimo mali drevni protein od 100 aminokiselina u kojem je svaka aminokiselina računalno određena s vjerojatnošću 90 %. Vjerojatnost da je rekonstruirani protein ujedno i stvarni protein iz prošlosti jednaka je  $0,9^{100} = 2,7 \times 10^{-5}$ , što je praktično jednako nuli! Pritom treba naglasiti da proteini u većini imaju više od 100 aminokiselina koje mogu biti određene s mnogo manjom vjerojatnošću od 90 %. Računalno rekonstruirani proteini naše su najbolje aproksimacije nekad postojećih proteina, ali sa sekvencom daleko od stvarne.

## 2.2. Aminoacil-tRNA-sintetaze

### 2.2.1. Mehanizam i uloga aminoacil-tRNA-sintetaza

Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) su važni enzimi koji sudjeluju u procesu translacije. Kataliziraju stvaranje esterske veze između aminokiseline i hidroksilne skupine terminalnog adenzina na 3' kraju pripadne molekule tRNA.<sup>1</sup> Pripadna tRNA je ona koja sadrži antikodon (slijed od 3 uzastopna nukleotida) komplementaran kodonu koji kodira točno određenu aminokiselinu (oznaka: tRNA<sup>aa</sup>). Produkt katalize aaRS (aa-tRNA<sup>aa</sup>) difuzijom dolazi na A mjesto u ribosomu i sparuje se s komplementarnim kodonom na mRNA molekuli. Budući da slijed kodona u mRNA kodira slijed aminokiselina u proteinu, aaRS točnim sparivanjem aminokiseline i tRNA osigurava ispravno čitanje genetskog koda. Svaka od 20 proteinogenih aminokiselina kodiranih standardnim genetskim kodom ima barem jednu aaRS.

Reakcija aminoacilacije tRNA odvija se u dva koraka koja se provode u katalitičkoj domeni aaRS (Slika 4). Najprije dolazi do aktivacije aminokiseline, a zatim do njezinog prijenosa na pripadnu tRNA.

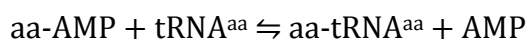


Slika 4 Shematski prikaz prijenosa aminokiseline (aa) na tRNA u dva koraka. Najprije dolazi do aktivacije aminokiseline ATP-om, a zatim do njezinog prijenosa na pripadnu tRNA. Obje reakcije događaju se u aktivnom mjestu odgovarajuće aminoacil-tRNA-sintetaze. Preuzeto i prilagođeno iz ref. 18.

U aktivaciji aminokiseline sudjeluje ATP u kompleksu s kofaktorom  $Mg^{2+}$ . Produkt reakcije je aminoacil-adenilat:



koji u drugom koraku reagira s jednom od dvije hidroksilne skupine (2'-OH ili 3'-OH) na ribози adenozina s 3' kraja tRNA molekule:



Pirofosfatni ion koji je nusprodukt prvog koraka ubrzo nakon nastanka hidrolizira u reakciji koju katalizira anorganska pirofosfataza, uz nastajanje dvaju fosfatnih iona.<sup>2</sup> Zbog trošenja jednog od produkata, reakcija aktivacije aminokiseline pomiče se udesno, a posredno i reakcija prijenosa na tRNA. Hidroliza pirofosfata tako pomiče ukupnu reakciju stvaranja  $aa\text{-tRNA}^{aa}$  u smjeru nastajanja produkata.

Zbog svoje važne uloge u stvaranju supstrata za sintezu proteina, aaRS imaju visoki stupanj točnosti (1 pogreška u  $10^4\text{-}10^5$  reakcija). Njihovo aktivno mjesto je svojom veličinom i rasporedom bočnih ogranaka prilagođeno specifičnoj aminokiselini, međutim sterički kriterij nekad nije dovoljan za diskriminaciju strukturno sličnih aminokiselina koje su manje od pripadne.<sup>19</sup> Zbog toga neke aaRS sadrže dodatnu domenu za popravak pogreške u kojoj dolazi do hidrolize estera nepripadne aminokiseline i tRNA. Aktivno mjesto domene za popravak omogućava vezanje manjih aminokiselina, a isključuje pripadnu aminokiselinu. Mehanizam isključenja nepripadnih aminokiselina prema veličini naziva se mehanizam dvostrukog sita.

Neke aaRS, kao što su proлил-tRNA-sintetaza i alanil-tRNA-sintetaza, imaju *trans* faktor – samostalni protein, homolog domene za popravak odgovarajuće aaRS koji katalizira hidrolizu nepripadne aminokiseline i tRNA.<sup>2,20</sup> *Trans* faktori predstavljaju tzv. treće sito u osiguravanju vjernosti odgovarajuće aaRS.

Osim specifičnosti prema aminokiselini, aaRS mora biti selektivna i prema pripadnoj tRNA. S obzirom na veliku dodirnu površinu između tRNA i enzima, diskriminacija nepripadnih tRNA se lakše postiže od diskriminacije aminokiselina.<sup>2</sup> Specifičnost prema određenoj tRNA rezultat je nekovalentnih interakcija između dušičnih baza i aminokiselinskih bočnih ogranaka, prepoznavanja oblika okosnice tRNA kao i njezinih specifičnih elemenata tercijarne strukture kao što je duga varijabilna ruka.<sup>21</sup>

Tablica 1 Razlike dvaju klasa aminoacil-tRNA-sintetaza.<sup>1,2</sup>

Karakteristika	Klasa I	Klasa II
<b>Kvaterni struktura</b>	uglavnom monomeri	multimeri
<b>Mjesto aminoacilacije terminalnog adenozina na 3' kraju tRNA</b>	2'-OH	3'-OH (iznimka: fenilalanil-tRNA-sintetaza)
<b>Sintetska domena sadrži</b>	Rossmannov nabor	$\beta$ ploču sastavljenu od 7 lanaca

Aminoacil-tRNA-sintetaze se prema strukturnim karakteristikama i reakcijskom mehanizmu dijele u dvije klase. Njihove razlike su prikazane u tablici 1. Osim navedenih, dvije klase na različite načine vežu ATP i tRNA,<sup>1</sup> a CCA kraj tRNA poprima različitu konformaciju u interakciji sa sintetazama iz klase I odnosno II.

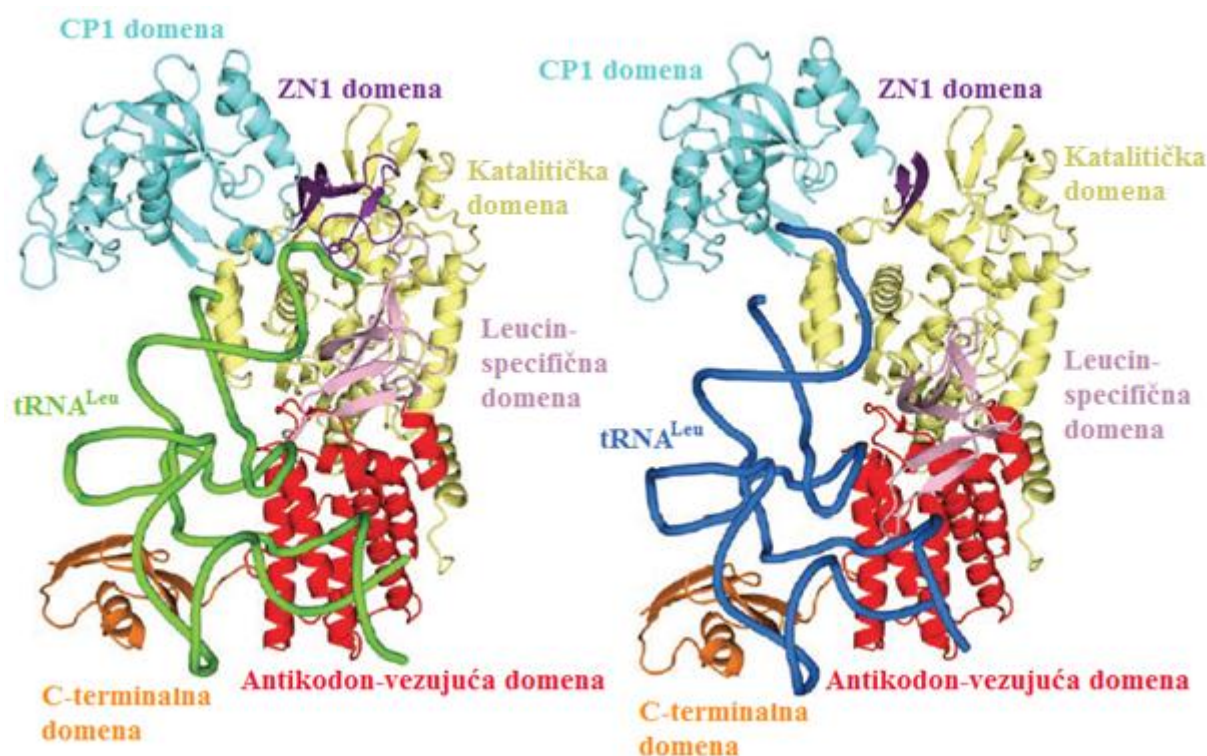
### 2.2.2. Leucil-tRNA-sintetaza iz *E. coli*

Leucil-tRNA-sintetaza iz bakterije *E. coli* (EcLeuRS) je monomer koji pripada klasi I aaRS.<sup>2</sup> Sastoji se od katalitičke, CP1 (domene za popravak pogreške), ZN1 (domene koja veže  $Zn^{2+}$ ), leucin-specifične, antikodon-vezujuće i C-terminalne domene (Slika 5).<sup>22</sup>

Katalitička domena EcLeuRS je Rossmannov nabor koji se nalazi na N kraju enzima. Nabor je dobio ime prema Michaelu Rossmannu koji ga je prvi uočio, a nalazi se u mnogim enzimima koji vežu nukleotide (npr. dehidrogenaze, aaRS i sukcinil-CoA-sintetaza).<sup>1</sup> Sastoji se od pet paralelnih  $\beta$  lanaca povezanih  $\alpha$  zavojnicama i sadrži dva motiva: HMGH i KMSKS koji ostvaruju interakcije s ATP-om.<sup>2</sup> Motiv KMSKS je karakterističan za klasu I aaRS, dok je

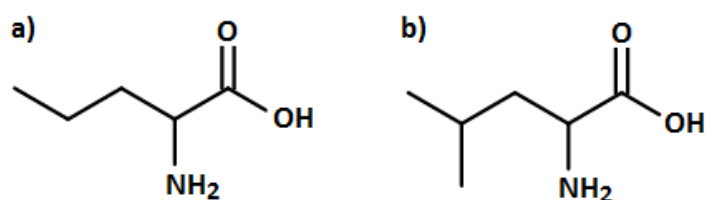


motiv HMGH nešto izmijenjena verzija HIGH motiva, s metioninom kao kemijski sličnom aminokiselinom izoleucinu.



Slika 5 Prikazi kompleksa leucil-tRNA-sintetaze iz *E. coli* (EcLeuRS) s pripadnom tRNA<sup>Leu</sup> u aminoacilacijskoj konformaciji (lijevo) i konformaciji koju zauzima tijekom popravka pogreške (desno). Vidljiva je razlika u orijentaciji 3' kraja tRNA. Preuzeto i prilagođeno iz ref. 22.

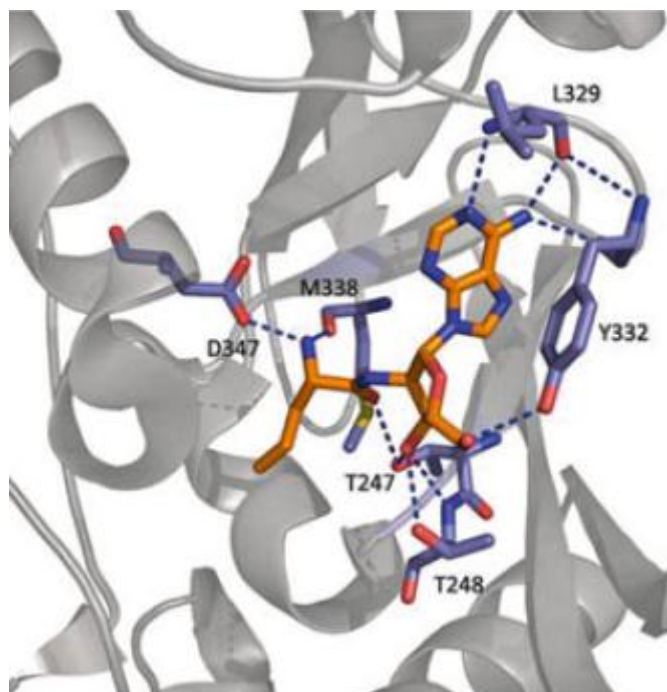
U katalitičku domenu svih aaRS klase I umetnuta je CP1 domena (engl. *connective peptide*) koja je kod EcLeuRS dodatno uvećana i ima ulogu popravka pogreške. Dva su načina na koje ester nepripadne aminokiseline i tRNA može doći u domenu za popravak pogreške.<sup>2</sup> Prvi je translakacija uslijed reorijentacije tRNA, a drugi disocijacija i ponovno vezanje. Orijentacija 3' kraja tRNA molekule koji se u aminoacilacijskoj konformaciji nalazi u katalitičkoj domeni, a u konformaciji za popravak u CP1 domeni (Slika 5) sugerira model translakacije u EcLeuRS.



Slika 6 Struktura molekule a) norvalina, b) leucina.

Pokazano je kako je glavna funkcija domene za popravak pogreške diskriminacija norvalina (Slika 6 a) – neproteinogene ravnolančane aminokiseline koja se nakuplja kao nusprodukt sinteze leucina u *E. coli* u uvjetima manjka kisika.<sup>3</sup>

U domeni za popravak pogreške nalaze se dvije važne aminokiseline: Thr 252 i Asp 345. Mutacija aspartata u alanin smanjuje konstantu brzine hidrolize uz faktor  $10^5$ .<sup>12</sup>



Slika 7 Prikaz interakcija između bočnih ogranaka leucil-tRNA-sintetaze iz bakterije *T. thermophilus* (PDB kôd: 1OBC) i analoga supstrata (2'-(L-norvalil)amino-2-deoksiadenozina) u aktivnom mjestu domene za popravak. Preuzeto iz ref. 2.

Analizom kristalografske strukture aktivnog mjesta domene za popravak leucil-tRNA-sintetaze iz bakterije *T. thermophilus* (ThLeuRS, PDB kôd: 1OBC) koja je homologna EcLeuRS, vidi se kako atom kisika iz  $\gamma$ -karboksilne skupine aspartata 347 (s istom funkcijom kao Asp 345 u EcLeuRS) ostvaruje vodikovu vezu s  $\alpha$ -amino skupinom analoga supstrata (Slika 7) i time sudjeluje u njegovom pravilnom pozicioniranju.

Treonin 252 ima drugačiju ulogu. Njegov bočni ogranak sterički onemogućuje hidrolizu ispravnog produkta, Leu-tRNA<sup>Leu</sup>, jer je leucin (Slika 6 b) prevelik da bi ušao u aktivno mjesto domene za popravak.<sup>23</sup> Promjenom treonina u alanin, aktivno mjesto se povećava, a obrnuto - povećanjem bočnog ogranka i dodatkom pozitivnog naboja (mutacijom treonina u arginin) smanjuje se veličina aktivnog mjesta i efikasnost hidrolize nepripadnih aminokiselina.<sup>11</sup>

## 2.3. Mutageneza

### 2.3.1. Nastanak mutacija u prirodi

Mutageneza je proces kojim nastaju mutacije – promjene u deoksiribonukleinskoj kiselini (engl. *deoxyribonucleic acid*, skraćeno DNA). Postoje različite vrste mutacija: insercije – umetanje nukleotidnog slijeda u DNA, delecije – izbacivanje nukleotidnog slijeda iz DNA, točkaste mutacije – zamjena jednog nukleotida drugim i genske duplikacije – udvostručavanje gena.<sup>1</sup>

Spontano nastajanje mutacija uvjetovano je greškama koje radi DNA-polimeraza tijekom replikacije DNA. Njihova učestalost je vrlo mala, primjerice u bakteriji *E. coli* iznosi oko  $10^{-10}$  mutacija po ugrađenoj bazi po replikaciji. Nastanak mutacija može se potaknuti korištenjem mutagena (sredstava koja izazivaju mutacije). Primjeri kemijskih mutagena su etidijev bromid,  $\text{HNO}_2$  i analozi dušičnih baza (5-bromouracil, 2-aminopurin), a fizikalnih razne vrste ionizirajućeg zračenja (UV, rendgensko ili radioaktivno).

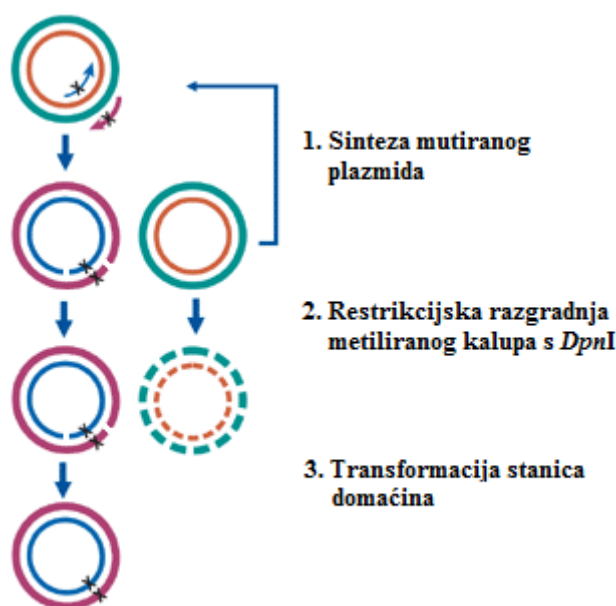
Mutacije mogu biti pod pozitivnom, negativnom i neutralnom selekcijom.<sup>13</sup> Mutacije pod pozitivnom selekcijom omogućuju organizmima bolju prilagodbu na uvjete u okolišu. Takve mutacije odgovorne su za nastanak različitih vrsta. S druge strane, mutacije pod negativnom selekcijom su štetne. One primjerice mogu uzrokovati nastanak proteina sa smanjenom ili uklonjenom aktivnošću. Kad bi se takve mutacije događale često, mogle bi ugroziti opstanak vrsta. Zato je važno da DNA-polimeraza ima mogućnost popravka greške kao i da u stanici postoje mehanizmi popravka pogreške nakon replikacije. Prema teoriji Motooa Kimure, većina mutacija u prirodi je neutralna ili približno neutralna.<sup>13</sup> Neutralne mutacije ne mijenjaju vrstu aminokiseline u proteinu. Primjer takve mutacije je promjena kodona CAA u CAG jer oba kodiraju aminokiselinu glutamin. Približno neutralne mutacije mijenjaju vrstu aminokiseline, ali tako da je promijene u kemijski sličnu verziju (npr. zamjena izoleucina leucinom).

### 2.3.2. Kružna mutageneza

Kružna mutageneza je metoda ciljanog uvođenja mutacije u plazmidnu DNA. Dio DNA u koji se nastoji uvesti mutacija naziva se ciljni slijed. Metoda radi na sličnom principu kao i lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR). Za provođenje kružne mutageneze potrebno je imati mutagene početnice, plazmidnu DNA u koju želimo uvesti mutaciju, vjernu

DNA-polimerazu, reakcijski pufer, 4 različita deoksinukleozid-trifosfata (dNTP-a) i restrikcijski enzim *DpnI*.<sup>24</sup>

Mutagene početnice su sljedovi nukleotida koji su cijelom dužinom komplementarni ciljnom slijedu plazmidne DNA, osim što u sredini nukleotidnog slijeda sadrže odgovarajuću mutaciju (Slika 8). One trebaju biti dužine od 25 do 45 parova baza (pb), ovisno o vrsti mutacije koja se uvodi. Za uvođenje točkastih mutacija početnice ne moraju biti jako duge jer i dalje većinom odgovaraju ciljnom slijedu. Međutim kod uvođenja insercija ili delecija, početnice trebaju biti duže kako bi se povećala komplementarnost s ciljnim slijedom koja osigurava specifično prianjanje uz ciljni slijed, a ne nespecifično – na neki drugi dio plazmida. Isto tako, kako bi se spriječilo nespecifično vezanje, temperatura mekšanja početnica (temperatura na kojoj je udio jednolančane DNA 50 %) bi trebala biti viša ili jednaka od 78 °C.



*Slika 8* Shema kružne mutageneze. Mutagene početnice u sredini sadrže mutaciju (označena slovom x) i prianjaju uz komplementarne sljedove u metiliranom plazmidu koji služi kao kalup (zeleno-narančasti). Tijekom amplifikacije u uređaju za PCR, *Pfu*-DNA-polimeraza stvara nove lance DNA (ljubičasto-plavi) koji sadrže željenu mutaciju i ureze na različitim mjestima. DNA koja je služila kao kalup uklanja se iz smjese razgradnjom s *DpnI* koja prepoznaje i cijepa specifični metilirani slijed. S mutiranim plazmidom transformiraju se stanice domaćini u kojima DNA-ligaza popravlja ureze. Preuzeto i prilagođeno iz uputa za *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis* (*Stratagene*).

Cilj kružne mutageneze je uvesti samo željenu, a ne slučajne mutacije. Kako bi se osigurala točna sinteza DNA koristi se polimeraza visoke vjernosti kao što je primjerice *Pfu*-DNA-polimeraza iz termofilne arheje *Pyrococcus furiosus*. Osim što je stabilna pri visokim temperaturama, što je važno za uporabu u uređaju za PCR, *Pfu*-DNA-polimeraza ima 3'-5' egzonukleaznu domenu koja služi za izrezivanje krivo ugrađenih nukleotida.

Kao što je prije naglašeno, kružna mutageneza radi na sličnom principu kao i PCR: ponavljanjem ciklusa koji se sastoji od tri koraka. Broj ciklusa u kružnoj mutagenezi ovisi o vrsti mutacije koja se uvodi i u literaturi se preporučuje da bude minimalan.<sup>24,25</sup> U uređaju za PCR kontrolirano se mijenja temperatura reakcijske smjese i ovisno o temperaturi događa se jedan od sljedećih procesa: denaturacija, sljepljivanje početnica ili polimerizacija.

Na početku je potrebno razdvojiti komplementarne lance plazmidne DNA (denaturacija), a to se postiže povišenjem temperature na 95 °C.<sup>24</sup> Odvajanje lanaca i stvaranje jednolančane DNA omogućava prijanjanje početnica uz ciljni slijed na plazmidu sniženjem temperature u koraku sljepljivanja. U zadnjem koraku, temperatura se povisuje na optimalnu radnu temperaturu DNA-polimeraze (72 °C za *Pfu*-DNA-polimerazu) koja produžuje mutagene početnice stvarajući novu DNA. Novonastala DNA na različitim stranama ciljnog slijeda sadrži jedan urez i zato ne može poslužiti kao kalup za sintezu DNA u idućem ciklusu (Slika 8). Drugim riječima, u svakom ciklusu kao kalup služi isključivo kružna plazmidna DNA. Amplifikacija DNA je zato linearna, a ne eksponencijalna kao u PCR-u. Budući da linearnim umnažanjem nastaje manje konačnog produkta, nego eksponencijalnim i nastali produkti nisu kalup u idućem ciklusu, kružna mutageneza zahtjeva puno veću količinu početne DNA nego PCR.

Nakon amplifikacije DNA, u smjesi se nalaze kružna plazmidna DNA, dodana na početku, i nastali produkt s jednolančanim urezima. Plazmidna DNA je metilirana, a nastali produkt nije. Kako bi se kružna DNA koja ne sadrži željenu mutaciju maknula iz smjese, dodaje se restrikcijski enzim *DpnI* koji specifično prepoznaje i cijepa GA\*TC slijed s adenozinom metiliranim na poziciji N6 (Slika 9).<sup>26</sup>



Slika 9 Palindromski slijed u dvolančanoj DNA koji prepoznaje restrikcijska endonukleaza *DpnI*.

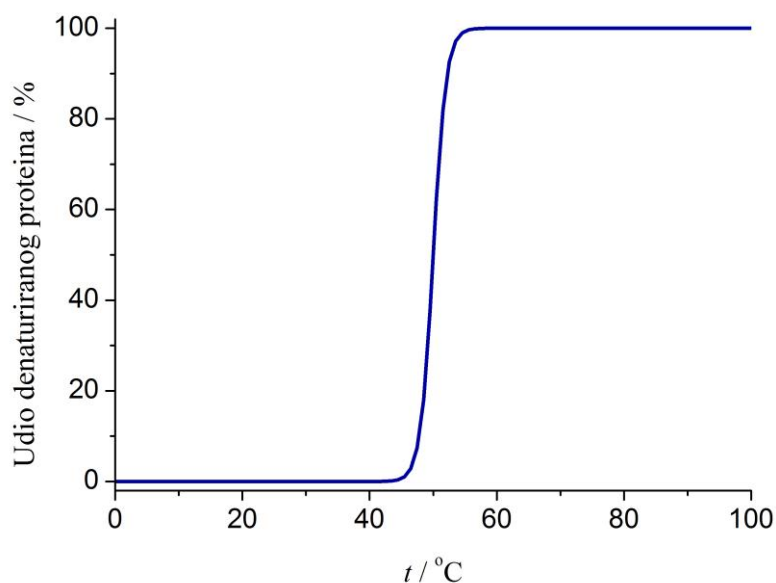
Kada se nastalom smjesom transformiraju odgovarajuće bakterije, u njima će doći do spajanja jednolančanih ureza u linearnim produktima mutageneze.

## 2.4. Termička stabilnost proteina

### 2.4.1. Struktura i stabilnost proteina

Proteini imaju stabilnu tercijarnu strukturu (raspored polipeptidnog lanca u prostoru) zbog ostvarivanja Van der Waalsovih interakcija, ionskih interakcija i vodikovih veza između bočnih ogranaka aminokiselina udaljenih u primarnom slijedu. Raspored aminokiselina obično je takav da se u unutrašnjosti proteina nalaze nepolarne, a na površini polarne. Nepolarne aminokiselinski bočni ogranci međusobno stvaraju van der Waalsove interakcije, a polarni vodikove veze s molekulama vode u stanici. Od ovog pravila odudaraju membranski proteini koji su okruženi nepolarnim fosfolipidnim dvoslojem i u pravilu tvore kanale koji propuštaju polarne molekule pa je kod njih raspored polarnih i nepolarnih aminokiselina obrnut.

Interakcije između aminokiselina u proteinu sprječavaju njegovo razmotavanje. U drugoj polovici 20. st. primijećeno je da je broj i jačina takvih interakcija dovoljna da osigura dovoljno stabilnu strukturu proteina, ali ne i više od toga.<sup>27</sup> Drugim riječima, proteini su granično stabilni i promjenom nekih aminokiselina moguće je povećati njihovu stabilnost.<sup>28</sup>



Slika 10 Izgled tipične krivulje termičke denaturacije.

Kako bi se narušila stabilna, trodimenzionalna struktura proteina, potrebno je uložiti energiju u obliku topline ili dodati neki kemijski reagens (denaturant) kao što je urea, gvanidinijev klorid ili natrijev dodecilsulfat (SDS).<sup>1</sup> Proces narušavanja tercijarne strukture proteina naziva se

denaturacija, a protein koji ju je izgubio zovemo denaturiranim proteinom ili nasumičnim klupkom (engl. *random coil*).

Krivulja koja opisuje postotak denaturiranog proteina u ovisnosti o temperaturi ili koncentraciji denuranta zove se krivulja denaturacije (Slika 10). Dalje u tekstu govorit će se samo o termičkoj denaturaciji. Krivulja denaturacije je sigmoidalna, s oštrim skokom koji odgovara prelasku proteina u denaturirano stanje. Prijelaz je oštar jer je denaturacija kooperativni proces – lokalno narušavanje strukture potiče narušavanje cjelovite tercijarne strukture.

Termička stabilnost proteina određuje se mjerenjem temperature pri kojoj je 50 % ukupne količine proteina denaturirano. Ona se naziva temperaturom mekšanja i određuje se kao apscisa točke infleksije na krivulji denaturacije. Postoje različite tehnike određivanja termičke stabilnosti proteina. U najjednostavnije spada mjerenje aktivnosti proteina pri različitim temperaturama. Od ostalih se ističu cirkularni dikroizam, diferencijalna pretražna kalorimetrija, izotermalna titracijska kalorimetrija, diferencijalna pretraga raspršenjem svjetlosti i diferencijalna pretražna fluorimetrija koja će detaljnije biti opisana u sljedećem potpoglavlju.<sup>29,30</sup>

Termička stabilnost proteina ovisi o njegovoj strukturi. Proteini termofilnih organizama koji žive na neuobičajeno visokim temperaturama u blizini termalnih izvora imaju visoke temperature mekšanja. Ekstremni primjer je glutamat-dehidrogenaza iz arheje *Pyrococcus furiosus* čija temperatura mekšanja iznosi nevjerojatnih 113 °C.<sup>31</sup> Statističkom analizom proteina iz mezofilnih (žive pri temperaturi od 20 do 45 °C (ref. 32)) odnosno termofilnih organizama uočeno je da termičku stabilnost proteina u najvećoj mjeri povećavaju ionske interakcije i vodikove veze.<sup>33</sup>

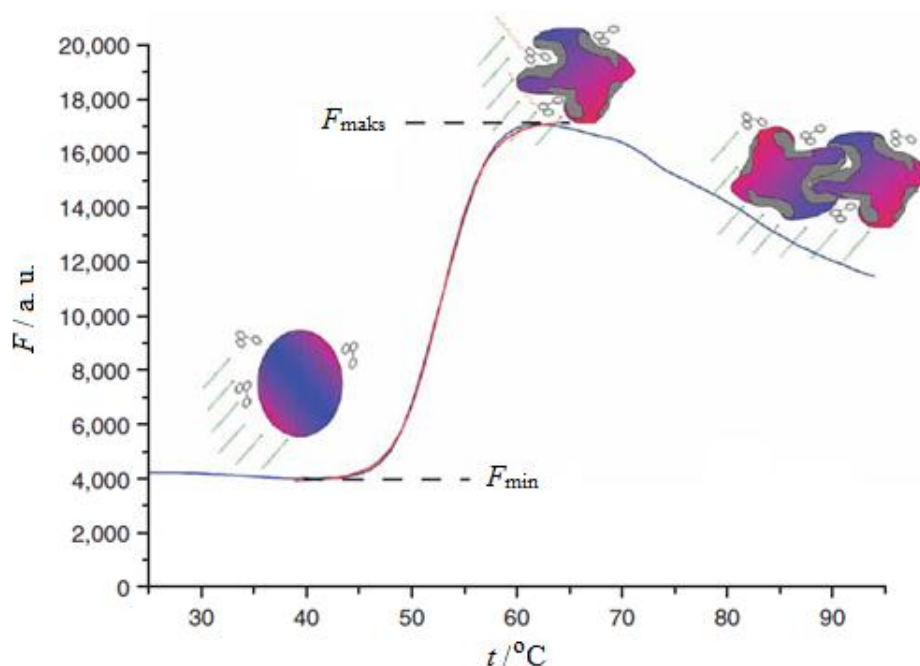
Na primjeru računalno rekonstruiranih predaka serumskih paraoksonaza,<sup>8</sup> elongacijskog faktora,<sup>9</sup> β-laktamaza<sup>10</sup> i drugih<sup>34</sup> pokazano je da drevni proteini pokazuju veću termičku stabilnost od današnjih proteina. Opaženi trend autori objašnjavaju na više načina. S jedne strane u prošlosti je temperatura na Zemlji bila viša pa su proteini u prosjeku bili stabilniji od današnjih. Nadalje, vjernost translacije i/ili transkripcije je bila manja pa je veća stabilnost proteina osiguravala da ga učestalije mutacije ne mogu destabilizirati. Dijelom je opaženi trend artefakt same metode rekonstrukcije jer se na nekim mjestima u primarnoj strukturi drevnog proteina nalazi aminokiselina koja je najzastupljenija u poravnatim sekvencama proteina (tzv.

konsenzusna aminokiselina), a otkrije je poznato da se stabilnost proteina povećava uvođenjem konsenzusnih mutacija.<sup>35</sup>

#### 2.4.2. Diferencijalna pretražna fluorimetrija

Diferencijalna pretražna fluorimetrija (engl. *differential scanning fluorimetry*, skraćeno DSF) je metoda koja omogućuje praćenje termalne denaturacije proteina putem porasta fluorescencije nepolarnog fluorofora.

Nepolarna boja koja se koristi za ovu metodu ne fluorescira u polarnom okruženju, primjerice u vodi.<sup>30</sup> Budući da je većina proteina smotana tako da su im nepolarni aminokiselinski ostaci orijentirani prema unutrašnjosti proteina, a polarni na površini, njihovom denaturacijom dolazi do izlaganja nepolarnih ostataka koji dolaze u kontakt s fluoroforom što dovodi do porasta fluorescencije. Tipični graf denaturacije proteina prikazan je na slici 11.



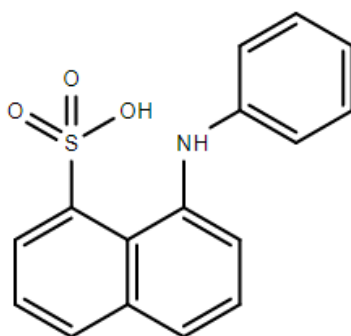
Slika 11 Krivulja denaturacije u tipičnom DSF eksperimentu uz shematski prikaz interakcije proteina s fluoroforom (SYPRO® Orange). Plavom i crvenom bojom označeni su polarni, a sivom nepolarni dijelovi proteina. Fluorofor je prikazan trima spojenim kružićima. Naznačeni su minimum i maksimum krivulje. Preuzeto i prilagođeno iz ref. 30.

Sve dok je temperatura dovoljno niska da je protein u nativnoj konformaciji, intenzitet fluorescencije je konstantan. S početkom denaturacije dolazi do povećanja intenziteta fluorescencije. Krivulja postiže maksimum u trenutku kad su sve molekule proteina potpuno razmotane i fluorofor vezan na maksimalan broj nepolarnih veznih mjesta. U tom trenutku,



uslijed van der Waalsovih interakcija između razmotanih molekula proteina dolazi do nastanka proteinskih agregata, što smanjuje broj veznih mjesta za fluorescentnu boju pa samim time i intenzitet fluorescencije. Metoda koja mjeri nastajanje proteinskih agregata i na taj način određuje termičku stabilnost proteina naziva se diferencijalna pretraga raspršenjem svjetlosti (engl. *differential scanning light scattering*).

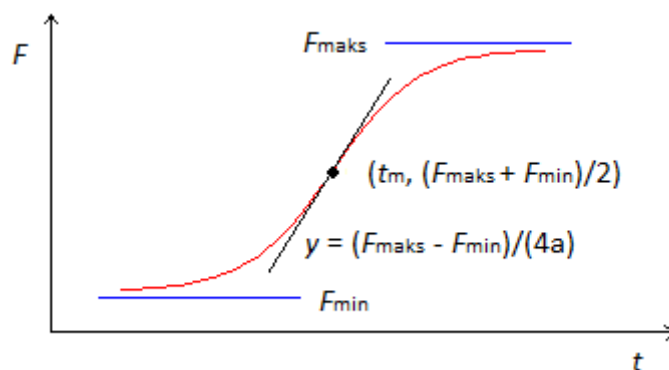
Najčešće korištene fluorescentne boje za DSF su SYPRO® *Orange* i 1-anilinonaftalen-8-sulfonska kiselina, skraćeno 1,8-ANS (Slika 12).<sup>30</sup>



Slika 12 Struktura molekule 8-anilinonaftalen-1-sulfonske kiseline (1,8-ANS).

SYPRO® *Orange* je češće korištena jer ima visok omjer signala prema pozadinskom šumu i može se koristiti u RT-PCR instrumentima pri čemu nije potrebno dodatno kalibrirati instrument jer se koristi kalibracija boje ROX™ s jednakim emisijskim maksimumom.<sup>36</sup> SYPRO® *Orange* boja ima maksimum pobude pri 492 nm, a emisije pri 610 nm.<sup>30</sup>

Točka infleksije na krivulji denaturacije odgovara temperaturi mekšanja,  $t_m$  pri kojoj je polovica molekula proteina denaturirana. Ona se može dobiti na dva načina. Određivanjem maksimuma 1. derivacije, odnosno nultočke 2. derivacije ili regresijom točaka koje se nalaze između minimuma i maksimuma intenziteta fluorescencije.



Slika 13 Graf Boltzmannove krivulje (crveno) prema jednadžbi (1) uz posebno istaknute horizontalne asimptote (plavo), točku infleksije i tangentu (crno). Naznačene su jednadžba tangente i koordinate točke infleksije.

Za nelinearnu regresiju koristi se Boltzmannova krivulja (Slika 13) dana formulom:

$$F = \frac{F_{\min} - F_{\max}}{1 + e^{(t-t_m)/a}} + F_{\max} \quad (1)$$

gdje je  $F_{\min}$  minimalni,  $F_{\max}$  maksimalni intenzitet fluorescencije,  $t_m$  temperatura mekšanja, a  $a$  skalirajući faktor koji je obrnuto proporcionalan širini skoka krivulje.

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Kemikalije

**Krutine:** agaroz (Sigma), ampicilin (Sigma), bromfenol-plavo (Serva), Coomassie Brilliant Blue G-250 (Merck), Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma), EDTA-Na<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O (Kemika, p.a.), fenol (Kemika), glicin (Fisher Scientific), gvanidinijev klorid (Carl Roth, p.a.), 2-[4-(2-hidroksietil)piperazin-1-il]etansulfonska kiselina, HEPES (AppliChem PanReac), imidazol (Sigma-Aldrich, p.p.a.), izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozid, IPTG (Roche), kanamicin-sulfat (Gibco BRL Life Technologies), KCl (Kemika, p.a.), KOH (Kemika, p.a.), K<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (Sigma), kvaščevo ekstrakt (Liofilchem), ksilencijan-ol-fluorofosfat (Serva), LB agar (Life Technologies), leucin (≥ 99.5 %, Sigma), 1,4-dimerkaptobutan-2,3-diol, ditiotretitol, DTT (Sigma), marker za agaroznu elektroforezu (GeneRuler 1 kb DNA Ladder), marker za poliakrilamidnu elektroforezu (Precision Plus Protein™ Standards Unstained), MgCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O (Kemika, p.a.), (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg · 4 H<sub>2</sub>O (Fluka, p.p.a.), natrijev dodecilsulfat, SDS (USB Corporation, ultrapure), NaCl (Gram-Mol, p.a.), CH<sub>3</sub>COONa (Gram-Mol, p.a.), NaOH (CARLO ERBA Reagents, p.a.), NaN<sub>3</sub> (Sigma), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (Fluka), NiSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O (Acros Organics, p.a.), norvalin (Sigma), fenilmetilsulfonil-fluorid, PMSF (Sigma, > 99 %), polietilenglikol 8000 (Sigma-Aldrich), N,N,N',N'-tetrametiletildiamin, TEMED (Fluka), toluidinsko modriilo (Sigma-Aldrich), tripton (Liofilchem), tris(hidroksimetil)aminometan, tris (Fisher Bioreagents), urea (Gram-Mol, p.a.), ZnCl<sub>2</sub> (Sigma)

**Tekućine:** 40 %-tni akrilamid/bisakrilamid, 19:1 (Merck), 40 %-tni akrilamid/bisakrilamid, 29,1:0,9 (AppliChem), CH<sub>3</sub>COOH, w = 99,5 % (T.T.T, p.a.), etanol, v/v = 96 % (Kefo, p.a.), etidijev bromid (Boehringer Mannheim), glicerol, redistirani, w = 100 % (Kemika, p.a.), HCl, w = 36,5 % (Kemika, p.a.), standardni puferi, pH = 4,01; 7,00; 9,21 (Mettler Toledo, tech.)

### 3.1.2. Instrumenti

Autoklav (EPSA 2000, Bari®), centrifuge (Sigma; Eppendorf; Thermo electron corporation), elektroporator (MicroPulser™ Electroporator, Bio-Rad), inkubator (DIGITHEAT, J. P. Selecta S.A.), instrument za brzo miješanje i zaustavljanje reakcije (engl. *rapid chemical quench*, KinTek RQF-3), PCR uređaj (Mastercycler® ep, Eppendorf), pH-metar (MP220 Basic pH/mV/°C Meter, Mettler Toledo), sonikator (VibraCell™, 50 Watt Model, Bioblock Scientific), spektrofotometar (Evolution™ 60S UV-Visible Spectrophotometer, Thermo Scientific), spektrofotometar (NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific), termoblok (ThermoMixer® C, Eppendorf), tresilice (Orbital Shaker 420, Thermo Forma; MaxQ 420 HP, Thermo Scientific), uređaj za agaroznu elektroforezu (EPS 600 Electrophoresis Power Supply, 120 V, Pharmacia Biotech) uređaj za RT-PCR (7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems), uređaj za sušenje uzoraka (Savant™ DNA SpeedVac™, Thermo Scientific™) UV kamera (MiniBIS Pro, DNR Bio-Imaging Systems), vaga (Electronic Balance FA-200, AND Company)

### 3.1.3. Nukleotidi i nukleinske kiseline

ATP (Sigma), smjesa dNTP-ova (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Sigma). Početnice za kružnu mutagenezu i sekvenciranje nabavljene su od komercijalnog proizvođača (Macrogen). Sljedovi nukleotida u početnicama navedeni su u tablici 2.

### 3.1.4. Proteini

Albumin iz goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumine*, BSA) (NEB), DpnI (NEB), Pfu-DNA-polimeraza s odgovarajućim 10x puferom i magnezijevim sulfatom (MgSO<sub>4</sub>) (Thermo Scientific).

### 3.1.5. Komercijalni kompleti

Kit za izolaciju plazmidne DNA iz bakterija (QIA prep® Spin Miniprep Kit, Qiagen)

### 3.1.6. Radioaktivno obilježeni spojevi

[<sup>14</sup>C]-leucin (Perkin Elmer), [<sup>32</sup>P]-PPi (Perkin Elmer), α-[<sup>32</sup>P]-ATP (Perkin Elmer)

### 3.1.7. Hranjivi mediji za uzgoj bakterija

LB medij pripremljen je otapanjem triptona ( $\gamma = 10 \text{ g dm}^{-3}$ ), kvašćevog ekstrakta ( $\gamma = 5 \text{ g dm}^{-3}$ ) i NaCl ( $\gamma = 10 \text{ g dm}^{-3}$ ) u vodi i zatim steriliziran u autoklavu 20 min na  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  uz povišen tlak. Prije velikog uzgoja u medij su dodavani antibiotici ampicilin konačne koncentracije  $100 \text{ mg dm}^{-3}$  (za ekspresiju tRNA<sup>Leu</sup> iz plazmida  $\Delta\text{pET-3a}$ ) ili kanamicin konačne koncentracije  $30 \text{ mg dm}^{-3}$  (za ekspresiju LeuRS iz plazmida pET-28a(+)).

Ploče s LB medijem pripremljene su na sljedeći način: LB agar otopljen je u vodi ( $\gamma = 37 \text{ g dm}^{-3}$ ) i steriliziran u autoklavu 20 min na  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  uz povišen tlak. U medij je zatim dodan odgovarajući antibiotik: ampicilin ( $\gamma = 100 \text{ mg dm}^{-3}$ ) ili kanamicin ( $\gamma = 30 \text{ mg dm}^{-3}$ ), a medij preliven u plastične Petrijeve zdjelice kako bi hlađenjem prešao u gel.

### 3.1.8. Bakterijski sojevi

**BL21 (DE3)** – najkorišteniji ekspresijski soj bakterije *E. coli* s genotipom  $F^- \text{ ompT hsdS}_B (r_B^- m_B^-) \text{ gal dcm (DE3)}$ .<sup>37</sup> Sadrži gen za virusnu T7-RNA-polimerazu pod kontrolom *lacUV5* promotora. Gen je u normalnim uvjetima utišan, a njegova transkripcija se potiče dodatkom izopropil- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozida (IPTG-a) u trenutku kad se bakterije nalaze u ekspanzionalnoj fazi rasta. Soj ne sadrži gene za Lon i OmpT proteaze koje bi mogle razgraditi prekomjerno eksprimirani produkt.

**DH5 $\alpha$**  – soj bakterije *E. coli* koji se koristi za kloniranje. Genotip:  $F^- \Phi 80\text{lacZ}\Delta\text{M15 } \Delta(\text{lacZYA}^- \text{argF}) \text{ U169 } \text{recA1 } \text{endA1 } \text{hsdR17} (rK^-, mK^+) \text{ phoA } \text{supE44 } \lambda^- \text{ thi-1 } \text{gyrA96 } \text{relA1}$ .<sup>38</sup> Soj ne sadrži gen za endonukleazu A ni *recA* i to ga čini posebno prikladnim za kloniranje. Endonukleaza A cijepa DNA i mogla bi utjecati na cjelovitost plazmida, a gen *recA* je potreban za homolognu rekombinaciju – njegova odsutnost osigurava da redosljed nukleotida na plazmidu ostane netaknut.

### 3.1.9. Plazmidi

**pET-28a(+)** – plazmid iz serije pET plazmida. Koristi se za prekomjernu ekspresiju proteina. Sadrži *T7lac* promotor i gen za otpornost na kanamicin.<sup>37</sup> Omogućava ekspresiju rekombinantnog proteina s privjeskom od 6 histidina na N ili C kraju. Histidinski privjesak omogućava izolaciju proteina iz ukupnog proteinskog ekstrakta Ni-NTA kromatografijom.

Nakon pročišćavanja histidinski privjesak može se ukloniti trombinom. Plazmid je korišten za prekomjernu ekspresiju EcLeuRS, odnosno AncLeuRS.

**ΔpET-3a** – derivat ekspresijskog plazmida pET-3a iz serije pET plazmida. Sadrži T7 promotor i gen za otpornost na ampicilin.<sup>37</sup> Omogućava prekomjernu ekspresiju proteina s T7-privjeskom od 11 aminokiselina na N kraju. Privjesak služi za pročišćavanje proteina na smoli na kojoj se nalaze monoklonska antitijela koja ga specifično prepoznaju. Korišten je kao transkripcijski vektor za ekspresiju tRNA<sup>Leu</sup>.

### 3.1.10. Ostalo

Kolona za odsoljavanje PD-10 (*GE Healthcare Bio-Sciences AB*), centrikoni (*Amicon® Ultra centrifugal filters, 30 000 MWCO, Milipore*), kolona za Ni-NTA kromatografiju, Ni-NTA agarozna (*Qiagen*), filter papir (*Whatman 3MM*), filter za sterilizaciju otopine s promjerom pora 0,22 μm (*Sterile Syringe Filter, Labex*), folija za mikrotitarsku pločicu (*Applied Biosystems*), mikrotitarska pločica (*Applied Biosystems*), set za agaroznu odnosno poliakrilamidnu elektroforezu (*BioRad*).

## 3.2. Metode rada s bakterijama

### 3.2.1. Elektroporacija i uzgoj prekonocne kulture sojeva bakterije *Escherichia coli*

Sojevi *E. coli* BL21 (DE3) i DH5α, uzgojeni i pripremljeni na poseban način da budu elektrokompetentni, pohranjeni su u alikvotima od 40 μl na -80 °C. Nakon dodatka otopine plazmida na elektrokompetentne stanice, smjesa se prebaci u elektrokivetu s razmakom od 2 mm i lupkanjem spusti na njezino dno. Pomoću plastičnog nastavka elektrokiveta se u pravilnoj orijentaciji namjesti između elektroda u elektroporatoru i izazove električni puls s naponom od 2,5 kV u trajanju između 5 i 6 ms. U slučaju iskrenja postupak se ponavlja s manjim volumenom smjese. Nakon elektroporacije bakterije se suspendiraju u 800 μl LB medija i inkubiraju 1 h na 37 °C. Određeni volumen bakterijske suspenzije zasadi se na ploču s LB medijem i odgovarajućim antibiotikom te inkubira preko noći na 37 °C. Idući dan zasadi se prekonocna kultura neke od naraslih izdvojenih bakterijskih kolonija na ploči.

### 3.2.2. Uzgoj prekonoćne kulture sojeva bakterije *Escherichia coli*

Prekonoćna kultura je zasićena bakterijska kultura s bakterijama u stacionarnoj fazi rasta. Mali volumen (nekoliko mililitara) LB medija s odgovarajućim antibiotikom (ampicilinom ili kanamicinom konačnih koncentracija  $100 \text{ mg dm}^{-3}$ , odnosno  $30 \text{ mg dm}^{-3}$ ) inokulira se sa željenim klonom bakterija i uzgaja se preko noći uz protresanje na  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .

## 3.3. Metode rada s nukleinskim kiselinama

### 3.3.1. Veliki uzgoj i indukcija ekspresije $tRNA^{Leu}$

Uzgoji se zasićena prekonoćna kultura BL21(DE3) stanica s plazmidom  $\Delta pET3a\_tRNA^{Leu}_{UAA}$  u LB mediju s ampicilinom. U 400 ml sterilnog LB medija doda se 1/100 volumena (4 ml) prekonoćne kulture i ampicilin konačne koncentracije  $\text{mg dm}^{-3}$ . Stanice se uzgajaju na  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  uz protresanje do  $OD_{600} = 0,4 - 0,6$  (eksponencijalna faza rasta). Indukcija ekspresije se potakne dodatkom izopropil- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozida (IPTG-a) konačne koncentracije  $1 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Indukcija traje 5 h, nakon čega se izmjeri  $OD_{600}$  i stanice spuste centrifugiranjem.

### 3.3.2. Izolacija $tRNA^{Leu}_{UAA}$

Uzgojene stanice *E. coli* soja BL21(DE3) transformirane s plazmidom  $\Delta pET3a\_tRNA^{Leu}_{UAA}$  suspendiraju se u 2 ml pufera za izolaciju tRNA ( $c$  (Tris) =  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$ , pH = 8;  $c$  (( $\text{CH}_3\text{COO}$ ) $_2\text{Mg}$ ) =  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$ ). Stanice se razore dodatkom 1 volumena fenola zasićenog vodom i protresanjem na *vortex* miješalici 8 puta u trajanju od 30 s između kojih su pauze od 30 s inkubacije na ledu kako bi se spriječilo prejako zagrijavanje smjese uslijed žustrog miješanja. Radi odvajanja slojeva u nastaloj emulziji, smjesa se centrifugira 8 min na 8000 g pri  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Gornji, većinom vodeni sloj (u kojem se nalaze nukleinske kiseline) se odvoji i doda mu se jedan volumen 1:1 (v/v) fenol-kloroforma. Smjesa se žustro miješa 1 min i slojevi odvoje centrifugiranjem 10 min na 8000 g pri  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Vodeni sloj se odvoji i doda mu se  $\frac{1}{2}$  volumena otopine polietilenglikola 8000 (PEG) i NaCl tako da konačni maseni udio PEG-a bude 7 %, a koncentracija NaCl  $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ . PEG se dodaje kako bi se smanjila topljivost velikih nukleinskih kiselina, prvenstveno genomske DNA. Smjesa se dobro promiješa i inkubira 30 min na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugira 50 min na 7000 g pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Supernatant se odvoji i  $tRNA^{Leu}$  istaloži standardnim postupkom: uz dodatak 1/10 volumena acetatnog pufera

( $c(\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}) = 3 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 5,2$ ) i 2 volumena 100 %-tnog etanola te inkubacijom 1 h na  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Talog tRNA<sup>Leu</sup> odvoji se od supernatanta centrifugiranjem na 12 000 g pri  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 3.3.3. Deacilacija i odsoljavanje tRNA<sup>Leu</sup>

Talog tRNA<sup>Leu</sup> otopi u 5 ml pufera ( $c(\text{Tris}) = 200 \text{ mmol dm}^{-3}$ , titriran s HCl do  $\text{pH} = 9$ ) i inkubira 1 h na  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  radi hidrolize Leu-tRNA<sup>Leu</sup>. Deacilacija se zaustavlja dodatkom octene kiseline tako da konačni pH bude 5, a tRNA<sup>Leu</sup> istaloži standardnim postupkom (potpoglavlje 3.3.2). Nakon otapanja u 1 ml vode, tRNA<sup>Leu</sup> se odsoli i prevede u pufer za skladištenje ( $c(\text{HEPES}) = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$ , titriran s KOH do  $\text{pH} = 7$ ;  $c(\text{KCl}) = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) na PD-10 koloni uz ponešto izmijenjene upute proizvođača.<sup>39</sup> Kolona se najprije uravnoteži s 25 ml pufera za skladištenje, zatim se nanese 1 ml uzorka pa 1,5 ml pufera. Uzorak se eluira s puferom u frakcijama od 2 ml (F1), dva puta po 1 ml (F2 i F3). Frakcijama se spektrofotometrijski odredi koncentracija tRNA i glavna frakcija pohrani na  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 3.3.4. Metoda renaturacije tRNA<sup>Leu</sup>

Izolirana tRNA<sup>Leu</sup> je nakon ekstrakcije s fenol-kloroformom denaturirana, zato ju je potrebno renaturirati prije uporabe u kinetičkim eksperimentima. Otopina tRNA<sup>Leu</sup> zagrijava se 2 min na  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  i u vruću otopinu doda otopina  $\text{MgCl}_2$  do konačne koncentracije  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Smjesa se potom ohladi na ledu.

### 3.3.5. Kružna mutageneza

Kružna mutageneza korištena je u svrhu inaktivacije domene za popravak u kojoj važnu ulogu imaju dvije važne aminokiseline treonin 252 i aspartat 345. U ovom diplomskom radu promijenjene su obje aminokiseline kako bi se potpuno onemogućio popravak pogreške u AncLeuRS. Radi toga su provedene dvije uzastopne mutageneze. Za mutaciju treonina (T) u arginin (R), kodon ACT promijenjen je u CGT, a za mutaciju aspartata (D) u alanin (A), kodon GAC u GCC (Tablica 2). S obzirom da je za mutaciju T252R potrebna promjena dvaju nukleotida, odgovarajuća nizvodna (engl. *forward*, F) i uzvodna (*reverse*, R) početnica su duže kako bi se nadoknadio manjak komplementarnosti u sredini.



**Tablica 2** Karakteristike početnica korištenih za uvođenje mutacija T252R i D345A u kodirajućem slijedu za drevnu leucil-tRNA-sintetazu. Slova F i R u nazivu početnice odnose se na engleske izraze *forward primer* (nizvodna početnica) i *reverse primer* (uzvodna početnica). Podaci o temperaturi mekšanja dobiveni su od komercijalnog dobavljača početnica (*Macrogen*). Crvenim slovima označeni su nukleotidi koji se razlikuju od nukleotida u kodirajućem slijedu, a podebljano je označen promijenjeni kodon.

Početnica	$T_m / ^\circ\text{C}$	$x (\text{G, C}) / \%$	Nukleotidni slijed
T252R_F	75,0	54,84	CCACTCGCCCAGAT <b>CGT</b> TTTTATGGGAGTGA
T252R_R	75,0	54,84	GTCACTCCCATAAAA <b>CGAT</b> CTGGGCGAGTG
D345A_F	71,0	57,69	CATGACCAGCGTG <b>CCT</b> GGGAATTTGC
D345A_R	71,0	57,69	GCAAATTCCCAG <b>G</b> CACGCTGGTCATG

Za prvi krug kružne mutageneze pripremljene su 4 reakcijske smjese svaka volumena 30  $\mu\text{l}$ . Sve četiri sadrže *Pfu* pufer s  $\text{MgSO}_4$ , smjesu dNTP-ova ( $c = 0,2 \text{ mmol dm}^{-3}$ ), 18 ng kalupa pET-28a(+)\_AncLeuRS i 1,2 U *Pfu*-DNA-polimeraze (U je jedinica aktivnosti, engl. *activity unit*). Prve dvije reakcijske smjese sadrže samo navedeno (negativne kontrole), treća sadrži F i R početnicu za uvođenje mutacije D345A, a četvrta F i R za mutaciju T252R. Koncentracija pojedine početnice u smjesi je  $0,5 \mu\text{mol dm}^{-3}$ .

Na uređaju za PCR namjesti se program prikazan u tablici x. Vrijeme polimerizacije određeno je prema informacijskom letku dobivenom uz *Pfu*-DNA-polimerazu (*Thermo Scientific*) uz dodatak 2 min s obzirom da je plazmid dosta velik: na prve 2 kb kalupa vrijeme ekstenzije se računa kao 2 min/kb, a kasnije 1 min/kb. Budući da je veličina plazmida pET-28a(+)\_AncLeuRS 7,885 kb, zaokruženo 8 kb, vrijeme polimerizacije iznosi 12 min.

**Tablica 3** Koraci u programu uređaja za PCR za metodu kružne mutageneze.

korak	$t / ^\circ\text{C}$	trajanje	
početna denaturacija	95	2:30	
denaturacija	95	0:30	15 ciklusa
sljepljivanje početnica	55	0:30	
polimerizacija	72	12:00	
završna polimerizacija	72	10:00	
kraj	4	$\infty$	

Nakon završetka mutageneze, u prvu, treću i četvrtu reakcijsku smjesu doda se 10 U enzima *DpnI* i smjesa inkubira 1 h na  $37 ^\circ\text{C}$ . Prema uputama proizvođača (*NEB*), jedinica aktivnosti enzima *DpnI* definirana je kao količina enzima potrebna da bi razgradila 1  $\mu\text{g}$  plazmida pBR322

DNA (metiliranog Dam-metilazom) inkubacijom 1 h pri 37°C u reakcijskoj smjesi volumena 50 µl. S obzirom da reakcijska smjesa sadrži količinu DNA manju od 1 µg, količina dodanog enzima je u velikom suvišku.

Kako bi se ispitalo djelovanje enzima u *Pfu* puferu u odnosu na njegov optimalni pufer *Cut Smart* provedena je restrikcijska razgradnja plazmida pET-28a(+)\_AncLeuRS u jednom odnosno drugom puferu, a rezultati analizirani agaroznom elektroforezom.

Nakon restrikcijske razgradnje, elektroporira se BL21 (DE3) soj *E. coli* s 3,2 µl reakcijske smjese (elektroporacija opisana u potpoglavlju 3.2.1). Nasumično se odaberu izdvojene kolonije na pločama, zasadi prekonoćna kultura (potpoglavlje 3.2.2) i izolira plazmidna DNA (potpoglavlje 3.3.5). Uspješnost mutageneze provjerava se Sangerovim sekvenciranjem u servisu tvrtke *Macrogen*.

U drugom krugu mutageneze kao kalup je uzet plazmid za koji je sekvenciranjem utvrđeno da sadrži mutaciju. Radi povećanja prinosa, volumen reakcijske smjese povećan je na 50 µl. Pripremljene su tri reakcijske smjese. Sve sadrže *Pfu* pufer s MgSO<sub>4</sub>, smjesu dNTP-ova ( $c = 0,2 \text{ mmol dm}^{-3}$ ), 30 ng kalupa i 2 U *Pfu*-DNA-polimeraze, a treća dodatno F i R početnicu (konačne koncentracije 0,5 µmol dm<sup>-3</sup>) za uvođenje druge mutacije. Parametri u PCR programu ostaju isti (Tablica 3). Nakon mutageneze, u prvu i treću smjesu je dodano 10 U *DpnI* i smjese inkubirane 1,5 h na 37 °C. Iz nastale smjese se zatim izolira plazmidna DNA ekstrakcijom s fenol-kloroformom i standardnim postupkom taloženja (potpoglavlje 3.3.2). Izolirana DNA se posuši 70 %-tnim etanolom i otopi u 10 µl Re H<sub>2</sub>O. Sa po 5 µl se elektroporiraju DH5α odnosno BL21 (DE3) stanice (potpoglavlje 3.2.1). Na ploče se nasadi 350 µl kulture, a kad narastu bakterije odaberu se nasumični klonovi, zasade njihove prekonoćne kulture i odgovarajući izolirani plazmidi pošalju na sekvenciranje.

### 3.3.6. Izolacija plazmidne DNA

Plazmidna DNA izolira se uz komercijalni set za izolaciju plazmidne DNA prema uputama proizvođača (*Qiagen*) iz stanica dobivenih centrifugiranjem iz 3 ml zasićene prekonoćne kulture

### 3.3.7. Agarozna elektroforeza

Uzorci nukleinskih kiselina analiziraju se elektroforezom na 1 %-tnom agaroznom gelu. Gel je pripremljen zagrijavanjem suspenzije agaroze u TAE puferu s etidijevim bromidom ( $c(\text{Tris}) =$

40 mmol dm<sup>-3</sup>, titriran octenom/acetatnom kiselinom do pH = 8,  $c(\text{EDTA}) = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma(\text{EtBr}) = 0,5 \text{ mg dm}^{-3}$ ) tako da maseni udio agaroze bude 1 %. Otopina je nakon kraćeg hlađenja izlivena u lađicu s plastičnim češljicima gdje je ostavljena da hlađenjem prijeđe u želatinozni gel. Nastali gel stavi se u kadicu za elektroforezu tako da pozitivna elektroda bude na suprotnom kraju od jažica. Kadica se napuni TAE puferom s etidijevim bromidom tako da razina pufera bude odmah iznad gela.

Uzorci u koje je dodana 1/10 volumena pufera za nanošenje uzoraka ( $\gamma(\text{ksilencijanolf-fluorofosfat}) = 2,5 \text{ g dm}^{-3}$ ,  $\gamma(\text{bromfenol-plavo}) = 2,5 \text{ g dm}^{-3}$ ,  $c(\text{EDTA}) = 0,07 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\varphi(\text{glicerol}) = 30 \%$ , pH = 8) nanese se redom u jažice i elektroforeza pokrene postavljanjem napona od 80 V ili 120 V, ovisno o veličini kadice za elektroforezu. Elektroforeza je gotova kad boja bromfenol-plavo dođe do kraja gela. Pruge nukleinskih kiselina na gelu vizualiziraju se uz pomoć UV kamere.

### 3.3.8. Poliakrilamidna elektroforeza u prisutnosti ureje – provjera čistoće tRNA<sup>Leu</sup>

Priredi se 8 %-tni poliakrilamidni gel s urejom koncentracije 8 mol dm<sup>-3</sup> u TBE puferu ( $c(\text{Tris}) = 90 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{H}_3\text{BO}_3) = 90 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{EDTA}) = 2 \text{ mmol dm}^{-3}$ , pH = 8,0). Polimerizacija se potakne dodatkom (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> i N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED-a). Otopina se ulije između stakalca razmaknutih 0,75 mm i ostavi da polimerizira. Stakalce s polimeriziranim gelom se umetne u držač, postavi u kadicu za elektroforezu i ulije TBE pufer. Prvih 15 min postavi se napon od 180 V bez da su na gel nanese uzorci (engl. *pre-run*). Uzorci, pročišćena tRNA<sup>Leu</sup> i ukupna RNA iz *E. coli* koja služi kao marker, pomiješani s 1 volumenom pufera za nanošenje ( $\gamma(\text{urea}) = 8 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\gamma(\text{bromfenol-plavo}) = 2 \text{ g dm}^{-3}$ ,  $\gamma(\text{ksilencijanolf-fluorofosfat}) = 2 \text{ g dm}^{-3}$ ,  $c(\text{EDTA}) = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$ , pH = 8,0) i zagrijani 5 min na 95 °C nanese se u jažice prethodno isprane puferom kako bi se maknula gusta otopina ureje. Elektroforeza se odvija uz napon od 180 V dok boja ne dođe do kraja. Gel se zatim 20-ak min boja u toluidinskom modrilu, a nespecifično vezana boja ukloni namakanjem gela 10 min u kipućoj vodi.

### 3.3.9. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije tRNA<sup>Leu</sup> i DNA

Koncentracija nukleinskih kiselina u uzorku određena je na spektrofotometru *NanoDrop 1000*. Sve nukleinske kiseline apsorbiraju u UV području s maksimumom apsorbancije pri valnoj duljini 260 nm. Za određivanje masene koncentracije DNA i RNA u otopini odabere se opcija

„DNA-50“ odnosno „RNA-40“. <sup>40</sup> Granice osjetljivosti instrumenta za određivanje koncentracije dvolančane DNA su 2-3700 ng  $\mu\text{l}^{-1}$ , a RNA 2-3000 ng  $\mu\text{l}^{-1}$ .

### 3.4. Metode rada s proteinima

#### 3.4.1. Veliki uzgoj i indukcija ekspresije leucil-tRNA-sintetaze

U LB medij doda se 1/100 volumena zasićene prekonoćne kulture *E. coli* soj BL21(DE3) transformirane s plazmidom pET-28a(+)\_LeuRS (LeuRS ovdje predstavlja leucil-tRNA-sintetazu, bilo drevnu bilo iz *E. coli*, sa ili bez mutacije T252R/D345A), kanamicin konačne koncentracije 30 mg  $\text{dm}^{-3}$  i otopinu  $\text{ZnCl}_2$  konačne koncentracije 0,1 mmol  $\text{dm}^{-3}$ . EcLeuRS sadrži cinkov ion sa strukturnom ulogom.<sup>22</sup> Stoga se dodatkom  $\text{ZnCl}_2$  osigurava dovoljna količina cinka za prekomjerno eksprimirani protein. Stanične kulture uzgajaju se na tresilici pri 37 °C do  $\text{OD}_{600} = 0,4-0,8$ , nakon čega se potakne ekspresija LeuRS dodatkom IPTG-a konačne koncentracije 0,3 mmol  $\text{dm}^{-3}$ . Indukcija traje 3 h, nakon čega se izmjeri  $\text{OD}_{600}$  i stanice spuste centrifugiranjem.

#### 3.4.2. Sonikacija stanica

Stanice se suspendiraju u puferu za lizu ( $c(\text{NaCl}) = 500 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{Tris}) = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{imidazol}) = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$ , titriran s HCl do pH = 8). Neposredno prije sonikacije doda im se fenilmetilsulfonil-fluorid (PMSF) konačne koncentracije 1 mmol  $\text{dm}^{-3}$  i  $\beta$ -merkaptetoetanol konačne koncentracije 7,5 mmol  $\text{dm}^{-3}$ . PMSF je ireverzibilni inhibitor serinskih proteaza kao što su kimotripsin, tripsin i trombin.<sup>41</sup> Njegov dodatak sprječava proteolitičku razgradnju prekomjerno eksprimiranog proteina.  $\beta$ -merkaptetoetanol reducira disulfidne veze u proteinima. Oba reagensa su nestabilna u vodenim otopinama i zato se u reakcijsku smjesu dodaju na kraju. Bakterijske suspenzije soniciraju se 12 puta u trajanju 30 s, s pauzama od 30 s inkubacije na ledu da bi se spriječilo pretjerano zagrijavanje uzorka. Ostaci bakterijskih membrana odvoje se od staničnog ekstrakta centrifugiranjem 30 min na 18 000 g pri 4 °C. Supernatant se odvoji od taloga i protisne kroz filter za sterilizaciju s veličinom pora 0,22  $\mu\text{m}$ .

### 3.4.3. Afinitetna kromatografija na Ni-NTA agarozu

Kolona za afinitetnu kromatografiju napuni se suspenzijom Ni-NTA agaroze u 20 %-tnom etanolu. Volumen kolone ovisi o količini proteina u proteinskom ekstraktu. Prema literaturi kapacitet smole iznosi 5-10 mg proteina/ml.<sup>4</sup> Ovisno o vrijednosti OD<sub>600</sub> izmjerenoj nakon indukcije prilagođen je volumen smole. Tako je primjerice za stanice iz 1200 ml stanične kulture s OD<sub>600</sub> = 1,5 odabran volumen smole od 3 ml. Nakon punjenja, kolona volumena 3 ml isprana je s:

- 2 x 4 ml ReH<sub>2</sub>O,
- 3 x 6 ml pufera A ( $c(\text{NaCl}) = 500 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{Tris}) = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{imidazol}) = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\beta\text{-merkaptetoanol}) = 7,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ , titriran s HCl do pH = 8).

Na kolonu se zatim nanese stanični ekstrakt, skupi nevezana frakcija i kolona ispere s:

- 3 x 3,2 ml pufera A,
- 7 x 4 ml pufera B ( $c(\text{NaCl}) = 500 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{Tris}) = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{imidazol}) = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\beta\text{-merkaptetoanol}) = 7,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ , titriran s HCl do pH = 8).

Ispiranje uklanja nespecifično vezane proteine sa smole. Nakon ispiranja, LeuRS je eluirana s puferom C ( $c(\text{NaCl}) = 500 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{Tris}) = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{imidazol}) = 200 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\beta\text{-merkaptetoanol}) = 7,5 \text{ mmol dm}^{-3}$  titriran s HCl do pH = 8) i proteinske frakcije F1-5 skupljene u obrocima: 2 x 1 ml, 5 ml, 2 x 2 ml.

### 3.4.4. Određivanje koncentracije proteina Bradfordovom metodom

Koncentracija proteina u frakcijama F1-F5 orijentacijski je određena tzv. *spot* testom. Iz svake frakcije uzet je alikvot od 1,5  $\mu\text{l}$  i pomiješan sa 100  $\mu\text{l}$  Bradfordovog reagensa ( $\gamma$  (*Coomassie Brilliant Blue G-250*) = 0,1 g dm<sup>-3</sup>,  $\varphi(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 5 \%$ ,  $\varphi(\text{H}_3\text{PO}_4) = 8,5 \%$ ). Smjesa u kojoj ima proteina poprima svijetloplavu boju, a ona koja ga nema ostaje smeđa. Frakcija s najvećom koncentracijom proteina naziva se glavnom frakcijom.

### 3.4.5. Odsoljavanje proteina

Glavna frakcija odsoljena je i prevedena u pufer 0 ( $c(\text{NaCl}) = 500 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{Tris}) = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\beta\text{-merkaptetoanol}) = 7,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ , titriran s HCl do pH = 8) na PD-10 koloni prema uputama proizvođača.<sup>39</sup>

### 3.4.6. Uklanjanje Leu-AMP iz aktivnog mjesta LeuRS

Otopini LeuRS spektrofotometrijski se odredi koncentracija i puferom 0 razrijedi na 1 mg/ml. Radi micanja Leu-AMP iz aktivnog mjesta dodaju joj se otopine MgCl<sub>2</sub> i K<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> konačnih koncentracija 4 odnosno 2 mmol dm<sup>-3</sup> i smjesa inkubira 30 min na sobnoj temperaturi. Važno je da su koncentracije MgCl<sub>2</sub> i K<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> točne kako ne bi došlo do taloženja Mg<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>.

Dodatak pirofosfata u suvišku pomiče reakciju:



ulijevo na taj način potičući disocijaciju leucil-adenilata. Dodatak MgCl<sub>2</sub> važan je jer su Mg<sup>2+</sup> ioni kofaktor u gornjoj reakciji.

Ni-NTA kolona uravnoteži se s puferom 0 i nanese proteinski uzorak koji se zatim ispere s 10 volumena kolone puferom A koji dodatno sadrži MgCl<sub>2</sub> koncentracije 2 mmol dm<sup>-3</sup> i K<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> koncentracije 4 mmol dm<sup>-3</sup>, a zatim s 10 volumena kolone puferom A. Prvo ispiranje uklanja Leu, ATP i Leu-AMP s proteina, a drugo pirofosfat. Nakon ispiranja protein se eluira s puferom C.

### 3.4.7. Odsoljavanje i koncentriranje proteina

Proteinska frakcija prevede se u pufer za skladištenje (*c* (HEPES) = 50 mmol dm<sup>-3</sup>, *c* (KCl) = 100 mmol dm<sup>-3</sup>, *φ* (glicerol) = 10 %, titriran s KOH do pH = 7,5) na koloni PD-10 prema uputama proizvođača.<sup>39</sup> U odsoljenu otopinu doda se 1,4-dimerkaptobutan-2,3-diol (trivijalnog imena ditiotretitol, DTT) do konačne koncentracije 4 mmol dm<sup>-3</sup> i otopina koncentrira pomoću centrikona prema uputama proizvođača.

### 3.4.8. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina određena je spektrofotometrijski na uređaju *NanoDrop* 1000. Aromatske aminokiseline triptofan i tirozin apsorbiraju UV zračenje s maksimumom apsorpcije pri valnoj duljini od 280 nm.

*Tablica 4* Molarna masa, molarni apsorpcijski koeficijent i izoelektrična točka određeni su prema sekvencama proteina s histidinskim privjeskom uz pomoć alata na internetskoj stranici <http://web.expasy.org/protparam/>.

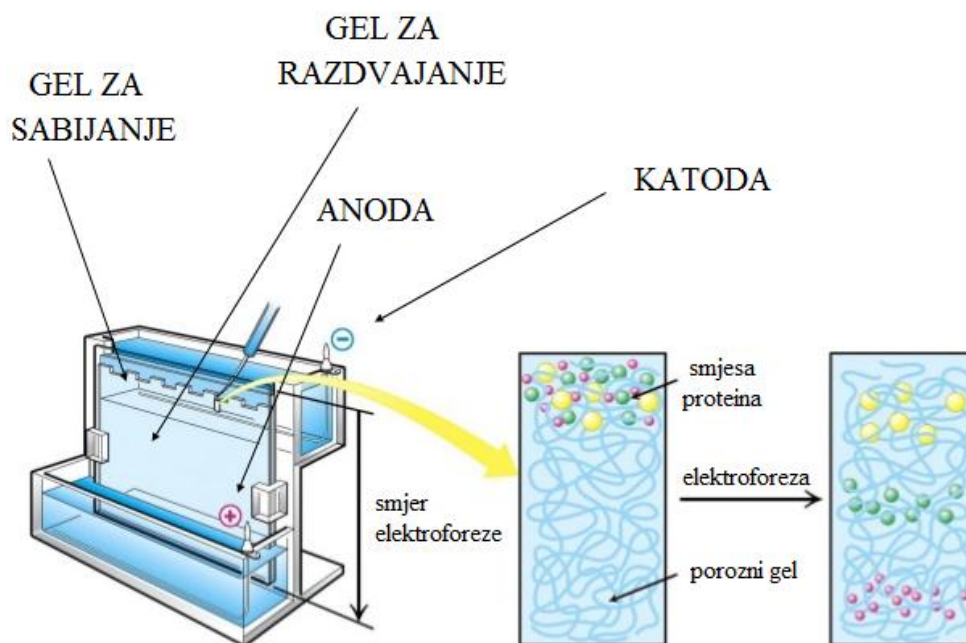
Naziv proteina	<i>m</i> <sub>r</sub> / Da	<i>ε</i> / dm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	pI <sub>teor</sub>
<b>AncLeuRS</b>	99 534,28	180 140	5,45
<b>EcLeuRS</b>	99 686,43	169 765	5,38

U program se unese molarna masa i molarni apsorpcijski koeficijent proteina (Tablica 4) i on automatski izračunava masenu koncentraciju.

### 3.4.9. Poliakrilamidna elektroforeza uz dodatak natrijeva dodecilsulfata

Za potrebe poliakrilamidne elektroforeze s dodatkom natrijeva dodecilsulfata (engl. *sodium dodecyl sulphate – polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) pripremaju se dvije vrste gela: gel za sabijanje i gel za razdvajanje uzoraka. Kao što im i nazivi govore, razlikuju se prema funkciji i postotku akrilamida/bisakrilamida. U gelu za sabijanje kroz koji uzorci najprije prolaze, svi uzorci se sabijaju kako bi krenuli s iste početne pozicije i kako uslijed difuzije ne bi stvarali široke pruge. Gel sadrži 4 %-tni akrilamid/bisakrilamid i pufer za razdvajanje ( $c(\text{Tris}) = 0,125 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\gamma(\text{SDS}) = 1 \text{ g dm}^{-3}$ , titriran s HCl do pH = 8,8).

Nakon što su prošli gel za sabijanje, proteinski uzorci dolaze na gel za razdvajanje koji je gušći i služi za odvajanje proteina. Tek u njemu dolazi do razlike u brzini migracije različitih proteina (Slika 14). Gel za sabijanje sadrži 8 %-tni akrilamid/bisakrilamid i pufer za razdvajanje ( $c(\text{Tris}) = 0,375 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\gamma(\text{SDS}) = 1 \text{ g dm}^{-3}$ , titriran s HCl do pH = 6,8). Polimerizacija obaju gelova potiče se dodatkom  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  i TEMED-a.



Slika 14 Shema kadice za SDS-PAGE (lijevo) i principa na kojemu dolazi do razdvajanja makromolekula (desno). Gel za razdvajanje nalazi se iznad gela za sabijanje i sadrži manji postotak poliakrilamida, uzorci njime najprije prolaze. Veći proteini kreću se sporije od manjih. Preuzeto i prilagođeno iz ref. 1.

Gelovi se uliju između stakalca razmaknutih za 0,75 mm, tako da najprije polimerizira gel za razdvajanje, a zatim iznad njega gel za sabijanje na kojem se jažice formiraju pomoću odgovarajućeg češljica (Slika 14).

Prije nanošenja uzoraka, potrebno normirati njihovu količinu kako bi se uzorci iz različitih jažica mogli međusobno uspoređivati i kako ih se ne bi nanijelo premalo ili previše. Ukupne stanice (smjesa stanica i proteinskog ekstrakta dobivena sonikacijom), talog stanica, proteinski ekstrakt i nevezana frakcija, dobivene tijekom pročišćavanja proteina, normiraju se na isti način. U jažicu se nanosi ona količina stanica koja suspendirana u 1 ml vode ima  $OD_{600} = 0,1$ . U izračunu količine koristi se vrijednost  $OD_{600}$  izmjerena u proteinskom uzorku nakon indukcije (potpoglavlje 3.4.1).

Proteinski uzorci se pripreme za elektroforezu miješanjem s 1/3 volumena pufera za nanošenje ( $c$  (Tris) = 0,25 mol  $dm^{-3}$ ,  $\varphi$  ( $\beta$ -merkaptotanol) = 5 %,  $\gamma$  (bromfenol plavo) = 0,1 g  $dm^{-3}$ ,  $\varphi$  (glicerol) = 30 %,  $w$  (SDS) = 5 %) i zagrijavanjem 5 min na 95 °C. Nakon grijanja, uzorci se spuštaju na dno tubice kratkim centrifugiranjem kako bi se osiguralo nanošenje ukupnog uzorka na gel. U prvu jažicu nanosi se marker *Precision Plus Protein™ Standards Unstained*, a zatim redom ostali uzorci. Elektroforeza se provodi u otopini za SDS-poliakrilamidnu elektroforezu ( $\gamma$  (glicin) = 14,4 g  $dm^{-3}$ ,  $\gamma$  (Tris) = 3,03 g  $dm^{-3}$ ,  $\gamma$  (SDS) = 1 g  $dm^{-3}$ ) 15 min na 130 V, a zatim na 200 V dok boja bromfenol plavo ne dođe do kraja gela. Nakon što je elektroforeza gotova, gelovi se 20-ak min boje u otopini *Coomassie Brilliant Blue R-250* ( $w$  (*Coomassie Brilliant Blue R-250*) = 0,25 %,  $\varphi$  ( $C_2H_5OH$ ) = 45 %,  $\varphi$  ( $CH_3COOH$ ) = 10 %), a nespecifično vezana boja ukloni se u kipućoj vodi.

### 3.5. Metode istraživanja termičke stabilnosti proteina

#### 3.5.1. Diferencijalna pretražna fluorimetrija

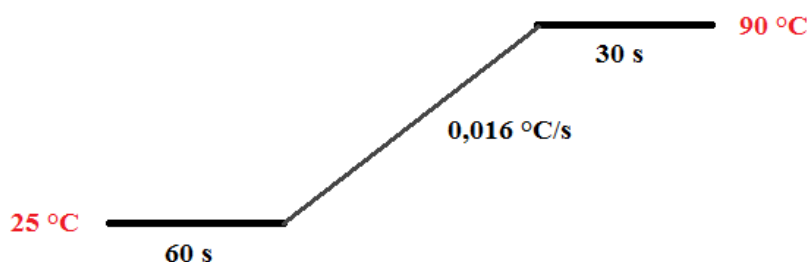
Početnim setom mjerenja odabrane su dvije kombinacije koncentracije proteina i boje *SYPRO® Orange* (nepoznate ishodne koncentracije, prema uputama proizvođača ukoncentrirana 5000 x) s najvećim odzivom instrumenta: 0,1 mg  $cm^{-3}$  i 10 x, odnosno 0,25 mg  $cm^{-3}$  i 5 x. Mjerenja su napravljena u puferu za DSF ( $c$  (KCl) = 150 mmol  $dm^{-3}$ ,  $c$  (HEPES) = 100 mmol  $dm^{-3}$ , pH = 7,5) koji treba biti pažljivo odabran tako da mu pH malo varira u temperaturnom području od 25 do 90 °C unutar kojeg su provedena mjerenja. Tris pufer kod kojeg se pH smanjuje za 1,8 između krajnjih vrijednosti u intervalu nije prikladan.<sup>30,42</sup> Naprotiv tome, pH pufera HEPES



smanjuje se za 1, što je još uvijek unutar puferuskog područja ( $pK_a \pm 1$ ), i prigodniji je za uporabu.

Otopina pojedinog proteina i boje SYPRO® Orange u puferu za DSF alikvotira se po 20  $\mu$ l u jažice mikrotitarske pločice kako bi se dobilo više replika u jednom mjerenju. Pločica se nadsloji posebnom prozirnom folijom tako da bude ravnomjerno zalijepljena i kako se ne bi odljepljivala tijekom zagrijavanja. Važno je da otopine u jažicama budu na samom dnu. U slučaju da negdje postoji mjehurić zraka, postoji opasnost da se temperatura u toj jažici nejednoliko mijenja tijekom eksperimenta pa je pločicu potrebno kratko centrifugirati.

U programu u kojem se namještaju uvjeti eksperimenta, namjestite se sljedeće postavke: *Experiment type: melt curve, Mode: standard, Ramp Rate: 1 %, Reporter Dye: ROX™, Quencher: none, Passive reference: none.* Kalibracija boje SYPRO® Orange nije potrebna jer koristi kalibraciju boje ROX™.<sup>43</sup> Temperatura se mijenja prema shemi prikazanoj na slici 15.



Slika 15 Shema promjene temperature tijekom DSF eksperimenta uz naznačeno vrijeme zadržavanja na početnoj i konačnoj temperaturi kao i brzinu promjene temperature (engl. *ramp rate*).

Nakon provedbe eksperimenta, dobiveni podaci se obrade u programu *Origin*.

### 3.5.2. Termička denaturacija\*

Priredeno je 6 – 8 otopina EcLeuRS odnosno AncLeuRS koncentracije 70 nmol dm<sup>-3</sup> u puferu sastava:  $c$  (HEPES) = 100 mmol dm<sup>-3</sup> – titriran s KOH do pH = 7,5,  $c$  (BSA) = 0,1 mg cm<sup>-3</sup>,  $c$  (KCl) = 150 mmol dm<sup>-3</sup>,  $c$  (DTT) = 4 mmol dm<sup>-3</sup>. Otopine su zagrijane na stalne temperature u rasponu od 40 do 60 °C 30 min u uređaju za PCR uz primjenu gradijentnog zagrijavanja. Nakon zagrijavanja, smjese se ohlade na ledu i uzme im se alikvot iz kojeg se priredi reakcijska smjesa sastava:  $c$  (LeuRS) = 5 nmol dm<sup>-3</sup>,  $c$  (tRNA<sup>Leu</sup>) = 15-20  $\mu$ mol dm<sup>-3</sup>,  $c$  ([<sup>14</sup>C]-Leu) = 100  $\mu$ mol

\* Mjerenja s radioaktivnom aminokiselinom proveo je doc. dr. sc. Marko Močibob.

dm<sup>-3</sup>. Reakcijskoj smjesi odredi se početna brzina nastanka [<sup>14</sup>C]-Leu-tRNA<sup>Leu</sup> u uvjetima ustaljenog stanja – mjera aktivnosti enzima. Početna brzina ukupne aminoacilacije smjesa na različitim temperaturama podijeli se s početnom brzinom za smjesu na 40 °C i tako dobije relativna aktivnost ( $A_{rel}$ ) enzima pri svakoj temperaturi ( $t$ ). Nelinearnom regresijom dobivenih točaka u programu *GraphPad Prism* dobivena je krivulja denaturacije prema jednadžbi:

$$A_{rel} = A_{min} + \frac{A_{maks} - A_{min}}{1 + 10^{a(T_{50}-t)}} \quad (2)$$

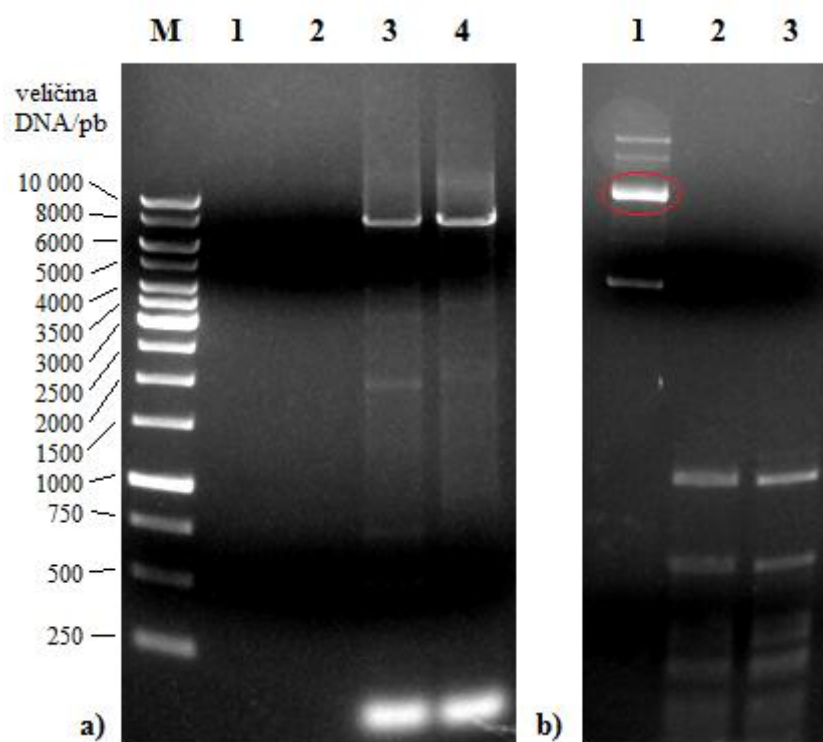
gdje je  $A_{min}$  najmanja, a  $A_{maks}$  maksimalna relativna aktivnost,  $a$  skalirajući faktor, a  $T_{50}$  temperatura pri kojoj je relativna aktivnost enzima 50 %, ujedno i temperatura mekšanja. Krivulja je slična Boltzmannovoj krivulji prikazanoj na slici 13.

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Kružna mutageneza

Kako bi se uvele mutacije T252R i D345A u domeni za popravak AncLeuRS, potrebno je napraviti dvije uzastopne kružne mutageneze (detaljno opisane u potpoglavlju 3.3.5). Uspješnost svakog kruga provjerava se sekvenciranjem u servisu tvrtke *Macrogen*. Za sekvenciranje su upotrijebljene početnice koje okružuju područje u plazmidu u kojem se nalaze obje aminokiseline.

Reakcijske smjese nakon prvog kruga mutageneze, prije razgradnje s restriktivskim enzimom *DpnI*, analizirane su agaroznom elektroforezom (Slika 16 a).



Slika 16 a) Provjera prvog kruga mutageneze agaroznom elektroforezom. **M** – marker s naznačenim veličinama DNA (*GeneRuler 1 kb DNA Ladder*), **1, 2** – negativne kontrole, smjese bez dodatka mutiranih početnica, **3** – smjesa s nizvodnom i uzvodnom početnicom za uvođenje mutacije D345A, **4** – smjesa s nizvodnom i uzvodnom početnicom za uvođenje mutacije T252R. Vidljive su pruge u uzorcima 3 i 4 koje veličinom odgovaraju očekivanom produktu mutageneze (7885 pb). U donjem dijelu vidljivi su dimeri početnica. b) Provjera aktivnosti restriktivskog enzima *DpnI*. **1** – otopina plazmida pET-28a(+)\_AncLeuRS, negativna kontrola, **2** – razgradnja plazmida enzimom *DpnI* u puferu *CutSmart*®, **3** – razgradnja plazmida enzimom *DpnI* u puferu *Pfu*. Pruga koja odgovara plazmidu (označena crveno) nije vidljiva u drugim dvjema uzorcima. Nasuprot tome, u uzorcima 2 i 3 vidljivi su produkti restriktivske razgradnje.

U negativnim kontrolama očekivano nema pruge produkta – količina kalupa pET-28a(+)\_AncLeuRS u uzorcima 1 i 2 (4,8 ng) premala je da bi se vidjela na gelu. Nasuprot tome,

u uzorcima 3 i 4 vidljive su pruge koje se nalaze blizu oznake 8 kb, što odgovara veličini očekivanog plazmida (7885 pb).

Nakon elektroporacije bakterija *E. coli* soja DH5 $\alpha$  smjesama 3 i 4, na pločama nisu narasle kolonije. Elektroporacija BL21 (DE3) soja daje bolje rezultate, ali broj naraslih kolonija je još uvijek mali. Iz šest nasumično odabranih kolonija, plazmid samo jedne sadrži odgovarajuću mutaciju (T252R). To nije u skladu s očekivanim brojem kolonija koje sadrže mutaciju (80 % prema uputama za *QuikChange*<sup>TM</sup> ciljanu mutagenezu). Međutim, plazmid pET-28a(+)\_AncLeuRS s veličinom od skoro 8 kb ubraja se u veće plazmide kod kojih efikasnost mutageneze nije zagarantirana.<sup>24</sup> Budući da je potvrđena aktivnost enzima *DpnI* u *Pfu* puferu (Slika 16 b), lažni pozitivni nisu rezultat njegove nedjelotvornosti. Još jedna potvrda aktivnosti enzima je prazna ploča negativne kontrole u koju je dodan *DpnI* (Slika 17). S obzirom da je negativna kontrola prije restrikcijske razgradnje sadržavala samo metilirani plazmid, odsutnost bakterija na ploči potvrđuje da je kalup razgrađen jer bakterije nisu mogle primiti plazmid koji bi im dao otpornost na antibiotik.

U drugom krugu mutageneze količina DNA u transformacijskoj smjesi povećana je za faktor 7,8 što je povećalo broj bakterijskih kolonija na ploči (Slika 17).



*Slika 17* LB ploče s kanamicinom: **1** – negativna kontrola, BL21 (DE3) stanice elektroporirane smjesom koja je prije inkubacije s *DpnI* sadržavala 4,8 ng plazmida pET-28a(+)\_AncLeuRS, **2** – negativna kontrola, stanice elektroporirane smjesom s 4,8 ng plazmida pET-28a(+)\_AncLeuRS, bez inkubacije s *DpnI*, **3** – stanice elektroporirane smjesom koja je prije inkubacije s *DpnI* sadržavala 4,8 ng plazmida pET-28a(+)\_AncLeuRS i produkt mutageneze. Ploča 1 nema kolonija što pokazuje ispravnost enzima *DpnI*. Veći broj kolonija na ploči 2 u odnosu na ploču 3 pokazuje da je efikasnost transformacije stanica veća s kružnim plazmidom nego linearnim.

Ploča 1 očekivano nema kolonija jer je sav plazmid razgrađen s *DpnI*. Druga ploča ima puno kolonija, više nego ploča 3 jer je efikasnost transformacije kružnom DNA veća od one linearnom. Ploča s potencijalnim dvostrukim mutantima sadrži veći broj kolonija, nego u prvom krugu, ali unatoč tome od 5 plazmida izoliranih iz nasumično odabranih kolonija BL21 (DE3) i 8 plazmida iz DH5 $\alpha$  soja, samo je jedan pozitivan rezultat (Slika 18).

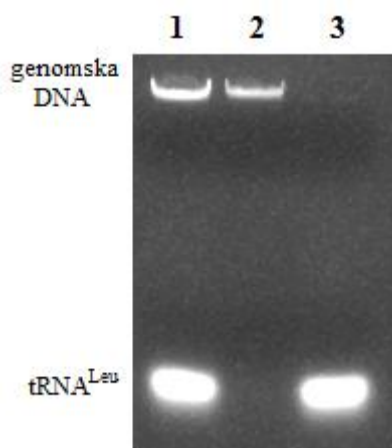


Slika 18 Isječci rezultata Sangerovog sekvenciranja plazmida koji sadrži obje željene mutacije.. Prikazani su dijelovi slijeda koji potvrđuju da je došlo do mutacije T252R (ACT → CGT) odnosno D345A (GAC → GCC).

## 4.2. Pročišćavanje tRNA<sup>Leu</sup>

Standardnim genetičkim kodom aminokiselina leucin kodirana je sa šest različitih kodona: UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG.<sup>1</sup> Molekule tRNA koje prepoznaju različite kodone, a vežu istu aminokiselinu nazivamo izoakceptorskim tRNA.<sup>44</sup> U ovom diplomskom radu korištena je izoakceptorska tRNA<sup>Leu</sup><sub>UAA</sub> dobivena *in vivo*: prekomjernom ekspresijom plazmida ΔpET-3a s odgovarajućim kodirajućim slijedom pod kontrolom T7 promotora u bakteriji *E. coli*. Stanice su suspendirane u smjesi pufera za izolaciju tRNA, a zatim im je dodan fenol zasićenog vodom. Otopina u kojoj je maseni udio fenola iznad 1 % ima baktericidno djelovanje jer fenol uništava staničnu membranu bakterija.<sup>45</sup> S obzirom da se fenol ne miješa s vodom, smjesa se razdjeli na dva dijela: gornji – vodeni i donji – fenolni. Ostaci bakterijskih membrana i nekih proteina nalaze se u fenolnom sloju i na granici slojeva. Gornji, većinski vodeni sloj sadrži stanični ekstrakt s preostalim proteinima i nukleinskim kiselinama.

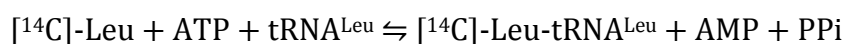
Proteini se dodatno uklanjaju dodatkom otopine fenola u kloroformu (dobivene miješanjem fenola zasićenog vodom i kloroforma u volumnom omjeru 1:1) u stanični ekstrakt. Fenol i kloroform u kombinaciji denaturiraju proteine bolje nego bilo koji od njih zasebno.<sup>46</sup> Denaturirani proteini vidljivo su istaloženi na granici faza organskog i vodenog sloja u obliku bijele pjene. Budući da je pufer za izolaciju tRNA blago lužnat, u vodenom sloju nalaze se i DNA i RNA.<sup>47</sup> Genomska DNA uklanja se dodatkom polietilenglikola koji smanjuje njezinu topljivost u vodi. U prozirnog talogu polietilenglikola je nakon centrifugiranja uočljiva sluzava bijela tvar. Prisutnost DNA u talogu je dodatno potvrđena agaroznom elektroforezom (Slika 19).



*Slika 19* Analiza koraka u pročišćavanju tRNA<sup>Leu</sup>. **1** – vodeni sloj nakon ekstrakcije fenol-kloroformom, **2** – talog nakon taloženja s polietilenglikolom (PEG-om), **3** – supernatant nakon taloženja PEG-om. Na gelu su vidljive dvije pruge: gornja odgovara genomske DNA, a donja tRNA<sup>Leu</sup>. Vidljivo je uklanjanje genomske DNA taloženjem s PEG-om jer pripadne pruge nema u supernatantu, a vidljiva je u talogu.

RNA preostala u supernatantu prevedena je u odgovarajući pufer, a zatim je SDS-poliakrilamidnom elektroforezom u prisustvu ureje ( $c = 8 \text{ mol dm}^{-3}$ ) u usporedbi s pozitivnom kontrolom potvrđeno da izolirana RNA većinski sadrži tRNA<sup>Leu</sup>.

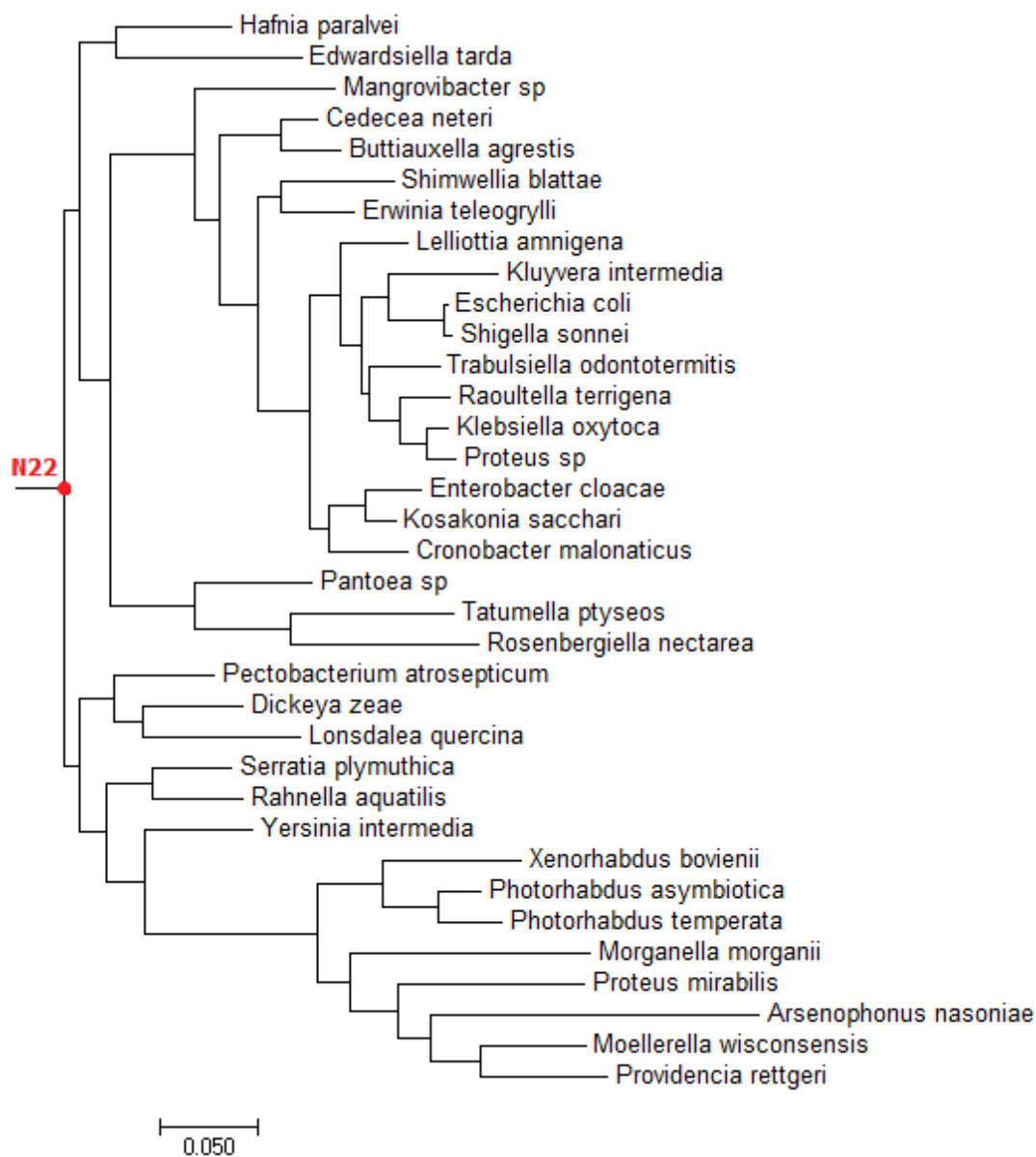
Kako bi se utvrdilo koliki udio ukupne RNA čini tRNA<sup>Leu</sup> praćena je reakcija aminoaciliranja s [<sup>14</sup>C]-leucinom:



u uvjetima zasićenja ( $c(\text{EcLeuRS}) = 200 \text{ nmol dm}^{-3}$ ,  $c([^{14}\text{C}]\text{-Leu}) = 100 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ ). Nakon kratke inkubacije reakcijske smjese (nekoliko minuta na 37 °C), uzeti su su alikvoti i istaloženi na papirnatim diskovima *Whatman* 3MM, uranjanjem u otopinu hladne trikloroctene kiseline ( $\gamma = 100 \text{ g dm}^{-3}$ ). Trikloroctena kiselina taloži nukleinske kiseline, uključivo i aminoaciliranu – radioaktivno obilježenu (<sup>14</sup>C)-Leu)-tRNA<sup>Leu</sup>, dok neizreagirani slobodni [<sup>14</sup>C]-Leu zaostaje u otopini. Diskići filter-papira isperu se dva puta hladnom otopinom trikloroctene kiseline ( $\gamma = 50 \text{ g dm}^{-3}$ ) i hladnim etanolom, te se osuše u sušioniku na 80 °C. Količina radioaktivnog produkta izmjeri se u scintilacijskom brojaču. Izračunata akceptorska aktivnost iznosi 80 %.

### 4.3. Pročišćavanje drevne leucil-tRNA-sintetaze i njezine mutirane inačice

Kodirajući slijed za drevnu leucil-tRNA-sintetazu (AncLeuRS) računalno je rekonstruiran, sintetiziran i ugrađen u vektor pET-28a(+) na Weizmann institutu u grupi Dana Tawfika. Slijed aminokiselina u AncLeuRS određen je metodom maksimalne vjerojatnosti na temelju poravnavanja proteinskih sekvenci s 50 %-tnom istovjetnošću EcLeuRS, dobivenih pretraživanjem baze podataka NCBI. Dobiveno je 57 sekvenci koje su poravnate u programu MUSCLE, a filogenetsko stablo (Slika 20) je dobiveno u programu *PhyML* uz standardne parametre: Le-Gasculov (LG) model supstitucije aminokiselina i 100 *bootstrap* replika.



*Slika 20* Prikaz klade filogenetskog stabla proteina koji su 50 % istovjetni leucil-tRNA-sintetazi iz bakterije *E. coli*. Svi proteini potječu iz gama proteobakterija (s naznačenim nazivima). Označen je unutarnji čvor N22 – drevna leucil-tRNA-sintetaza (AncLeuRS).

Svih 57 proteina potječe iz gama proteobakterija.<sup>48</sup> Između više potencijalnih kandidata za AncLeuRS odabran je unutarnji čvor 22 (N22) – predak proteina iz enterobakterija (Slika 20). Za rekonstrukciju je korištena metoda maksimalne vjerojatnosti i Jones-Taylor-Thorntonov (JTT) model supstitucije aminokiselina. AncLeuRS sadrži jednak broj aminokiselina kao i EcLeuRS (860) i relativne molekulske mase su im vrlo slične (oko 97 000). Sadrže 89 % istih aminokiselina i 4 % sličnih. Motivi HMGH i KMSKS važni za ostvarivanje interakcija s ATP-om u EcLeuRS sačuvani su u AncLeuRS.

Kodirajući slijed za AncLeuRS odnosno za T252R/D345A AncLeuRS nalaze se u vektoru pET-28a(+) pod kontrolom T7 promotora. Njihov kodirajući slijed dodatno kodira 23 aminokiseline na N kraju proteina (podebljane) među kojima je slijed od 6 uzastopnih histidina (plavo) i slijed koji prepoznaje proteaza trombin (zeleno):

**MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMAS**MQEQYRPEDIESHVQQHWQEKKTFKVTEDPSKEKYCLSM  
 PYPGRLHMGHVNRNYTIGDVISRYQRMLGKNVLQPIGWDAFGLPAEGAAVKNNTAPAPWTYDNI  
 EYMKNQLKLLGFGYDWSREIATCKPDYRWEQWFFTKLYEKGLVYKKTSAVNWCNDQTVLANE  
 QVIDGCCWRCDTKVERKEIPQWFIKITAYADQLLNDLDTLESWPEQVKTMQRNWIGRSEGVEIT  
 FDVADSDEKLTVYTTRPD**T**FMGVTYVAVAAGHPLAQQAANNPALADFIDECNTKVAEADMAT  
 MEKKGMATGLYAIHPLTGEKLPVWVANFVLMGYGTGAVMAVPGHDQ**R**DWEFATKYNLPIKPVIL  
 NADGSEPDLSAQAMTEKGVLFNSGEFDGLDFEAGFNAIADKLVAKGVGERKVNRYRLRDWGVSRQ  
 RYWGAPIPMVTLEDGTVIPTPEDQLPVILPEDVVMGIGITSPIKADPEWAKTTVNGQPALRETDT  
 FDTFMESSWYYARYTTCPOYDQGMLDAPAAANYWLPVDQYVGGIEHAIMHLMYFRFFHKLMRDAGL  
 VNSDEPAKRLLCQGMVLADAFYYTGNNGERIWVSPVDVTVERDEKGRIVKATDAEGRELVYAGM  
 SKMSKSKNNGIDPQVMVEKYGADTVRLFMMFASPAEMTLEWQESGVEGANRFLKRVWKLAYEHT  
 AKGAVAALDVAALNEDQKALRRDLHKTIAKVTDIGRRQTFNTAIAAIMELMNKLARAPQESEQ  
 DRALMQEALLAVRMLYPFTPHVCFTLWQALGGEGDIDNAPWPVADEQAMVEDSKLVVVQVNGK  
 VRGKITVAADATEEQVRERAAQEHLVAKYLDGVTVRKVIYVPGKLLNLVVG

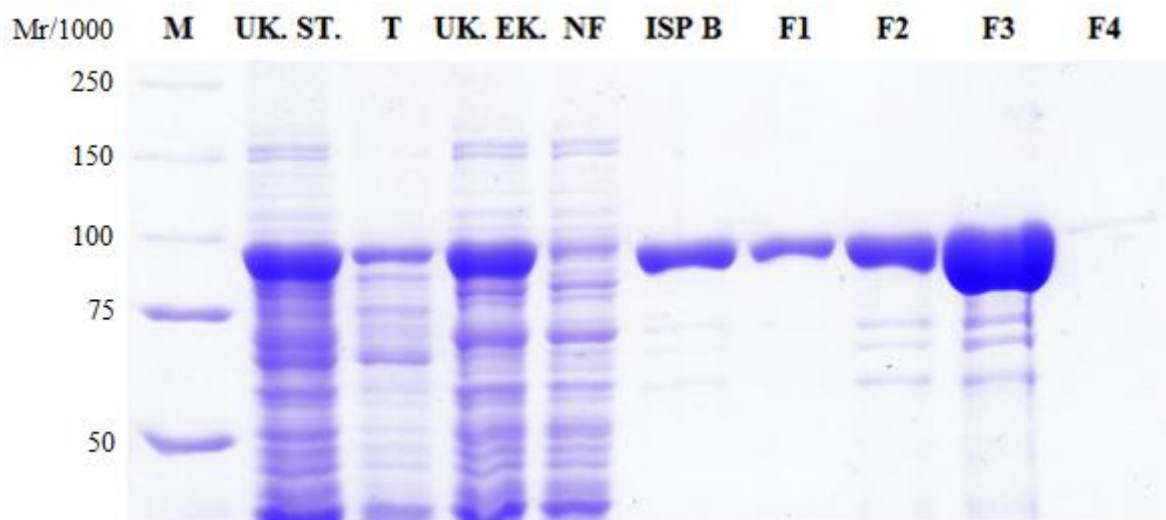
Crveno su podebljane aminokiseline koje su promijenjene u T252R/D345A AncLeuRS.

Proteini su prekomjerno eksprimirani i pročišćeni na Ni-NTA koloni kako je ranije opisano. Rezultat pročišćavanja analiziran je SDS-poliakrilamidnom elektroforezom (Slika 21). Prikazana je slika gela samo za AncLeuRS T252R/D345A jer je analogna i za AncLeuRS wt (engl. *wild type*).

U proteinskom ekstraktu (UK. EK.) posebno je vidljiva pruga AncLeuRS što pokazuje da je bila prekomjerno eksprimirana u *E. coli*, tj. da je indukcija bila uspješna. S obzirom da relativna molekulska masa AncLeuRS s histidinskim privjeskom iznosi 99 534, pruga se



očekivano nalazi blizu oznake za 100 000. Protein je dobro topljiv, zato se većinom nalazi u proteinskom ekstraktu, a vrlo malo u talogu stanica nakon sonikacije (T).



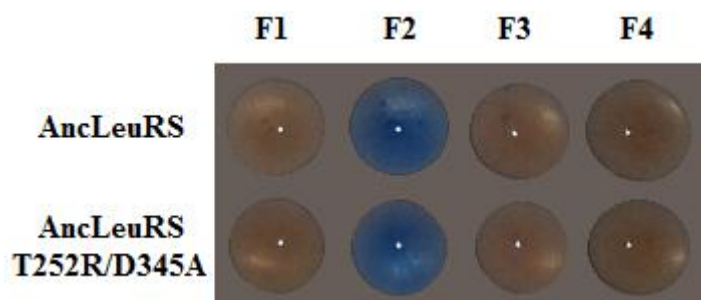
*Slika 21* Analiza pročišćavanja prekomjerno eksprimirane T252R/D345A AncLeuRS iz BL21 (DE3) soja bakterije *E. coli*. **M** – marker s proteinima naznačene relativne molekulske mase (*Precision Plus Protein™ Standards Unstained*), **UK. ST.** – ukupne stanice (smjesa proteinskog ekstrakta i ostataka stanica dobivena sonicanjem, **T** – talog ostataka stanica, **UK. EK.** – proteinski ekstrakt, **NF** – nevezana frakcija, **ISP B** – zadnja dva ispiranja puferom B, **F1-4** – frakcije dobivene ispiranjem s puferom za eluciju. F3 je glavna frakcija.

Proteinski ekstrakt nanosi se na Ni-NTA kolonu kako bi se pročistila AncLeuRS. Ostali proteini ne vežu se na kolonu i stoga se nalaze u nevezanoj frakciji (NF). Nakon nanošenja na kolonu, protein se ispire puferom B radi uklanjanja nespecifično vezanih proteina. Određena količina AncLeuRS izgubljena je ispiranjem (ISP B), ali su zato proteinske frakcije (F1-4) dosta čiste. Nekoliko pruga koje odgovaraju proteinima manje relativne molekulske mase od 100 000 posebno su vidljive u frakciji F3. Radi se ili o nespecifično vezanim proteinima ili o produktima proteolitičke razgradnje AncLeuRS.

Određeni postotak pročišćene AncLeuRS sadrži leucin ili Leu-AMP u aktivnom mjestu.<sup>49</sup> To predstavlja problem kod kinetičkih mjerenja kao što je primjerice praćenje nastanka Nva-[<sup>32</sup>P]-tRNA<sup>Leu</sup> u uvjetima predustaljenog stanja, gdje je visoka koncentracija enzima, jer se zbog kontaminacije dolazi do neželjenog nastanka Leu-[<sup>32</sup>P]-tRNA<sup>Leu</sup>. Budući da je samo tRNA radioaktivno obilježena, ta dva produkta ne mogu se ni na koji način razlikovati. Kinetička mjerenja osjetljiva su na količinu Leu-AMP-a u aktivnom mjestu od svega nekoliko posto pa takva kontaminacija može uzrokovati artefakte i pogrešnu interpretaciju podataka.

Poznato je nekoliko tehnika uklanjanja Leu-AMP-a iz aktivnog mjesta LeuRS: dijaliza u odsutnosti P<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>4-</sup> i inkubacija LeuRS s tRNA<sup>Leu</sup> u svrhu potpunog prijenosa aktivirane

aminokiseline na tRNA.<sup>49</sup> U ovom diplomskom radu korištena je nova metoda za uklanjanje aminokiseline iz aktivnog mjesta čija je prednost da ne troši tRNA. Metoda se zasniva na pomicanju reakcije aktivacije aminokiseline prema reaktantima dodatkom  $K_4P_2O_7$  u suvišku, a zatim uklanjanjem ATP-a i leucina obilnim ispiranjem na Ni-NTA koloni. Metoda je detaljno opisana u potpoglavlju 3.4.6.



Slika 22 Analiza proteinskih frakcija Bradfordovim reagensom, tzv. *spot* testom nakon uklanjanja Leu-AMP-a iz aktivnog mjesta drevne leucil-tRNA-sintetaze (AncLeuRS) i T252R/D345A AncLeuRS. Plavo obojena frakcija sadrži protein.

Nakon uklanjanja Leu-AMP-a, AncLeuRS se eluira s kolone (Slika 22), prevede u pufer za skladištenje i ukoncentrira. Efikasnost uklanjanja Leu-AMP-a potvrđena je tankoslojnom kromatografijom (Slika 27 b). Ako se u AncLeuRS ne doda leucin, nego samo s ATP i tRNA<sup>Leu</sup>, ne dolazi do nastanka Leu-tRNA<sup>Leu</sup>. To je dokaz da nema Leu-AMP-a u aktivnom mjestu.

## 4.4. Mjerenja termičke stabilnosti

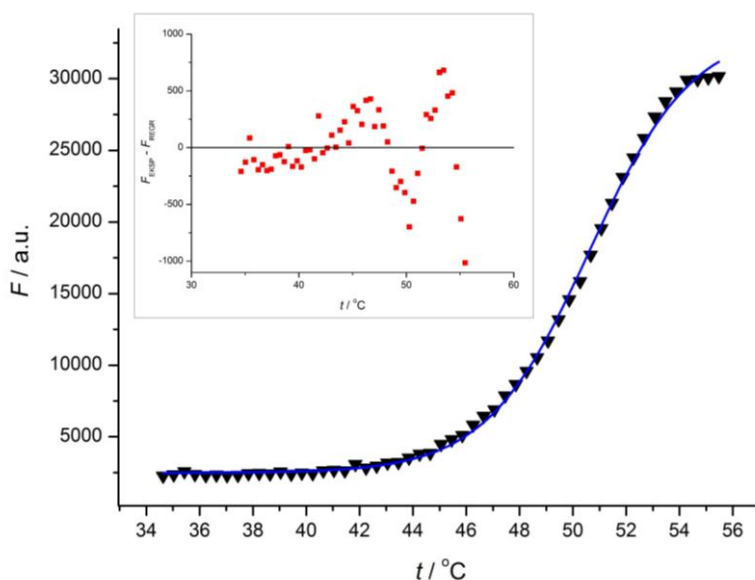
### 4.4.1. Diferencijalna pretražna fluorimetrija

Diferencijalna pretražna fluorimetrija (DSF) je metoda određivanja termičke stabilnosti proteina na temelju porasta intenziteta fluorescencije nepolarne boje SYPRO® Orange uslijed denaturacije proteina. U mjerenjima su korištene dvije kombinacije koncentracije proteina i boje SYPRO® Orange (potpoglavlje 3.5.1.) jer obje imaju veliki odziv instrumenta. U obradi podataka odabrana je kombinacija s koncentracijom proteina  $0,1 \text{ mg cm}^{-3}$  i  $10 \times$  SYPRO® Orange zbog oštrijeg skoka u krivulji koji omogućuje preciznije određivanje temperature mekšanja.

U literaturi su navedena dva načina za određivanje temperature mekšanja (potpoglavlje 2.5.1).<sup>30,50</sup> Prvi je nelinearna regresija Boltzmannovom krivuljom (jednadžba (1)), a drugi traženje nultočke druge derivacije krivulje. U ovom radu korišten je drugi način.

Boltzmannova krivulja neprikladan je odabir za određivanje temperature mekšanja iz nekoliko razloga. Prije regresije je potrebno ukloniti eksperimentalne točke prije i poslije skoka

u intenzitetu fluorescencije. Pritom je širina intervala koji se uklanja proizvoljna, a čak i tako modificirani set podataka pokazuje trend odstupanja od regresijske krivulje što je vidljivo u grafu reziduala (Slika 23). Rezidual je razlika između eksperimentalnih i regresijom procijenjenih vrijednosti. Njegov graf bi trebao prikazivati nasumično raspršene točke sa srednjom vrijednošću 0, a jasno je vidljivo da pokazuje trend odstupanja koji nije nasumičan.

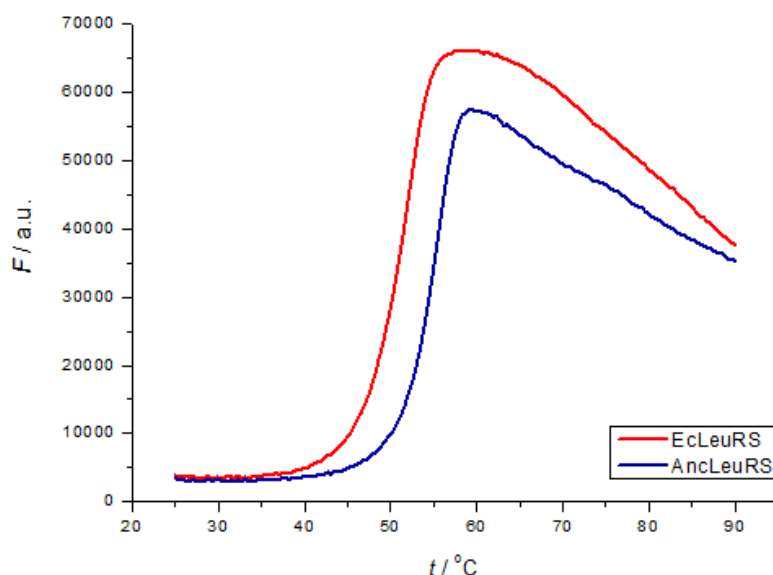


*Slika 23* Primjer Boltzmannove regresije (plavo). Prikazani su rezultati DSF eksperimenta (crno) dobiveni za otopinu 0,1 mg  $\text{cm}^{-3}$  EcLeuRS i 10 x SYPRO® Orange u puferu za DSF ( $c(\text{KCl}) = 150 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{HEPES}) = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7,5$ ). Posebno je naznačen graf reziduala, tj. ovisnosti razlike u intenzitetu fluorescencije između eksperimentalno ( $F_{\text{EKSP}}$ ) i regresijom dobivene ovisne varijable ( $F_{\text{REGR}}$ ) o temperaturi. Trend nepravilnog odstupanja eksperimentalnih točaka od regresijske krivulje vidljiv u grafu reziduala pokazuje da regresija nije dobra.

U objašnjenju zašto je Boltzmannova krivulja loš izbor za nelinearnu regresiju stoji jasna fizikalna podloga. Krivulja dobivena DSF eksperimentom je rezultat dvaju procesa: denaturacije proteina i nastajanja proteinskih agregata. Ti procesi nisu neovisni jer čim dođe do denaturacije počinju nastajati i agregati. Boltzmannova krivulja dobro opisuje samo proces denaturacije, ali on se preklapa s nastankom agregata i to već u području oko točke infleksije DSF krivulje. Odbacivanjem eksperimentalno dobivenih točaka iza maksimuma DSF krivulje ne odbacuje se sav doprinos krivulji uslijed nastanka proteinskih agregata. Budući da proteinski agregati nastaju već u području skoka krivulje, nelinearna regresija Boltzmannovom krivuljom pokazuje povećanje odstupanja s temperaturom jer pojava novog fizikalnog procesa uvodi grešku koja se ne može objasniti regresijskim modelom.

Isto tako, Boltzmannova krivulja ne može pouzdano odrediti temperaturu mekšanja kod krivulja denaturacije u kojima postoji više faznih prijelaza, a time i više točaka infleksije.<sup>29</sup> Iz

svoga navedenog slijedi da nije dobar odabir za nelinearnu regresiju krivulje denaturacije dobivene u DSF eksperimentu.



Slika 24 Krivulje denaturacije u DSF eksperimentu za otopine drevne (AncLeuRS) i leucil-tRNA-sintetaze iz *E. coli* (EcLeuRS). Mjerenja su provedena u puferu za DSF ( $c(\text{KCl}) = 150 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{HEPES}) = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7,5$ ) s koncentracijom proteina  $0,1 \text{ mg cm}^{-3}$  i  $10 \times \text{SYPRO}^\circledast \text{ Orange}$ . AncLeuRS je termički stabilniji protein.

Iz točke infleksije krivulje denaturacije (Slika 24) određene su temperature mekšanja za AncLeuRS i T252R/D345A AncLeuRS te za odgovarajuće kontrolne proteine EcLeuRS i T252R/D345A EcLeuRS (Tablica 5). Krivulja denaturacije mutiranih proteina nije prikazana jer pokazuje isti trend kao i krivulja na slici 24. SYPRO<sup>®</sup> Orange boja jednako fluorescira i s AncLeuRS i s EcLeuRS prije njihove denaturacije (engl. *pre-melt fluorescence*). S obzirom da tada intenzitet fluorescencije ovisi o interakciji boje s nepolarnim bočnim ograncima na površini proteina, AncLeuRS ima sličan površinski sastav nepolarnih aminokiselina kao i EcLeuRS.

Tablica 5 Temperature mekšanja za otopine različitih proteina ( $c = 0,1 \text{ mg cm}^{-3}$ ) pri koncentraciji boje SYPRO<sup>®</sup> Orange  $10 \times$  u puferu za DSF ( $c(\text{KCl}) = 150 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{HEPES}) = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7,5$ ). Navedene su srednje vrijednosti dobivene u jednom mjerenju iz šest replika. Naznačene pogreške određuju interval pouzdanosti od 95 %.

PROTEIN	$t_m / ^\circ\text{C}$
EcLeuRS	$51,48 \pm 0,17$
AncLeuRS	$55,23 \pm 0,28$
EcLeuRS T252R/D345A	$50,81 \pm 0,11$
AncLeuRS T252R/D345A	$54,42 \pm 0,11$

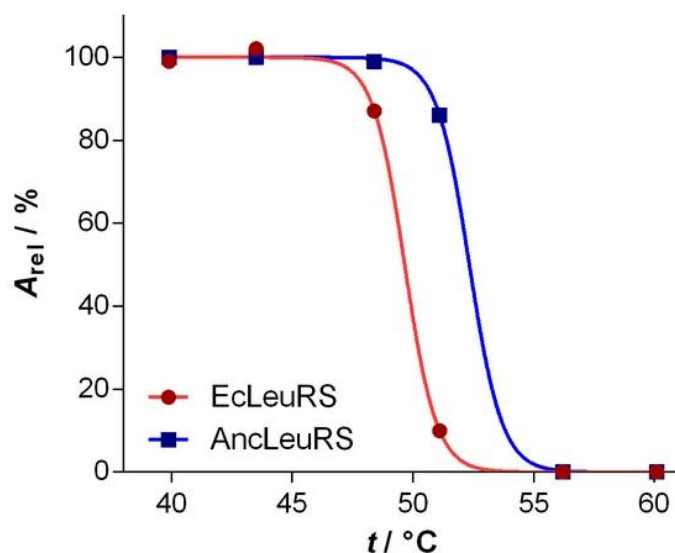
Denaturacija EcLeuRS počinje na nižoj temperaturi nego AncLeuRS (Tablica 5). Prema tome, AncLeuRS je termički stabilniji protein od EcLeuRS, što je u slaganju s primijećenom trendom veće stabilnosti računalno rekonstruiranih drevnih proteina.<sup>8-10,34</sup> Razlika u temperaturama iznosi  $\Delta t_m$  (LeuRS) =  $(3,75 \pm 0,45)$  °C odnosno  $\Delta t_m$  (T252R/D345A LeuRS) =  $(3,61 \pm 0,22)$  °C.

Proteini s inaktiviranom domenom za popravak pokazuju nešto manju termičku stabilnost od wt proteina. Razlika temperatura mekšanja za EcLeuRS iznosi  $\Delta t_m = (0,67 \pm 0,28)$  °C, a za AncLeuRS  $\Delta t_m = (0,81 \pm 0,39)$  °C. Iako su vrijednosti male, nisu unutar eksperimentalne pogreške, što pokazuje da dvije supstitucije važnih aminokiselina u aktivnom mjestu mogu utjecati na malo smanjenje termičke stabilnosti enzima.

S početkom denaturacije proteina počinje i njihova agregacija. AncLeuRS i EcLeuRS pokazuju različit mehanizam agregacije jer njihove DSF krivulje odstupaju u području iza maksimuma krivulje. Takav rezultat je očekivan zbog razlike u strukturi.

#### 4.4.2. Termička denaturacija

Osim diferencijalnom pretražnom fluorimetrijom, temperatura mekšanja EcLeuRS i AncLeuRS određena je praćenjem aktivnosti enzima u temperaturnom području od 40 do 60 °C. Temperaturni interval je odabran tako da se temperatura mekšanja određena u DSF eksperimentu nalazi u sredini. Dobivene krivulje denaturacije prikazane su na slici 25.



Slika 25 Krivulja denaturacije drevne (AncLeuRS) i leucil-tRNA-sintetaze iz *E. coli* (EcLeuRS). Mjerenja su provedena uz koncentracija enzimu  $70 \text{ nmol dm}^{-3}$  u puferu sastava:  $c$  (HEPES) =  $100 \text{ mmol dm}^{-3}$  – titriran s KOH do pH = 7,5,  $c$  (BSA) =  $0,1 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c$  (KCl) =  $150 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c$  (DTT) =  $4 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Relativna aktivnost određena je kao omjer aktivnosti enzima pri pojedinoj temperaturi i pri 40 °C.

Iz krivulje denaturacije AncLeuRS odnosno EcLeuRS temperatura mekšanja je određena kao apscisa točke koja odgovara 50 % aktivnosti enzima, (Tablica 6).

*Tablica 6* Temperatura mekšanja drevne (AncLeuRS) i leucil-tRNA-sintetaze iz *E. coli* (EcLeuRS) određena kao apscisa točke kojoj odgovara 50 % aktivnosti enzima. Srednja vrijednost izračunata je iz 3 neovisna mjerenja. Naznačene pogreške određuju interval pouzdanosti od 95 %.

ENZIM	$t_m / ^\circ\text{C}$
AncLeuRS	$52,32 \pm 0,27$
EcLeuRS	$49,26 \pm 0,85$

Prema izmjerenim vrijednostima AncLeuRS je termički stabilniji od EcLeuRS, što je u slaganju s rezultatom dobivenim metodom DSF. Razlika u temperaturi mekšanja za dva enzima iznosi  $\Delta t_m = (3,1 \pm 1,1) ^\circ\text{C}$ . Izračunata razlika ima veću relativnu pogrešku (35 %) nego u DSF mjerenjima (12 %) što je posljedica same metode. Naime, budući da je za svaku izmjerenu točku potrebno odrediti aktivnost enzima, krivulja denaturacije određena je na temelju mnogo manje eksperimentalnih točaka od DSF krivulje.

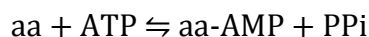
Dobivene razlika u termičkoj stabilnosti enzima mogu se usporediti s računalno rekonstruiranim drevnim proteinom N9 – pretkom serumskih paraoksonaza (PON) sisavaca koji s njima dijeli 70-82 % identičnosti u redosljedu.<sup>51</sup> N9 je za  $\Delta t_m = (13,3 \pm 1,2) ^\circ\text{C}$  stabilniji od rekombinantnog proteina dobivenog kombinacijom gena različitih PON iz sisavaca.<sup>8</sup> AncLeuRS je 89 % identičan EcLeuRS. Čini se da je tako velika sličnost uzrok manjeg dobitka na termičkog stabilnosti kod AncLeuRS, nego kod N9.

Apsolutne vrijednosti temperatura mekšanja AncLeuRS i EcLeuRS određene na temelju mjerenja aktivnosti nešto su manje, nego u DSF eksperimentu. Razlika proistječe iz drugačijih principa dvaju metoda: jedna se temelji na mjerenju aktivnosti enzima, a druga na mjerenju denaturacije. Dobiveni podaci pokazuju da gubitak aktivnosti prethodi denaturaciji enzima.

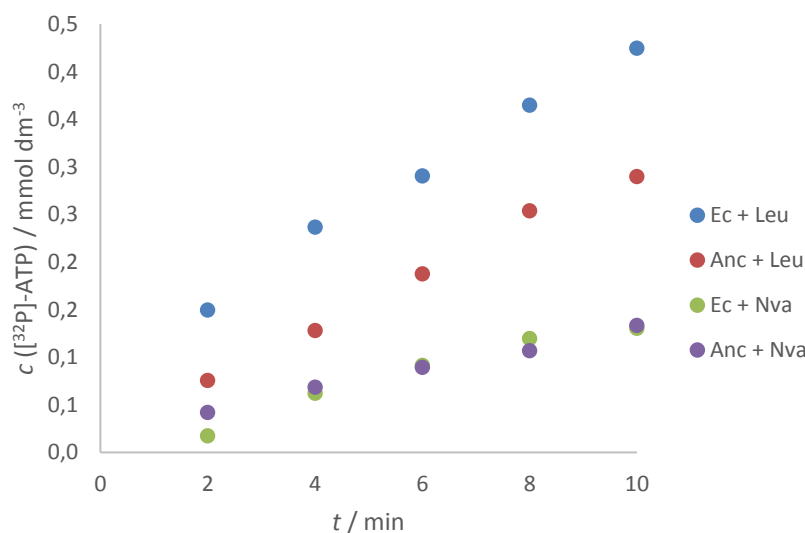
## 4.5. Kinetička mjerenja\*

### 4.5.1. Izmjena pirofosfata

Izmjena pirofosfata metoda je mjerenja brzine reakcije aktivacije aminokiseline – prve od dviju reakcija koju katalizira svaka aaRS. U reakcijskoj smjesi nalaze se aminokiselina (leucin ili norvalin), ATP i  $[^{32}\text{P}]$ -PPi. Mjeri se količina radioaktivnog  $[^{32}\text{P}]$ -ATP-a koji nastaje kao produkt u reakciji izmjene pirofosfata prikazanog sljedećim dvjema reakcijama:



Reakcija ugradnje radioaktivnog pirofosfata u ATP se odvija pri ravnotežnim uvjetima, aminoacil-adenilat (aa-AMP) ostaje čvrsto vezan u aktivnom mjestu enzima. Stoga se brzina ugradnje pirofosfata u ATP u povratnoj reakciji uzima kao mjerilo brzine i učinkovitosti brzine aktivacije aminokiseline (Slika 26).<sup>52</sup>



*Slika 26* Vremenski tijek nastanka  $[^{32}\text{P}]$ -ATP-a u reakciji izmjene pirofosfata s norvalinom, Nva ( $c = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$ ), odnosno leucinom, Leu ( $c = 100 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ ) u reakciji kataliziranom drevnom (Anc) odnosno leucil-tRNA-sintetazom iz *E. coli* (Ec) koncentracije  $10 \text{ nmol dm}^{-3}$ . ATP je dodan u suvišku. Mjerenja su provedena pri  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Linearnom regresijom određeni su nagibi pravaca na slici 26 koji predstavljaju početnu brzinu aktivacije aminokiseline ( $v_0$ ) za danu koncentraciju aminokiseline. Iz početne brzine aktivacije

\* Mjerenja s radioaktivnim tvarima proveo je doc. dr. sc. Marko Močibob. Ovdje su prikazani i obrađeni rezultati s njegovim dopuštanjem.

i poznate koncentracije enzima ( $[E]_0$ ) možemo odrediti opažene (engl. *observed*) konstante brzine reakcije ( $k_{obs}$ ) prema jednadžbi:

$$v_0 = \frac{k_{cat}[aa][E]_0}{K_m + [aa]} = k_{obs}[E]_0 \quad (3)$$

gdje je  $[aa]$  početna koncentracija aminokiseline,  $K_m$  koncentracija supstrata (u ovom slučaju aminokiseline) za koju je postignuta polovica maksimalne brzine reakcije, a  $k_{cat}$  katalitička (engl. *catalytic*) konstanta brzine reakcije. Opažena konstanta brzine reakcije je funkcija  $k_{cat}$  i  $K_m$  pri određenoj koncentraciji aminokiseline (Tablica 7). S obzirom da su opažene konstante mjerene pri različitim koncentracijama norvalina i leucina, ne možemo međusobno uspoređivati njihove konstante aktivacije. Možemo uspoređivati samo konstante aktivaciju iste aminokiseline različitim enzimima. AncLeuRS ima nešto manje konstante aktivacije leucina odnosno norvalina od EcLeuRS – za 18 odnosno 22 %. Međutim, to još uvijek nije značajno odstupanje.

*Tablica 7* Početne brzine aktivacije norvalina, Nva ( $c = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) odnosno leucina (Leu) ( $c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) s drevnom (AncLeuRS) odnosno leucil-tRNA-sintetazom iz *E. coli* (EcLeuRS) koncentracije  $10 \text{ nmol dm}^{-3}$ . Prema jednadžbi (3) izračunate su odgovarajuće opažene konstante brzine aktivacije. Mjerenja su provedena pri  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .

LeuRS + aminokiselina	$v_0 / \text{mmol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$	$k_{obs} / \text{s}^{-1}$
EcLeuRS + Leu	0,0339	56,5
AncLeuRS + Leu	0,0277	46,2
EcLeuRS + Nva	0,0142	23,6
AncLeuRS + Nva	0,0111	18,5

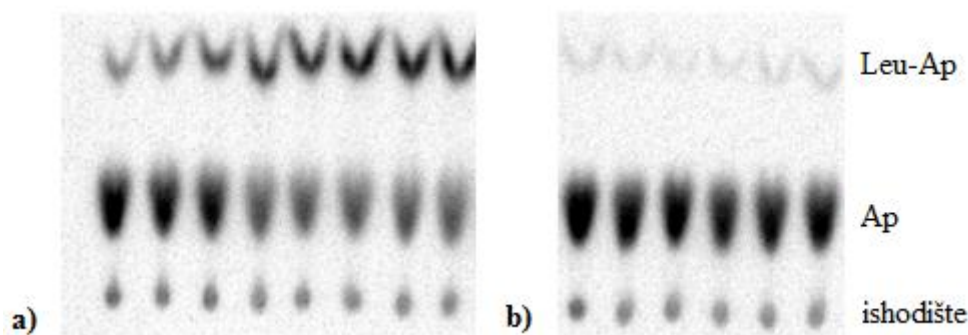
S obzirom da su opažene konstante određene na temelju jednog mjerenja, za precizniju usporedbu dvaju enzima najbolje bi bilo odrediti parametre Michaelis-Mentenine jednadžbe (jednadžba (3)),  $K_m$  i  $k_{cat}$ , u reakciji aktivacije leucina odnosno norvalina s AncLeuRS.

#### 4.5.2. Prijenos leucina na $tRNA^{Leu}$

Prijenos leucina na  $tRNA^{Leu}$  prati se uz uporabu instrumenta za brzo miješanje i zaustavljanje reakcije, pomoću kojeg se mogu pratiti reakcije koje se odvijaju na vremenskoj skali višoj od 2,8 ms. AncLeuRS je inkubirana s ATP-om i leucinom, dodanima u suvišku, kako bi u njezinom aktivnom mjestu nastao Leu-AMP. Enzim je odvojen od neizreagiranih reaktanata na koloni za odsoljavanje. Tako priređena AncLeuRS ( $c = 10 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ ) pomiješana je s  $[^{32}\text{P}]\text{-tRNA}^{Leu}$  ( $c = 1 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ ) čime je inicirana reakcija prijena leucina na  $tRNA^{Leu}$ . Reakcija je kemijski



zaustavljena dodatkom  $\text{CH}_3\text{COONa}$  ( $c = 2 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 4,5$ ) i SDS-a u različitim vremenskim točkama od početka reakcije, u intervalu od 4 ms do 1 s.



*Slika 27 a)* Vremenski tijek reakcije prijenosa leucina na drevnu leucil-tRNA-sintetazu praćen tankoslojnom kromatografijom (TLC) na polietilenimin-celulozi nakon tretmana zaustavljene reakcijske smjese nukleazom P1. Količine radioaktivnih produkata razgradnje, 3'-terminalnog adenzina bez leucina (Ap) i s vezanim leucinom (Leu-Ap), proporcionalne su količinama  $\text{tRNA}^{\text{Leu}}$  odnosno  $\text{Leu-tRNA}^{\text{Leu}}$ . TLC je provedena u puferu za razvijanje ( $c(\text{CH}_3\text{COONH}_4) = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\varphi(\text{CH}_3\text{COOH}) = 5\%$ ). *b)* Slijepa proba – vremenski tijek reakcije prijenosa bez leucina dodanog u početnu smjesu. Slijepa proba ukazuje na efikasnost uklanjanja Leu-AMP-a iz aktivnog mjesta tijekom pročišćavanja AncLeuRS. Mjerenja su provedena pri  $37^\circ\text{C}$ .

Alikvoti uzimani u različitim vremenima tretirani su s nukleazom P1 i analizirani tankoslojnom kromatografijom (Slika 27). Nukleaza P1 cijepa tRNA uz nastanak smjese oligonukleotida i nukleozid-monofosfata.<sup>53</sup> Ako je dodana u suvišku, produkti reakcije bit će isključivo nukleozid-monofosfati. Analizirani alikvoti zaustavljene reakcijske smjese u različitim vremenskim točkama sadrže  $\text{Leu-}^{[32\text{P}]}\text{-tRNA}^{\text{Leu}}$  i  $^{[32\text{P}]}\text{-tRNA}^{\text{Leu}}$  koji su radioaktivno označeni na  $\alpha$  fosfatu 3'-terminalnog adenzina. Njihovom razgradnjom nastaju  $^{[32\text{P}]}\text{-adenozin-monofosfat}$  s vezanim leucinom ili bez njega. Oni se mogu razdvojiti tankoslojnom kromatografijom na PEI-celulozi (polietilenimin-celulozi) i odrediti pripadajući intenzitet radioaktivnog signala. Množinski udio produkta reakcije:  $\text{Leu-}^{[32\text{P}]}\text{-tRNA}^{\text{Leu}}$  računa se prema formuli:

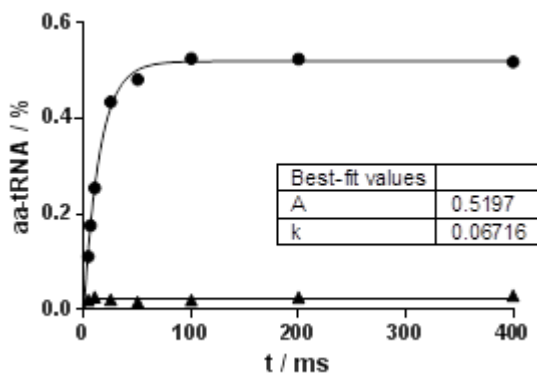
$$\chi_{\text{Leu-Ap}} = \frac{I_{\text{Leu-Ap}}}{I_{\text{Leu-Ap}} + I_{\text{Ap}}} \quad (4)$$

gdje je  $I$  intenzitet radioaktivnog zračenja leucil-adenozin-monofosfata (Leu-Ap) odnosno adenzin-monofosfata (Ap). Izračunati udjeli  $\text{Leu-}^{[32\text{P}]}\text{-tRNA}^{\text{Leu}}$  u uzetim alikvotima određuju vremenski tijek reakcije prijenosa leucina na  $\text{tRNA}^{\text{Leu}}$  (Slika 28). Nelinearnom regresijom eksperimentalno dobivenih točaka prema jednadžbi

$$y = A(1 - e^{-kx}) \quad (5)$$

može se dobiti konstanta reakcije za prijenos leucina na  $\text{tRNA}^{\text{Leu}}$  koja iznosi  $67 \text{ s}^{-1}$ . U usporedbi s analognom konstantom za EcLeuRS ( $59 \text{ s}^{-1}$ ),<sup>4</sup> AncLeuRS pokazuje 14 % brži transfer leucina

na tRNA<sup>Leu</sup>. Vrijednost konstante brzine za AncLeuRS određena je iz jednog mjerenja pa je standardna pogreška nepoznata.

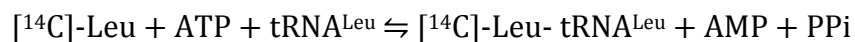


*Slika 28* Praćenje nastanka produkta, Leu-[<sup>32</sup>P]-tRNA<sup>Leu</sup> tijekom reakcije prijenosa Leu-AMP-a na tRNA. Drevna leucil-tRNA-sintetaza ( $c = 10 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ) je prethodno reakciji inkubirana s viškom ATP-a i leucina kako bi njezino aktivno mjesto sadržavalo Leu-AMP. Reakcija je pokreće dodatkom [<sup>32</sup>P]-tRNA<sup>Leu</sup> ( $c = 1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ). Mjerenja su provedena pri 37 °C.

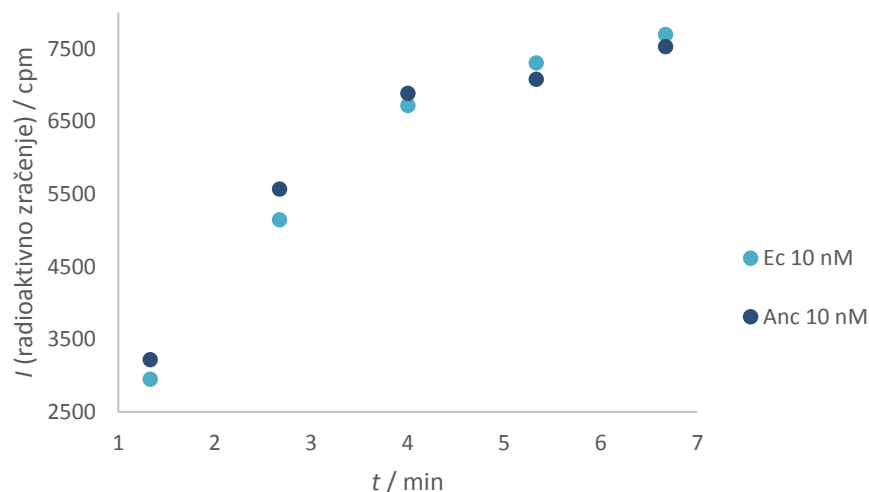
Prema podacima iz literature dobivenima na istome instrumentu, red veličine eksperimentalne pogreške u reakciji prijenosa kreće se između 8-13 %, <sup>4</sup> što razliku dvaju konstanti stavlja unutar eksperimentalne pogreške. Stoga se može zaključiti da AncLeuRS pokazuje sličnu aktivnost kao i EcLeuRS u reakciji prijenosa leucina na tRNA<sup>Leu</sup>.

#### 4.5.3. Ukupna reakcija aminoacilacije

Ukupna reakcija aminoacilacije prati se u uvjetima ustaljenog stanja – pri niskoj koncentraciji enzima ( $10 \text{ nmol dm}^{-3}$ ), uz  $[^{14}\text{C}]$ -leucin ( $c = 100 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ ) i  $\text{tRNA}^{\text{Leu}}$  dodanu u suvišku. Prati se intenzitet zračenja radioaktivnog produkta u reakciji:



Vremenski tijek reakcije pokazuje identično ponašanje AncLeuRS i EcLeuRS (Slika 29).

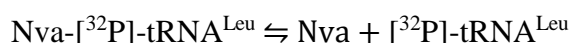


*Slika 29* Vremenski tijek reakcije ukupnog aminoaciliranja za drevnu (Anc) i leucil-tRNA-sintetazu iz *E. coli* (Ec) pri koncentraciji enzima  $10 \text{ nmol dm}^{-3}$  i uz koncentraciju leucina  $100 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ . Intenzitet radioaktivnog zračenja izražen je u broju udaraca po minuti (engl. *counts per minute*, cpm) i proporcionalan je količini nastale  $[^{14}\text{C}]\text{-Leu-tRNA}^{\text{Leu}}$ . Mjerenja su provedena pri  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .

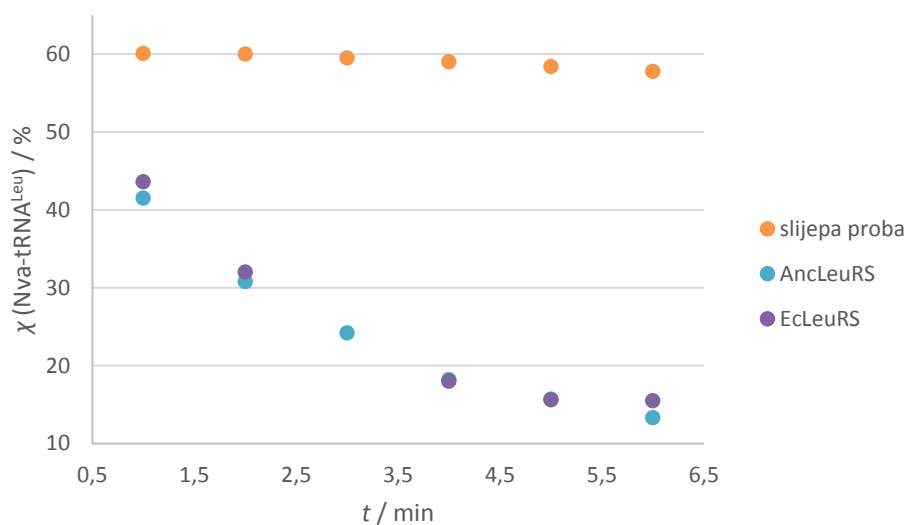
Dobiveni kvalitativni rezultat potvrđuje zaključke dobivene u individualnim reakcijama aktivacije i prijenosa leucina na  $\text{tRNA}^{\text{Leu}}$  te snažno ukazuje na jednaku aktivnost dvaju enzima.

#### 4.5.4. Praćenje deacilacije Nva-tRNA<sup>Leu</sup> u uvjetima ustaljenog stanja

Osim aktivnosti katalitičke domene, potrebno je utvrditi aktivnost domene za popravak pogreške. Kako bi se to utvrdilo AncLeuRS odnosno EcLeuRS je pomiješana s Nva- $[^{32}\text{P}]\text{-tRNA}^{\text{Leu}}$  i praćen vremenski tijek hidrolize (Slika 30):



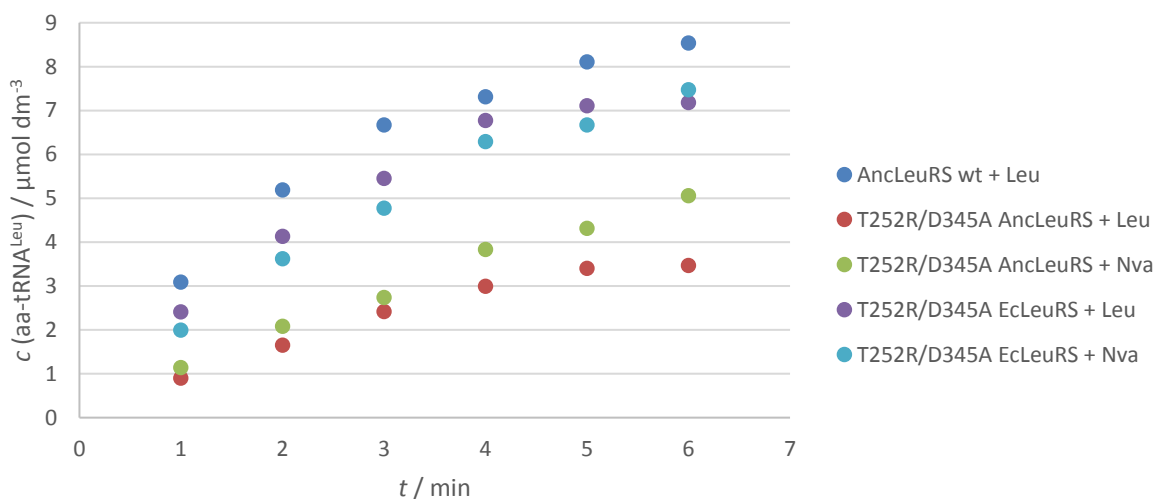
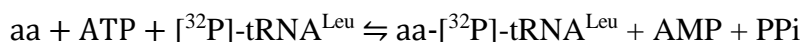
Poklapanje točaka kvalitativno upućuje na jednaku aktivnost CP1 domene u AncLeuRS i EcLeuRS. Za precizniju usporedbu potrebno je odrediti vrijednosti  $K_m$  i  $k_{\text{cat}}$ .



Slika 30 Hidroliza Nva-tRNA<sup>Leu</sup> u uvjetima ustaljenog stanja ( $c(\text{Nva}-[^{32}\text{P}]\text{-tRNA}^{\text{Leu}}) = 7 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{LeuRS}) = 4 \text{ nmol dm}^{-3}$ ). Slijepa proba ukazuje na spontanu hidrolizu Nva-tRNA<sup>Leu</sup> bez prisutnosti enzima. Mjerenja su provedena pri 37 °C.

#### 4.5.5. Provjera aktivnosti T252R/D345A drevne leucil-tRNA-sintetaze

Aktivnost wt AncLeuRS te T252R/D345A AncLeuRS i EcLeuRS određena je u reakciji aminoaciliranja s [<sup>32</sup>P]-tRNA<sup>Leu</sup> (Slika 31):



Slika 31 Vremenski tijek reakcije aminoaciliranja katalizirana s drevnom leucil sintetazom (AncLeuRS), njezinim deacilacijskim mutantom (T252R/D345A AncLeuRS) ili deacilacijskim mutantom leucil-tRNA-sintetazom iz *E. coli* (T252R/D345A EcLeuRS) u uvjetima ustaljenog stanja ( $c(\text{LeuRS}) = 10 \text{ nmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{tRNA}^{\text{Leu}}) = 25 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{Leu}) = 500 \mu\text{mol dm}^{-3}$  ili  $c(\text{Nva}) = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$ ). Početna brzina aminoaciliranja s T252R/D345A AncLeuRS je manja od ostalih enzima. Mjerenja su provedena pri 37 °C.

Nagibi dobivenih reakcija su početne brzine aminoaciliranja odgovarajućih enzima. Iz početnih brzina i koncentracije enzima izračuna se opažena konstanta aminoacilacije,  $k_{\text{obs}}$  prema jednadžbi (3). Dobivene vrijednosti su prikazane u tablici 8.

*Tablica 8* Opažene konstante ukupne aminoacilacije katalizirane s drevnom leucil sintetazom (AncLeuRS), njezinim deacilacijskim mutantom (T252R/D345A AncLeuRS) ili deacilacijskim mutantom leucil-tRNA-sintetazom iz *E. coli* (T252R/D345A EcLeuRS) u uvjetima ustaljenog stanja ( $c(\text{LeuRS}) = 10 \text{ nmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{tRNA}^{\text{Leu}}) = 25 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{Leu}) = 500 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$  ili  $c(\text{Nva}) = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$ ). Mjerenja su provedena pri 37 °C.

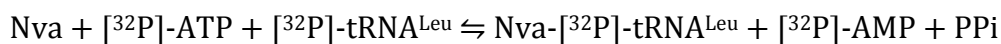
Enzim + aminokiselina	$k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$
wt AncLeuRS + Leu	2,98
T252R/D345A AncLeuRS + Leu	1,17
T252R/D345A EcLeuRS + Leu	2,40
T252R/D345A AncLeuRS + Nva	1,46
T252R/D345A EcLeuRS + Nva	2,34

T252R/D345A AncLeuRS neočekivano pokazuje oko 2,5 puta manju aktivnost od wt AncLeuRS i oko 2 puta manju od T252R/D345A EcLeuRS. Još jednim neovisnim mjerenjem potvrđeno je da rezultati nisu rezultat slučajne pogreške u mjerenju. Deacilacijski mutant AncLeuRS doista ima manju aktivnost.

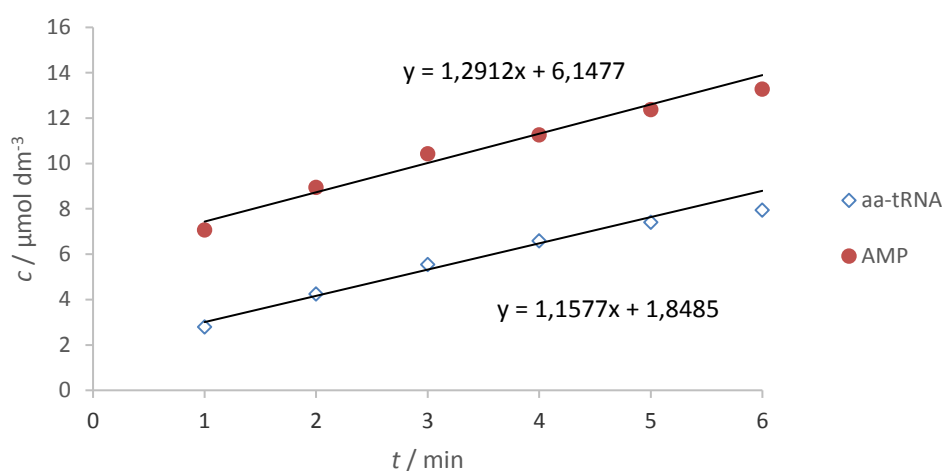
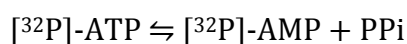
Rezultat je neočekivan jer se mutacije T252R i D345A nalaze u domeni za popravak i utječu samo na aktivnost hidrolize nepripadnih aminokiselina (popravak pogreške poslije prijenosa), a ne i katalitičku aktivnost enzima. To dokazuje aktivnost T252R/D345A EcLeuRS koja je usporediva s aktivnošću wt AncLeuRS. Ovakav rezultat možda je posljedica nespecifično uvedenih mutacija tijekom kružne mutageneze koje su smanjile aktivnost enzima. S obzirom da je Sangerovim sekvenciranjem provjeravan samo slijed nukleotida u kodirajućem slijedu AncLeuRS koji se nalazi neposredno oko mjesta uvođenja mutacije, moguće je da je došlo do mutacije u nekom drugom dijelu enzima. U svakom slučaju, dobiveni rezultat čini se kao artefakt uzrokovan eksperimentalnom pogreškom tijekom dobivanja enzima jer ako T252R/D345A EcLeuRS, wt AncLeuRS i wt EcLeuRS pokazuju slične aktivnosti, prema načelu tranzitivnosti trebao bi i T252R/D345A AncLeuRS.

#### 4.5.6. Paralelno praćenje hidrolize ATP-a i nastanka aminoacil-tRNA u enzimima s mutacijama T252R i D345A

Kako bi se utvrdilo je su li mutacije T252R i D345A doista deaktivirale domenu za popravak AncLeuRS, potrebno je odrediti koji udio ATP-a se troši za reakciju prijenosa norvalina na tRNA:



a koji za hidrolizu ATP-a uslijed hidrolize neprirodnog produkta  $\text{Nva}-[^{32}\text{P}]\text{-tRNA}^{\text{Leu}}$ :



Slika 32 Paralelno praćenje nastanka  $[^{32}\text{P}]\text{-AMP}$ -a (crveno) i  $\text{Nva}-[^{32}\text{P}]\text{-tRNA}$  (bijelo) u uvjetima ustaljenog stanja ( $c(\text{Nva}) = 4 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{ATP}) = 100 \text{ μmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{AncLeuRS T252R/D345A}) = 67 \text{ nmol dm}^{-3}$ ). U smjesu se radi detekcije radioaktivnih produkata u tragovima dodaju  $[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  i  $[^{32}\text{P}]\text{-tRNA}$ . Reakcijske smjese pripremljene su u standardnom reakcijskom puferu ( $c(\text{HEPES}) = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7,5$ ,  $c(\text{MgCl}_2) = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{KCl}) = 150 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{DTT}) = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma(\text{BSA}) = 100 \text{ μg cm}^{-3}$ ,  $c(\text{tRNA}) = 15 \text{ μmol dm}^{-3}$ ). Mjerenja su provedena pri  $37 \text{ °C}$ .

Zato se paralelno prati brzina nastanka  $[^{32}\text{P}]\text{-AMP}$ -a i  $\text{Nva}-[^{32}\text{P}]\text{-tRNA}^{\text{Leu}}$  u uvjetima ustaljenog stanja (Slika 30). Budući da se obje reakcije događaju u reakcijskoj smjesi istog volumena, iz omjera nagiba dvaju pravaca dobiva se količina potrošenog ATP-a po jednoj aminoaciliranoj molekuli tRNA prema sljedećoj jednadžbi:

$$\frac{\Delta c(\text{AMP})}{\Delta t} / \frac{\Delta c(\text{Nva} - \text{tRNA})}{\Delta t} = \frac{\Delta N(\text{AMP})}{\Delta N(\text{Nva} - \text{tRNA})} \quad (6)$$

Ako je vrijednost blizu jedan, sav ATP se troši na nastanak  $\text{Nva}-\text{tRNA}$ , a u suprotnom postoji popravak pogreške. Iz dvaju neovisnih mjerenja određene su vrijednosti omjera 1,12 i 1,21 za dvije različite koncentracije  $\text{tRNA}^{\text{Leu}} - 15 \text{ μmol dm}^{-3}$ , odnosno  $25 \text{ μmol dm}^{-3}$ . U usporedbi s literaturno određenim omjerom 100 za wt EcLeuRS,<sup>4</sup> u enzimu AncLeuRS T252R/D345A je očekivano onemogućen popravak pogreške.

## § 5. ZAKLJUČAK

- Nova metoda za uklanjanje leucil-adenilata iz aktivnog mjesta katalitičke domene je uspješno primijenjena na drevnoj leucil-tRNA-sintetazi (AncLeuRS). Metoda ne zahtijeva uporabu tRNA i uklapa se u proces pročišćavanja proteina.
- Nelinearna regresija Boltzmannovom krivuljom nije dobar odabir za određivanje točke mekšanja u krivulji dobivenoj diferencijalnom pretražnom fluorimetrijom. Boltzmannova krivulja opisuje samo denaturaciju proteina, a ne uzima u obzir da usporedno s denaturacijom dolazi do drugoga procesa, agregacije proteina, koji pridonosi izgledu krivulje već oko točke infleksije.
- AncLeuRS je termički stabilnija od leucil-tRNA-sintetaze iz bakterije *E. coli* (EcLeuRS).
- AncLeuRS se ponaša analogno EcLeuRS u reakcijama aktivacije norvalina i leucina, prijenosa leucina na tRNA<sup>Leu</sup>, ukupne aminoacilacije leucinom i hidrolize nepripadnog supstrata norvalil-tRNA<sup>Leu</sup>.
- Sukladno početnoj hipotezi, AncLeuRS je termički stabilniji analog EcLeuRS, posjeduje vrlo slična katalitička svojstva, i kao takva pogodna je za upotrebu u istraživanjima temeljenim na usmjerenom evoluciji u kojima je poželjna veća stabilnost enzima.
- T252R/D345A AncLeuRS neočekivano pokazuje dva puta manju aktivnost od AncLeuRS i T252R/D345A EcLeuRS. S obzirom na sličnu aktivnost enzima T252R/D345A EcLeuRS, EcLeuRS i AncLeuRS, navedeni rezultat čini se kao artefakt uzrokovan eksperimentalnom pogreškom i zahtijeva daljnje istraživanje.
- T252R/D345A AncLeuRS ima inaktiviranu domenu za popravak pogreške.

## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

aa	engl. <i>amino acid</i> (aminokiselina)
aaRS	aminoacil-tRNA-sintetaza
AncLeuRS	drevna leucil-tRNA-sintetaza
1,8-ANS	1-anilinonaftalen-8-sulfonska kiselina
a.u.	engl. <i>arbitrary units</i> (proizvoljne jedinice)
BSA	engl. <i>bovine serum albumine</i> (albumin iz goveđeg seruma)
<i>cpm</i>	engl. <i>counts per minute</i> (udarci u minuti)
DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> (deoksiribonukleinska kiselina)
dNTP	deoksiribonukleozid-trifosfat
DSF	engl. <i>differential scanning fluorimetry</i> (diferencijalna pretražna fluorimetrija)
DTT	ditiotreitol (1,4-dimerkaptobutan-2,3-diol)
EcLeuRS	leucil-tRNA-sintetaza iz bakterije <i>E. coli</i>
EDTA	engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> (etilendiamintetraoctena kiselina)
EtBr	etidijev bromid
GFP	engl. <i>green fluorescent protein</i> (zeleni fluorescirajući protein)
HEPES	2-[4-(2-hidroksietil)piperazin-1-il]etansulfonska kiselina
JTT	Jones-Taylor-Thornton
LB	Luria-Bertani
LG	Le-Gascul
Leu	leucin
LeuRS	leucil-tRNA-sintetaza
ML	engl. <i>maximum likelihood</i> (najveća vjerojatnost)
MSA	engl. <i>multiple sequence alignment</i> (višestruko poravnavanje sekvenci)
NTP	nukleozid-trifosfat
Nva	norvalin
pb	par baza
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i> (lančana reakcija polimeraze)
PEI	polietilenimin
PEG	polietilenglikol



---

<i>Pfu</i>	lat. <i>Pyrococcus furiosus</i>
PMSF	engl. <i>phenylmethanolsulphonyl fluoride</i> (fenilmetilsulfonil-fluorid)
PON	serumska paraoksonaza
PPi	engl. <i>inorganic pyrophosphate</i> (pirofosfat), $P_2O_7^{4-}$
RT-PCR	engl. <i>real time polymerase chain reaction</i> (kvantitativna lančana reakcija polimeraze)
SDS	engl. <i>sodium dodecyl sulphate</i> (natrijev dodecilsulfat)
SDS-PAGE	engl. <i>sodium dodecyl sulphate – polyacrylamide gel electrophoresis</i> (poliakrilamidna elektroforeza uz dodatak natrijeva dodecilsulfata)
TAE	skraćeni naziv za pufer koji sadrži tris, octenu kiselinu i EDTA
TBE	skraćeni naziv za pufer koji sadrži tris, bornu kiselinu i EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin
ThLeuRS	leucil-tRNA-sintetaza iz bakterije <i>T. thermophilus</i>
Tris	tris(hidroksimetil)aminometan
tRNA	engl. <i>transfer ribonucleic acid</i> , prijenosna ribonukleinska kiselina
tRNA <sup>aa</sup>	prijenosna ribonukleinska kiselina s antikodonom za odgovarajuću aminokiselinu (aa)
wt	engl. <i>wild type</i> (divlji tip)

## § 7. LITERATURNI IZVORI

1. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, W. F. Freeman and Company, New York, 2002, str. 25-26, 68, 83-85, 440, 476, 768-774, 817-823, 829-831.
2. J. J. Perona, I. Gruić-Sovulj, *Top. Curr. Chem.* **344** (2013) 1–41.
3. N. Cvetešić, A. Palencia, I. Halasz, S. Cusack, I. Gruić-Sovulj, *EMBO J.* **33** (2014) 1639–1653.
4. N. Cvetešić, *Mehanizmi popravka pogreške leucil-tRNA-sintetaze sprječavaju nekanonsku mistranslaciju proteoma bakterije Escherichia coli*, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2015, str. 52, 54–56, 87, 93–94, 136.
5. M. J. Harms, J. W. Thornton, *Nat. Rev. Genet.* **14** (2013), 559–571.
6. J. W. Thornton, *Nat. Rev. Genet.* **5** (2004) 366–375.
7. M. J. Harms, J. W. Thornton, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **20** (2010) 360–366.
8. D. L. Trudeau, M. Kaltenbach, D. S. Tawfik, *Mol. Biol. Evol.* **33** (2016) 2633-2641.
9. E. A. Gaucher, S. Govindarajan, O. K. Ganesh, *Nature* **451** (2008) 704–707.
10. V. A. Risso, J. A. Gavira, D. F. Mejia-Carmona, E. A. Gaucher, J. M. Sanchez-Ruis, *J. Am. Chem. Soc.* **135** (2013) 2899–2902.
11. M. Tan, B. Zhu, X. L. Zhou, R. He, X. Chen, G. Eriani, E. D. Wang, *J. Biol. Chem.* **285** (2010) 3235–3244.
12. N. Cvetešić, J. J. Perona, I. Gruić-Sovulj, *J. Biol. Chem.* **287** (2012) 25 381–25 394.
13. J. Pevsner, *Bioinformatics and Functional Genomics*, John Wiley & Sons, Hoboken, 2015, str. 208, 245-296.
14. *Globin Evolution*, veljača 2017., *Molecule of the month*,  
<https://pdb101.rcsb.org/motm/206>. (datum pristupa 27. kolovoza 2017.)
15. W. M. Fitch, *Syst. Zool.* **20** (1971) 406–416.
16. J. T. Bridgham, S. M. Carroll, J. W. Thornton, *Science* **312** (2006) 97–101.
17. S. F. Field, M. V. Matz, *Mol. Biol. Evol.* **27** (2010) 225–233.
18. J. Ling, N. Reynolds, M. Ibba, *Annu. Rev. Microbiol.* **63** (2009) 61–78.
19. A. Fersht, *Structure and Mechanism in Protein Science*, W. H. Freeman and Company, New York, 1998, str. 103–111, 384-389.

20. S. An, K. Musier-Forsyth, *J. Biol. Chem.* **279** (2004) 42359–42362.
21. J. J. Perona, A. Hadd, *Biochemistry* **46** (2007) 10 149–10 432.
22. A. Palencia, T. Crépin, M. T. Vu, T. L. Lincecum, S. A. Martinis, S. Cusack, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19** (2012) 677–684.
23. R. S. Mursinna, T. L. Lincecum, S. A. Martinis, *Biochemistry* **40** (2001) 5376–5381.
24. J. Sambrook, D. W. Russell, *Molecular Cloning: a laboratory manual*, Vol. 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001, str. 13.19–13.25.
25. M. M. Ling, B. H. Robinson, *Anal. Biochem.* **254** (1997) 157–178.
26. G. F. Vovis, S. Lacks, *J. Mol. Biol.* **115** (1977) 525–538.
27. N. C. Pace, *Crit. Rev. Biochem.* **3** (1975) 1–43.
28. A. R. Fersht, L. Serrano, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3** (1993) 76–83.
29. J. A. Abbott, N. M. Livingston, S. B. Egri, E. Guth, C. S. Francklyn, *Methods* **113** (2017) 64–71.
30. F. H. Niesen, H. Berglund, M. Vedadi, *Nat. Protoc.* **2** (2007) 2212–2221.
31. H. Klump, J. D. Ruggiera, M. Kessel, J. B. Park, M. W. W. Adams, F. T. Robb, *J. Biol. Chem.* **267** (1992) 22 681–22 685.
32. <http://www.biology-online.org/dictionary/Mesophile> (datum pristupa 30. kolovoza 2017.)
33. S. Kumar, C. J. Tsai, R. Nussimar, *Protein Eng., Des. Sel.* **13** (2000) 179–191.
34. L. C. Wheeler, S. A. Lim, S. Marqusee, M. J. Harms, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **38** (2016) 37–43.
35. M. Goldsmith, D. S. Tawfik, *Methods Enzymol.* **523** (2013) 257–283.
36. M. O'Donoghue, P. Allard, A. Ferlinz, J. Verheyde, K. Warrington, *Protein Thermal Shift Assay Using Applied Biosystems Real Time PCR Systems*, 2009.
37. *pET System Manual*, 11. izd., Novagen, 2005.
38. <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/cloning/competent-cells-for-transformation/chemically-competent/dh5alpha-genotypes.html> (datum pristupa 27. srpnja 2017.)
39. [https://www.gelifesciences.com/gehcls\\_images/GELS/Related%20Content/Files/1478781880316/litdoc52130800\\_20161110134421.pdf](https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1478781880316/litdoc52130800_20161110134421.pdf) (datum pristupa 17. veljače 2017.)
40. <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/nd-1000-v3.8-users-manual-8%205x11.pdf> (datum pristupa 6. srpnja 2017.)

41. [http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/pmsfro?lang=en&region=HR&gclid=Cj0KCQjwierMBRCHARIsAHl9i4EViuXtPS7TtKbdX-RDfyfUECJrIf9hbM9f\\_ltrPUrc\\_PUSnuHGlwAjtEEALw\\_wcB](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/pmsfro?lang=en&region=HR&gclid=Cj0KCQjwierMBRCHARIsAHl9i4EViuXtPS7TtKbdX-RDfyfUECJrIf9hbM9f_ltrPUrc_PUSnuHGlwAjtEEALw_wcB) (datum pristupa 21. kolovoza 2017.)
42. R. M. C. Dawson, D. C. Elliott, W. H. Elliott, K. M. Jones, *Data for Biochemical Research*, Oxford University Press, Oxford, 1986.
43. <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/technical-resources/technical-reference-library/real-time-digital-PCR-applications-support-center/protein-thermal-shift-support/protein-thermal-shift-support-getting-started.html> (datum pristupa 15. ožujka 2017.)
44. <http://www.medilexicon.com/dictionary/45827> (datum pristupa 17. kolovoza 2017.)
45. U. Quint, R. T. Müller, G. Müller, *Arch. Orthop. Trauma. Surg.* **117** (1998) 43–46.
46. <http://physiology.med.cornell.edu/faculty/mason/lab/zumbo/files/PHENOL-CHLOROFORM.pdf> (datum pristupa 17. kolovoza 2017.)
47. G. Brawerman, J. Mendecki, S. Y. Lee, *Biochemistry* **11** (1972) 637–641.
48. <http://www.uniprot.org/taxonomy/> (datum pristupa 6. rujna 2017.)
49. N. Cvetešić, I. Gruić-Sovulj, *Methods* **113** (2017) 13–26.
50. A. S. Guillermo, P. J. Finerty, *Mol. BioSyst.* **5** (2009) 217–223.
51. H. Bar-Rogovsky, A. Hugematter, D. S. Tawfik, *J. Biol. Chem.* **288** (2013) 23 914–23 927.
52. C. S. Francklyn, E. A. First, J. J. Perona, Y. M. Hou, *Methods* **44** (2008) 100–118.
53. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/n8630?lang=en&region=HR> (datum pristupa 29. kolovoza 2017.)



## § 8. ŽIVOTOPIS

### Osobni podaci

Ime i prezime: Marija Viher

Datum rođenja: 4. kolovoza 1993.

Mjesto rođenja: Zagreb

### Obrazovanje

2000. – 2008. Osnovna škola Petar Zrinski, Zagreb

2008. – 2012. V. gimnazija, Zagreb

2012. – 2015. Preddiplomski sveučilišni studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

### Nagrade i priznanja

2013. Posebna Rektorova nagrada

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2013. Znanstveni piknik

2013 – 2017 Otvoreni dan kemijskog odsjeka PMF-a