

Analiza proteinskih interakcija mikrotermoforezom

Antičević, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:217:284587>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-26**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Kemijski odsjek

Ivan Antičević

**Analiza proteinskih interakcija
mikrotermoforezom**

Nastavni kromatografski pokusi

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistra edukacije biologije i kemije

Zagreb, 2019. godina.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za biokemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Jasmine Rokov Plavec i neposrednim voditeljstvom dr. sc. Maria Kekeza.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom Aminoacil-tRNA-sintetaze kao čuvari standardnog genetičkog koda (IP-2016-06-6272) te u okviru potpore istraživanjima Sveučilišta u Zagrebu pod nazivom Istraživanje proteinskih kompleksa biljne seril-tRNA-sintetaze.

ZAHVALE

Veliko Hvala mentorici Jasmini što ste bili mentor u punom smislu te riječi, što ste mi pružili priliku izraditi zanimljiv rad, na neprestanoj spremnosti za pomoć u eksperimentalnom radu i pisanju zadržavajući stalno osmijeh na licu.

Hvala Mariu na prijateljskoj radnoj atmosferi i velikom strpljenju, hvala na uloženom vremenu i trudu provedenom u labosu, a najviše hvala na pozitivnom stavu kada stvari nisu išle baš po planu.

Hvala i svim članovima Zavoda za biokemiju posebno Vladimiru i Jurici koji su stalno bili tu kada nešto zapne i uvijek spremni pomoći.

Hvala prof. Judašu što me je naučio razmišljati drugačije.

Hvala mojoj ekipici, što su ispunili ove studentske dane, sada ću vas pilot s nekim drugim pričama :)

Neizmjereno hvala mojoj obitelji a pogotovo mojim roditeljima koji su uvijek tu, hvala na ljubavi i pomoći.

Sadržaj

ABSTRACT	XI
1. ISTRAŽIVAČKI DIO	1
1.1. UVOD	3
1.2. LITERATURNI PREGLED	5
1.2.1. Proteini.....	5
1.2.2. Protein-protein interakcije	9
1.2.3. Mikrotermoforeza	11
1.2.4. Seril-tRNA-sintetaza	14
1.3. MATERIJALI I METODE	22
1.3.1. Materijali.....	22
1.3.1.1. Standardne kemikalije	22
1.3.1.2. Boje	22
1.3.1.3. Markeri veličine.....	22
1.3.1.4. Peptidi.....	22
1.3.1.5. Kromatografske kemikalije, kolone, membrane i filmovi	23
1.3.1.6. Kapilare za mikrotermoforetska mjerenja.....	23
1.3.1.7. Hranjive podloge i medij za uzgoj bakterije Escherichia coli	23
1.3.1.8. Sojevi bakterije Escherichia coli.....	23
1.3.1.9. Plazmidni vektori.....	23
1.3.2. Metode	25
1.3.2.1. Bioinformatičke metode	25
1.3.2.2. Priprema glicerolskih bakterijskih kultura	25
1.3.2.3. Metode rada s proteinima	25
1.3.2.4. SDS-poliakrilamidna elektroforeza	26
1.3.2.5. Nadekspresija ciljanih proteina.....	27
1.3.2.6. Homogeniziranje stanica	28
1.3.2.7. Afinitetna kromatografija na Ni-NTA agarozima.....	28
1.3.2.8. Gel-filtracija	29
1.3.2.9. Ionsko-izmjenjivačka kromatografija	29
1.3.2.10. Proizvodnja Tev proteaze	30
1.3.2.11. Proteolitičko odcjepljivanje afinitetnog privjeska s fuzijskog proteina	31
1.3.2.12. Ultrafiltracija	31
1.3.2.13. Određivanje koncentracije proteina	31
1.3.2.14. Western-hibridizacijska analiza	31
1.3.2.15. Mikrotermoforeza	33
1.4. REZULTATI	35
1.4.1. Ispitivanje interakcije (<i>His</i>) ₆ -PNF i (<i>His</i>) ₆ -GSTF2 sa SerRS-om	35
1.4.2. Ispitivanje utjecaja peptida s N-kraja BEN1 na interakciju SerRS:BEN1.....	39
1.5. RASPRAVA.....	45

1.6. ZAKLJUČAK ISTRAŽIVAČKOG DIJELA	48
2. METODIČKI DIO	49
2.1. NASTAVNI KROMATOGRAFSKI POKUSI.....	51
2.1.1. Općenito o kromatografiji	51
2.2. KROMATOGRAFIJA I NASTAVA KEMIJE.....	59
2.2.1. Osnovnoškolski nastavni program.....	59
2.2.2. Srednjoškolski nastavni program	59
2.3. KROMATOGRAFIJA U UDŽBENICIMA	60
2.3.1. Kromatografija u osnovnoškolskim i srednjoškolskim udžbenicima	60
2.4. OBJAŠNJENJE NASTAVNOG SATA	62
2.4.1. Uporaba kromatografije.....	62
2.4.2. Nastavni sat	63
2.4.2.1. Potrebni materijali i metode za izradu nastavnog sata	63
2.4.2.2. Tijek nastavnog sata	64
2.5. ZAKLJUČAK METODIČKOG DIJELA.....	66
3. LITERATURNI IZVORI.....	67
4. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA	77
5. DODATAK	81
6. ŽIVOTOPIS	XXII



SAŽETAK
Analiza proteinskih interakcija mikrotermoforezom
Nastavni kromatografski pokusi

Ivan Antičević

Osim svoje kanonske uloge (uspostava kovalentne veze između pripadne tRNA^{Ser} i aminokiseline serin) seril-tRNA-sintetaza (SerRS) ostvaruje i nekanonske uloge djelujući samostalno ili u interakciji s drugim proteinima. U sklopu ovog rada provedena su mjerenja s prethodno identificiranim potencijalnim proteinskim interaktorima SerRS iz biljke *Arabidopsis thaliana* koristeći mikrotermoforezu, biofizičku metodu za kvantitativnu analizu proteinskih interakcija *in vitro*. Interakcija SerRS s proteinom do sada nepoznate funkcije (PNF) nije potvrđena, a mikrotermoforeza se nije pokazala prikladnom metodom za identifikaciju interakcije SerRS i glutation-S-transferaze phi 2 (GSTF2). Prethodnim istraživanjima potvrđena je interakcija SerRS i proteina BEN1, koji je uključen u metabolizam brasinosteroidnih hormona. Istraživanja su pokazala da njihovo interakcijsko sučelje čini katalitička domena SerRS-a, te N-terminalni produžetak proteina BEN1. Da bi se dodatno ispitala važnost N-kraja proteina BEN1 metodom mikrotermoforeze ispitana je interakcija SerRS i BEN1 u prisutnosti peptida koji odgovara prvim 17 aminokiselina na N-kraju proteina BEN1. Kompeticijski eksperimenti su pokazali da peptid s N-kraja proteina BEN1 ometa interakciju SerRS:BEN1 čime je potvrđeno da je N-kraj proteina BEN1 doista dio interakcijskog sučelja dva proteina.

Kromatografija je zbirni naziv za grupu laboratorijskih tehnika za razdvajanje homogenih smjesa. Uporaba kromatografskih tehnika je učestala te izrazito povezana sa svakodnevnim životom. Zastupljenost kromatografije u osnovnoškolskoj nastavi kemije je izostavljena, a u srednjoškolskoj nastavi se o njoj govori malo. Ovakvo stanje čudi s obzirom na široku primjenu kromatografije kao važne laboratorijske metode. U sklopu ovog rada predložen je 90-minutni nastavni sat koji će poslužiti kao predložak za uključivanje kromatografije u svakodnevnu nastavnu praksu.

105 (80+25) stranica, 30 slika, 5 tablica, 93 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: BEN1, pročišćavanje proteina, protein-protein interakcije, mikrotermoforeza, seril-tRNA-sintetaza, kromatografija, nastava

Mentor istraživačkog dijela: doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec, KO PMF

Neposredni voditelj: dr. sc. Mario Kekez, KO PMF

Mentor metodičkog dijela: izv. prof. dr. sc. Nenad Judaš

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec
2. izv. prof. dr. sc. Nenad Judaš
3. doc. dr. sc. Dubravko Pavoković

Zamjena: izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

Datum diplomskog ispita: 19. veljače 2019.



ABSTRACT

Analysis of protein interactions by microscale thermophoresis Chromatography demonstrations

Ivan Antičević

In addition to its canonical role (the establishment of a covalent bond between the cognate tRNA^{Ser} and the amino acid serine) seryl-tRNA-synthetase (SerRS) also exhibits noncanonical roles acting alone or in interaction with other proteins. In this diploma thesis, measurements were made with previously identified potential proteins interactors of SerRS from the plant *Arabidopsis thaliana* using microscale thermophoresis, a biophysical method for the quantitative analysis of protein interactions *in vitro*. Interaction of SerRS with protein of unknown function (PNF) was not confirmed, while microscale thermophoresis appeared as an inappropriate method for identifying the interaction of SerRS and glutathione S-transferase phi 2 (GSTF2). Previous studies have confirmed the interaction of SerRS and BEN1 protein, which is involved in the brassinosteroid hormones metabolism. Studies have shown that interaction interface consists of SerRS catalytic domain and BEN1 N-terminal extension. To further investigate the importance of N-terminal extension of BEN1 protein, interaction of SerRS and BEN1 was tested in the presence of a peptide corresponding to the first 17 amino acids at the BEN1 N-terminus. Competition experiments have shown that the N-terminal peptide interferes with the SerRS:BEN1 interaction, confirming that BEN1 N-terminal extension is indeed a part of the interaction interface of two proteins.

Chromatography is a collective name for a group of laboratory techniques for separating homogeneous mixtures. Elementary school chemistry syllabus lacks knowledge on chromatography while highschool syllabus contains scarce information. This practice is in contrast to wide application of chromatography as an important laboratory method. In this thesis, a 90-minute lesson was proposed that could serve as a template for inclusion of chromatography in regular chemistry teaching practice.

105 (80+23) pages, 30 figures, 5 tables, 93 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: BEN1, protein purification, protein-protein interactions, microscale thermophoresis, seryl-tRNA synthetase, chromatography, teaching

Mentor of research part: dr. sc. Jasmina Rokov Plavec, Assistant Professor, FoS UniZg
Assistant mentor: dr. sc. Mario Kekez, FoS UniZg
Mentor of methodical part: dr. sc. Nenad Judaš, Associate Professor, FoS UniZg

Reviewers:

1. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec, Assistant Professor, FoS UniZg
2. dr. sc. Nenad Judaš, Professor, FoS UniZg
3. dr. sc. Dubravko Pavoković, Assistant Professor, FoS UniZg

Substitute: dr. sc. Ivana Ivančić Baće, Professor, FoS UniZg

Date of exam: February 19th 2019

1. ISTRAŽIVAČKI DIO

1.1. UVOD

Bjelančevine ili proteini imaju važnu ulogu u rastu i razvoju svih živih organizama. Osim što izgrađuju različite dijelove svake stanice, izvode čitav niz različitih aktivnosti unutar organizma. Pri izvršavanju svoje zadaće proteini interagiraju s različitim molekulama pa tako i s drugim proteinima. Proteini rijetko djeluju sami, procese u stanicama obavljaju molekulski mehanizmi koji se sastoje od velikog broja komponenti.¹ Pošto su interakcije među proteinima važne za razumijevanje rasta i razvoja stanice razvijene su i razne metode kojima se proučavaju te interakcije. Jedna od njih je biofizička metoda mikrotermoforeze.

Mikrotermoforeza (eng. *microscale thermophoresis*, MST) podrazumijeva mjerenje promjene intenziteta fluorescencije (intrinzične fluorescencije ili fluorescencije fluorofora kojim je obilježena molekula od interesa), a koja je posljedica kretanja molekule u otopini u mikroskopskom temperaturnom gradijentu. Gibanje molekule ovisi o promjeni u hidratacijskom omotaču, naboju ili veličini molekula. Ako postoji interakcija, dolazi do promjene jednog od navedenih parametara i samim time i do promjene u kretanju molekule, odnosno promjene u intenzitetu fluorescencije.²

Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) su enzimi čija je uloga vezanje pripadajuće aminokiseline na pripadnu molekulu tRNA. AaRS kataliziraju reakcije aktivacije i prijenosa aminokiseline na molekulu tRNA.¹ AaRS su proteini koji mogu ulaziti u interakcije s drugim proteinima i pri tome sudjeluju u raznolikim staničnim procesima. Seril-tRNA-sintetaze (SerRS) su dio obitelji aaRS, a odgovorni su za uspostavu kovalentne veze između pripadne tRNA^{Ser} i aminokiseline serin. Uz ovu kanonsku ulogu, SerRS imaju i nekanonske uloge koje ostvaruju samostalno ili uspostavljajući interakcije s drugim staničnim proteinima. Prethodnim istraživanjima pokazano je da postoji interakcija između seril-tRNA-sintetaze iz biljke *Arabidopsis thaliana* i proteina BEN1 iz istog organizma.³ BEN1 je slabo istražen protein koji sudjeluje u metabolizmu brasinosteroidnih hormona u biljkama.⁴ Dosadašnja istraživanja su pokazala da u interakcijskom sučelju sudjeluje katalitička domena SerRS-a. Delecijom prvih 17 aminokiselina N-kraja proteina BEN1 dokinuta je interakcija što je upućivalo da je N-kraj proteina BEN1 također dio interakcijskog sučelja kompleksa SerRS:BEN1.⁴

Dodatni proteinski interaktori seril-tRNA-sintetaze iz biljke *Arabidopsis thaliana* identificirani su metodom tandemskog afinitetnog supročišćavanja spregnutog sa spektrometrijom masa (eng. *tandem affinity purification with mass spectroscopy*, TAP-MS).⁵ Kao potencijalno zanimljivi interaktori odabrana su četiri proteina, no za istraživanja u ovom diplomskom radu

korišteni su GSTF2 (glutation-S-transferaza phi2, TAIR oznaka: At4G02520) i PNF (protein čija biološka funkcija još nije poznata, TAIR oznaka: At4G27450).

Jedan od ciljeva ovog diplomskog rada jest metodom MST utvrditi postojanje interakcije proteina PNF-a i SerRS-a, odnosno proteina GSTF2 i SerRS-a. U tu svrhu proteine je potrebno prekomjerno eksprimirati i pročistiti te potencijalnu interakciju provjeriti metodom MST. Drugi cilj diplomskog rada je ispitati je li doista prvih 17 aminokiselina na N-kraju proteina BEN1 odgovorno za ostvarivanje interakcije SerRS:BEN1. U tu svrhu je proveden kompeticijski eksperiment u kojem je smjesi proteina BEN1 i SerRS dodan peptid duljine sedamnaest aminokiselina koji odgovara N-kraju BEN1 te je MST metodom određena jačina interakcije SerRS i BEN1 u prisutnosti peptida. Za potrebe ovih eksperimenata proteine je potrebno prekomjerno eksprimirati i pročistiti te provesti MST mjerenja. Rezultati ovog diplomskog rada trebali bi pomoći u boljem razumijevanju funkcije i strukture proteinskih kompleksa u kojima sudjeluje biljna SerRS.

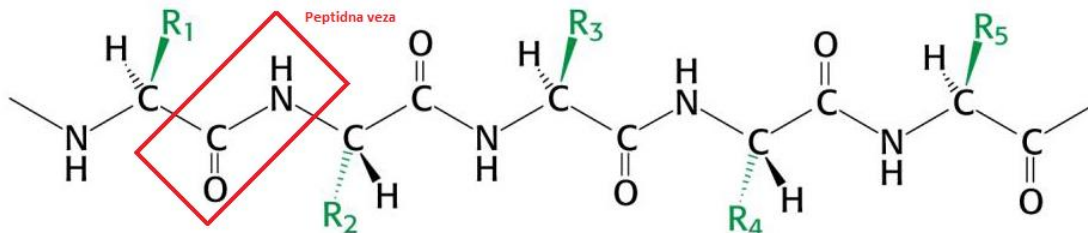
1.2. LITERATURNI PREGLED

1.2.1. Proteini

Proteini su makromolekule koje nalazimo u živim organizmima i koji obavljaju ključnu funkciju u svim životnim procesima stanice. Imaju katalitičku, transportnu, spremišnu ulogu, pružaju imunološku zaštitu, kontroliraju rast i diferencijaciju, prenose živčane impulse, kontroliraju pokrete... Proteini su linearni polimeri izgrađeni od aminokiselina, koji se smataju u specifičnu trodimenzionalnu strukturu. Funkcija proteina je direktno povezana s njihovom trodimenzionalnom strukturom. Redosljed aminokiselina nekog proteina određen je redosljedom nukleotida u genu koji ga kodira. Aminokiseline koje grade proteine sadrže širok spektar funkcionalnih skupina, one uključuju alkoholnu, tiolnu, karboksilnu, tioestersku... Većina skupina je kemijski reaktivna i često su ključne za obavljanje funkcije. Proteini mogu interagirati jedni s drugima te s drugom biološkim molekulama tvoreći komplekse, primjerice makromolekulske komplekse koji sudjeluju u replikaciji DNA, prijenosu signala kroz stanicu ili izgradnji staničnog skeleta. Neki proteini su strukturno prilično kruti dok su drugi proteini fleksibilni. Proteini krute grade često sudjeluju u izgradnji citoskeleta ili u izgradnji vezivnog tkiva. Proteini koji pokazuju dozu fleksibilnosti mogu sudjelovati kao opruge ili poluge koje su ključne u stvaranju kompleksa između dva i više proteina ili proteina i druge molekule, u procesima prijenosa informacije unutar ili između stanica. Enzimi, tj. proteini koji kataliziraju biokemijske reakcije, također pripadaju u fleksibilne proteine jer često tijekom biokemijske reakcije mijenjaju svoju konformaciju.¹

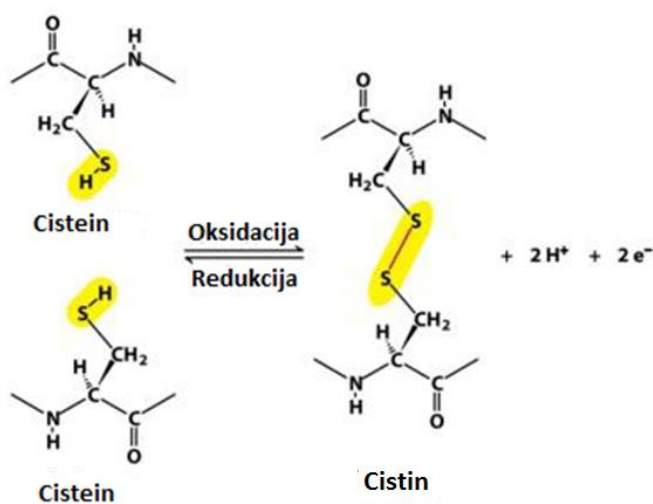
Proteini su polipeptidni polimeri izgrađeni od aminokiselina, molekula koje sadrže amino skupinu (-NH₂) i karboksilnu skupinu (-COOH) spojene na centralni ugljikov atom. Pri nastanku polipeptida aminokiseline se međusobno spajaju stvarajući peptidnu vezu, pri čemu se α -karboksilna grupa jedne aminokiseline povezuje s α -amino grupom druge aminokiseline (slika 1). U stanicama peptidna veza nastaje tijekom elongacijske faze translacije na ribosomu. U reakciji ne sudjeluju slobodne aminokiseline, već su one vezane na molekule tRNA. Amino skupina aminoacil-tRNA koja se nalazi u A mjestu nukleofilno napada estersku vezu između aminokiseline i tRNA u P mjestu. Zatim se ribosom pomiče za jedan kodon u mRNA, na način da se deacilirana tRNA nalazi u E mjestu, peptidil-tRNA se nalazi u P mjestu, dok je A mjesto prazno za novu aminoacil-tRNA. Peptidna veza je kovalentna veza koja se može raskinuti putem amidne hidrolize, odnosno dodatkom vode. U prisustvu vode peptidne veze spontano se razlažu, pri čemu se oslobađa energija ($2 - 4 \text{ kcal mol}^{-1}$). Međutim, ovaj proces je jako spor,

jer su peptidne veze stabilne pa je za spontani raspad jedne veze potrebno i do 1000 godina. U živim organizmima ovaj proces se događa mnogo brže jer u njemu sudjeluju enzimi proteaze i peptidaze.¹



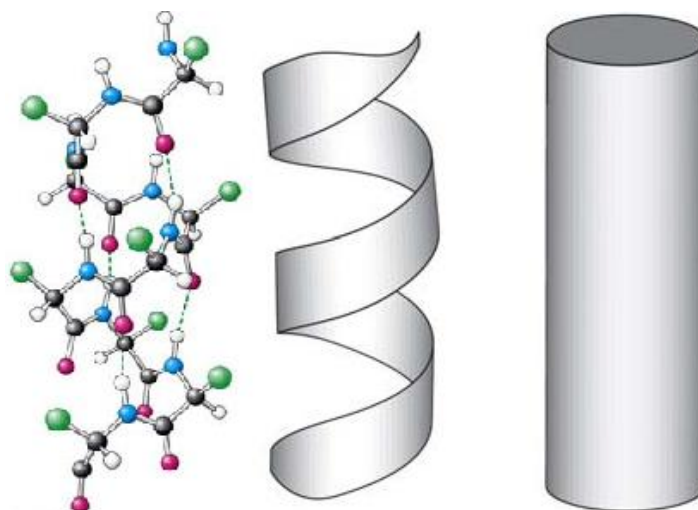
Slika 1. Dio polipeptidnog lanca – niz aminokiselina povezanih peptidnim vezama. Preuzeto i prilagođeno iz literaturnog navoda 1.

Aminokiseline tvore linearne lance polipeptida koji su često umreženi, umrežavanje je najčešće omogućeno stvaranjem disulfidne veze između molekula cisteina (slika 2).



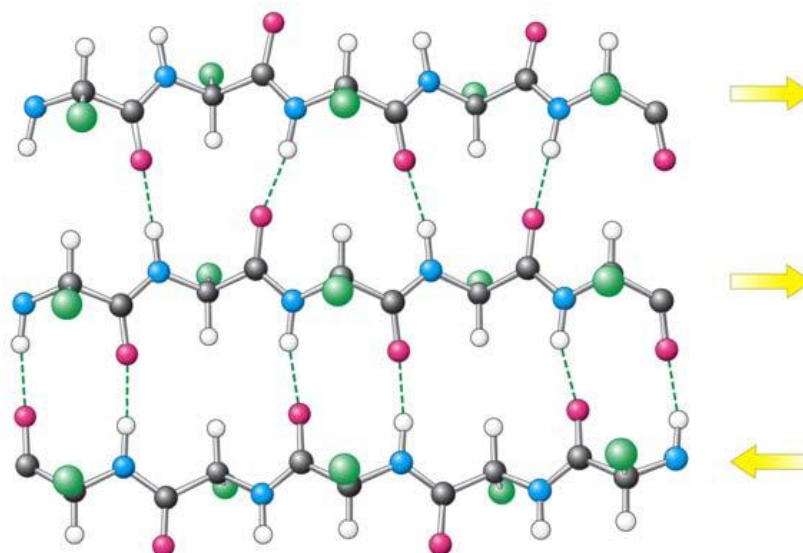
Slika 2. Stvaranje disulfidne veze između molekula cisteina je reakcija oksidacije. Preuzeto i prilagođeno iz literaturnog navoda 1.

Linearni polipeptidni lanci stvaraju različite sekundarne strukture od kojih su najčešće: α -uzvojnice ili β -ploče. α -uzvojnica je struktura koja je dodatno stabilizirana vodikovim vezama nastalim između -CO grupe jedne aminokiseline i -NH grupe aminokiseline koja se nalazi 4 mjesta uzduž glavnog lanca (slika 3). Uzvojnica je desna, a svaki navoj sadrži 3,6 aminokiselina. Osim α -uzvojnice, u sekundarnoj građi proteina, sudjeluju i β -ploče koje se sastoje od maksimalno rastegnutih polipeptidnih lanaca nazvanih β -nitima. Unutar niti aminokiseline su međusobno udaljene 3.5 Å, a u samoj α -uzvojnici ta udaljenost je 1.5 Å.¹



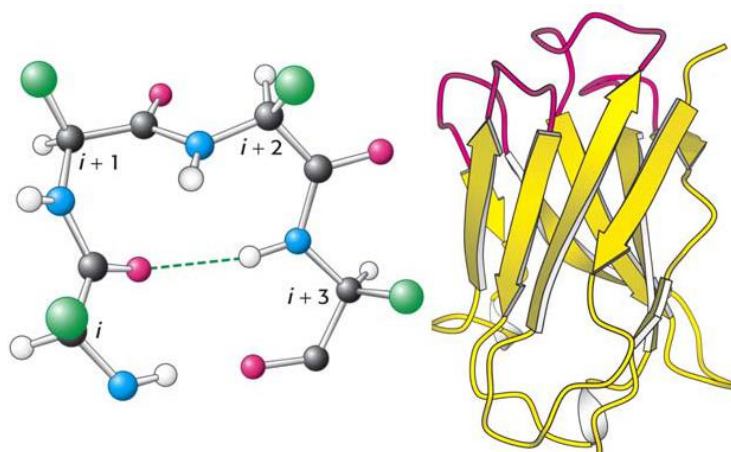
Slika 3. Struktura α -uzvojnice. A) Struktura prikazana modelom kuglica i štapića. B) Vrpčasti opis. C) Valjkasti opis. Preuzeto i prilagođeno iz literaturnog navoda 1.

β -ploču stabiliziraju vodikove veze između karbonilnih i amidnih skupina međusobno paralelnih ili antiparalelnih dijelova polipeptidnog lanca, tvoreći tako list ispod i iznad kojega strše bočni ogranci aminokiselina (slika 4). Neke aminokiseline ne sudjeluju u stvaranju α -uzvojnice zbog svoje građe. β -C atomi aminokiselina koje se dodatno granaju (Val, Thr, Ile) destabiliziraju α -uzvojniciu iz steričkih razloga te zbog toga stvaraju β -ploče. Ser, Asp i Asn razaraju α -uzvojnice budući da imaju bočne skupine koje su donori ili akceptori vodikovih atoma i nalaze se neposredno uz okosnicu polipeptidnog lanca te ovi donori i akceptori vodika razaraju vodikove veze u α -uzvojnici.



Slika 4. Struktura miješane β -ploče. Preuzeto i prilagođeno iz literaturnog navoda 1.

Proteini mogu sadržavati miješane β -ploče koje se sastoje i od paralelnih i antiparalelnih β -lanaca. Promjena orijentacije polipeptidnog lanca osigurana je β -okretom, koji je stabiliziran vodikovom vezom između CO grupe aminokiseline na položaju i i NH grupe aminokiseline koje se nalazi na položaju $i + 3$ (slika 5). Druge fleksibilnije strukture proteina su ostvarene Ω -omčama na površini. Omče su odgovorne za promjenu smjera lanca, te su zajedno s β -pločom, α -uzvojnica i β -okretom odgovorne za nastanak sekundarne strukture. Omče se najčešće nalaze na površini proteina i često su odgovorne za interakcije među proteinima ili interakcije s drugim molekulama.¹



Slika 5. Struktura β -okreta i Ω -omče. Preuzeto i prilagođeno iz literaturnog navoda 1.

Tercijarnom strukturom proteina se smatra redosljed i slaganje udaljenih aminokiselina i disulfidnih veza (ako su prisutne) u trodimenzionalnoj strukturi proteina. Tercijarna struktura je prvenstveno uzrokovana zbog interakcija između bočnih ogranaka (R) aminokiselina koje grade protein. Interakcije R-skupina uključuju cijeli niz nekovalentnih interakcija: vodikove veze, ionske veze, dipol-dipol interakcije... R-skupine sa sličnim nabojem odbijaju jedna drugu, dok one sa suprotnim nabojem mogu tvoriti ionsku vezu. Slično tome, polarne R-skupine mogu tvoriti vodikove veze i druge dipol-dipol interakcije. Za tercijarnu strukturu također su važne hidrofobne interakcije, u kojima se aminokiseline s nepolarnim, hidrofobnim R-skupinama (leucin, valin, metionin, fenilalanin) grupiraju u unutrašnjosti proteina, dok se hidrofilne aminokiseline (aspartat, glutamat, lizin, arginin, histidin) nalaze na površini proteina u interakciji s okolnim molekulama vode. U tercijarnoj strukturi proteina mogu se naći i disulfidne veze. Disulfidne veze, se javljaju između bočnih lanaca cisteina koji sadrže sumpor, a s obzirom da se radi o kovalentim vezama mnogo su jače od ostalih vrsta veza koje doprinose tercijarnoj strukturi.¹ Promatrajući građu proteina često prema njoj možemo više reći o

potencijalnoj funkciji koju protein može obavljati, jer su određene kombinacije sekundarnih struktura prisutne u više različitih proteina, a te kombinacije još nazivamo i motivima. Struktura dviju α -uzvojnica razdvojenih okretom se još naziva zavojnica-okret-zavojnica i često se nalazi kod proteina koji se vežu na DNA.¹

U prirodi, većina proteina građena je od više polipeptidnih lanaca, te mogu biti sastavljeni od dva ili više istih ili različitih lanaca. Raspored i način vezanja tih podjedinica opisuje kvartarna struktura proteina. Općenito, iste vrste interakcija koje doprinose terciarnoj strukturi (uglavnom slabe interakcije, kao što su vodikove veze ili različite dipol-dipol interakcije) drže podjedinice zajedno formirajući kvartarnu strukturu. Jako je bitan raspored terciarnih struktura proteina s više podjedinica, jer male promjene mogu uzrokovati nefunkcionalni protein.¹

1.2.2. Protein-protein interakcije

Protein-protein interakcije (PPI) podrazumijevaju neslučajan fizički kontakt između dva i više proteina.⁶ Interakcije su regulirane ovisno o određenom signalu, poticaju ili dijelu staničnog ciklusa. PPI ovise o mnogim čimbenicima, poput staničnog tipa, razvojne faze stanice, staničnog ciklusa ili odgovora stanice na vanjski podražaj. Stoga, identifikacija proteinskih interaktora u određenom staničnom odgovoru je neophodna za poznavanje funkcije proteina. Identifikacija interakcija snažno ovisi o kontaktu površina proteina koji u njoj sudjeluju. Većina procesa ovisi o izravnom kontaktu između proteina u binarnim ili velikim kompleksima s više proteina.⁷ Fizički kontakt između proteina može potaknuti konformacijske promjene ili posttranslacijske modifikacije (PTM) koje određuju aktivnost tih proteina. Mnoge konformacijske promjene su potaknute hidrolizom nukleozid-trifosfata (ATP, GTP) koji su glavni dio visoko organizirane strukture interakcija. Nukleozid-trifosfati osiguravaju energiju i samim time promjenu u konformaciji proteina.⁸ Fizički kontakt između proteina nije uvijek statičan i trajan; proteinski kompleksi se kontinuirano ponovno sastavljaju i nestaju.

Najčešća klasifikacija PPI temelji se na duljini njihovog trajanja. Proteinski kompleksi mogu se sastojati od skupa stabilnih interakcija među proteinima (stabilni PPI) i manje stabilnih (prolazne PPI) interakcija ili kombinaciji ovih dviju vrsta interakcija. Kako bi ispunili svoju važnu ulogu u staničnim procesima, proteini stalno ili privremeno komuniciraju jedni s drugima stvarajući veliku interaktomsku mrežu.⁹ Primjeri stabilnog kompleksa su proteini koji se sastoje od više podjedinica, kao što su hemoglobin i RNA-polimeraza.¹⁰ Dobar primjer stabilnih proteinskih kompleksa su i ribosomi pronađeni u svim živim stanicama, te proteini koji su zaduženi za izgradnju staničnog kostura, α i β tubulini.^{11,12} Većina proteinskih interakcija s

nuklearnim proteinima dinamična je i prolazna, ali pojedine interakcije proteina u jezgri pokazuju značajnu stabilnost. Dobar primjer je kompleks centrosoma, njegova je stabilnost potrebna za odvlačenje sestrinskih kromatida uzduž mikrotubula u stanice kćeri.¹³ PPI se mogu ostvariti pomoću hidrofobnih interakcija, van der Waalsovih interakcija ili ionskih interakcija. U slučaju leucinskog zatvarača, hidrofobne interakcije igraju ključnu ulogu u vezivanju alfa-uzvojnice svakog proteina.^{14,15} Tijekom fizičkog kontakta sa svojim partnerima, proteini tvore komplekse koji mogu biti uključeni u vrlo širok raspon staničnih aktivnosti poput sinteze proteina, transporta, degradacije, signalizacije stanica i mnogih drugih aktivnosti. Te interakcije vrlo su brze jer pružaju brzi odgovor na podražaje (vezanje hormona, aktivacija ekspresije gena transkripcijskim faktorima...). Gotovo sve unutarstanične interakcije i međustanična signalizacija su prolazne, njihova funkcija zahtijeva stalnu promjenu između postojanja i odsutnosti interakcije između proteina. Interakcije na površini stanica ovise o mnogo čimbenika, o veličini, naboju i građi supstrata, količini supstrata prisutnog u izvanstaničnom prostoru, jakosti vezanja supstrat-površinski protein.¹⁶ Protein-protein interakcije na površini stanice utječu na svojstva enzima ili u izgradnji struktura kao što je citoskelet. Interakcije mogu promijeniti specifičnost proteina za njihov supstrat, inaktivirati druge proteine ili ih zaštititi od razgradnje.^{17,18} PPI su važna komponenta u gotovo svakom procesu u živoj stanici.

Istraživanje PPI često omogućuje da se protein, s potpuno nepoznatim funkcijama, stavi u kontekst kojeg daje njegov partner čija funkcija je već poznata. No, isti protein može imati potpuno različite funkcije u interakciji s drugim partnerima ili kada se nalazi u drugom okruženju. Dodatno, analiza PPI već naizgled poznatih proteina može pružiti nove uvide u njihovu funkciju. Stoga, se provode projekti u mnogim istraživačkim institucijama za izgradnju sveobuhvatne interakcijske karte za proteine i njihove komplekse.

Svaka metoda za identifikaciju PPI ima prednosti, kao i nedostatke i stoga je važno analizirati PPI s više od jedne metode kako bi se izbjegli lažno pozitivni rezultati. Budući da se većina metoda koje se koriste za identifikaciju PPI provodi uglavnom u prokariotima i jednostavnim eukariotskim organizmima potrebne su metode za predviđanje PPI u višim organizmima. U sisavaca, PPI se može predvidjeti i validirati na temelju homologije s proteinima i njihovim interakcijskim partnerima otkrivenim u jednostavnijim organizmima.^{19,20} S druge strane, postoje primjeri proteina s vrlo sličnim sekvencama koji interagiraju s potpuno različitim proteinskim partnerima u različitim vrstama. Osim homologije, za predviđanje proteinskih interakcija, koriste se i računalne baze podataka, koje sadrže dosad otkrivene proteinske

interakcije i gdje se može prema usporedbi predvidjeti moguća interakcija istraživanog proteina.

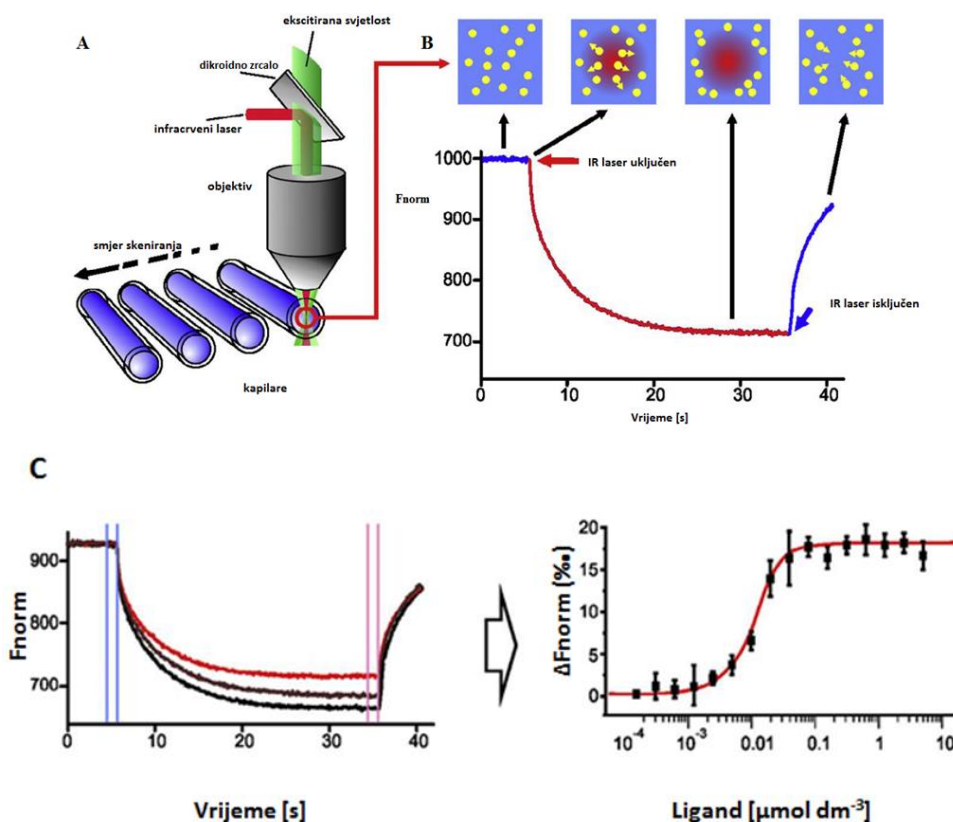
Život stanica ovisi o PPI. Ako zamislimo stanice u kojima su interakcije proteina disfunkcionalne, stanica bi bila oštećena u svakom obliku jer su PPI uključene u gotovo sve stanične procese.²¹ Svi proteini uključeni u PPI su poput strojeva, s vrlo koordiniranim, organiziranim i kontroliranim pokretima koji dolaze zajedno kada je to potrebno. Stanica je poput malog, ali vrlo sofisticiranog stroja sa stotinama međusobno povezanih mehanizama, u kojima reakcija 3. jako ovisi o reakciji 2., koja zauzvrat ovisi o reakciji 1. Učinkovitost cijelog sustava ugrožena je čak i ako samo jedan dio prestane raditi ispravno. Isti princip može se primijeniti na jednu stanicu, tkivo ili visoko napredni organizam. Danas je poznato da se gotovo svaki stanični proces odvija djelovanjem proteina koji međusobno komuniciraju i razmjenjuju informacije. Proteini igraju ulogu u transkripciji gena, kontroli staničnog ciklusa, prijenosu signala ili staničnom odgovoru na stres. Dakle, razumijevanje funkcije proteina zahtijeva analizu proteinskih interakcija. S druge strane, razumijevanje PPI pomoći će razjasniti patofiziologiju i razvoj mnogih bolesti.²² Njihova važnost može biti istaknuta po tome što postoje brojne tehnike koje su razvijene kako bi se razumjele složene interakcije unutar stanica. Dodatno, analiza proteinskih kompleksa doprinosi identifikaciji novih ciljeva lijekova, prikladnih transportera lijekova, i pomaže u razumijevanju mehanizama djelovanja novih terapijskih spojeva.

1.2.3. Mikrotermoforeza

Fluorescentne molekule koriste se u znanosti za praćenje i analizu molekularnih interakcija. Fluorescentne tehnike postale su neophodne za kvantitativno razumijevanje bioloških procesa. Ne samo da omogućuju vizualizaciju i lokalizaciju proteina u stanicama u velikom broju mikroskopskih tehnika, nego se također opsežno koriste *in vitro* za određivanje biofizičkih parametara molekularnih procesa, u rasponu od ravnotežne konstante vezanja i enzimske kinetike do termodinamike i mehanizama proteinskog smatanja. Razumijevanje fluorescencije biomolekula omogućava analizu njihove interakcije na različite načine: ovisnost svojstava ispitivanog sustava, gašenje fluorescencije, fluorescentnu korelacijsku spektroskopiju, anizotropiju.²³ Međutim, ove tehnike često zahtijevaju veliki volumen uzorka, složene eksperimentalne postavke ili intenzivne analize podataka.

Posljednjih godina mikrotermoforeza (eng. *microscale thermophoresis*, MST) pojavila se kao revolucionarna metoda za praćenje usmjerenog kretanja fluorescentnih molekula kroz

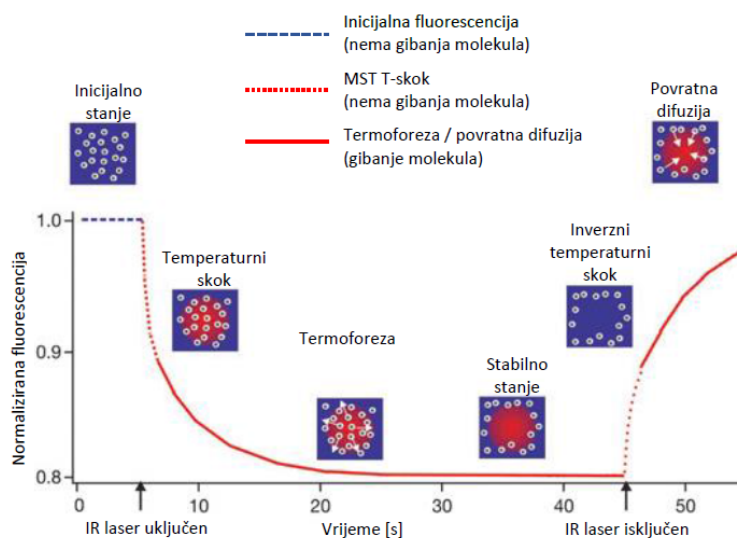
mikroskopski temperaturni gradijent. Ova metoda omogućuje preciznu kvantitativnu analizu interakcije dvije molekule, neovisno o njihovoj veličini ili fizičkim svojstvima. S obzirom da se u metodi koristi mala količina uzorka, mikrotermoforeza je izuzetno prikladna za analizu bioloških makromolekula koje nije jednostavno proizvesti u velikim količinama.^{24,25,26} Fenomen termoforeze najprije je opisao Ludwig prije gotovo 150 godina.²⁷ Termoforeza je usmjereno kretanje molekula kroz temperaturni gradijent. MST zaobilazi ograničenja drugih metoda temeljenih na fluorescenciji. S obzirom da metoda detektira promjene u hidratacijskoj ljusci biomolekula uslijed promjene veličine,^{28,29}



Slika 9. Prikaz MST eksperimenta i rezultata. **A)** Optički dio uređaja sastoji se od dikroidnog zrcala, IR lasera, objektiva i 16 kapilara. **B)** Termogram koji se dobije nakon provedenog mjerenja termoforeze u jednoj kapilari. Plava linija odgovara fluorescenciji prije uključivanja IR lasera, a crvena linija odgovara fluorescenciji nakon uključivanja IR lasera. **C)** Grafički prikaz eksperimenta koji prati vezanje molekula. Fluorescencija molekule se mijenja uslijed vezanja s ligandom. Konstanta vezanja kompleksa se dobije iz ovisnosti koncentracije neobilježenog liganda i normalizirane fluorescencije. Preuzeto i prilagođeno prema literaturnom navodu 30.

MST čak može otkriti događaje poput vezanja male molekule na protein, supstrata na enzim ili liganda na liposom. MST također nudi napredak u odnosu na najčešće nefluorescentne metode poput izotermne titracijske kalorimetrije (ITC) ili rezonancije površinskih plazmona (SPR),

izbjegavanjem visoke potrošnje uzoraka ili imobilizacije proteina na površinu. Eksperimentalni postav za detekciju MST-om sastoji se od sljedećeg: u uređaj serije *Monolith* (slika 9A, str. 11) postavi se 16 malih staklenih kapilara koje sadrže otopinu fluorescentne molekule te različite količine liganda (ukupni volumen iznosi oko 10 μL). Zatim se inducira i detektira termoforeza. Infracrveni (IR) laser s emisijskom valnom duljinom od 1480 nm fokusiran je kroz kapilaru, kako bi se proizveo mikroskopski gradijent temperature koji obuhvaća 2 – 6 $^{\circ}\text{C}$ u volumenu s promjerom od 50 μm . Istovremeno se pobuđuje fluorescencija MST laserom koja se detektira (slika 9B, str. 11). Ovo omogućuje praćenje termoforeze ovisno o gašenju (ili akumulaciji) fluorescencije obilježene molekule unutar IR-laserski induciranoj temperaturnog gradijenta (slika 9C, str. 11). Za dobivanje konstante vezanja koristi se niz kapilara s konstantnim koncentracijama fluorescentne molekule i povećanim koncentracijama liganda. Kapilare se skeniraju uzastopno i u njima se detektira termoforeza (slike 9B i 9D, str. 11). Promjena u termoforezi obilježene molekule zbog vezanja liganda se tada može upotrijebiti za izračunavanje konstante vezanja ili disocijacije (slika 9D, str. 11).



Slika 10. Signal dobiven nakon provedenog mikrotermoforetskog eksperimenta. U početku molekule su jednolično raspoređene unutar kapilare te je izmjerena početna fluorescencija. Djelovanjem IR lasera dolazi do porasta temperature (T-skok) što uzrokuje gibanje molekula, uređaj mjeri promjenu fluorescencije tijekom 30 sekundi. Nakon isključenja IR lasera, događa se inverzni T-skok, te povratna difuzija molekula koja ovisi i o masi molekule. Preuzeto i prilagođeno prema literaturnom navodu 25.

Signal dobiven instrumentom MST sastoji se od nekoliko različitih dijelova koji su vremenski ovisni (slika 10). Ovi dijelovi su: "inicijalna fluorescencija" (fluorescencija uzorka na sobnoj temperaturi bez laserskog zagrijavanja), "MST T-skok" (promjena fluorescencije uzrokovana

zagrijavanjem uzorka), "termoforezu" (promjena fluorescencije uzrokovana termoforezom), "inverzni T-skok" (izazvan hlađenjem uzorka nakon gašenja IR lasera), i "povratna difuzija" (obnavljanje fluorescencije potaknuto masovnom difuzijom molekula nakon što je zagrijavanje laserom isključeno). Povratna difuzija služi za detekciju promjene u veličini molekule. Svaka pojedina faza termoforeze sadrži informacije o afinitetu i mehanizmu vezanja.³¹ Za analizu termoforetskog grafa koristi se omjer fluorescencije dobiven nakon 30 sekundi i 1 sekunde od uključenja lasera. Omjer se prikazuje grafički u odnosu na koncentraciju liganda. Ovako se bilježi promjena fluorescencije koja ne uključuje T-skok.^{2,30,31}

1.2.4. Seril-tRNA-sintetaza

Za ispravnu biosintezu proteina važno je ispravno čitanje genetičkog koda, tj. translacija genetičke upute u molekuli mRNA. Translacija mRNA odvija se na ribosomu gdje se na temelju kodona u mRNA ugrađuje aminokiselina u polipeptidni lanac. Kodon je komplementaran antikodonu na molekuli tRNA koja nosi aminokiselinu koja je određena upravo tim kodonom. Stoga točnost translacije ovisi o ispravnom povezivanju točne aminokiseline s pripadnom molekulom tRNA. AaRS su enzimi čija je uloga vezanje pripadajuće aminokiseline na pripadnu molekulu tRNA. AaRS katalizira reakcije aktivacije i prijenosa aminokiseline na molekulu tRNA. Aktivacija predstavlja nukleofilni napad atoma kisika karboksilne skupine aminokiseline na α -atom fosfora molekule ATP-a, pri čemu nastaje aminoacil-adenilat i oslobađa se pirofosfat (PP_i). Zatim se aminokiselinski ostatak prenosi na molekulu tRNA tako da kisik 2'- ili 3'-OH skupine riboze adenzina tRNA nukleofilno napada α -ugljikov atom aminoacil-adenilata pri čemu nastaje aminoacil-tRNA i oslobađa se AMP.³²

Uloga seril-tRNA-sintetaze (SerRS) u stanici je aminoacilacija tRNA^{Ser} serinom. Rješavanjem kristalne strukture SerRS iz bakterije *Escherichia coli*⁴⁰ dobiven je uvid u strukturnu organizaciju enzima. SerRS pripada razredu II aaRS što znači da je njena katalitička domena građena od sedam antiparalelnih β -lanaca okruženih α -uzvojnicama. Također sve aaRS razreda II dijele tri očuvana aminokiselinska motiva, motiv 1 je odgovoran za dimerizaciju samog enzima, a motivi 2 i 3 sadrže aminokiseline aktivnog mjesta koje su važne za reakciju aminoacilacije.³³ AaRS razreda I sadrže Rossmannovu strukturu blizu N-kraja građenu od pet paralelnih β -lanaca povezanih α -uzvojnicama. Osim Rossmannove strukture sadrže i CP1 domenu (engl. *connectiv peptide 1*), koja kod monomernih enzima veže 3'-jednolančani kraj tRNA, a kod dimernih enzima je odgovorna za dimerizaciju.^{33,34} Osim na ova dva razreda aaRS se dijele i na podrazrede i to na temelju filogenetskih konstrukcija. Osim u građi razredi se

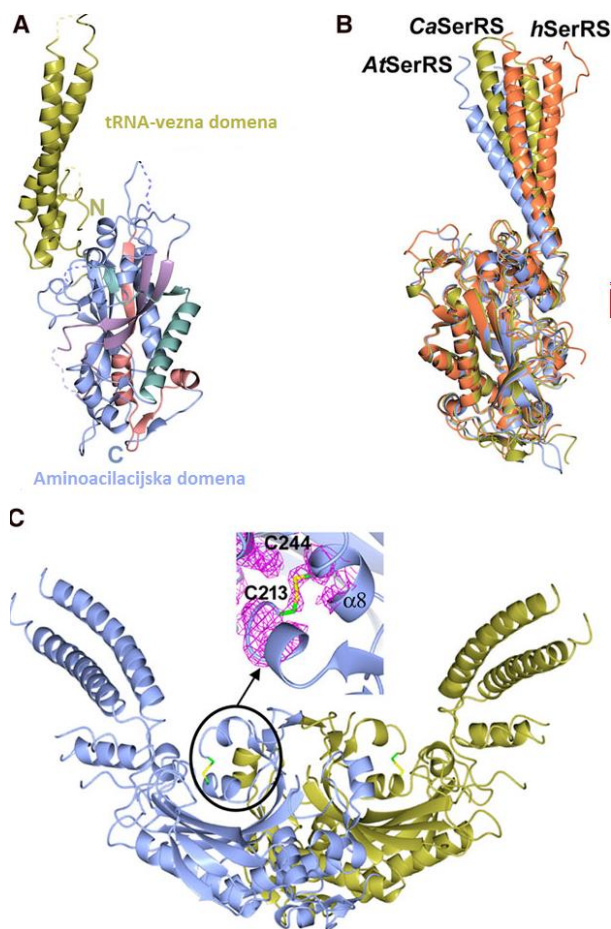
razlikuju i u procesu aminoacilacije, svi aaRS razreda I kataliziraju aminoacilaciju na 2'-OH skupinu adenzina na 3'-kraju molekule tRNA. Zatim dolazi do transterifikacije pri čemu se aminokiselinski ostatak prebacuje na 3'-OH skupinu istog adenzina. aaRS razreda II (uz izuzetak PheRS) kataliziraju aminoacilaciju direktno na 3'-OH skupinu adenzinskog ostatka.^{35,36} Također postoji i razlika u vezanju molekule ATP-a, aaRS razreda I ju vežu u produženoj konformaciji, a aaRS razreda II u savijenoj konformaciji.³⁷

Rješavanje kristalne strukture bakterijske SerRS dalo je uvid u njegovu trodimenzijsku strukturu. Enzim se sastoji od dvije domene: N-terminalne domene i katalitičke domene. N-terminalna domena sastoji se od dvije antiparalelne α -uzvojnice, a katalitička domena enzima građena je od sedam antiparalelnih β -lanaca okruženih α -uzvojnica, kao i kod ostalih aaRS razreda II. Provedeni su kinetički eksperimenti na cjelovitoj i skraćenoj verziji SerRS kako bi se odredila uloga pojedine domene.³⁸ U odsutnosti N-terminalne domene jako je smanjena aktivnost aminoacilacije no nema utjecaja na aktivaciju samog serina. Verzija enzima s djelomično deletiranom N-terminalnom domenom pokazala je smanjenu aktivnost aminoacilacije. Obe verzije proteina izgubile su svojstvo visoke specifičnosti za tRNA^{Ser}, te umjesto nje vezale su i neodgovarajuće tRNA. Iz ovih eksperimenata može se zaključiti da je N-terminalna domena odgovorna za vezanje pripadne tRNA^{Ser}, dok je C-terminalna domena katalitička domena odgovorna za aktivaciju aminokiseline.

Svaka tRNA sadrži pojedine elemente koji su specifični i prepoznati od strane pripadne aaRS. Većina aaRS prepoznaje odgovarajuću tRNA na temelju antikodona, što nije slučaj kod SerRS-a. Razlog tomu je što je genetički kod za serin izrazito degeneriran, serin je kodiran sa šest kodona iz dvije kodonske grupe (UCN i AGC/U). Ne postoji samo jedan antikodon koji može prepoznati svih 6 serinskih kodona, stoga stanica sadrži nekoliko tRNA^{Ser} koje nemaju iste antikodone, pa antikodon ne može biti element prepoznavanja od strane SerRS. Istraživanja bakterijske SerRS pokazala su da SerRS ne prepoznaje niti antikodon niti diskriminacijsku bazu unutar tRNA^{Ser}.³⁹ Razlog visoke specifičnosti enzima za tRNA^{Ser} je prepoznavanje duge varijabilne ruke i tercijarne strukture tRNA^{Ser}. Varijabilna ruka sadrži više od 10 nukleotida. Rješavanjem kristalne strukture bakterijskog kompleksa SerRS:tRNA^{Ser}, pokazano je da se većina interakcija ostvaruje između aminokiselinskih ostataka SerRS i fosfatne okosnice tRNA^{Ser}. Homodimerna struktura enzima važna je za pravilno vezivanje i pozicioniranje tRNA^{Ser}. Pokazano je da se jedna tRNA^{Ser} veže preko dvije podjedinice dimera što je bitno za stabilizaciju fleksibilne N-terminalne domene SerRS koja sadrži dvije antiparalelne α -uzvojnice. Specifičnost vezanja serina osigurana je veličinom veznog mjesta unutra SerRS

koji ne dozvoljava ulazak aminokiselina većih bočnih ogranaka. Specifičnost je osigurana i na drugi način, stvaranjem vodikovih veza unutar veznog mjesta, što SerRS čini jedinom aaRS kod koje su uočena dva nezavisna mehanizma za prepoznavanje jedne aminokiseline, serina.^{40,41}

Biljne SerRS slabije su istražene nego aaRS kod ostalih organizama. Sinteza gotovo svih biljnih proteina odvija se u citosolu stanice, no dio proteina se sintetizira i u mitohondrijima i u kloroplastima jer genomi kloroplasta i mitohondrija sadrže gene za određene proteine bitne za procese fotosinteze i staničnog disanja. Stoga se postavlja pitanje kodira li biljna stanica posebno svaku aaRS za pojedini odjeljak ili postoji dijeljenje aaRS među odjeljcima. Bioinformatičkim metodama se pretpostavilo, a kasnije se eksperimentima potvrdilo da se u biljci *Arabidopsis thaliana* najmanje 15 aaRS dijeli između mitohondrija i plastida, a njih 5 se dijeli između mitohondrija i citosola. Ova dvojna lokalizacija pokazala se kao generalno pravilo za biljku *Arabidopsis thaliana*.⁴² U više biljaka je pokazano da postoje dvije SerRS, jedna je dvojno lokalizirana u kloroplastima i mitohondrijima,^{42,43,44} a druga je isključivo citosolna^{45,46}. Pri izostanku organelne SerRS uvelike se umanjuje broj mitohondrija i kloroplasta u stanici.⁴³ Kako bi dobili uvid u strukturu biljne SerRS, riješena je kristalna struktura citosolne SerRS iz modelne biljke *Arabidopsis thaliana*. SerRS monomer se sastoji od dvije domene: N-terminalne domene za vezanje tRNA^{Ser} koja sadrži dvije antiparalelne α -zavojnice i globularne aminoacilacijske katalitičke domene (slika 6A). Obje domene su dobro očuvane među kanonskim SerRS. Monomer SerRS dobro se preklapa s monomerom njegovog homologa iz gljivice *Candida albicans*, naročito s katalitičkom jezgrom, pri čemu je tRNA-vezna domena blago pomaknuta (slika 6B).³ Preklapanje ljudskog SerRS s *Arabidopsis* SerRS pokazuje značajno različito prostorno orijentiranje tRNA-veznih domena (Slika 6B), što je posljedica posebne otvorene konformacije specifične za humani SerRS bez vezanog liganda.^{46,47} Budući da se katalitička domena vrlo dobro poklapa u ta tri SerRS homologa (slika 6B), struktura aktivnog džepa *Arabidopsis* SerRS koja je uključena u vezanje seril-adenilata je očuvana. Kvaterni struktura *Arabidopsis* SerRS unutar kristala je dimer (slika 6C). SerRS također tvori dimer u otopini kao što je prethodno opaženo gel-filtracijom.⁴⁹



Slika 6. Kristalna struktura SerRS iz biljke *Arabidopsis thaliana*. **A)** Pogled na monomer *A. thaliana* SerRS. tRNA-vezna i aminoacilacijska domena obojeni su zlatno i svijetlo plavo. Vidljivi su i očuvani motivi 1 (morsko zeleno), 2 (ljubičasto) i 3 (ružičasto) aminoacilacijske domene. **B)** Superpozicija humanog SerRS (narančasta), SerRS iz gljivice *Candida albicans* (zlatno) i *Arabidopsis* SerRS (svijetloplava). **C)** Dimer *Arabidopsis* SerRS (monomer A je prikazan plavom bojom i njegov simetrični monomer A u zlatnoj boji). Disulfidni most je istaknut žutom bojom. Slika preuzeta i prilagođena iz literaturnog navoda 3.

Zanimljivo, jedinstvena disulfidna veza između Cys213 i Cys244 istog monomera prisutna je u kristalnoj strukturi, iako je uzorak proteina korišten u kristalizaciji tretiran s reducirajućim agensom ditiotreitolum (DTT). Udaljenost između dva atoma sumpora svakog cisteina iznosi 2,09 Å, što je u skladu s intramolekularnom disulfidnom vezom (slika 6C). Cys213 i Cys244 koji tvore S-S vezu nalaze se u aminoacilacijskoj domeni i pripadaju fleksibilnoj omći i α -uzvojnici. Kod drugih kristalnih struktura eukariotskih kanonskih SerRS cisteini nisu prisutni na tom mjestu. Bioinformatička analiza aminokiselinskih sljedova SerRS iz različitih organizama je pokazala da samo biljne SerRS sadrže cisteine na tim položajima, što ukazuje na njihovu funkcionalnu važnost za biljku.³

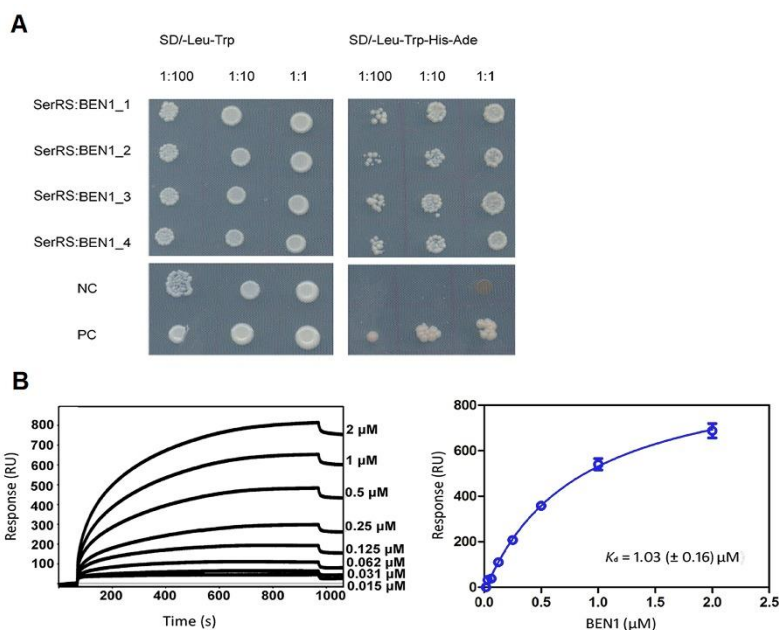
Za bolje ostvarivanje svoje uloge proteini često sudjeluju u interakciji s drugim makromolekulama, primjerice drugim proteinima. SerRS iz različitih organizama sudjeluju u proteinskim interakcijama zbog ostvarivanja i optimizacije translacijskih funkcija te također zbog drugih nekanonskih funkcija koje nisu povezane s biosintezom proteina.^{50,51,52} U potrazi za proteinskim interaktorima biljne SerRS korišten je sustav dvaju kvašćevih hibrida koji je pokazao da protein BEN1 ostvaruje interakciju s citosolnom SerRS (slika 7A).³ Sama metoda se temelji na detekciji proteinskih interakcija *in vivo*. Protein od interesa tzv. protein mamac (u ovom slučaju SerRS), eksprimira se u obliku fuzije s DNA-veznom domenom transkripcijskog faktora GAL4 na svom N-terminalnom kraju koja mu omogućava ulazak u staničnu jezgru i vezanje na uzvodnu aktivacijsku sekvencu gena izvjestitelja. Protein plijen, interakcijski parter, se eksprimira u fuziji s aktivacijskom domenom transkripcijskog faktora GAL4 i također ulazi u jezgru. Ako postoji interakcija među proteinima, GAL4-domene će se naći blizu jedna drugoj i aktivirati transkripciju gena izvjestitelja koji će omogućiti preživljavanje auksotrofnim kvascima na selektivnoj hranjivoj podlozi. Ovom metodom je kao potencijalni proteinski interaktor SerRS identificiran protein BEN1, enzim iz skupine oksido-reduktaza, koji sudjeluje u metabolizmu brasinosteroidnih hormona. BLASTP analiza pokazala je da je BEN1 protein očuvan samo u biljkama iz obitelji *Brassicaceae*.⁵³

Kako bi se potvrdila interakcija SerRS:BEN1, protein BEN1 je eksprimiran i pročišćen. Interakcija SerRS i BEN1 ispitivana je *in vitro* upotrebom površinske plazmonske rezonancije (SPR). SerRS (u fuziji s histidinskim privjeskom) je pročišćen i imobiliziran na SPR čipu, dok je BEN1 korišten kao analit. Uočeno je stabilno stvaranje kompleksa između SerRS i BEN1 (Slika 7B). Određen je K_d za interakciju SerRS: BEN1 koji iznosi $1,03 (\pm 0,16) \mu\text{M}$.

Dodatna potvrda interakcije napravljena je MST metodom. Korišten je pročišćeni SerRS bez (His)₆ privjeska (da se isključi utjecaj privjeska na SerRS:BEN1). Pratila se promjena fluorescencije fluorescentno obilježenog proteina BEN1 u otopinama rastuće koncentracije SerRS (slika 8B). K_d vrijednost interakcije bila je $0,44 (\pm 0,14) \mu\text{M}$, što je bilo slično K_d vrijednosti dobivenoj u SPR eksperimentima.

Kako bi se odredile interakcijske domene odgovorne za oblikovanje sučelja kompleksa SerRS:BEN1, daljnja MST mjerenja provedena su korištenjem skraćenih varijanti SerRS i BEN1 proteina (slika 8). *Arabidopsis* SerRS sadrži katalitičku domenu (CD), tRNA-veznu domenu (TBD) i C-terminalni produžetak bogat bazičnim aminokiselinama. Da bi se utvrdila moguća uloga C-terminalnog produžetka SerRS u vezanju BEN1, pripremljene su proteinske inačice SerRS Δ C9 i SerRS Δ C9-His bez 9 aminokiselina na C-kraju proteina (slika 8A). MST

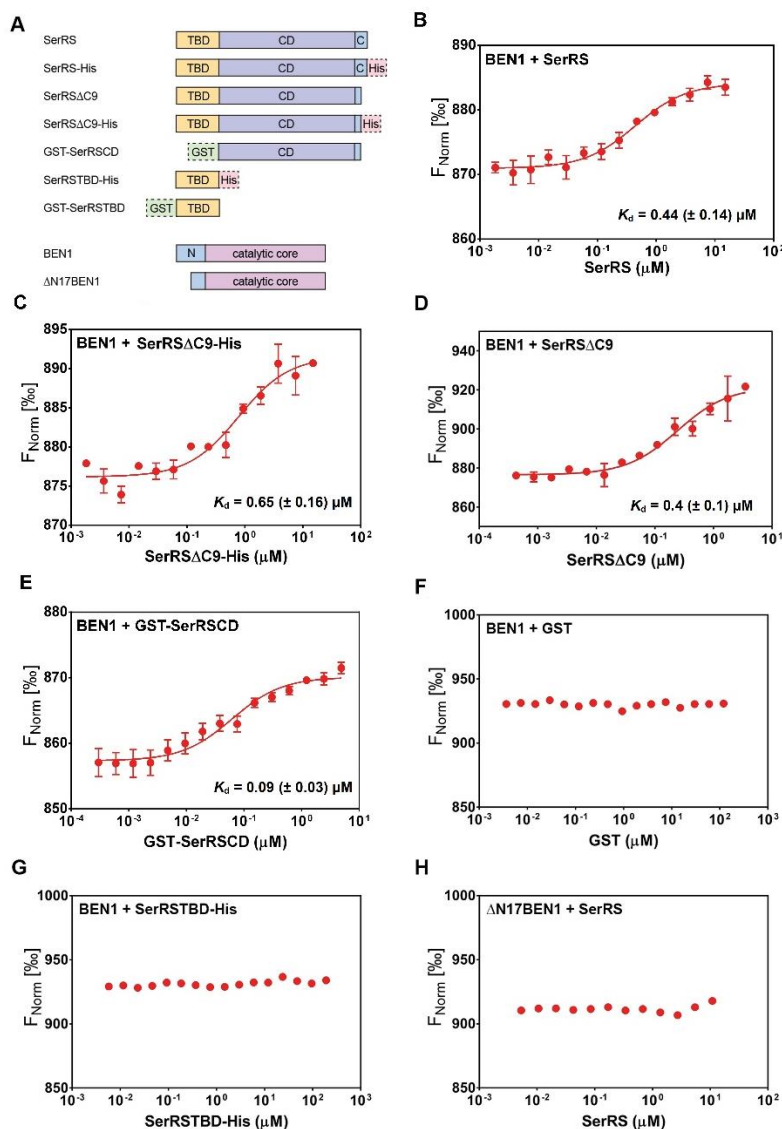
test je pokazao interakciju BEN1 sa SerRS Δ C9-His varijantom (slika 8C) s K_d (0,65 (\pm 0,16) μ M) usporedivom s K_d SerRS: BEN1 kompleksa (0,44 (\pm 0,14) μ M).



Slika 7. BEN1 je proteinski interaktor *Arabidopsis* SerRS. (A) BEN1 interagira sa SerRS u testu dvaju kvašćevih hibrida. Diploidne stanice kvasca koje eksprimiraju SerRS i četiri cDNA klonova za BEN1. (B) Analiza interakcije SerRS:BEN1 sa SPR-om. Prikazani su senzogrami (lijevo) i krivulja vezanja (desno). Senzorgrami odgovaraju jednom eksperimentu, a krivulja vezanja dobivena je dvostrukim mjerenjima. Slika je preuzeta iz literaturnog navoda 3.

Dodatno je testirana inačica SerRS Δ C9 bez (His)₆-oznake kako bi se isključio utjecaj bazičnog (His)₆-privjeska. SerRS Δ C9:BEN1 kompleks (slika 8D) pokazao je K_d 0,4 (\pm 0,1) μ M koji je gotovo identičan K_d -u za SerRS:BEN1 kompleks u MST testu. Podaci pokazuju da bazični C-terminalni produžetak SerRS nije potreban za formiranje kompleksa SerRS:BEN1. Varijanta SerRS koja sadrži samo katalitičku domenu fuzioniranu s privjeskom GST (GST-SerRSCD) pokazala je veći afinitet (slika 8E) za BEN1 nego SerRS pune duljine. K_d (0,09 (\pm 0,03) μ M) za interakciju između GST-SerRSCD i BEN1 bio je 5 puta niži od K_d za kompleks SerRS: BEN1 koji ukazuje na jaču interakciju u odsutnosti tRNA-vezne domene.³ Obje varijante koje sadrže samo domenu za vezanje tRNA, SerRSTBD-His (slika 8G) i GST-SerRSTBD nisu vezale BEN1, bez obzira na vrstu privjeska (-GST ili -His) u fuzijskom proteinu ili položaj privjeska (N- ili C-terminalni). Sveukupno, analiza mapiranja domena SerRS pokazala je da je katalitička domena SerRS odgovorna za interakciju s BEN1.³ BEN1 je protein iz obitelji epimeraza/dehidrataza koji sadrži NAD(P)⁺-veznu domenu i N-terminalni pridruženik bogat

kiselim aminokiselinama.⁵⁴ Uklanjanje prvih 17 aminokiselina iz BEN1 potpuno je ukinulo interakciju Δ N17BEN1 sa SerRS, što pokazuje da je N-terminalni produžetak proteina BEN1 bitan za vezanje SerRS (slika 8H).³



Slika 8. (A) Shematski prikaz inačica SerRS i BEN1 korištenih u analizi interakcije. Glavne domene SerRS su sljedeće: N-terminalna tRNA-vezna domena (TBD), katalitička domena (CD) i bazični C-terminalni kraj (C). BEN1 se sastoji od kiselog N-terminalnog produžetka (N) i katalitičke jezgre koja sadrži NADP⁺-veznu domenu. Neke SerRS inačice sadrže GST ili (His)₆-privjesak. (B-H) Određivanje sučelja interakcije SerRS:BEN1 kompleksa mikrotermoforezom. BEN1 je fluorescentno obilježen i inkubiran s rastućim koncentracijama različitih SerRS inačica (B-E i G) i proteinom GST kao kontrolu nespecifičnog vezanja (F). Varijanta Δ N17BEN1 fluorescentno je obilježena i inkubirana sa SerRS (H). Prikazan je termoforetski signal, u dijelovima na tisuću. Slika preuzeta iz literaturnog navoda 3.

Dodatni proteinski interaktori *Arabidopsis* SerRS identificirani su metodom tandemskog afinitetnog supročišćavanja spregnutog sa spektrometrijom masa.⁵ Kao potencijalno zanimljivi interaktori odabrano je četiri proteina. Glutation-S-transferaza phi2 (GSTF2) je odabrana jer, kao i SerRS, sudjeluje u staničnom odgovoru na različite stresne uvjete.^{55,56} Protein čija biološka funkcija još nije poznata (PNF) je odabran jer je njegova ekspresija inducirana dodatkom aluminijske soli što je slično kao kod SerRS čija je ekspresija inducirana dodatkom kadmija.⁵⁶ Translacijski elongacijski faktor (EF2) je odabran jer je pokazano da homolog ovog proteina, EF-G iz arheje *Methanothermobacter thermautotrophicus* ostvaruje interakciju s metanogenim tipom SerRS. Ribosomski protein L9 (RPL9) je odabran jer njegov homolog L6 također ostvaruje interakciju s metanogenim tipom SerRS iz iste arheje.⁵⁷

1.3. MATERIJALI I METODE

1.3.1. Materijali

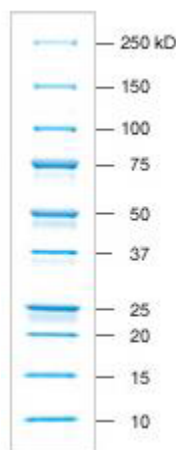
1.3.1.1. Standardne kemikalije

Agar (*Sigma*), akrilamid (*Sigma*), ampicilin (*Sigma*), amonijev peroksodisulfat (APS) (*Sigma*), ditiotreititol (DTT) (*Sigma*), etanol (*Kemika*), ekstrakt kvasca (*BD Difco*), fenilmetilsulfonil-fluorid (PMSF) (*Sigma*), fosforna kiselina (*T.T.T.*), glicerol (*Kemika*), imidazol (*Sigma*), izopropanol (*Kemika*), izopropil- β -tiogalaktozid (IPTG) (*Sigma*), kalijev klorid (*Kemika*), kanamicin (*Sigma*), magnezijev klorid (*Kemika*), *N,N'*-metilenbisakrilamid (*Sigma*), *N*-(2-hidroksietil)piperazin-*N'*-2-etansulfonska kiselina (Hepes) (*Sigma*), natrijev dodecilsulfat (SDS) (*Sigma*), natrijev hidroksid (*Kemika*), natrijev klorid (*Kemika*), *N,N,N,N'*-tetrametiletildiamin (TEMED) (*Sigma*), tripton (*BD Difco*), Tris(hidroksimetil)-aminometan (TRIS) (*Sigma*), *Tween-20* deterdžent (*Sigma*).

1.3.1.2. Boje

647-NT Red dye (*Nanotemper*), 495 -NT Blue dye (*Nanotemper*), bromfenol plavilo (*Serva*), Coomassie Brilliant Blue R-250 (*Merck*), Coomassie Brilliant Blue G-250 (*Merck*)

1.3.1.3. Markeri veličine



Slika 11. Prikaz raspodjele veličina na poliakrilamidnom gelu komercijalnog markera *PreScission Plus Protein Standards* (*Bio-rad*).⁵⁸

1.3.1.4. Peptidi

Peptid (N17BEN1) naručen je od dobavljača *Genecust*. Sastoji se od 17 aminokiselina slijeda: 1 MVREEQEEDDNNNNNNG 17

1.3.1.5. Kromatografske kemikalije, kolone, membrane i filmovi

Centrikoni *Amicon Ultra centrifugal filters (Millipore)*, gel-filtracijska kolonica *Column B (Nanotemper)*, film za *western-hibridizacijsku* analizu *Carestream biomax XAR (Kodak)*, filtracijski sustav *Corning bottle-top vacuum filter system* 0,2 μm celuloza acetat (*Sigma*), filteri s promjerom pora 0,2 μm celuloza acetat (*GE Healthcare*), kolone za gel-filtraciju *Superdex 200 10/300* i *Superdex 75 10/300 (GE Healthcare)*, anionsko-izmjenjivačka kolona za ionsku izmjenu *MonoQ 10/10 (GE Healthcare)*, Ni-NTA agarozna (*Qiagen*), gel-filtracijske kolonice *Zeba (Thermo Scientific)*.

1.3.1.6. Kapilare za mikrotermoforetska mjerenja

Staklene kapilare NT.115 *Standard Treated (Nanotemper)*, staklene kapilare NT.115 *Premium Coated MO-K005 (Nanotemper)*.

1.3.1.7. Hranjive podloge i medij za uzgoj bakterije *Escherichia coli*

Tekuća hranjiva podloga Luria-Bertani (LB): 5 g dm^{-3} kvašćev ekstrakt, 10 g dm^{-3} tripton, 10 g dm^{-3} NaCl.

Kruta hranjiva podloga LB: 5 g dm^{-3} kvašćev ekstrakt, 10 g dm^{-3} tripton, 10 g dm^{-3} NaCl, 15 g dm^{-3} agar.

Podloge su autoklavirane 16 minuta pri 121 °C. Nakon hlađenja dodani su im antibiotici: ampicilin (0,1 mg mL^{-1}), kanamicin (0,05 mg mL^{-1}).

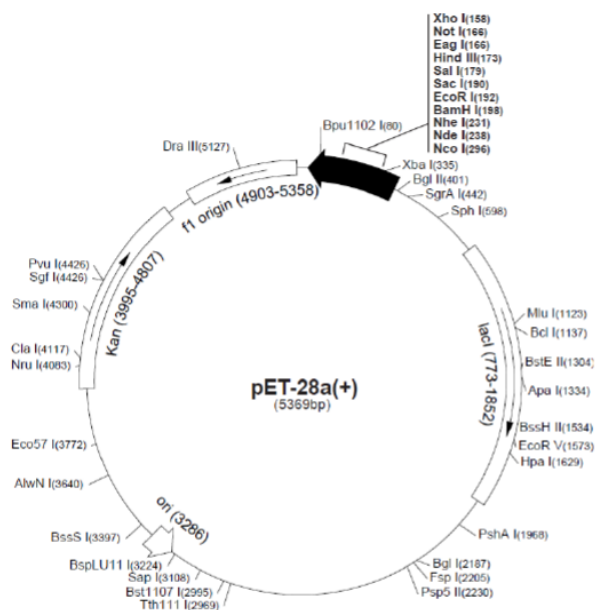
1.3.1.8. Sojevi bakterije *Escherichia coli*

BL21 (F- *ompT hsdS_B (r_B-m_B-) gal dcm (DE3)*) (*Novagen*): bakterijski soj za nadekspresiju gena kloniranih u vektore pET sustava, odnosno vektore koji sadrže T7 promotor. Gen za T7-RNA-polimerazu ugrađen je kao lizogen u bakterijski genom i pod kontrolom je inducibilnog promotora *lacUV5*. Gen je moguće inducirati dodatkom IPTG-a. Zbog mutacija u genima *lon* i *ompT* utišana je proteazna aktivnost što onemogućuje proteolitičku razgradnju proteina prilikom pročišćavanja.⁵⁹

1.3.1.9. Plazmidni vektori

pET28b_SerRS: rekombinantni plazmidni vektor pET28b s ugrađenim nukleotidnim slijedom za cjelovitu varijantu proteina SerRS bez privjeska, između restrikcijskih mjesta *NcoI* i *BamHI* s kanamicinskom rezistencijom. Bakterijski soj BL21 (DE3) bakterije *E. coli* koje sadrže ovaj rekombinantni plazmid pripremio je dr. sc. Mario Kekez,⁵ te je korišten u ovom radu.

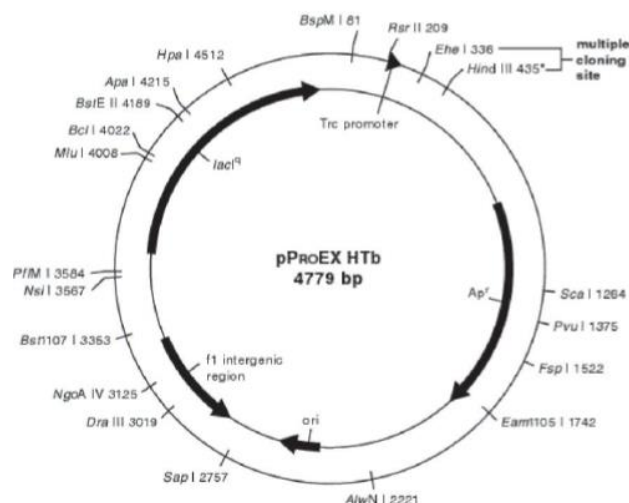
Plazmid pET28b(+) dio je serije pET vektora, niskog broja kopija i s kanamicinskom rezistencijom, a služi za prekomjernu ekspresiju proteina pod kontrolom inducibilnog promotora *T7lac*. Omogućuje stvaranje rekombinantnih proteina s N- i/ili C-terminalnom fuzijom s heksahistidinskim privjeskom (His_6) ili bez njega. Tako fuzionirani proteini efikasno se pročiste kromatografijom na Ni-NTA agarozima. Na plazmidu je nukleotidna sekvenca koja odgovara aminokiselinskom slijedu koji prepoznaje proteaza (aminokiselinski slijed LVPRGS i cijepa iza arginina (R)). Na taj način može se efikasno ukloniti (His_6)-privjesak proteina na njegovom N-kraju (slika 12).⁶⁰



Slika 12. Shematski prikaz plazmidnog vektora pET-28a(+). Preuzeto iz literaturnog navoda 60.

pPROEX Htb_BEN1 je plazmid za nadekspresiju rekombinantnog proteina BEN1. Plazmid pPROEX Htb je niskokopijski plazmid s ampicilinskom rezistencijom. Ciljni gen ugrađen u plazmid je pod kontrolom inducibilnog promotora *trc*. Ekspresijom nastaje fuzionirani protein s heksahistidinskim privjeskom na N-kraju proteina. Privjesak omogućuje pročišćavanje afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozima.⁶¹ Rekombinantni vektor je u bakterijski soj BL21 (DE3) bakterije *E. coli* transformirao dr. sc. Mario Kekez⁵ te su tako pripremljene stanice korištene u ovom radu.

(His_6)-privjesak fuzioniranog proteina može se ukloniti djelovanjem *Tev* proteaze koja prepoznaje aminokiselinski slijed ENLYFQG/S i cijepa iza glutamina (Q) (Slika 13).⁶¹



Slika 13. Shematski prikaz plazmidnog vektora pPROEX HTb. Preuzeto iz literaturnog navoda 61.

1.3.2. Metode

Pri radu su poštovane upute proizvođača priložene kemikalijama i kompletima.

1.3.2.1. Bioinformatičke metode

Korištenjem računalnog programa *ProtParam (ExPASy)* izračunate su molekularne mase pojedinih proteina, njihove vrijednosti pI, te molarni ekstinkcijski koeficijenti potrebni za izračunavanje koncentracija. Ove vrijednosti su izračunate na temelju aminokiselinskog slijeda pojedinih proteina. Rezultati dobiveni mikrotermoforetskim eksperimentima analizirani su u računalnom programu *MO.Affinity Analysis (Nanotemper)*, dok su grafovi i statistička obrada podataka napravljeni koristeći računalni program *GraphPad Prism*.⁶²

1.3.2.2. Priprema glicerolskih bakterijskih kultura

Prekonoćne bakterijske kulture ohlađene su na +4 °C, nakon čega su resuspendirane u sterilnom glicerolu tako da konačni udio glicerola bude 30 % (w/v).

1.3.2.3. Metode rada s proteinima

Za potrebe izračunavanja pojedinih parametara korištene su vrijednosti iz tablice 1 (parametri u tablici dobiveni su korištenjem programa *ProtParam (ExPASy)* na temelju aminokiselinske sekvence proteina).

Tablica 1. Fizikalno-kemijski parametri za proteine koji su korišteni. Parametri su dobiveni računalnim programom ProtParam (ExPASy).

Protein	duljina proteina / ak	molarna masa / g mol^{-1}	pI	molarni ekstinkcijski koeficijent / $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{cm}^{-1}$
(His) ₆ -GSTF2	240	27 500	5,95	21 890
(His) ₆ -PNF	278	30 994	5,73	30 745
SerRS	451	103 228	6,27	94 740
(His) ₆ -BEN1	392	43 632	5,7	33 600
BEN1 ^a	369	40 664	5,55	27 640
N17BEN1	17	2 021	3,77	- ^b
(His) ₆	6	931	5,97	5 960

^a cjeloviti protein BEN1 s uklonjenim privjeskom

^b peptid ne sadrži aromatske aminokiseline

1.3.2.4. SDS-poliakrilamidna elektroforeza

Za izvođenje elektroforeze i pripremu poliakrilamidnih gelova i korišten je komercijalni komplet PROTEAN TETRA (*Bio-Rad*). Svaki pripremljeni gel ima dva dijela, donji dio za razdvajanje sastavljen od (9 – 15% (w/v) akrilamid-bisakrilamid (29 : 1 w/v), 0,375 mol dm⁻³ Tris-HCl, pH = 8,8, 0,1 % (w/v) SDS, 0,7 µg mL⁻¹ APS, 0,05 % (w/v) TEMED), te gornjeg dijela za sabijanje proteina (9 – 15 % (w/v) akrilamid-bisakrilamid (29 : 1 w/v), 0,125 mol dm⁻³ Tris-HCl, pH = 6,8, 0,1 % (w/v) SDS, 0,7 µg mL⁻¹ APS, 0,05 % (w/v) TEMED). 9 %-tni gelovi se koriste za analizu proteina veće molekulske mase, a 15 %-tni za manje proteine. Prvo se izlijeva donji gel za razdvajanje, koji je potrebno ostaviti pola sata kako bi polimerizirao. Natrijev dodecilsulfat (engl. *sodium dodecyl sulphate*, *SDS*) je negativno nabijeni detergent koji se koristi za denaturaciju proteina. SDS je negativno nabijen, ravnomjerno se veže na protein i čini ukupni naboj proteina negativnim. Djelovanjem β-merkaptetanola dolazi do kidanja disulfidnih mostova, čime se proteini denaturira. Negativno nabijeni proteini putuju prema pozitivno nabijenoj elektrodi, a njihovo razdvajanje uvjetovano je veličinom molekulskih masa. Na smjesu za gel dolivena je redestilirana voda kako bi se spriječio doticaj s atmosferskim kisikom koji je inhibitor polimerizacije. Nakon 30 minuta voda se odlije i zamijeni sa smjesom za gel za sabijanje proteina u koji se urone češljici za formiranje jažicama u koje će se kasnije nanositi uzorci. Proteini za analizu pomiješani su s puferom za nanošenje (62,5 mmol dm⁻³ Tris-HCl, pH = 6,8, 12,5 mmol dm⁻³ β-merkaptetanola, 6,25 % (w/v) glicerol, 1,25 % (w/v) SDS, 0,002 % (w/v) bromfenolno plavilo) i zbog pospješivanja denaturacije zagrijavaju se 5

minuta pri temperaturi od 100 °C. Kao marker veličine korišten je *PreScission Plus Protein Standards* (Bio-Rad). Elektroforeza je provedena pri sobnoj temperaturi, tijekom 15 minuta uz napon od 120 V (radi sabijanja uzoraka) i potom 45 minuta uz napon od 180 V u elektroforetskom puferu (14,4 g dm⁻³ glicin, 0,1 % (w/v) SDS i 3,03 g dm⁻³ Tris-HCl). Nakon završetka elektroforeze gelovi se urone u boju *Coomassie Brilliant Blue R-250* (2,5 g dm⁻³, 10 % (v/v) octena kiselina, 45 % (v/v) etanol) 15 minuta. Višak boje se ukloni, a odbojavanje samog gela provodi se kuhanjem u destiliranoj vodi.

1.3.2.5. Nadekspresija ciljanih proteina

U ovom radu korištene su prethodno transformirane bakterije *E. coli* soja BL21 (DE3) odgovarajućim rekombinantnim ekspresijskim vektorom (pET28b_SerRS, pPROEX Htb_BEN1, pPROEX Htb_PNF). Vektor pET28b sadrži T7-promotor koji se nalazi uzvodno od kodirajućeg slijeda od interesa. Promotor se inducira IPTG-om, te se na ovaj način može postići nadekspresija proteina koji je kodiran slijedom od interesa. U genomu bakterija *E. coli* soja BL21 (DE3) nalazi se gen za T7-RNA-polimerazu iz bakteriofaga T7, učestalo korištenu u molekularnoj biologiji i biokemiji zbog mogućnosti da transkribira gotovo svaki slijed DNA povezan s T7-promotorom. U genomu bakterija nalazi se i gen *lacI* koji kodira za represor Lac. Represor sjeda na *lac*-operator i samim time inhibira transkripciju gena za T7-RNA-polimerazu. Dodatkom IPTG-a koji se veže na represor Lac dolazi do disocijacije represora s *lac*-operatora te nativna bakterijska RNA-polimeraza vezana na promotor *lac* započinje transkripciju gena za T7-RNA-polimerazu. Novonastala T7-RNA-polimeraza prepoznaje T7-promotor i prepisuje gen od interesa koji se nalazi nizvodno. Na ovaj način se postiže prekomjerna ekspresija željenog proteina.

Drugi korišteni vektor je pPROEX Htb_BEN1 koji sadrži *trc*-promotor, *lac* operator i gen za represor Lac. Dodatak IPTG-a i u ovom slučaju uzrokuje uklanjanje represora Lac s *lac*-operatora i potiče ekspresiju ciljnog proteina sa *trc*-promotora.

Tekući hranjivi LB medij (s dodanim odgovarajućim antibiotikom) inokuliran je bakterijama *E. coli* s odgovarajućim rekombinantnim vektorom i inkubiran preko noći pri 30 °C uz protresanje brzinom od 200 okretaja u minuti. Sljedećeg dana zasićena prekonocna kultura razrijeđena je 10 × svježim LB medijom (s dodanim antibiotikom) i postavljena na daljnji uzgoj pri 15 °C uz protresanje istom brzinom. Rast bakterija prekinut je kada je vrijednost njihovog OD₆₀₀ dosegla 0,6 – 0,8. Tada je dodan IPTG do konačne koncentracije od 0,5 mmol dm⁻³, te je nastavljeno s inkubacijom sljedećih 12 sati. Sljedećeg dana, stanice su oborene

centrifugiranjem na $4\,000 \times g$ 15 minuta pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, a postupak centrifugiranja ponovljen je tri puta.

1.3.2.6. Homogeniziranje stanica

Talozima stanica dobivenim nakon obaranja stanica induciranih bakterija doda se pufer za lizu stanica sastava 25 mmol dm^{-3} Tris-HCl, 500 mmol dm^{-3} NaCl, 5 % (w/v) glicerol, 1 mmol dm^{-3} DTT, 1 mmol dm^{-3} PMSF (inhibitor serinskih proteaza), $50\text{ ng }\mu\text{L}^{-1}$ lizozim. Talog se resuspendira i sonicira na ledu korištenjem *High Intensity Ultrasonic Processor (Bioblock Scientific)* sonikatora. Sonikacija je izvedena u 7 ciklusa po 1 minutu s jednom minutom pauze između, dobivena smjesa centrifugirana je tri puta po 15 min na $5\,000\text{ rpm}$. Supernatant, u kojem se nalaze fuzionirani proteini, profiltriran je kroz sterilni celuloza acetatni filter veličine pora $0,22\text{ }\mu\text{m}$. Alikvoti proteinskog ekstrakta (supernatant) i taloga pohranjeni su pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ zbog analize na SDS-poliakrilamidnoj elektroforezi.

1.3.2.7. Afinitetna kromatografija na Ni-NTA agarozu

U ovom radu korištena je afinitetna kromatografija na Ni-NTA agarozu za pročišćavanje proteina s heksahistidinskim privjescima (His_6). Afinitetna kromatografija je metoda za jednostavno brzo i efikasno pročišćavanje, koja se temelji na interakciji dušikovih atoma imidazolnog prstena histidina u privjesku proteina i niklovih atoma (Ni^{2+}) keliranih nitriloctenom kiselinom (NTA) vezanom za agarozni matriks stacionarne faze, pri čemu je NTA tetradentatni kelirajući agens i zaokuplja 4 od 6 koordinacijskih mjesta niklovih iona, dok se dva preostala mjesta koriste za interakciju s histidinom. Mililitar smole može vezati 5 – 10 mg fuzijskog proteina. Nevezana frakcija proteina ispiru se otopinom niske koncentracije imidazola, a protein vezan na smolu kompetitivno istiskuje visokom koncentracijom imidazola. Afinitetna kromatografija je provedena pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ radi očuvanja stabilnosti proteina. Otopina s fuzioniranim proteinima dobivena nakon homogeniziranja stanica pomiješana je s 1 mL Ni-NTA smole. Smola je prethodno isprana s $3 \times 5\text{ mL}$ redestilirane vode, potom s $3 \times 5\text{ mL}$ pufera A sastava: 25 mmol dm^{-3} Tris-HCl, $\text{pH} = 7,4$ (mjereno pri sobnoj temperaturi), 500 mmol dm^{-3} NaCl, 5 % (w/v) glicerol, 1 mmol dm^{-3} DTT, 10 mmol dm^{-3} imidazol) te inkubirana 1 sat pri temperaturi od $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Miješanje pospješuje vezanje proteina na samu smolu. Nakon sat vremena smjesa se propusti kroz praznu kolonu na čijem dnu se taloži smola s vezanim proteinima, dok je ostatak propušten i sakupljen te pohranjen pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (u slučaju da se protein ne zadrži na smoli). Ispiranje smole provedeno je dodatkom novih 20 mL pufera A te 20 mL pufera B (25

mmol dm⁻³ Tris-HCl, pH = 7,4 (mjereno pri sobnoj temperaturi), 500 mmol dm⁻³ NaCl, 5 % (w/v) glicerol, 1 mmol dm⁻³ DTT, 20 mmol dm⁻³ imidazol). Potom je dodano 10 mL pufera C (25 mmol dm⁻³ Tris-HCl, pH = 7,4 (mjereno pri sobnoj temperaturi), 500 mmol dm⁻³ NaCl, 5 % (w/v) glicerol, 1 mmol dm⁻³ DTT, 400 mmol dm⁻³ imidazol) koji će eluirati ciljani protein, smola se inkubira 5 minuta. Nakon inkubacije skupljaju se frakcije po 1 mL koje se analiziraju SDS-poliakrilamidnom gel-elektroforezom. Frakcije se pohranjuju pri -80 °C. Smola se nakon svega ispiru 2 mL otopine imidazola (2 mol dm⁻³), zatim 30 mL ReH₂O, te pohrani pri 4 °C u otopini 30 % (v/v) etanola.

1.3.2.8. Gel-filtracija

Gel-filtracijom je moguće razdvojiti proteine na temelju njihove veličine, odnosno molekulske mase. Molekule analita (proteina) prolaze kroz stacionarnu fazu koju čini punilo s porama, pri čemu molekule veće molekulske mase ne ulaze u pore i kreću se brže kroz kolonu, dok molekule manje molekulske mase zaostaju u porama što uzrokuje sporije kretanje. Ova metoda se može koristiti za određivanje molekulske mase proteina. U ovom radu gel-filtracija je korištena za pročišćavanje proteina SerRS te fuzijskog proteina (His)₆-PNF.

Korištene su gel-filtracijske kolone *Superdex 200 10/300* i *Superdex 75 10/300* (GE Healthcare) punjene komercijalnom smjesom agaroze i dekstrana. Ukoncentrirana otopina proteina nanosena je na gel-filtracijsku kolonu uravnoteženu u puferu sastava: 25 mmol dm⁻³ Tris-HCl, pH = 7,5 (mjereno pri sobnoj temperaturi), 50 mmol dm⁻³ NaCl, 5 % (w/v) glicerol, 1 mmol dm⁻³ DTT. Skupljene frakcije analizirane su SDS-poliakrilamidnom elektroforezom i pohranjene pri -80 °C.

1.3.2.9. Ionsko-izmjenjivačka kromatografija

Ionsko-izmjenjivačka kromatografija je fizikalno-kemijska metoda separacije u kojoj se sastojci razdjeljuju između dviju faza, od kojih je jedna nepokretna, dok se druga kreće u određenom smjeru (pokretna faza). Nepokretna faza može biti čvrsta i tekuća, a ako je tekuća može biti raspoređena na čvrstoj fazi, koja može, ali ne mora sudjelovati u separacijskom procesu. Tekuća faza može biti kemijski vezana na čvrstu fazu kovalentnom vezom ili imobilizirana na nju, primjerice *in situ* polimerizacijom nakon nanošenja. Otopina proteina nanosi se na stacionarnu fazu, a između molekula u otopini i molekula unutar stupca uspostavljaju se ionske interakcije između suprotno nabijenih grupa. Ako protein ima više funkcionalnih grupa (koje ostvaruju vezanje na stacionarnu fazu), vezanje je jače. Proteini se

eluiraju korištenjem linearnog gradijenta soli koji se postupno povećava. S manjim udjelom soli prvo se eluiraju molekule koje su slabije vezane za stacionarnu fazu, dok veći udjeli soli eluiraju dobro vezane molekule. U ovom radu ionsko-izmjenjivačka kromatografija korištena je za pročišćavanje cjelovitog SerRS-a.

Za pročišćavanje odabranih frakcija cjelovitog SerRS-a korištena je anionsko-izmjenjivačka kolona *MonoQ* (GE Healthcare), prethodno uravnotežena u puferu A (25 mmol dm⁻³ Tris-HCl, pH = 7,4 (mjereno pri sobnoj temperaturi), 50 mmol dm⁻³ KCl, 5 % (w/v) glicerol, 1 mmol dm⁻³ DTT). Prije početka kromatografije odabrane frakcije cjelovitog SerRS-a prevedene su u pufer A, a elucija samog proteina izvodila se postupnim povećanjem volumnog udjela pufera B (25 mmol dm⁻³ Tris-HCl, pH = 7,4 (mjereno pri sobnoj temperaturi), 800 mmol dm⁻³ KCl, 5 % (w/v) glicerol, 1 mmol dm⁻³ DTT). Dobivene frakcije analizirane su SDS-poliakrilamidnom gel-elektroforezom te pohranjene pri -80 °C.

1.3.2.10. Proizvodnja *Tev* proteaze

Tev proteaza je cisteinska proteaza iz virusa *Tobacco Etch Virus* (TEV), koja se koristi za visoko specifično cijepanje. Optimalno mjesto prepoznavanja za ovaj enzim je sekvenca Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-(Gly/Ser), a cijepanje se događa između ostataka Gln i Gly/Ser. Proteaza se koristi za cijepanje afinitetnih oznaka iz fuzijskih proteina (u ovom radu (His)₆ privjeska). Optimalna temperatura za cijepanje je 30 °C, no može se koristiti i pri temperaturi od 4 °C.⁶⁵ Proizvodnja *Tev* proteaze pokrenuta je iz 1 L LB medija. U tekući hranjivi LB medij (s dodatkom kanamicina) nasadene su bakterije *E. coli* s rekombinantim vektorom pPROEX Htb_*Tev* (dobiveno ljubaznošću dr. sc. Nevene Cvetešić) i inkubirane preko noći pri 30 °C uz protresanje brzinom od 200 okretaja u minuti. Sljedećeg dana prekonoćna kultura razrijeđena je 10 × svježim LB medijom (s kanamicinom) te je postavljena na daljnji uzgoj pri 15 °C uz protresanje istom brzinom. Rast bakterija prekinut je kada je vrijednost njihovog OD₆₀₀ dosegla 0,6 – 0,8. Dodan je IPTG do konačne koncentracije od 0,5 mmol dm⁻³ te je nastavljeno s inkubacijom sljedećih 12 sati. Sljedećeg dana, stanice su oborene centrifugiranjem uz 4 000 g 15 minuta pri 4 °C, a postupak centrifugiranja ponovljen je tri puta. Dobiveni talog resuspendiran je u pufer za lizu stanica te soniciran. Nakon centrifugiranja supernatant je pročišćen afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA smoli. Frakcije najbogatije proteazom korištene su za proteolitičko odcjepljivanje afinitetnog privjeske, a ostale su zamrznute pri -80 °C.

1.3.2.11. Proteolitičko odcjepljivanje afinitetnog privjeska s fuzijskog proteina

(His)₆ privjesak u fuzijskim proteinima služio je kako bi se pojednostavilo pročišćavanje ciljnih proteina i kako bi se ciljni protein na što lakši način odvojio od ostalih staničnih proteina. Za ispitivanje interakcije ciljanog proteina potrebno je otcijepiti afinitetni privjesak, kako taj privjesak ne bi utjecao na interakciju. Nakon što je fuzijski protein porezan proteazom, privjesak je odvojen ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom. (His)₆-privjesak s fuzijskog proteina odvojen je tako da je u otopinu frakcije fuzijskog proteina dodana *Tev* proteaza (masa proteaze bila je 50 puta manja od mase fuzijskog proteina). Smjesa je inkubirana preko noći pri 4 °C. Sljedećeg dana proteaza je uklonjena ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom.

1.3.2.12. Ultrafiltracija

Zamjena pufera prije kromatografije ili ugušćivanje proteinskih frakcija nakon kromatografije izvođeno je ultrafiltracijom kroz anizotropnu membranu. Rabljeni su *Amicon Ultra centrifugal filters* (*Milipore*) s veličinom pora kroz koje prolaze samo čestice manje od 30 kDa te se iznad membrane zadržavaju ciljani proteini veći od 30 kDa, a kroz membranu prolaze samo čestice manje od 30 kDa. Otopina proteina centrifugirana je uz 5 000 g pri 4 °C dva do tri puta (ovisno o željenoj konačnoj koncentraciji), kroz membranu bi prošle čestice manje od 30 kDa i s njima jedan dio pufera u kojem se protein trenutačno nalazi. Količina pufera koja je prošla kroz membranu nadomjesti se s određenom količinom željenog pufera i ponovi se centrifugiranje još dva puta. Tijekom postupka potrebno je paziti da se membrana ne posuši, tj. da uvijek ostane dovoljno uzorka iznad membrane.

1.3.2.13. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina određena je mjerenjem apsorbancije na 280 nm uređajem *NanoDrop* 1000. Pri ovoj valnoj duljini najviše apsorbiraju aromatske aminokiseline. Molarna koncentracija proteina izračunata je pomoću Lambert-Beerovog zakona, a molarni ekstinkcijski koeficijent za svaki protein određen u programu *ProtParam* (*ExpASy*) i dostupan je u tablici 1.

1.3.2.14. Western-hibridizacijska analiza

Western-hibridizacijska analiza je metoda za detekciju proteina od interesa korištenjem specifičnih antitijela koja se vežu ili za sam protein ili za privjesak koji nosi. Metoda se izvodi u više koraka: prijenos proteina s poliakrilamidnog gela na nitroceluloznu membranu, blokiranje membrane inertnim proteinima (kazeinom iz nemasnog mlijeka) kako bi se spriječilo

nespecifično vezanje antitijela na membranu, specifično vezanje primarnih antitijela na protein od interesa, vezanje sekundarnih antitijela na primarna antitijela, detekcija signala sekundarnih antitijela. Nakon izvedene SDS-gel-elektroforeze, gelu za razdvajanje se izmjere dimenzije i izrežu se odgovarajuća površina filter papira (6 komada), te nitrocelulozna membrana (*Amersham*). Gel za razdvajanje se inkubira 15 minuta u puferu za prijenos ($14,4 \text{ g dm}^{-3}$ glicin, 3 g dm^{-3} Tris-HCl pH = 7,5, 20 % (v/v) etanol). Po završetku vremena u instrumentu za polusuhi prijenos *2117 Multiphor II (LKB)* između dviju pločastih grafitnih elektroda postave se, prethodno umočene u pufer za prijenos, tri filter-papira potom gel za razdvajanje i na njega nitrocelulozna membrana na koju se stavi preostala tri filter-papira. Takva sendvič-konstrukcija još se malo zalije malom količinom pufera za prijenos. Električno polja podese se na vrijednost od $0,8 \text{ mA cm}^{-2}$, prema katodi je orijentiran gel, a membrana prema anodi kako bi uslijed djelovanja električnog polja negativno nabijeni proteini iz gela krenuli prema pozitivno nabijenoj anodi, odnosno membrani. Nakon 1,5 sat pri sobnoj temperaturi prijenos se provjerava bojanjem membrane u otopini boje *Ponceau S* (0,1 % (w/v), 5 % (v/v) octena kiselina) (*Sigma*). Višak boje ispran je u vodi, a membrana je potopljena u pufer za blokiranje (5 % nemasno mlijeko (w/v), 25 mmol dm^{-3} Tris-HCl pH = 7,5, 150 mmol dm^{-3} NaCl, 0,2 % (v/v) Tween) i ostavljena preko noći pri $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Kazein iz mlijeka nespecifično se veže na membranu na mjesta gdje se ne nalaze proteini, a to nespecifično vezanje omogućuje specifično vezanje antitijela na proteine od interesa. Sutradan je membrana isprana u TBS puferu (25 mmol dm^{-3} Tris-HCl pH = 7,5, 150 mmol dm^{-3} NaCl, 0,2 % (v/v) Tween) $3 \times 10 \text{ mL}$, te inkubirana 1 sat pri sobnoj temperaturi u otopini odgovarajućih primarnih antitijela (antitijela su razrijeđena $200 \times$ za $(\text{His})_6$). Membrana je potom isprana u TBS puferu te potopljena u otopini mišjih sekundarnih antitijela $10\,000 \times$ razrijeđenih u puferu za blokiranje. Nakon toga pripremi se 2 mL detekcijske otopine miješanjem jednakih volumena otopina A i B iz komercijalnog kompleta *LumiGlo (KPL)*. Membrana se potom uroni u detekcijsku otopinu pri čemu dolazi do pojave kemiluminiscencije koja se detektira na fotografskom filmu. Sekundarna antitijela imaju na sebi vodikovu peroksidazu koja luminol iz detekcijske otopine prevodi u eksitirani intermedijarni dianion, koji kemiluminiscira vraćanjem u nepobuđeno stanje. Vremena ekspozicije bila su različita, a filmovi su potom uronjeni u otopinu razvijача (*Kodak*) razrijeđenu 5 puta, inkubirani 2 minute, isprani vodom i potom fiksirani 2 minute u otopini razvijача (*Kodak*) razrijeđenoj 5 puta.

1.3.2.15. Mikrotermoforeza

Mikrotermoforeza je metoda koja se koristi za mjerenje makromolekulskih interakcija u uvjetima *in vitro* te je opisana u uvodu. U ovom radu provjereni su novi potencijalni interaktori SerRS-a. Također, ispitan je utjecaj peptida koji odgovara N-kraju BEN1 na već opisanu interakciju SerRS:BEN1.

Fluorescentno su obilježeni proteini BEN1, PNF te GSTF2. 100 μL otopine svakog od proteina koncentracije između 2 – 20 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ pomiješano je s fluorescentnom bojom *647NT Red dye (Nanotemper)*, (PNF s *495 –NT Blue dye (Nanotemper)*) i *binding buffer (Nanotemper)* te su tako pripremljene otopine inkubirane u mraku 30 minuta. Nakon inkubacije, smjesa je nanosena na gel-filtracijsku kolonu *Column B (Nanotemper)*, koja je prethodno isprana s 3 \times 3 mL pufera HBS (50 mmol dm^{-3} Hepes, 5 mmol dm^{-3} MgCl_2 , 140 mmol dm^{-3} NaCl, 0,05 % *Tween*, titrirano do pH = 7,4 pri sobnoj temperaturi). Nakon ulaska obilježenog proteina u kolonu, dodano je 300 μL pufera HBS, a eluat je uklonjen. Nakon toga dodano je novih 600 μL pufera HBS te je sav eluat sakupljen. Na ovaj način odvojen je višak boje iz smjese. Količina obilježene molekule je podešena tako da odziv fluorescencije bude u rasponu od 200 – 1500 jedinica.

Mikrotermoforeza zahtijeva da proteini koji sudjeluju u interakciju budu u istom puferu stoga su svi proteini prevedeni u HBS pufer korištenjem *Zeba* kromatografskih kolonica (*Thermo Scientific*). Smola u kolonici se prvo podvrgne centrifugiranju 1 minutu na 1500 \times g kako bi se uklonio konzervans, nakon čega slijedi ispiranje s 3 \times 300 μL pufera HBS centrifugiranjem 1 minutu na 1500 \times g. Na kolonu se potom nanosi do 100 μL proteina koncentracije između 2 – 20 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ kojemu se zamjeni pufer centrifugiranjem 2 minute na 1500 \times g. Svi proteini koji su analizirani MST-om prevedeni su u pufer HBS, a sve iste serije mjerenja provedene su u istom puferu.

Za mjerenja MST-om potrebno je napraviti 16 serijski razrijeđenih otopina. U sve tubice (osim prve) dodano je po 10 μL HBS pufera. U prvu reakcijsku tubicu, u kojoj se ne nalazi HBS pufer, dodano je 20 μL neobilježenog proteina maksimalne koncentracije. Kako bi se postigla serijska razrijeđena, 10 μL otopine neobilježenog proteina najveće koncentracije iz prve tubice preneseno je u drugu tubicu i promiješano pipetom, te je potom uzet alikvot od 10 μL i prenešen u treću tubicu. Taj postupak je ponavlján do zadnje tubice. Konačno, iz zadnje tubice se odvoji alikvot od 10 μL i baci. U sve tubice je potom dodano po 10 μL fluorescentno obilježenog proteina. Pripremljene smjese su inkubirane 5 minuta na ledu, nakon čega su nanešene u

staklene kapilare. U mjerenjima su korištene *Premium* kapilare. Mjerenja su izvršena pri temperaturi od 25 °C i snazi lasera od 20 %, 40 % i 50 %.

1.4. REZULTATI

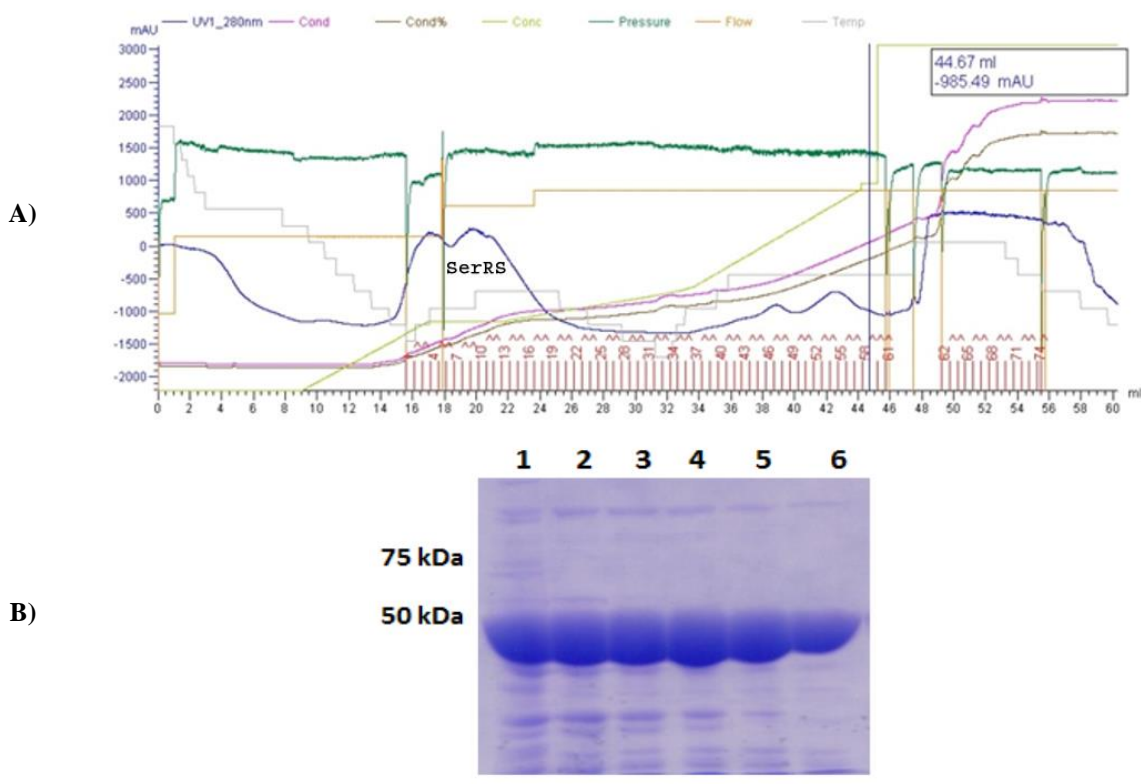
1.4.1. Ispitivanje interakcije (His)₆-PNF i (His)₆-GSTF2 sa SerRS-om

Od četiri potencijalna interaktora dobivena metodom tandemskog afinitetnog supročišćavanja spregnutog sa spektrometrijom masa (TAP-MS) i pregledavanjem literature, za eksperimente u ovom diplomskom radu korišteni su GSTF2 i PNF. GSTF2 i PNF odabrani su jer su kodirajući sljedovi za oba proteina uspješno klonirani, a proteini su prekomjerno eksprimirani u bakterijskim stanicama.⁵ Cilj je bio MST metodom utvrditi postojanje interakcije PNF-a i SerRS-a odnosno GSTF2 i SerRS-a. Za potrebe istraživanja proteine je bilo potrebno prekomjerno eksprimirati te dobiti otopine visoke čistoće i koncentracije svakog od interaktora. Za MST mjerenja potencijalnih interakcija (His)₆-PNF i SerRS-a te (His)₆-GSTF2 i SerRS-a pokrenuta je proizvodnja proteina (His)₆-PNF i SerRS. Protein (His)₆-GSTF2 nije ponovno proizveden, već je korišten protein koji je prethodno pripremio dr. sc. Mario Kekez.⁵

SerRS protein ($M_r = 51\ 614$ Da, $pI = 6,27$) eksprimiran je u soju BL21(DE3) bakterije *E. coli* i transformiran s rekombinantnim plazmidom pET28b_SerRS. Bakterije su uzgojene u 600 mL LB medija u koji je dodan kanamicin, kultura je inkubirana pri 30 °C uz brzinu potresanja 200 okretaja u minuti. Prekonoćna kultura razrijeđena je 100 puta te je ukupno pripremljeno 12 L kulture. Kulture su inkubirane u tresilici pri 15 °C, dok optičke gustoće $OD_{600} = 0,6$. Kada je postignuta željena optička gustoća dodatkom IPTG-a inducirana je ekspresija do konačne koncentracije 0,5 mmol dm⁻³. Tako pripremljene kulture ostavljene su preko noći (15 h) u tresilici pri 15 °C i uz brzinu potresanja od 200 okretaja u minuti. Bakterijske stanice resuspendirane su u puferu za lizu, sonicirane te centrifugirane. Jedna trećina supernatanta, tj. proteinskog ekstrakta, u kojem se nalazio otopljeni SerRS, smrznuta je i ostavljena pri -80 °C kao rezerva koju je, u slučaju potrebe, moguće pročistiti radi dobivanja proteina za MST mjerenja. Druga trećina proteinskog ekstrakta pročišćena je ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom na anionsko-izmjenjivačkoj koloni *MonoQ (GE Healthcare)* i korištena za MST eksperimente s proteinima GSTF2 i PNF (Slika 14). Treća trećina proteinskog ekstrakta korištena je u eksperimentima opisanim u poglavlju *Ispitivanje utjecaja peptida s N-kraja BEN1 na interakciju SerRS:BEN1*.

Proizvodnja (His)₆-PNF ($M_r = 31\ 925$ Da, $pI = 5,73$) je krenula iz prekonoćno inkubirane kulture u 200 mL LB medija s dodanim ampicilinom pri 30 °C uz potresanje od 200 okretaja u

minuti. Potom je prekonoćna kultura razrijeđena 100 puta i dobiveno je 4 L kulture koja je inkubirana na 15 °C do $OD_{600} = 0,6$.



Slika 14. Pročišćavanje proteina SerRS ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom.

A) kromatogram dobiven nakon pročišćavanja SerRS ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom na anionsko-izmjenjivačkoj koloni *MonoQ* (*GE Healthcare*), B) analiza odabranih frakcija na 9 %-tnom SDS gelu nakon ionsko-izmjenjivačke kromatografije (M – marker veličine: *PreScission Plus Protein Unstained Standards* s označenim veličinama standardnih proteina).

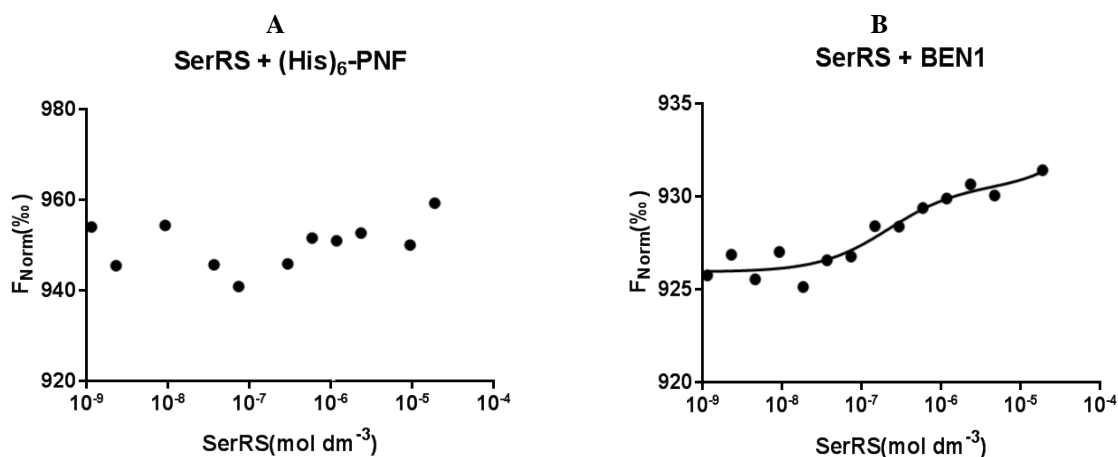
Kada je postignut željeni OD, ekspresija je inducirana IPTG-om. Fuzijski protein $(His)_6$ -PNF sadrži $(His)_6$ -privjesak te je stoga pročišćen afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu (slika 15A). Frakcije najbogatije proteinom su sakupljene te su dodatno pročišćene gel-filtracijom na *Superdex 75* koloni. U frakcijama se može vidjeti onečišćenje proteinima većih molekularnih masa koje i nisu toliko izražene, osim proteina s masom od oko 50 kDa. On ne bi trebao utjecati na mikrotermoforetska mjerenja jer je koncentracija PNF-a puno veća (slika 15B). Frakcija 5 ($80 \mu\text{mol dm}^{-3}$) $(His)_6$ -PNF-a je odabrana za mjerenje MST-om. Prije mikrotermoforeze potrebno je kovalentno na proteine vezati fluorescentnu boju. Vežanje s bojom *647-NT Red dye* (*Nanotemper*) bilo je neuspješno te je protein označen s bojom *495-NT Blue dye* (*Nanotemper*) koja omogućuje kovalentno vežanje boje preko cisteinskih bočnih

ogranaka proteina. 40 μL frakcije 5 $(\text{His})_6\text{-PNF}$ -a korišteno je za bojanje, otopina proteina s kovalentno vezanom bojom potom je razrijeđena 5 puta i kao takva korištena za MST mjerenja. Frakcije 3 ($38 \mu\text{mol dm}^{-3}$), 4, 5 i 6 SerRS-a dobivene nakon ionsko-izmjenjivačke kromatografije ukoncentrirane su uz zamjenu pufera ($87 \mu\text{mol dm}^{-3}$).



Slika 15. Pročišćavanje fuzijskog proteina $(\text{His})_6\text{-PNF}$. **A)** SDS-elektroforeza frakcija dobivenih pročišćavanjem fuzijskog proteina afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu (M – marker: *PreScission Plus Protein Standards*, 1 – 10 su elucijske frakcije), **B)** SDS-elektroforeza (9 %-tni gel) frakcija dobivenih pročišćavanjem gel-filtracijom (M – marker: *PreScission Plus Protein Standards*, 5 –frakcija odabrana za buduća mikrotermoforetska mjerenja)

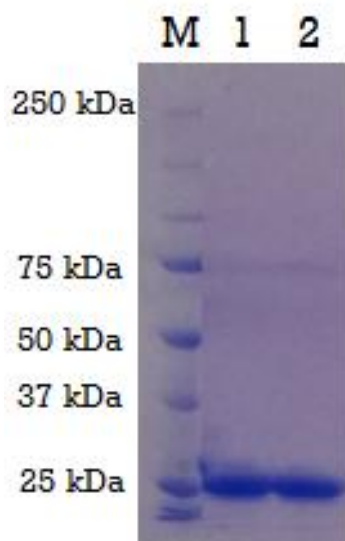
Prvi uzorak najveće koncentracije u nizu serijskih razrjeđenja MST mjerenja sadži otopinu SerRS-a koncentracije $43 \mu\text{mol dm}^{-3}$. Provedena je MST analiza interakcije SerRS i $(\text{His})_6\text{-PNF}$ na 50 % MST snage (slika 16A) te uspoređena s pozitivnom kontrolom pri istim uvjetima (pozitivna kontrola je interakcija SerRS i BEN1) (slika 16B). Iz prikazanih grafova može se vidjeti da nema interakcije između SerRS-a i $(\text{His})_6\text{-PNF}$ -a (nema skoka kao u grafu koji prikazuje interakciju SerRS i BEN1, točke su više manje u ravnini).



Slika 16. **A)** Mikrotermoforetsko ispitivanje interakcije SerRS i $(\text{His})_6\text{-PNF}$. **B)** Interakcija SerRS i BEN1 (pozitivna kontrola).

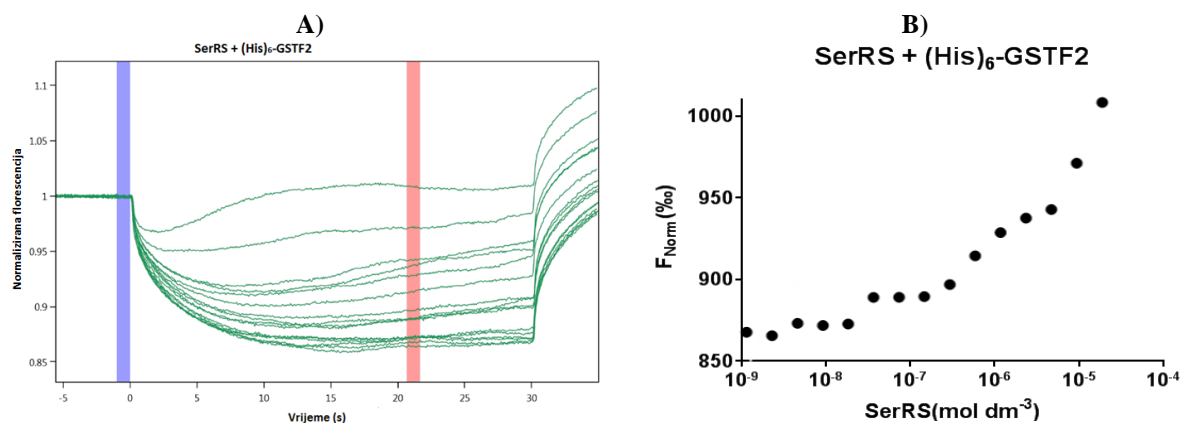
U svrhu provjere interakcije (His)₆-GSTF2 ($M_r = 28\,432$ Da, $pI = 5,95$) i SerRS korišten je protein (His)₆-GSTF2 koji je prethodno pripremio dr. sc. Mario Kekez. Protein je provjeren SDS-gel elektroforezom i izmjerena mu je koncentracija ($68\ \mu\text{mol dm}^{-3}$) (Slika 17).

(His)₆-GSTF2 kovalentno je označen preko amino skupina bojom *647-NT Red dye* (*Nanotemper*). MST mjerenja su se provodila s obilježenim proteinom (za bojanje je uzeto $34\ \mu\text{L}$ $68\ \mu\text{mol dm}^{-3}$ otopine proteina koja je nakon toga razrijeđena 10 puta) i SerRS-om (koncentracija inicijalne otopine $87\ \mu\text{mol dm}^{-3}$) (Slika 18). Eksperiment je ponavljan variranjem različitih uvjeta: promjena pufera (umjesto *Hepes*-a u standardnom HBS puferu dodana je ista količina *Tris-HCl*-a), dodatak BSA ($1\ \text{mg mL}^{-1}$), povećanje koncentracije *Tween*-a (0,1 %), različite snage lasera (40 %, 50 % i 60 %). Sve izmjene osmišljene su prema savjetima proizvođača.⁶⁴ MST krivulja prikazana na slici 18 B dobivena je pri 40 % snage lasera, a mjerenje je provedeno u HBS puferu ($50\ \text{mmol dm}^{-3}$ *Hepes*, $5\ \text{mmol dm}^{-3}$ MgCl_2 , $140\ \text{mmol dm}^{-3}$ *NaCl*, 0,05 % *Tween*, titrirano do $\text{pH} = 7,4$ pri sobnoj temperaturi) bez dodatka BSA.



Slika 17. SDS-gel elektroforeza proteina (His)₆-GSTF2 (pripremio dr. sc. Mario Kekez)
(frakcije 1 i 2, M –marker: *PreScission Plus Protein Standards*)

Na temelju dobivenih rezultata ispitivanjem metodom MST nije moguće zaključiti postoji li ili ne postoji interakcija SerRS:(His)₆-GSTF2. U samom termogramu (slika 18A) kao i u analizi rezultata (slika 18B) može se vidjeti prisutnost agregata u otopini koji utječu na rezultate. Variranjem različitih parametara agregati se nisu uspjeli maknuti iz otopine.

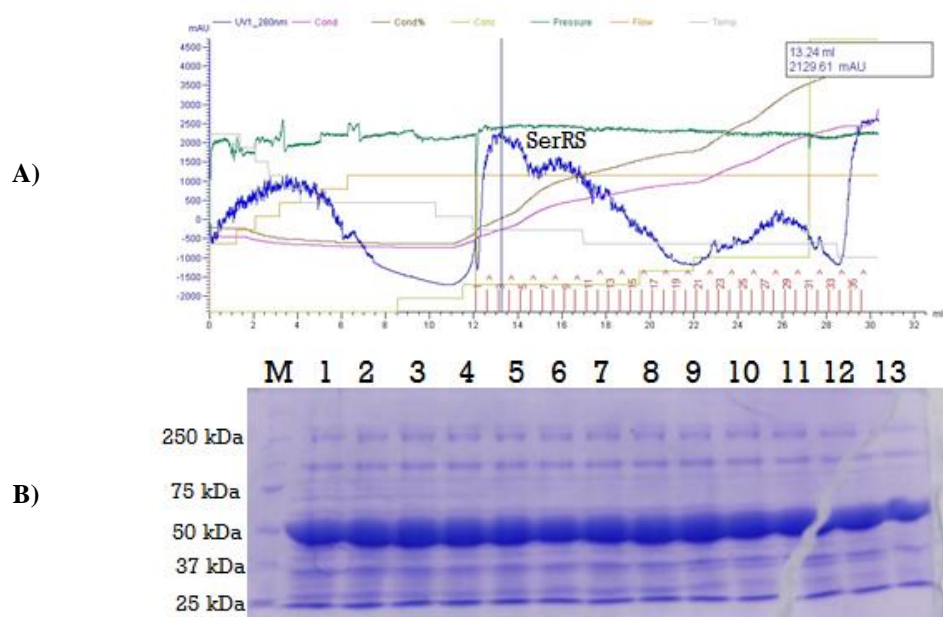


Slika 18. MST mjerenje interakcije SerRS:(His)₆-GSTF2 . **A)** Termogram dobiven MST mjerenjem. **B)** Analiza rezultata dobivenih mikrotermoforetskim mjerenjem u računalnom programu *MO.Affinity Analysis (Nanotemper)*.

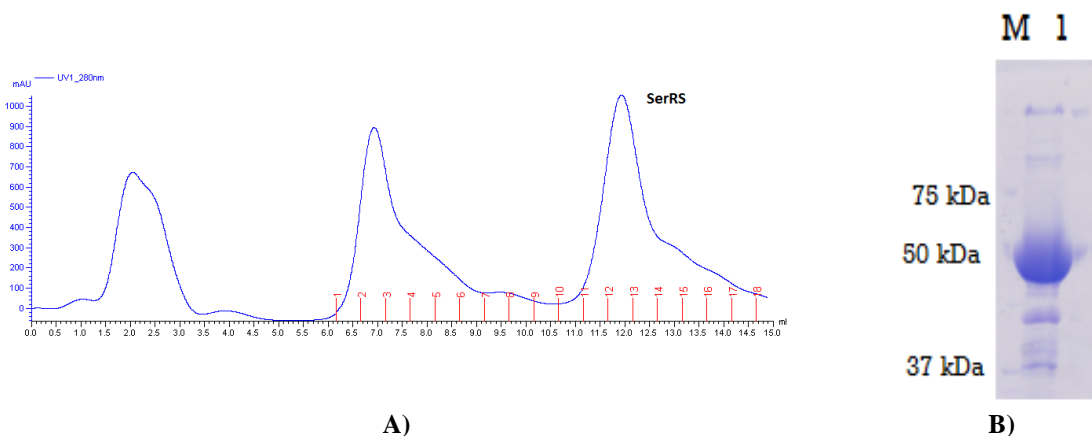
1.4.2. Ispitivanje utjecaja peptida s N-kraja BEN1 na interakciju SerRS:BEN1

Dosadašnjim ispitivanjima pokazano je da je N-terminalni kraj proteina BEN1 odgovoran za ostvarivanje interakcije SerRS:BEN1. U drugom dijelu eksperimenata provedenih u ovom radu izvedeni su kompeticijski eksperimenti u kojima je smjesi BEN1 i SerRS dodavan peptid duljine sedamnaest aminokiselina koji odgovara N-terminalnom kraju BEN1. Ovim eksperimentima promatran je utjecaj samog peptida na interakciju SerRS:BEN1. Za potrebe ovih pokusa proteine SerRS i BEN1 je potrebno prekomjerno eksprimirati, pročištititi te provesti MST mjerenja.

Treći dio proteinskog ekstrakta, u kojem se nalazi prekomjerno eksprimirani SerRS (vidi odjeljak *Ispitivanje interakcije (His)₆-PNF i (His)₆-GSTF2 sa SerRS-om*), pročišćen je ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom na anionsko-izmjenjivačkoj koloni *MonoQ (GE Healthcare)* (Slika 19A). Zbog visokih udjela nečistoća (slika 19B), frakcije najbogatije SerRS-om pročišćene su gel-filtracijskom kromatografijom na koloni *Superdex 200 10/300*. Frakcije (od 1 do 12, slika 19B) su ukoncentrirane i pročišćene gel-filtracijom u tri kruga (ukupni volumen ukoncentriranih frakcija bio je 3 mL, a kapacitet kolone bio je 1 mL) (Slika 20A). Nakon gel-filtracije, frakcije (prvo pročišćavanje – frakcije 12 i 13, drugo i treće pročišćavanje – frakcije 3 i 4), koje su bile najbogatije SerRS proteinom ukoncentrirane su i provjerene na 9 % SDS-poliakrilamidnom gelu (slika 20B). Frakcijama je izmjerena koncentracija ($75 \mu\text{mol dm}^{-3}$) te im je pufer zamijenjen u pufer za MST mjerenja (HBS). Tako pripremljen uzorak SerRS-a korišten je za ispitivanje utjecaja peptida s N-kraja BEN1 na interakciju SerRS:BEN1.



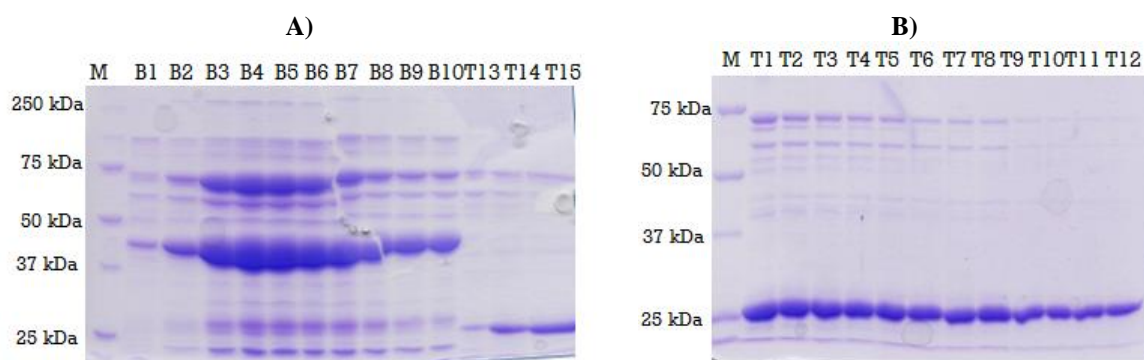
Slika 19. Pročišćavanje proteina SerRS ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom. **A)** kromatogram dobiven nakon pročišćavanja SerRS ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom na anionsko-izmjenjivačkoj koloni MonoQ (*GE Healthcare*), **B)** analiza odabranih frakcija na 9%-tnom SDS gelu nakon ionsko-izmjenjivačke kromatografije (M – marker veličine: *PreScission Plus Protein Unstained Standards* s označenim veličinama standardnih proteina)



Slika 20. Pročišćavanje proteina SerRS gel-filtracijskom kromatografijom. **A)** Kromatogram dobiven nakon pročišćavanja SerRS gel-filtracijskom kromatografijom na koloni *Superdex 200 10/300*, **B)** analiza uzorka na 9 %-tnom SDS gelu nakon ukoncentriravanja odabranih frakcija pročišćenih gel-filtracijom. (M – marker veličine: *PreScission Plus Protein Unstained Standards* s označenim veličinama standardnih proteina)

Proizvodnja proteina (His)₆-BEN1 je krenula iz 12 L LB medija u koji je dodano po 600 mL (12 × 50 mL) prekonoćne kulture koja je uzgajana na 30 °C, uz dodatak ampicilina i potresanje od 200 okretaja u minuti. Kulture dobivene miješanjem LB medija i prekonoćne kulture

ostavljene su pri 15 °C do $OD_{600} = 0,6$. Kada je OD postignut, dodan je IPTG zbog indukcije ekspresije. Kulture su ostavljene u tresilici preko noći pri istoj temperaturi. Paralelno uz proizvodnju (His)₆-BEN1 proteina proizvedena je i proteaza (His)₆-*Tev* (za uklanjanje (His)₆-privjeska s BEN1). Proizvodnja je pokrenuta iz 1 L LB medija i provedena je jednako kao i proizvodnja (His)₆-BEN1 proteina. Talози bakterijskih stanica s prekomjerno ekspimiranim proteinima (His)₆-BEN1, odnosno (His)₆-*Tev*, resuspendirani su u puferu za lizu, sonicirani te su lizati centrifugirani. Supernatanti, tj. proteinski ekstrakti su pomiješani s odgovarajućom količinom Ni-NTA smole u kojoj su inkubirani sat vremena. Nakon inkubacije oba proteina su pročišćena afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu (Slika 21).



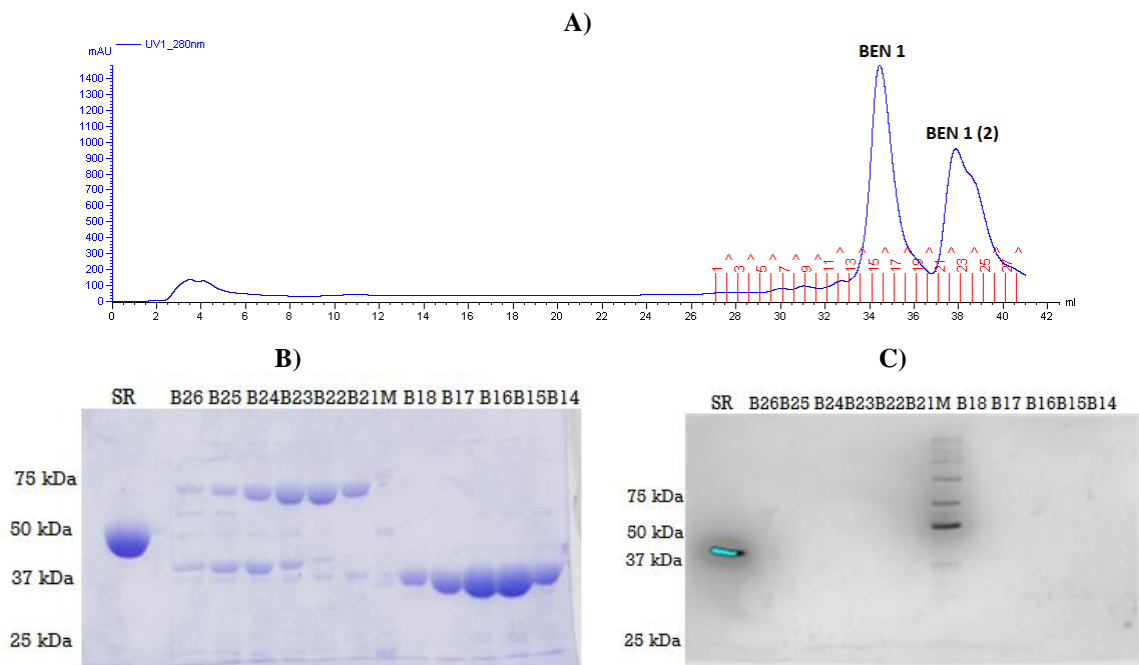
Slika 21. Analiza frakcija na 9 %-tnom SDS gelu nakon afinitetne kromatografije na Ni-NTA agarozu (M – marker veličine: *PreScission Plus Protein Unstained Standards* s označenim veličinama standardnih proteina). **A)** Frakcije (His)₆-BEN1 (označene B) i tri frakcije (His)₆-*Tev* proteaze (označene T), **B)** frakcije (His)₆-*Tev* proteaze (M – marker veličine: *PreScission Plus Protein Unstained Standards* s označenim veličinama standardnih proteina)

Nakon pročišćavanja sve frakcije (His)₆-BEN1 sakupljene su te je u njih dodana *Tev* proteaza (cijela 4. i pola 5. frakcije) tako da *Tev* proteazina masena koncentracija bude 5 mg dm⁻³. Pripremljena otopina inkubirana je preko noći pri 4°C na rotatoru. Sljedećeg dana otopina je ukoncentrirana pri čemu je pufer zamijenjen puferom za kromatografiju. Nakon toga provedena je ionsko-izmjenjivačka kromatografija na anionsko-izmjenjivačkoj koloni *MonoQ* (*GE Healthcare*). Uočena su dva kromatografska maksimuma, a frakcije su dodatno analizirane SDS gel-elektroforezom. S obzirom na uočenu veličinu proteina na gel-elektroforezi, zaključeno je da frakcije 14-18 sadrže porezani BEN1 bez privjeska, a frakcije 21-26 neporezani (His)₆-BEN1. Uspješnost djelovanja proteaze provjerena je *western*-hibridizacijskom analizom koristeći antitijela specifična za (His)₆-privjesak (slika 22C, str. 42). Kao pozitivna kontrola za *western* analizu na gel je nanescena i prethodno pripremljena SerRS-(His)₆ (priredio dr. sc. Mario

Kekez). Na slici 22 B (str. 42) prikazana je nitrocelulozna membrana nakon što je provedena *western*-hibridizacijska analiza. Signali koji se vide odgovaraju SerRS-(His)₆ te standardu molekularnih masa. Nisu uočeni signali u frakcijama 14 – 18 što odgovara predviđanjima da te frakcije sadrže BEN1 bez privjeska što znači da je uklanjanje (His)₆ privjeska *Tev* proteazom prošlo uspješno. Međutim, *western*-hibridizacijska analiza pokazala je negativan rezultat i s frakcijama 21 – 26, za koje je pretpostavljeno da odgovaraju (His)₆-BEN1 (slika 22A i B, str. 42). Zbog neočekivanih rezultata ponovno je eksprimiran i pročišćen (His)₆-BEN1. Uzgoj je pokrenut iz 4 L kulture. Nakon indukcije ekspresije dodatkom IPTG-a, talozi bakterijskih stanica resuspendirani su u puferu za lizu i sonicirani te su lizati centrifugirani. Supernatant je pročišćen afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu. Ponovno je provedena *western*-hibridizacija. Na membranu su naneseni sljedeći uzorci: standard molekularne mase, dvije količine novopripremljenog (His)₆-BEN1 i frakcije 16 i 24 korištene u prethodnoj *western*-hibridizacijskoj analizi, a dobivene nakon razgradnje s *Tev* proteazom i naknadne ionske kromatografije (slika 22, str. 42) i kontrolni uzorak SerRS-(His)₆. Na nitroceluloznoj membrani novoprovodene *western*-hibridizacije mogu se uočiti signali u standardu molekularne mase, u dva uzorka novopripremljenog (His)₆-BEN1 te u uzorku SerRS-(His)₆. (slika 23, str. 43). Kao i u prethodnoj *western*-hibridizacijskoj analizi ne uočavaju se signali u frakcijama 16 i 24 što se može objasniti time da prvi kromatografski maksimum (frakcije 14 – 18, slike 22A i 22B, str. 42) odgovara porezanom BEN1 bez privjeska, a drugi kromatografski maksimum (frakcije 21 – 26, slike 22A i 22B) odgovara nečistoćama koje ne sadrže (His)₆-BEN1 (jer ne pokazuju signal tijekom *western*-hibridizacijske analize). Zaključeno je da je (His)₆-privjesak uspješno otcijepljen s BEN1 proteina i da frakcije 14 – 18 sadrže BEN1 protein bez privjeska te se mogu koristiti u planiranim kompeticijskim eksperimentima.

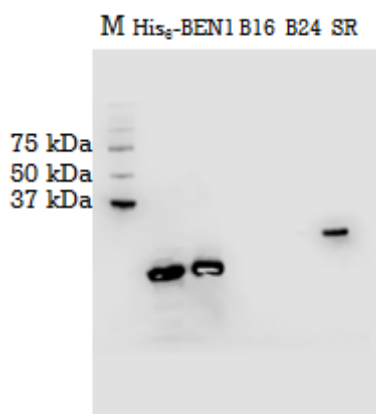
Ispitivanje utjecaja peptida s N-kraja BEN1 na interakciju SerRS:BEN1 određeno je kompeticijskim eksperimentom. U eksperimentima je korišten peptid N17BEN1 (MVREEQEEDDNNNNNG) koji sadrži 17 aminokiselina koje odgovaraju N-kraju proteina BEN1. Za kompeticijske eksperimente uzeto je 30 µL 55 µmol dm⁻³ otopine frakcije 15 BEN1. Protein je fluorescentno označen bojom 647-NT Red dye (*Nanotemper*). Za potrebe MST mjerenja otopinu označenog proteina potrebno je razrijediti 20 puta tako da se reakcija provodila s otopinom koncentracije 0,124 µmol dm⁻³. Za prvi dio pokusa pripremljen je HBS pufer u koji je dodan peptid u množinskim omjerima 1 : 1 u odnosu na BEN1. Tako pripremljen pufer dodan je u svaku od 16 tubica za MST mjerenje. Potom su napravljena serijska

razrijeđenja SerRS-a (prvi uzorak najveće koncentracije $37,5 \mu\text{mol dm}^{-3}$). U svaki od uzoraka dodana je ista količina fluorescentno obilježenog BEN1 (slika 24, str. 43). Mjerenja su napravljena pri 40 % jakosti MST lasera.



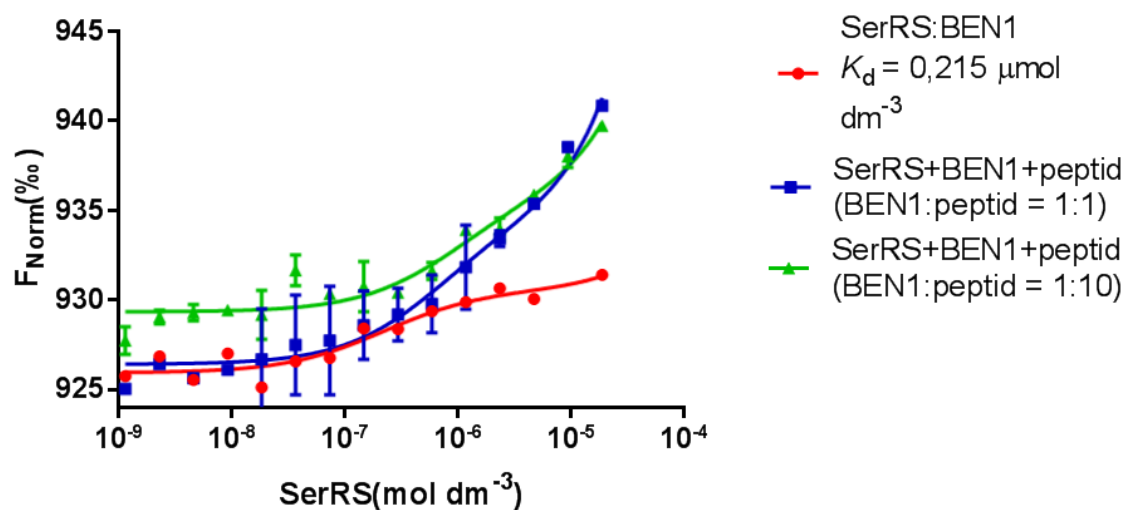
Slika 22. A) Kromatogram dobiven nakon cijepanja $(\text{His})_6$ -BEN 1 *Tev* proteazom i pročišćavanja BEN 1 ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom na anionsko-izmjenjivačkoj koloni *MonoQ* (*GE Healthcare*). B) Slika 9%-tnog SDS-poliakrilamidnog gela (SR – SerRS $(\text{His})_6$, B – odabrane frakcije BEN1, M – marker veličine: *PreScission Plus Protein Unstained Standards* s označenim veličinama standardnih proteina) čiji duplikat je korišten za western analizu. C) Slika nitrocelulozne membrane nakon western hibridizacije (SR – SerRS- $(\text{His})_6$, B – odabrane frakcije BEN1, M – marker veličine: *PreScission Plus Protein Unstained Standards* s označenim veličinama standardnih proteina).

U prikazanim rezultatima može se uočiti kako dodatak peptida utječe na izgled krivulje u odnosu na kontrolnu reakciju, SerRS:BEN1 bez dodatka peptida. U prisutnosti peptida MST krivulje pokazuju sigmoidnu narav, no nije dostignut gornji plato, te se ne može precizno odrediti vrijednost K_d -a. No, vidljiva je tendencija povećanja vrijednosti K_d -a u odnosu na reakciju bez prisutnosti peptida. Iz toga možemo zaključiti da je peptid u kompeticiji s cjelovitim BEN1 za vezanje sa SerRS-om. Promjene možemo uočiti i s malom te s velikom količinom dodanog peptida.



Slika 23. Rezultat ponovljene *western*-hibridizacijske analize. (M – marker veličine: *PreScission Plus Protein Unstained Standards* s označenim veličinama standardnih proteina, (His)₆-BEN1 dva uzorka s različitim količinama proteina (prvi 8,94 μg, drugi 4,5 μg) , B – frakcije BEN1, SR – SerRS-(His)₆)

Utjecaj peptida N17BEN1 na interakciju SerRS:BEN1



Slika 24. Utjecaj peptida s N-kraja BEN1 na interakciju SerRS:BEN1. Rezultati su obrađeni u programu *GraphPadPrism*

1.5. RASPRAVA

Metoda tandemskog afinitetnog supročišćavanja spregnutog sa spektrometrijom masa identificirala je nekoliko potencijalnih proteinskih interaktora SerRS iz biljke *Arabidopsis thaliana*.⁵ U ovom diplomskom radu ispitana su dva potencijalna interaktora, glutation-S-transferaza phi2 (GSTF2, TAIR oznaka: At4G02520) za koje se smatra da sudjeluje u staničnom odgovoru na stresne uvjete^{55,56} i protein za sada nepoznate biološke funkcije (PNF, TAIR oznaka: At4G27450) čija ekspresija je povećana u prisutnosti aluminija. S obzirom na to da i SerRS sudjeluje u staničnom odgovoru na stres, jer se njegova ekspresija povećava dodatkom kadmija,⁵⁷ pretpostavljeno je da bi interakcije između ovih proteina mogle biti funkcijski važne za biljnu stanicu u uvjetima stresa. Stoga je bilo potrebno provjeriti interagiraju li doista ovi proteini sa SerRS. Oba proteina eksprimirana su i pročišćena te je interakcija sa SerRS provjerena *in vitro* biofizičkom metodom mikrotermoforeze (MST).

U slučaju GSTF2 i SerRS, MST rezultati nisu pokazali niti postojanje niti nepostojanje interakcije. Dobiveni rezultati ukazuju na postojanje agregata koji nastaju tijekom reakcije i smetaju mjerenjima. Agregate se nastojalo ukloniti na više načina: promjenom sastava pufera, dodatkom BSA, povećanjem koncentracije neionskog detergenta *Tween-a*, variranjem snage lasera. Sve ove modifikacije nisu doprinijele boljim rezultatima. Uzevši u obzir postojanje agregata, bilo bi dobro u budućim eksperimentima pokušati dodatno pročistiti proteine, osobito GSTF2, jer je taj protein pročišćen samo afinitetnom kromatografijom. Osim toga, radi se o proteinu iz GST obitelji za čije članove je poznato da su skloni agregiranju, osobito u oksidacijskim uvjetima. Stoga bi bilo dobro u reakciju dodati redukcijski agens DTT. DTT se ne može dodati prije, jer smeta fluorescentnom obilježavanju proteina. Također, bilo bi poželjno interakciju ispitati i drugim metodama (SPR, ITC).

U eksperimentima kojima se provjeravala interakcija PNF i SerRS fluorescentno je obilježen protein PNF. Kovalentno vezanje fluorescentne boje *647-NT Red dye (Nanotemper)* preko primarnih amina (lizinskih ostataka) na PNF nije bilo uspješno. No, uspješnim se pokazalo označavanje proteina PNF fluorescentom bojom *495-NT Blue dye (Nanotemper)* koja se kovalentno veže preko cisteinskih bočnih ogranaka proteina. Rezultati MST mjerenja provedenih na 50 % snage lasera pokazali su da interakcije između PNF i SerRS nema. Iz tog zaključujemo da MST metodom ne možemo odrediti postojanje interakcije koja je bila vidljiva TAP-MS-om. Moguće je da fluorescentna boja vezana na PNF smeta interakciji, stoga bi bilo poželjno interakciju ispitati drugim metodama (SPR, ITC).

S obzirom na to da potencijalne interakcije GSTF2:SerRS i PNF:SerRS nisu bile potvrđene MST-om, potrebno je provjeriti interakcije i drugim metodama. Ako se i tim metodama ne bi mogle potvrditi interakcije, mogli bismo zaključiti da su potencijalni interaktori SerRS identificirani TAP-MS metodom zapravo bili lažni pozitivni. Moguće je potencijalnu interakciju provjeriti metodom rezonancije površinskih plazmona (eng. *surface plasmon resonance* (SPR)). Prednost ove metode su: relativno mala količina ispitivane tvari u reakciji, mogućnost rada s neobilježenim molekulama te sposobnost praćenja asocijacije i disocijacije u *in vitro* uvjetima. Sustav čine optički i protočni dio između kojih se nalazi SPR čip, sastavljen od tankog sloja zlata na koji se naslanja površinski matriks za vezanje ispitivane tvari. U protočnom dijelu nalazi se otopina potencijalnog interaktora. U slučaju interakcije dolazi do promjene kuta ogiba (lasersko zračenje ogiba se na sloju atoma zlata i analizira u detektoru), odnosno fenomena rezonancije površinskih plazmona.⁶⁵ Druga česta metoda koja se koristi u kvantitativnim istraživanjima proteinskih interakcija je ITC. Izotermalna titracijska kalorimetrija (ITC) je analitička metoda koja se često koristi za analizu intermolekulskih interakcija. Volumetrijska metoda za kvantitativnu kemijsku analizu, pri kojoj otopina reagensa, titranta, reagira s analitom (ili otopinom analita). Titracija se izvodi pri konstantnom tlaku i temperaturi, što znači da jedan eksperiment ITC-a nudi podatke o entalpiji vezanja, konstanti disocijacije i stehiometriji. Iz ovih podataka može se izračunati entropija vezanja i Gibbsove energije [66]. Osim ovih metoda za istraživanja proteinskih interakcija mogu se koristiti i druge biofizičke (NMR – nuklearna magnetska rezonancija, analitičko ultracentrifugiranje), biokemijske („*pull-down*” metoda) ili genetičke metode.

Analiza mapiranja interakcijskih domena SerRS i BEN1 proteina pokazala je da su katalitička domena SerRS te N-kraj BEN1 odgovorni za interakciju SerRS:BEN1.³ Uklanjanje prvih 17 aminokiselina s N-kraja BEN1 dokinulo je u potpunosti interakciju sa SerRS, što upućuje na to da je N-kraj BEN1 esencijalan za interakciju. Stoga je u okviru ovog diplomskog rada ispitano je li doista prvih 17 aminokiselina na N-kraju proteina BEN1 odgovorno za ostvarivanje interakcije SerRS:BEN1. Provedeni su kompeticijski eksperimenti s peptidom koji odgovara prvih 17 aminokiselina u proteinu BEN1. Taj peptid dodavan je u reakcijsku smjesu SerRS:BEN1. Vrijednost K_d za interakciju SerRS:BEN1 iznosila je $0,215 \mu\text{mol dm}^{-3}$ te je tako provedena reakcija uzeta kao kontrola. Dodatak peptida u jednakom množinskom omjeru u odnosu na protein BEN1, odnosno u 10 puta većoj koncentraciji slabi interakciju što je vidljivo

iz MST krivulja. Rezultati potvrđuju da je prvih 17 aminokiselina na N-kraju proteina BEN1 doista dio interakcijskog sučelja kompleksa SerRS:BEN1.

1.6. ZAKLJUČAK ISTRAŽIVAČKOG DIJELA

Prekomjerno su eksprimirani i pročišćeni proteini: SerRS (seril-tRNA-sintetaza), (His)₆-PNF (protein nepoznate biološke funkcije s (His)₆ privjeskom) te dvije inačice proteina BEN1 ((His)₆-BEN1 i BEN1 bez (His)₆ privjeska).

Mikrotermoforetska mjerenja su pokazala odsutnost interakcije PNF i SerRS.

Metoda mikrotermoforeze nije se pokazala prikladnom za analizu interakcije glutation-S-transferaze phi2 (GSTF2) i SerRS zbog pojave agregata te je potrebno interakciju ispitati drugim metodama.

Dodatak peptida koji građom odgovara prvim 17 aminokiselina s N-terminalnog kraja proteina BEN1 ometa interakciju SerRS:BEN1, čime je potvrđeno da je N-kraj proteina BEN1 doista dio interakcijskog sučelja.

2. METODIČKI DIO

2.1. NASTAVNI KROMATOGRAFSKI POKUSI

2.1.1. Općenito o kromatografiji

Kromatografija je metoda odvajanja koja se zasniva na različitoj raspodjeli komponenti uzorka između dvije faze od kojih je jedna nepokretna (stacionarna) a druga pokretna (mobilna). Stacionarna faza može biti čvrsta ili tekuća, a mobilna tekuća (tekućinska kromatografija) ili plinovita (plinska kromatografija). Komponente se pod utjecajem mobilne faze kreću kroz stacionarnu fazu različitom brzinom i tako se razdvajaju.

Prva upotreba kromatografije, prolazak smjese kroz inertni materijal zbog odvajanja komponenata otopine na temelju različite adsorpcije, ponekad se pripisuje njemačkom kemičaru Friedlieb Ferdinand Runge, koji je 1855. godine opisao uporabu papira za analizu boja. Runge je ispustio mrlje različitih anorganskih kemikalija na krugove filter-papira već impregniranog s drugom kemikalijom, a reakcije između različitih kemikalija stvorile su jedinstvene uzorke boja.⁶⁷ Tijekom 1860-ih kemičar Friedrich Schönbein i njegov učenik Friedrich Goppelsroeder objavili su prve pokuse za proučavanje različitih stopa na kojima se različite tvari kreću kroz filter-papir.^{68,69} Schönbein je smatrao da je kapilarno djelovanje (umjesto adsorpcije) odgovorno za kretanje mobilne faze pa je metodu nazvao kapilarnom analizom, a Goppelsroeder je proveo veći dio karijere istražujući kapilarne analize kako bi testirao brzinu kretanja širokog spektra tvari. Za razliku od moderne papirne kromatografije, kapilarna analiza se koristi za spremnike tvari koji se analiziraju, stvarajući preklapajuće zone komponenata otopine, a ne za odvajanje točke ili vrpce.⁶⁸

Rad na kapilarnoj analizi nastavljen je, ali bez velikog tehničkog razvoja, sve do 20. stoljeća. Prvi značajan napredak, u odnosu na Goppelsroederove metode, pokazao je Raphaela E. Liesegangar, 1927. godine postavio je filtarske trake u zatvorene posude s atmosferom zasićenom otapalima, a 1943. započeo je s uporabom diskretnih točaka uzorka, adsorbiranih na filter-papiru, koji je umočen u čista otapala radi postizanja odvajanja.⁷⁰ Ova metoda jako je utjecala na daljnji tok istraživanja i primjenu kromatografije.

Prva prava kromatografija obično se pripisuje rusko-talijanskom botaničaru Mikhailu Tsvetu. Tsvet je primijenio svoja istraživanja ekstrakcije na nove metode frakcioniranja, koje su bile razvijene 1890-ih godina za odjeljivanje komponenti nafte. Koristio je tekućinsko-adsorpcijsku kolonu koja sadrži kalcijev karbonat kako bi odijelio žuti, narančasti i zeleni biljni pigment (danas poznati kao ksantofili, karotenoidi i klorofili). Metoda je opisana 30. prosinca 1901. na

11. kongresu prirodoslovaca i doktora u Sankt Peterburgu. Prvi put je upotrijebio termin kromatografija 1906. godine u dva dokumenta o klorofilu u njemačkom botaničkom časopisu *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*. Mihailovo prezime *Tsvet* na ruskom jeziku znači boja pa postoji mogućnost da bi njegovo imenovanje kromatografskog postupka (doslovno „pisanje u boji,“) bio način na koji bi si mogao osigurati očuvanje imena.⁷¹

Tsvet je opisao kako se pomoću filter-papira mogu razdvojiti biljni pigmenti – prekursor papirne kromatografije. Ustanovio je da može izdvojiti neke pigmente (poput narančastih karotena i žutih ksantofila) od lišća s nepolarnim otapalima, ali drugi (poput klorofila) zahtijevaju polarna otapala. Također je zaključio da se klorofil jako veže na podlogu adsorpcijom te da su potrebna jača otapala za prevladavanje adsorpcije. Da bi ovo ispitao, nanio je otopljene pigmente na filter-papir, pustio da otapalo ispari, a zatim je nanio različita otapala kako bi utvrdio koje otapalo može izlučiti pigmente iz filter-papira. Zaključio je da se karoten može izvući iz papira pomoću nepolarnih otapala, ali klorofil zahtijeva polarna otapala.⁷¹ Tsvet je među prvim znanstvenicima otkrio potencijal kromatografije kao idealne metode za razdvajanje tvari iz homogenih smjesa. Nakon njega, kromatografija se jako istražuje i primjenjuje u istraživanjima raznih znanstvenih područja. Kromatografija je danas jedna od nezaobilaznih metoda u kemiji, biologiji, prehrambenoj industriji i bilo kojem drugom području suvremenog života.

Za poznavanje kromatografije kao metode potrebno je razumjeti sljedeće pojmove:

Analit je tvar koja se razdvaja u kromatografiji.

Kromatogram je grafički prikaz rezultata kromatografskog postupka. Svakoj tvari odgovara određeni maksimum u kromatogramu.

Kromatograf je uređaj za kromatografiju.

Eluent je komponenta separacijskog sustava koja pokreće uzorak kroz stupac.

Mobilna faza je faza koja se kreće u određenom pravcu. Može biti tekuća ili plinovita. Mobilna faza se kreće kroz stupac noseći uzorak koji se razdvaja.

Stacionarna faza je tvar koja je fiksirana u stupcu ili ploči, na čijoj se površini određeno vrijeme zadržavaju tvari koje se razdvajaju.

U suvremenoj literaturi može se pronaći više podjela same kromatografije:

Podjela prema fizikalnom stanju faza:

- Tekućinska kromatografija
- Plinska kromatografija

- Superkritična fluidna kromatografija

Podjela prema obliku sustava:

- Kromatografija na stupcu
- Planarna kromatografija

Podjela prema mehanizmu odvajanja komponenti:

- Adsorpcijska kromatografija (raspodjela zbog vezanja komponenti smjese na čvrstoj podlozi)
- Afinitetna kromatografija (temelji se na afinitetu jedne molekule prema pojedinim malim molekulama), kromatografija s ionskim izmjenjivačima
- Gel-kromatografija (razdvajanje prema veličini molekula)

Tekućinska kromatografija je metoda koja se koristi za odvajanje homogenih smjesa na svoje pojedinačne dijelove. Ovo odvajanje zbiva se na temelju interakcija mobilne i stacionarne faze. Budući da postoje mnoge kombinacije stacionarnih i pokretnih (mobilnih) faza koje se mogu koristiti pri odvajanju smjese, postoji nekoliko različitih vrsta kromatografije koje su klasificirane na temelju fizikalnih stanja tih faza. Tekućinska kromatografija na koloni je najpopularnija tehnika kromatografije, sadrži tekuću pokretnu fazu koja se polako filtrira kroz čvrstu stacionarnu fazu, dajući time odvojene komponente.⁷⁴

Plinska kromatografija (eng. *gas chromatography*, GC ili GLC) je uobičajena analitička metoda koje se primjenjuje u mnogim istraživačkim i industrijskim laboratorijima za kontrolu kvalitete kao i za identifikaciju i kvantitativno određivanje spojeva u smjesi. GC je također često primijenjena tehnika u mnogim ekološkim i forenzičnim laboratorijima jer omogućuje otkrivanje sastava vrlo malih količina uzorka. Različiti uzorci mogu se analizirati sve dok su spojevi dovoljno toplinski stabilni i razumno hlapljivi. Kao i za sve ostale kromatografske tehnike, za plinsku kromatografiju također su potrebne mobilna i stacionarna faza. Mobilna faza (nosač plina) sastoji se od inertnog plina, npr. helija, argona ili dušika. Stacionarna faza sastoji se od upakiranog stupca u koje je pakirana čvrsta podloga koja djeluje kao stacionarna faza ili je presvučena tekućom stacionarnom fazom (polimeri visokog vrelišta). Razdvajanje spojeva temelji se na različitoj jakosti interakcije spojeva sa stacionarnom fazom. Što je jača interakcija, spoj se jače veže sa stacionarnom fazom, to je potrebno više vremena za migraciju kroz kolonu (dulje vrijeme retencije).⁷²

Unatoč njihovoj važnosti, plinska kromatografija i tekućinska kromatografija ne mogu se koristiti za odvajanje i analizu svih vrsta uzoraka. Plinska kromatografija osigurava brzo

odjeljivanje s izvrsnom rezolucijom, no njena primjena je ograničena, njom se ne mogu analizirati spojevi koji su ili ne isperivi (pri odeđenim uvjetima) ili osjetljivi na povišenu temperaturu. Tekućinska kromatografija se koristi za odvajanje šireg spektra otopljenih tvari, međutim, njen nedostatak je taj što svi spojevi nemaju funkcionalne grupe koje se određuju ovom metodom. Kromatografija superkritične tekućine (SFC) pruža korisnu alternativu plinskoj i tekućinskoj kromatografiji za neke uzorke. Mobilna faza je superkritični fluid koji se drži pri temperaturi i tlaku većem od njegove kritične točke. Pod tim je uvjetima mobilna faza ni plin niti tekućina. Umjesto toga, mobilna faza je superkritična tekućina čija svojstva su međuproizvod između plina i tekućine. Superkritični fluidi imaju viskozitete slične onima plinova, što znači da se mogu kretati kroz kapilare ili pakirane stupce bez potrebu za visokim tlakovima. Vrijeme analize i razlučivost, iako ne takao dobro kao u GC, obično su bolji od onog koji se može postići s tekućinskom kromatografijom. Gustoća superkritične tekućine mnogo je bliža onoj tekućina. Mobilna faza u SFC ponaša se više poput tekuće pokretne faze kao u tekućinskoj kromatografiji. Najčešća mobilna faza za kromatografiju superkritičnim fluidom je ugljikov dioksid. Njegova niska kritična temperatura, 31 °C i kritični tlak, 72,9 atm, relativno se lako postižu i održavaju. Superkritični CO₂ je dobro otapalo za nepolarne organske spojeve, stoga se ne koristi za polarna otapala. Dodavanje organskih modifikatora, kao što je metanol, poboljšava otpornost eluiranja pokretne faze. Superkritična tekućinska kromatografija pronašla je mnogo primjena u analizi polimera, fosilnih goriva, voskova, lijekova i prehrambenih proizvoda.⁷³

U kromatografiji na stupcu, stavi se stacionarna faza u uski stupac kroz koji se pokretna faza pomiče pod utjecajem gravitacije ili tlaka. Stacionarna faza je ili krutina ili tanki, tekući film s kojim je premazan kruti materijal za pakiranje unutar stijenke stupca. U planarnoj kromatografiji stacionarna faza je presvučena na ravnu staklenu, metalnu ili plastičnu ploču i nalazi se u komori za razvoj (komora je zasićena ishlapljenim molekulama otapala). Spremnik koji sadrži mobilnu fazu se stavlja u dodir sa stacionarnom fazom, a pokretna faza se pomiče kapilarnim djelovanjem.⁷³

Adsorpcijska kromatografija je kromatografska metoda kod koje se molekule fizički adsorbiraju na površinu netopljivih materijala. Kromatografija koju je još Tsvet koristio bila je adsorpcijska kromatografija vezanja biljnih pigmenta na podlogu. Adsorpcijska kromatografija koristi stacionarnu fazu u krutom stanju i mobilnu fazu u tekućem ili plinovitom stanju. U samoj kromatografiji postoji ravnoteža između vezanja (analit i kruta površina) i

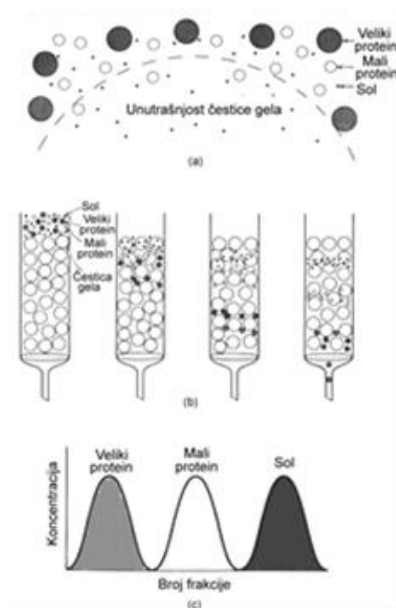
topljivosti analita u otapalu. Kako se otapalo pomiče uz stacionarnu fazu sa sobom nosi mobilnu fazu, u mobilnoj fazi se nalaze različite tvari koje se različito adsorbiraju na stacionarnu fazu, što uzrokuje različito vrijeme putovanja. Budući da će različiti spojevi putovati različitim udaljenostima, ti se spojevi mogu identificirati na temelju toga koliko su putovali. Kao stacionarna faza najčešće se koriste alumina (aluminijev oksid, Al_2O_3), aktivni ugljen, diatomajska zemlja (oklopi mikroskopskih algi kremenjašica), prah saharoze i silikagel.⁷⁴ Najpoznatije vrste adsorpcijske kromatografije su kromatografija na hidroksiapatitu te kromatografija s obrnutim fazama. Hidroksiapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) je mineral iz grupe kalcijevih fosfata koji se koristi za odjeljivanje nepolarnih molekula. Kromatografska kolona se ispuni hidroksiapatitom, prije prolaska mobilne faze ispire odgovarajućim puferom, molekule analita mobilne faze se adsorbiraju na stacionarnu fazu a razdvajaju tako da se kolona ispire gradijentom koncentracije fosfata.⁷⁴ Kromatografija s obrnutim fazama (eng. *reverse phase chromatography*, RPC) koristi nepolarnu stacionarnu fazu i polarnu mobilnu fazu. Metoda je učinkovita za pročišćavanje negativno nabijene molekule DNA te proteina s hidrofobnim skupinama koji se hidrofobnim interakcijama vežu za nepolarne skupine stacionarne faze. Za prevladavanje hidrofobnih interakcija analita i stacionarne faze kolona se mora isprati izrazito hidrofobnim eluensom (npr. acetonitril).⁷⁴

Biološke makromolekule, kao što su enzimi i drugi proteini, djeluju u interakciji s drugim molekulama. Takve interakcije uključuju vezanje vodika, ionske interakcije, hidrofobne interakcije i još mnoge druge. Na tom svojstvu vezanja molekula temelji se afinitetna kromatografija. Visoka selektivnost afinitetne kromatografije uzrokovana je željom molekule da stupi u interakciju sa stacionarnom fazom i njeno vezanje unutar stupca kako bi se odvojila od neželjenog materijala koji će se eluirati. Molekule koje nisu vezane na stacionarnu fazu ispiru se puferom dok se željena molekula eluira u prisustvu eluentnog otapala (većinom otapalo s visokom koncentracijom soli). Ovaj proces stvara konkurentnu interakciju između željene molekule i imobiliziranih molekula stacionarne faze, što na kraju omogućuje oslobađanje sada visoko pročišćene željene molekule.⁷⁵ Posebna vrsta afinitetne kromatografije je ionsko-izmjenjivačka kromatografija, fizikalno-kemijska metoda separacije u kojoj se sastojci razdjeljuju između dviju faza, od kojih je jedna nepokretna, dok se druga kreće u određenom smjeru (pokretna faza). Metoda se temelji na afinitetu molekula analita prema molekulama stacionarne faze.⁷⁶ Nepokretna faza može biti čvrsta i tekuća, a ako je tekuća može biti raspoređena na čvrstoj fazi, koja može, ali ne mora sudjelovati u separacijskom procesu.

Tekuća faza može biti kemijski vezana na čvrstu fazu kovalentnom vezom ili imobilizirana na nju, primjerice in situ polimerizacijom nakon nanošenja. Stupci se obično pune supstituiranim celulozama; dietilaminoetil-celuloza (DEAE-celuloza) je slab anionski izmjenjivač, a fosfoceluloza i karboksimetil-celuloza slabi kationski izmjenjivači. Većina bioloških molekula je električki nabijena tako da se ionsko-izmjenjivačka kromatografija pokazala zahvalnom metodom za pročišćavanje različitih protina i nukleinskih kiselina. Kada su molekule analita vezane bilo za anionsku ili kationsku kolonu one se jednostavno mogu eluirati povećanjem ionske jakosti eluenta (postupno eluiranje promjenom pH).⁷⁴

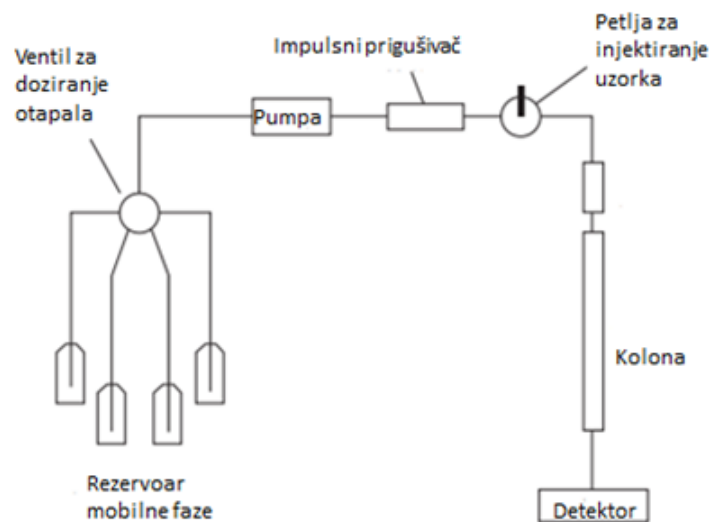
Gel-filtracija je oblik razdjelne kromatografije kod koje se odjeljivanje temelji na različitoj veličini molekula. Obično se primjenjuje za odvajanje makromolekulskih kompleksa kao što su proteini i industrijski polimeri. Kromatografski stupac se ispuni poroznom stacionarnom fazom, molekule analita iz mobilne faze ulaze u pore i vremenski se različito zadržavaju. Ulazak manjih molekula u pore stacionarne faze usporava gibanje niz stupac. Stoga, sa stupca prve silaze velike molekule, a potom sve manje. Ako je veličina molekula analita približno jednaka, tada prvo izlaze molekule veće relativne molekulske mase nakon njih manje (Slika 25, str. 56). Ovo svojstvo se može iskoristiti za određivanje relativne molekulske mase nepoznatih molekula analita. Gel-filtracija se pokazala bitnom kromatografskom metodom koja se učestalo koristi zbog toga što su gotovo svih materijali u gelovima pri kromatografiji praktički neovisno o temperaturi, pH, ionskoj jakosti ili sastavu pufera. Na ovaj način uspješno se odvajaju velike molekule od manjih, pri raznim uvjetima. Vrlo labilne molekule su očuvane jer nema adsorpcije, također širenje zone uzorka je manje nego pri ostalim kromatografskim metodama. Zbog razlike između elucijskog vremena i molekulske mase metoda se koristi za određivanje relativne molekulske mase.⁷⁴ Gelovi koji su danas u najčešćoj upotrebi, koriste se u vodenim otopinama, sadrže jedan od tri polimera: dekstran, agarozu ili poliakrilamid. Za gel filtraciju važni su pojmovi inkluzioni i ekskluzioni limit. Inkluzioni limit je najmanja veličina čestice koja se može razdvojiti, sve čestice manje od ovog limita izlaze zajedno. Ekskluzioni limit je najveća veličina čestice koja se može razdvajati, sve veće čestice izlaze zajedno.⁷⁵

HPLC (engl. *high performance liquid chromatography*, slika 26, str. 57) odjeljivanje se temeljit na bilo kojoj od dosad opisanih kromatografskih metoda (adsorpciji, ionskoj izmjeni, gel-filtraciji). Princip rada HPLC-a je potiskivanje analizirane tvari ili smjese kroz stupac (cijev ispunjenu materijalom sitnih čestica, a time i velike površine) pumpanjem tekućine (mobilne faze) pod visokim tlakom kroz sam stupac.



Slika 25. Shema gel-filtracijske metode u stupcu. Preuzeto i prilagođeno iz literaturnog navoda 74.

Postupak predviđa unošenje malog volumena uzorka u tok mobilne faze i na temelju specifičnih kemijskih i fizikalnih interakcija, dolazi do različitog zadržavanja komponenata smjese. Vrijeme zadržavanja ovisi o prirodi tvari koja se analizira, stacionarnoj fazi i sastavu mobilne faze. Vrijeme u kojem se tvar eluira naziva se retencijsko vrijeme i karakteristično je za određenu tvar. Koriste se uobičajena otapala, čista ili u bilo kojoj kombinaciji (npr. voda, metanol, organska otapala...). Moguće je koristiti i gradijentno eluiranje, što podrazumijeva promjenu sastava mobilne faze u tijeku eluiranja.⁷⁵ Odjeljivanje se izuzetno poboljšava primjenom stupaca s visokim razlučivanjem i skraćivanjem vremena trajanja kromatografije. Uski, dugački stupci punjeni su matriksom koji se ne sabija pri visokom tlaku, npr. mikroskopskim staklenim ili plastičnim kuglicama obloženim tankim slojem stacionarne faze. U usporedbi s drugim kromatografskim tehnikama HPLC je izuzetno brz i učinkovit. Koristi pumpu, a ne gravitaciju, kako bi potisnuo mobilnu fazu kroz čvrsti adsorbirajući materijal. Proces se može završiti za otprilike 10 do 30 minuta i daje visoku rezoluciju. Budući da je u velikoj mjeri automatizirana, osnovni HPLC postupci mogu se izvoditi uz minimalnu obuku. Općenito, HPLC je svestran (koristi se za identifikaciju širokog spectra molekula) i iznimno precizan kada je riječ o identificiranju i kvantificiranju kemijskih spojeva. Nedostaci HPLC-a su u tome što neke tvari se ireverzibilno vežu za podlogu pa se ne mogu detektirati i jako hlapljive tvari se teško identificiraju ovom metodom pa se za takve tvari koristi plinska kromatografija.^{74,75}



Slika 26. Shematski dijagram HPLC-a. Preuzeto i prilagođeno iz literarnog navoda 75.

2.2. KROMATOLOGRAFIJA I NASTAVA KEMIJE

2.2.1. Osnovnoškolski nastavni program

U nastavnom planu i programu za osnovnu školu kromatografija kao metoda razdvajanja homogenih smjesa izostaje. U nastavnom planu i programu za sedmi razred osnovne škole, u nastavnoj cjelini: *Smjese i postupci razdvajanja smjesa*, učenici će naučiti razliku homogenih i heterogenih smjesa te metode kojima se te smjese razdvajaju. Među metodama razdvajanja (taloženje (sedimentacija), dekantacija, filtracija, destilacija, sublimacija te kristalizacija) izostaje kromatografija.⁷⁷ Tema kromatografije u osnovnoj školi je prepuštena volji učitelja i mogućnostima njihovih učenika za savladavanje metode. Pretraživajući internet može se naći mnogo osnovnoškolskih projekata (dodatna nastava, znanstveni kutak, otvoreni dani škole, školski projekti...) koji se baziraju na kromatografiji.

2.2.2. Srednjoškolski nastavni program

Kromatografija je više zastupljena u srednjoškolskom planu i programu. U četverogodišnjem programu za kemiju (gimnazijski program), kromatografije se spominje u prvoj godini učenja kemije pod nastavnom cjelinom: Tvari i njihove promjene, pod nastavnom temom: Podjela, izvori i agregatna stanja tvari. Nastavni sadržaj koji učenici trebaju usvojiti pod ovom zadanom temom su: agregatna stanja tvari, prijelazi iz jednog agregatnoga stanja u drugo, smjese tvari (heterogene i homogene), te postupci razdvajanja smjese (filtriranje, prekriztalizacija, destilacija, sublimacija, kromatografija...)⁷⁸ U nastavnom programu za prirodoslovnu gimnaziju (*Kemija s vježbama*) ne spominje se izvedba laboratorijskih vježbi čija je teorijska pozadina kromatografija.⁷⁹ U jednogodišnjem i dvogodišnjem strukovnom nastavnom planu i programu za kemiju kromatografije izostaje iz programa.^{80,81}

2.3. KROMATOLOGRAFIJA U UDŽBENICIMA

2.3.1. Kromatografija u osnovnoškolskim i srednjoškolskim udžbenicima

Pregledavajući osnovnoškolske te srednjoškolske udžbenike koji su trenutačno službeno odobreni, kromatografija kao metoda razdvajanja homogenih smjesa nije prisutna u osnovnoškolskim udžbenicima, ali je u srednjoškolskim. Kromatografija je redovna tema u udžbenici iz kemije za prvi razred srednje škole u svim gimnazijskim programima,^{82,83,84,85,86} također se može pronaći u udžbenicima za strukovne škole (npr. za smjer medicinski tehničar⁸⁴) ili onim programima koji imaju vježbe iz pojedinih grana kemije (npr. biokemija ili organska kemija^{82,87}). Mnogo više se o kromatografiji može pronaći u priručnicima za nastavnike koji opisuju potencijalne pokuse za izvođenje na nastavi kemije i detaljnije opisuju pojedine vrste kromatografije.^{89,90} U gimnazijskim udžbenicima kromatografija se nalazi u sklopu poglavlja *Smjese tvari, metode odjeljivanja homogenih smjesa*. O njoj piše vrlo malo: u svim udžbenicima navedena je definicija kromatografije, nabrojene su različite vrste kromatografije, objašnjena razlika između nepokretne (stacionarne) i pokretne (mobilne faze) uz definiciju kromatograma.^{82,83,84,85,86,87} U udžbenicima nije naglašena važnost kromatografije kao metode u svakodnevnom životu.

Šturi tekst u svim udžbenicima popraćen je različitim pokusima od kojih je jedan odvajanje biljnih pigmenata.⁸⁸ Cilj samog pokusa je kombinacijom ekstrakcije i kromatografije pokazati da se u biljnim kloroplastima osim zelenog klorofila nalaze i drugi biljni pigmenti koje ne možemo vidjeti promatrajući zelenu homogenu smjesu ekstrakta. Drugi udžbenik predlaže pokus razdvajanje komponenti flomasterske boje na kromatografiji na stupcu.⁸⁶ Stupac predstavlja školska kreda koja se uroni u staklenu posudu zasićenu parama etanola. Prednost ovog pokusa su jednostavna izvedba i pristupačnost kemikalija, a sami rezultat vizualno je dobro uočljiv te su glavni dijelovi kromatografskog postupka jasno vidljivi. Sljedeći udžbenik predstavlja pokus kromatografije na stupcu u kojem se na startnu liniju krede nanese točka otopine olovova(II) nitrata te točka otopine kadmijeva nitrata.⁸⁵ Tako pripremljena kreda uroni se u otopinu etanola i klorovodične kiseline (samo početak krede mora biti uronjen u otopinu), kreda se poklopi Petrijevom zdjelicom i ostavi neko vrijeme. Nakon nekog vremena kreda se uroni u otopinu natrijevog sulfida, poznavajući boje nastalih sulfida može se zaključiti koji od iona je brže putovao. Četvrti udžbenik predstavlja pokus kružne kromatografije na papiru.⁸⁴ Kružnom kromatografijom razdvajaju se komponente vodene smjese koje imaju različite

uzorke. Uzorci se identificiraju tako da se paralelno provodi kromatografija čistih tvari pri jednakim uvjetima. Određivanjem fronte otapala jednostavno se mogu identificirati sastojci smjese.

Strukovni udžbenici (kemijske struke) sadrže pokuse koji iziskuju bolje poznavanje kemije i posjedovanje vještina pri izvođenju pokusa. Tako u udžbeniku za biokemijski praktikum se nalazi pokus tankoslojne kromatografije aminokiselina.⁸⁷ Pokus traži od učenika samostalnji rad, bolju koncentraciju pri radu te veći oprez, jer se u izvedbi koriste različita organska otapala. Osim tog pokusa, u sadržaju udžbenika nalazi se i gel-filtracijski pokus razdvajanja smjese dekstran-plavog te kalijevog heksacijanoferata(III). Smjesa se razdvaja u stupcu ispunjenim Sephadex-om, a mobilnu fazu čini voda. Oba pokusa zahtijevaju kemikalije koje nisu dostupne u svim školama te veću spremnost profesora, ali i učenika. U ostalim udžbenicima i nastavnim priručnicima nalaze se isti pokusi uz male modifikacije.^{89,90}

2.4. OBJAŠNJENJE NASTAVNOG SATA

2.4.1. Uporaba kromatografije

Za one koji nisu upućeni u svijet znanosti, pojam kromatografija ne znači mnogo. No, ova metoda utječe na naš svakodnevni život na različite načine. Kromatografija, kao metoda za razdvajanje smjesa na različite komponente ima značajnu ulogu u domeni forenzike, regulaciji hrane, testiranju sportaša na doping pa čak i kontrole kvalitete nekih alkoholnih pića. Pučanstvu je dovoljno znati da kromatografija služi za efikasno razdvajanje sastojaka unutar smjese i za identifikaciju tvari unutar smjese.

Kako je plinska kromatografija uspješna za identificiranje pojedinih sastojaka prisutnih u uzorku, primijenjena je i u forenzičnoj patologiji radi utvrđivanja vrsta tekućina i spojeva prisutnih u ljudskom tijelu nakon smrti. Tako se može odrediti je li osoba bila opijena ili pod utjecajem droga u trenutku smrti, je li u njezinom tijelu prisutan otrov ili druga štetna tvar. Ovo je neophodno znanje za određivanje uzroka smrti i mogućeg motiva i krivca u slučaju kasnijeg kaznenog gonjenja. Može se koristiti i za ispitivanje uzoraka pronađenih na mjestu zločina, bilo da su to uzorci krvi ili uzorci vlakana od odjeće ili drugi materijali.⁹¹ Identifikacija uzoraka i njihovog sastava omogućuje znanstvenicima da točno odrede što (i možda tko) je bio prisutan na mjestu zločina pa čak i da pretpostave gdje je osumnjičenik (ili žrtva) bio prije tragičnog događaja. Naravno, nisu svi uzorci krvi uzeti nakon smrti. Preciznost i točnost s kojom kromatografija može identificirati tvari u krvotoku čine je vrijednom za testiranje sportaša na doping, tj. umjetno poboljšanje njihovih performansa.⁹² Kromatografija je našla široku uporabu u prehrambenoj industriji te industriji alkoholnih pića. Proizvođači *Jägermeistera* strogo nadziru razine šećera koje se nalaze u konačnom proizvodu pa kromatografski provjeravaju kvalitetu sadržaja svake boce.⁹² Visoka učinkovitost tekućinske kromatografije, kombinirana s masenom spektrometrijom (HPLC-MS), uspješno se koristi za identifikaciju mesa ili nekih drugih sastojaka u hrani. Pomaže u provjeri razine pesticida, fungicida i kontaminanata u hrani i pitkoj vodi. Kromatografija je našla svoju promjenu i u farmaceutskoj industriji, izolaciji potencijalnih lijekova, izolaciji antitijela... Možda je kromatografija i potencijalna metoda za borbu protiv virusne bolesti Ebole.⁹² Kromatografija unutar kemijske struke se koristi za određivanje odnosa različitih tvari, vrlo je djelotvorna tehnika za ispitivanje čistoće uzorka. Količina uzorka prisutna u smjesi može se izračunati korištenjem kromatografije. Kiralni spojevi koji su vrlo slični u molekularnoj masi, elementarnom sastavu i fizikalnim svojstvima,

razlikuju se samo u optičkim izomerima, mogu se razdvojiti upotrebom kromatografije. Koristi se za pročišćavanje proteina i nukleinskih kiselina čija čistoća je jako bitna za biokemijska, molekularna i medicinska istraživanja. Koristi se također za pripremu kemikalija visoke čistoće.

2.4.2. Nastavni sat

2.4.2.1. Potrebni materijali i metode za izradu nastavnog sata

Naziv nastavnog sata: *Pomozi Marku zadržati posao...*

Nastavna cjelina/tema: *Tvari i njihove promjene*

Nastavna jedinica: *Podjela, izvori i agregacijska stanja tvari*

Razred: prvi razred gimnazije

Glavni nastavni cilj: Upoznati učenike s kromatografijom i njezinom primjenom.

Razrada postignuća (ishoda) i zadaci/aktivnosti za provjeru njihove usvojenosti:

1. Ispravno čitanje podataka s kromatograma.
2. Izračunati koncentraciju pojedine tvari iz kromatograma.
3. Objasniti uzrok putovanja i razdvajanja tvari na stacionarnoj fazi kromatograma.
4. Predložiti gdje se sve kromatografija može koristiti u svakodnevnom životu.

Oblik rada:

- praktični rad (grupni rad)
- individualni rad na radnom listiću

Prethodno potrebna znanja, vještine i sposobnosti:

- **rabiti** osnovne matematičke operacije.
- **navesti** specifična fizikalna svojstva tvari.
- **tumačiti** podatke iz grafa.
- **prevesti** tablične vrijednosti u grafički prikaz.

Procjena opasnosti i rizika: Nema.

Povezane nastavne jedinice (pokusi):

- Osnovna svojstva tekućine
- Relativna molekulska masa
- Građa molekula i međumolekulske interakcije
- Metode razdvajanja smjesa

2.4.2.2. Tijek nastavnog sata

Nastavni sat počinje uvodnim tekstom (koji je dan u radnom listiću, vidi Dodatak) kojeg će prvo svi učenici pročitati svatko za sebe, a nakon toga će jedan učenik pročitati tekst na glas. Poslije čitanja uvodnog teksta, nastavnik će prikazati shemu kromatografske aparature (dana u PowerPoint prezentaciji, prva sličica) i tražiti učenike da je objasne. Kad se postigne zadovoljavajuće objašnjenje shematskog prikaza, učenici će započeti s rješavanjem prvog problemskog zadatka. Zadatak prvo trebaju pročitati svatko za sebe, a potom ga diskutirati u skupinama. Slijedi frontalna rasprava, koju pitanjima vodi i usmjerava nastavnik pri tome mu je cilj redom utvrditi sljedeće:

- da su sve skupine razumjele zadatak,
- da učenici razumiju što je standardni uzorak,
- da učenici razumiju što predstavljaju pojedini podatci (površine maksimuma i retencijska vremena),
- da učenici shvaćaju da kromatograme uzoraka bazenske vode trebaju usporediti s kromatogramom standardnog uzorka
- da su znaju kako će izračunati masene koncentracije pojedinih sastojaka.

Kad je to postignuto učenici počinju rješavati problem, a nastavnik za to vrijeme može obići skupine i po potrebi im pomoći u radu. Kad nastavnik ustanovi da je većina skupina riješila problem, frontalno će raspraviti rješenje s cijelim razredom. Pri tome će sugovornike birati sam (ili prema redosljedu kojim su rješavali problem ili prema samostalnom javljanju učenika ili prema vlastitom odabiru sugovornika).

Uspješnim rješavanjem prvog problemskog zadatka učenici stječu sljedeća znanja:

- količina spoja proporcionalna je površini kromatografskog maksimuma
- kromatografski maksimum karakterističan je za pojedini spoj
- karakteristika svakog kromatografskog maksimuma je retencijsko vrijeme
- kromatografija se može uporabiti za identifikaciju tvari.

Time su se osposobili za rješavanje drugog problemskog zadatka u kojem trebaju prvo predložiti metodu izdvajanja ciljane tvari (protein X) iz smjese i nakon toga predložiti izgled kromatograma. Rješenje tog problema dano je u uvodnom tekstu radnog lista, a učenici moraju prepoznati koja od ponuđenih metoda je pogodna za odvajanje proteina X od ostalih proteina. Rješenje je gel-filtracija jer će uporabiti razliku u molekularnoj masi jedinki. Pri tome trebaju spoznati i da će kao rezultat gel-filtracije dobiti smjesu inzulina i željenog proteina što

predstavlja sljedeći problemski zadatak: „Kako protein X odvojiti od inzulina.?” Kao rješenje nameće se afinitetna kromatografija, koju se također može odabrati na temelju uvodnog teksta u radni list. Za ovo rješenje učenici trebaju povezati fiziološku funkciju inzulina (PITANJE 1 i PITANJE 2) na temelju čega mogu predložiti potrebno svojstvo stacionarne faze (svojstvo inzulinskog receptora). Nakon toga, mogu (i trebaju) predložiti postupak pripreme sustava za afinitetnu kromatografiju.

Na kraju sata, nakon rješениh problemskih zadataka, nastavnik će tražiti učenike da mu predlože područja moguće primjene kromatografije u svakodnevnom životu (farmaceutska i prehrambena industrija, industrija alkoholnih pića, forenzika, kemija). Pri tome će za svako područje primjene nastavnik navesti po mogućnosti nasvesti i konkretan primjer.

2.5. ZAKLJUČAK METODIČKOG DIJELA

Predloženi nastavni sat predstavlja primjer primjene kromatografije u nastavi kemije. Ovom temom učenici produbljuju i integriraju znanja stečena tijekom nastave biologije i nastave fizike. Ipak, valja imati na umu da je ovako zamišljen nastavni sat kognitivno zahtijevan te da učenici za njega moraju prethodno biti dobro pripremljeni. Naglasak predloženog nastavnog sata je na primjeni kromatografije u svakodnevnom životu i razumijevanju kromatografskog postupka, a ne na opisu kromatografije kao metode razdvajanja smjesa (što je najčešća praksa u udžbenicima).

Analiza prethodno stečenih obrazovnih postignuća ukazuje da učenici imaju dovoljno znanja za savladavanje predloženog nastavnog sadržaja. Hoće li ovaj predloženi nastavni sadržaj biti uporabljen u nastavi i kada, uglavnom ovisi nastavniku i njegovoj procjeni mogućnosti njegovih učenika. Ovaj nastavni sat predložen je za prvi razred srednje škole (gimnazijsko usmjerenje), no može biti i nastavni sadržaj za dodatnu nastavu.

Podatci potrebni za predloženi nastavni sat dostupni su i mogu se nabaviti kod različitih ustanova ili na internetu.

Predviđeno trajanje osmišljenog nastavnog sata je 90 minuta. Načelno, vrijeme može biti razdvojeno i na dvije 45-minutne jedinice pri čemu se domaćom zadaćom može sačuvati potreban fokus i obaviti dio pripreme potrebne za nastavak.

3. LITERATURNI IZVORI

1. L. Stryer, J. Berg i J. Tymoczko, *Biochemistry*, 6th ed, W.H. Freeman and Company, New York, 2006, str. 25 – 64, 857 – 887.
2. M. Jerabek-Willemsen, T. Andre, R. Wanner, H. M. Roth, S. Duhr, P. Baaske i D. Breits. MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond, *Journal of Molecular Structure* **1077** (2014) 101-113.
3. Kekez M, Zanki V, Kekez I, Baranasic J, Hodnik V, Duchene A-M, Anderluh G, Gruic-Sovulj I, Matkovic-Calogavic D, Weygand-Durasevic I, Rokov-Plavec J, Arabidopsis seryl-tRNA synthetase: The first crystal structure and novel protein interactor of plant aminoacyl-tRNA synthetase. *FEBS Press* **7-9** (2018).
4. Yuan T, Fujioka S, Takatsuto S, Matsumoto S, Gou X, He K, Russell SD, Li J BEN1, a gene encoding a dihydroflavonol 4-reductase (DFR)-like protein, regulates the levels of brassinosteroids in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **51** (2007) 220–233.
5. M. Kekez. Funkcionalna karakterizacija citosolne seril-tRNA-sintetaze iz biljke *Arabidopsis thaliana*. Zagreb: PMF. 2016.
6. Bruce Alberts, “The Cell as a Collection of Protein Machines: Preparing the Next Generation of Molecular Biologists,” *Cell* **92** (1998) 291-294.
7. Paul FE, Hosp F, Selbach M Analyzing protein–protein interactions by quantitative mass spectrometry. *Methods* **54** (2011) 387–395.
8. Alberts B, The cell as a collection of protein machines: preparing the next generation of molecular biologists. *Cell* **92** (1998) 291–294.
9. Kerrien S, Int Actopen source resource for molecular interaction data. *Nucleic Acids Res* **35** (2007) 561–565.
10. Byrum S, Analysis of stable and transient protein– protein interactions. *Methods Mol Biol* **833** (2012) 143–152.
11. Bashor CJ, Rewiring cells: synthetic biology as a tool to interrogate the organizational principles of living systems. *Annu Rev Biophys* **39** (2010) 515–537.
12. Dutcher SK, The tubulin fraternity: alpha to eta. *Curr Opin Cell Biol* **13** (2001) 49–54.
13. Hemmerich P, Schmiedeberg L, Diekmann S, Dynamic as well as stable protein interactions contribute to genome function and maintenance. *Chromosome Res* **19** (2011) 131–151.
14. DeLano WL, Unraveling hot spots in binding interfaces: progress and challenges. *Curr Opin Struct Biol* **12** (2002) 14–20.
- 15.

16. Krylov D, Mikhailenko I, Vinson C, A thermodynamic scale for leucine zipper stability and dimerization specificity: e and g interhelical interactions. *EMBO J* **13** (1994) 2849–2861.
17. Schreiber G, Haran G, Zhou HX, Fundamental aspects of protein–protein association kinetics. *Chem Rev* **109** (2009) 839–860.
18. Pawson T, Protein modules and signalling networks. *Nature* **37** (1995) 573–580.
19. Pellegrini M, Haynor D, Johnson JM, Protein interaction networks. *Expert Rev Proteomics* **1** (2004) 239–24.
20. Terentiev AA, Moldogazieva NT, Shaitan KV, Dynamic proteomics in modeling of the living cell. Protein–protein interactions. *Biochemistry (Mosc)* **74** (2009) 1586–1607.
21. Sugase K, Dyson HJ, Wright PE, Mechanism of coupled folding and binding of an intrinsically disordered protein. *Nature* **447** (2007) 1021–1025.
22. Sardi ME, Washburn MP, Building protein–protein interaction networks with proteomics and informatics tools. *J Biol Chem* **286** (2011) 23645–23651.
23. Sanderson CM, A new way to explore the world of extracellular protein interactions. *Genome Res* **18** (2008) 517–520.
24. C. Chan i H. M. Lam. A putative lambda class glutathione S-transferase enhances plant survival under salinity stress. *Plant Cell Physiol.* **55** (2014) 570-579.
25. Boehr DD, Wright PE, Biochemistry: How do proteins interact? *Science* **320** (2008) 1429–1430.
26. M. Jerabek-Willemsen, C. J. Wienken, D. Braun, P. Baaske i S. Duhr. Molecular interaction studies using microscale thermophoresis. *Assay Drug. Dev. Technol.* **9** (2011) 342-353.
27. C.J. Wienken, P. Baaske, U. Rothbauer, D. Braun, S. Duhr. Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis *Nat. Commun.* **1** (2010) 100.
28. K. Zillner, M. Jerabek-Willemsen, S. Duhr, D. Braun, G. Langst, P. Baaske, Molecular interaction studies using microscale thermophoresis. *Meth. Mol. Biol.* **815** (2012) 241–252.
29. C. Ludwig, *Diffusion zwischen ungleich erwärmten Orten gleichzusammengesetzter Lösungen, Sitzungber Bayer Akad Wiss Wien Math-Naturwiss Kl*, vol. 20 (1856)
30. S. Duhr, D. Braun, Thermophoretic Depletion Follows Boltzmann Distribution *Phys. Rev. Lett.* (2006) str 96.

31. S. Duhr, D. Braun, Why molecules move along a temperature gradient *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103** (2006) 19678–19682.
32. S. A. I. Seidel, P. M. Dijkman, W. A. Lea, G. van den Bogaart, M. Jerebek-Willmenden, A. Lazic, J. S. Joseph, P. Srinivasan, P. Baaske, A. Simeonov, I. Katritch, F. A. Melo, J. E. Ladbury, G. Schreiber, A. Watts, D. Braun i S. Duhr. Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions. *Methods*. **59** (2013) 301-315.
33. M. Ibba, D. Söll, Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu Rev Biochem.* **69** (2000).
34. J. J. Perona i A. Hadd. Structural diversity and protein engineering of the aminoacyl-tRNA synthetases. *Biochemistry* **51** (2012) 8705-8729.
35. J. J. Perona i I. Gruić-Sovulj. Synthetic and editing mechanisms of aminoacyl-tRNA synthetases. *Top Curr. Chem.* **344** (2014) 1-41.
36. G. Eriani, M. Delarue, O. Poch, J. Gangloff i D. Moras. Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature* **347** (1990) 203-206.
37. D. Moras. Structural and functional relationship between aminoacyl-tRNA synthetases. *Trends Biochem. Sci.* **17** (1992) 159-164.
38. J. G. Arnez i D. Moras. Structural and functional considerations of the aminoacylation reaction. *Trends Biochem. Sci.* **22** (1997) 211-216.
39. F. Borel, C. Vincent, R. Leberman i M. Hartlein. Seryl-tRNA synthetase from *Escherichia coli*: implication of its N-terminal domain in aminoacylation activity and specificity. *Nucleic Acids Res.* **22** (1994) 2963-2969.
40. H. Himeno, T. Hasegawa, T. Ueda, K. Watanabe i M. Shimizu. Conversion of aminoacylation specificity from tRNA^{Tyr} to tRNA^{Ser} in vitro. *Nucleic Acids Res.* **18** (1990) 6815-6819.
41. S. Cusack, C. Berthet-Colominas, M. Hartlein, N. Nassar i R. Leberman. A second class of synthetase structure revealed by X-ray analysis of *Escherichia coli* seryl-tRNA synthetase at 2,5 Å. *Nature* **347** (1990) 249-255.
42. H. Belrhali, A. Yaremchuk, M. Tukalo, K. Larsen, C. Berthet-Colominas, R. Leberman, B. Beijer, B. Sproat, J. Als-Nielsen, G. Grubel, J. F. Legrand, M. Lehmann i S. Cusack. Crystal structures at 2.5 Angstrom resolution of seryl-tRNA synthetase complexed with two analogs of seryl adenylate. *Science* **263** (1994) 432-436.

43. A.-M. Duchene, A. Giritch, B. Hoffmann, V. Cognat, D. Lancelin, N. M. Peeters, M. Zaepfel, L. Marechal-Drouard i D. Small. Dual targeting is the rule for organellar aminoacyl-tRNA synthetases in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* **102** (2005) 16484-16489.
44. Y. Kim, J. Lee, H. Cho, S. Lee, H. Ha, S. Kim, D. Choi i H. Pai. Inactivation of organellar glutamyl- and seryl-tRNA synthetases leads to developmental arrest of chloroplasts and mitochondria in higher plants. *J. Biol. Chem.* **280** (2005) 37098-37106.
45. Rokov-Plavec J, Dulic M, Duchene AM & Weygand-Durasevic I Dual targeting of organellar seryl-tRNA synthetase to maize mitochondria and chloroplasts. *Plant Cell Rep* **27** (2008) 1157–1168.
46. Kekez M, Bauer N, Šarić E, Rokov-Plavec J. Exclusive cytosolic localization and broad tRNA^{Ser} specificity of *Arabidopsis thaliana* seryl-tRNA synthetase. *J Plant Biol* **59** (2016) 44–54.
47. Rokov-Plavec J, Lesjak S, Gruic-Sovulj I, Mocibob M, Dulic M & Weygand-Durasevic I Substrate recognition and fidelity of maize seryl-tRNA synthetases. *Arch Biochem Biophys* **529** (2013) 122–130.
48. Xu X, Shi Y, Zhang H, Swindell EC, Marshall AG, Guo M, Kishi S, Yang X. Unique domain appended to vertebrate tRNA synthetase is essential for vascular development. *Nat Commun* **3** (2012) 681–689.
49. Xu X, Shi Y, Yang XL. Crystal structure of human seryl-tRNA synthetase and Ser-SA complex reveals a molecular lever specific to higher eukaryotes. *Structure* **21** (2013) 2078–2086.
50. Rocha R, Pereira PJ, Santos MA, Macedo-Ribeiro S Unveiling the structural basis for translational ambiguity tolerance in a human fungal pathogen. *Proc Natl Acad Sci* **108** (2011) 14091–14096.
51. Mocibob M, Weygand-Durasevic I The proximal region of a noncatalytic eukaryotic seryl-tRNA synthetase extension is required for protein stability in vitro and in vivo. *Arch Biochem Biophys* **470** (2008) 129–138.
52. Godinic V, Mocibob M, Rocak S, Ibbá M, Weygand-Durasevic I, Peroxin Pex21p interacts with the C-terminal noncatalytic domain of yeast seryl-tRNA synthetase and forms a specific ternary complex with tRNA^{Ser}. *FEBS J* **274** 2788–2799.

53. Godinic-Mikulcic V, Jaric J, Greber BJ, Franke V, Hodnik V, Anderluh G, Ban N, Weygand-Durasevic I Archaeal aminoacyl-tRNA synthetases interact with the ribosome to recycle tRNAs. *Nucleic Acids Res* **42** (2014) 5191–5201.
54. Shi Y, Xu X, Zhang Q, Fu G, Mo Z, Wang GS, Kishi S, Yang XL tRNA synthetase counteracts c-Myc to develop functional vasculature. *ELife* **3** (2014) 1–21.
55. Kavanagh KL, Jörnvall H, Persson B, Oppermann U Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families: the SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes. *Cell Mol Life Sci* **65** (2018) 3895-3906.
56. E. Horvath, K. Bela, C. Papdi, A. Galle, L. Szabados, I. Tari i J. Csiszar. The role of *Arabidopsis* glutathione transferase F9 gene under oxidative stress in seedlings. *Acta Biol. Hung.* **66** (2015) 406-418.
57. T. Kouno i B. Ezaki. Multiple regulation of *Arabidopsis* at GST11 gene expression by four transcription factors under abiotic stresses. *Physiol. Plant* **148** (2013) 97-104.
58. J. E. Sarry, L. Kuhn, C. Ducruix, A. Lafaye, C. Junot, V. Hugovieux, A. Jourdain, O. Bastien, J. B. Fievet, D. Valihen, B. Amekraz, C. Moulin, E. Ezan, J. Garin i J. Bourguignon. The early responses of *Arabidopsis thaliana* cells to cadmium exposure by protein and metabolite profiling analyses. *Proteomics* **6** (2006) 2180-2198.
59. Unstained Protein Standards. <http://www.bio-rad.com/>. Pristupljeno 4.1.2019.
60. pET System Manual. Merck Milipore. **11** (2007) 63.
61. Merck Milipore. <http://www.merckmillipore.com/>. Pristupljeno 12.12.2018.
62. Thermo Fisher Scientific. <http://www.thermofisher.com>. Pristupljeno 12.12.2018.
63. Prism. <http://www.graphpad.com/scientific-software/prism>. Pristupljeno 12.12.2018.
64. Tropea J.E., Cherry S., Waugh D.S. Expression and Purification of Soluble His6-Tagged TEV Protease. In: Doyle S.A. (eds) High Throughput Protein Expression and Purification. *Methods in Molecular Biology, Humana Press* **498** (2009).
65. physiology.case.edu/media/eq_manuals/eq_manual_nanotemper_mst_starting_guide.pdf, preuzeto 6.1.2019
66. C. J. Fee, *Methods Mol. Biol.* **996** (2013) 287-312.
67. Du X, Li Y, Xia YL, et al. Insights into Protein-Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods. *Int J Mol Sci.* **17** (2016) 144.
68. Bussemas, H.H., Harsch, G. & Ettre, L.S. *Chromatographia* **38** (1994) 243.

69. D. Kritchevsky, Friedrich Goppelsroeder: Pioneer of paper chromatography, *Journal of Chemical Education* (1959) 36.
70. Robert M. Dondelinger Liquid Chromatography Systems. *Biomedical Instrumentation & Technology* **46** (2012) 299-306.
71. Pechenkin A. Liesegang Rings and the Other Periodic Phenomena. In: The History of Research on Chemical Periodic Processes. SpringerBriefs in History of Science and Technology. Springer, Cham 2018.
72. Ettre, L.S. Sakodynskii, K.I. *Chromatographia* **35** (1993) 223.
73. Harvey, D. Modern analytical chemistry. Boston: McGraw-Hill 2000.
74. Novotny, M., Springston, S. R., Peaden, P. A., Fjeldsted, J. C., & Lee, M. L. Capillary supercritical fluid chromatography. *Analytical Chemistry*, **53** (1981).
75. PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET, ZAVOD ZA BIOKEMIJU, Interna skripta za PRAKTIKUM IZ BIOKEMIJE, 15. RADNO IZDANJE, Zagreb 2016.
76. Ninfa, Alexander J. Ballou, David P. Benore, Marilee Fundamental Laboratory Approaches for Biochemistry and Biotechnology (2nd ed.). Wiley. 133 (2009).
77. Š. Cerjan-Stefanović, V. Drevenkar, B. Jurišić, M. Medić-Šarić, M. Petrović, N. Šegudović, V. Švob, S. Turina: Kromatografsko nazivlje: IUPAC preporuke 1993. i 1998., HINUS i Sekcija za kromatografiju HDKI, Zagreb, 1999.
78. https://www.azoo.hr/images/AZOO/Ravnatelj/RM/Nastavni_plan_i_program_za_osnovnu_skolu_-_MZOS_2006_.pdf, preuzeto 3.1.2019.
79. http://dokumenti.ncvvo.hr/Nastavni_plan/gimnazije/obvezni/kemija.pdf, preuzeto 3.1.2019.
80. http://dokumenti.ncvvo.hr/Nastavni_plan/pmg/kemija.pdf, preuzeto 3.1.2019.
81. http://dokumenti.ncvvo.hr/Nastavni_plan/strukovne/kemija-1.pdf, preuzeto 3.1.2019.
82. http://dokumenti.ncvvo.hr/Nastavni_plan/strukovne/kemija-2.pdf, preuzeto 3.1.2019.
83. Kušec, Galas, Herak, Škorić, Petreski, Marković OSNOVE FIZIKALNE KEMIJE, Grafički zavod Hrvatske, Zagreb, 1974.
84. M. Sikirica, B. Korpar – Čolig, KEMIJA S VJEŽBAMA 2 - Udžbenik za 2. razred gimnazije, Školska knjiga, Zagreb, 2002.
85. M. Herak, A. Petreski OPĆA KEMIJA - udžbenik kemije za prvi razred medicinske škole, Profil, Zagreb, 2012.

86. A. Habuš, V. Tomašić, S. Liber OPĆA KEMIJA 1 - udžbenik kemije za prvi razred gimnazije, Profil, Zagreb, 2014
87. Z. Popović, Lj. Kovačević KEMIJA 1 - udžbenik iz kemije za prvi razred gimnazije, Alfa, Zagreb, 2014.
88. M. Flögel, G. Lauc, Biokemijski praktiku, Školska knjiga, Zagreb, 1998.
89. D. Turčinović, I. Halasz OPĆA KEMIJA 1 - udžbenik kemije u prvom razredu gimnazije, Školska knjiga, Zagreb, 2014.
90. M. Sikirica, Zbirka kemijskih pokusa za osnovnu i srednju školu, Školska knjiga, Zagreb, 2012.
91. V. Mayer, Eksperimentalna nastava kemije, Školska knjiga, 1991.
92. https://www.chromatographytoday.com/news/gc-mdgc-gc-ms/32/breaking_news/how_is_gas_chromatography_used_in_forensics/30185, pristupljeno 3,1,2019.
93. https://www.chromatographytoday.com/news/bioanalytical/40/breaking_news/can_chromatography_help_cureEbola/32362, pristupljeno 3,1,2019

4. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

aa-AMP – aminoacil-adenilat

aaRS – aminoacil-tRNA-sintetaza

ATP – adenzin-5'-trifosfat

BSA – albumin govedeg seruma, engl. *bovine serume albumine*

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

DTT – ditiotritol

GST – glutation-S-transferaza

Hepes – *N*-(2-hidroksietil)piperazin-*N'*-2-etansulfonska kiselina

IPTG – izopropil- β -D-tioglaktopiranozid

ITC – izotermalna titracijska kalorimetrija (eng. *isothermal titration calorimetry*)

K_d – konstanta disocijacije

LB – Luria-Bertani medij, kompletni medij za uzgoj bakterije *Escherichia coli*

mRNA – glasnička ribonukleinska kiselina

MST – mikrotermoforeza (eng. *microscale thermophoresis*)

Ni-NTA – nikal(II)-nitrilotriocetna kiselina

PPi – pirofosfat

PPI – protein-protein interakcije

PTM – posttranslacijske modifikacije

RNA – ribonukleinska kiselina

SDS-PAGE – elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecilsulfata

SPR – metoda rezonancije površinskih plazmona (eng. *surface plasmon resonance*)

TAP-MS – tandemsko afinitetno sutaloženje spregnuto spektrometrijom masa (eng. *tandem affinity purification-mass spectrometry*)

tRNA – prijenosna ribonukleinska kiselina

w / V – masena koncentracija

TRIS – Tris(hidroksimetil)-aminometan

Popis dvadeset standardnih aminokiselina i odgovarajuće troslovne, odnosno jednoslovne kratice

Ala (A) alanin

Cys (C) cistein

Asp (D) asparaginska kiselina

Glu (E) glutaminska kiselina

Phe (F) fenilalanin

Gly (G) glicin

His (H) histidin

Ile (I) izoleucin

Lys (K) lizin

Leu (L) leucin

Met (M) metionin

Asn (N) asparagin

Pro (P) prolin

Gln (Q) glutamin

Arg (R) arginin

Ser (S) serin

Thr (T) treonin

Val (V) valin

Trp (W) triptofan

Tyr (Y) tirozin

5. DODATAK

POKUS 1 Pomozi Marku zadržati posao...

Pribor: pisaći pribor, milimetarski papir, ravnalo

Marko je student kemije koji je nakon završenog studija dobio svoj prvi posao. U svom prvom radnom tjednu Marko je još uvijek u strahu, što zbog okoline u kojoj se nalazi što zbog svoje nesigurnosti. Kao drugi radni zadatak Marko je dobio kromatografiju, metodu razdvajanja homogenih smjesa.

Ono čega se Marko sjeća o kromatografiji sa studija je sljedeće:

Kromatografija je metoda odvajanja koja se zasniva na različitoj raspodjeli komponenti uzorka između dvije faze od kojih je jedna nepokretna (stacionarna) a druga pokretna (mobilna).

Gel-filtracija je oblik razdjelne kromatografije kod koje se odjeljivanje temelji na različitoj veličini molekula. Kromatografski stupac se ispuni poroznom stacionarnom fazom, molekule analita iz mobilne faze ulaze u pore i vremenski se različito zadržavaju. Ulazak manjih molekula u pore stacionarne faze usporava gibanje niz stupac. Stoga, sa stupca prve silaze velike molekule, a potom sve manje.

Moć afinitetne kromatografije uzrokovana je željom molekula mobilne faze da stupe u interakciju sa stacionarnom fazom i njihovo vezanje unutar stupca odvaja ih od neželjenog materijala koji će se eluirati.

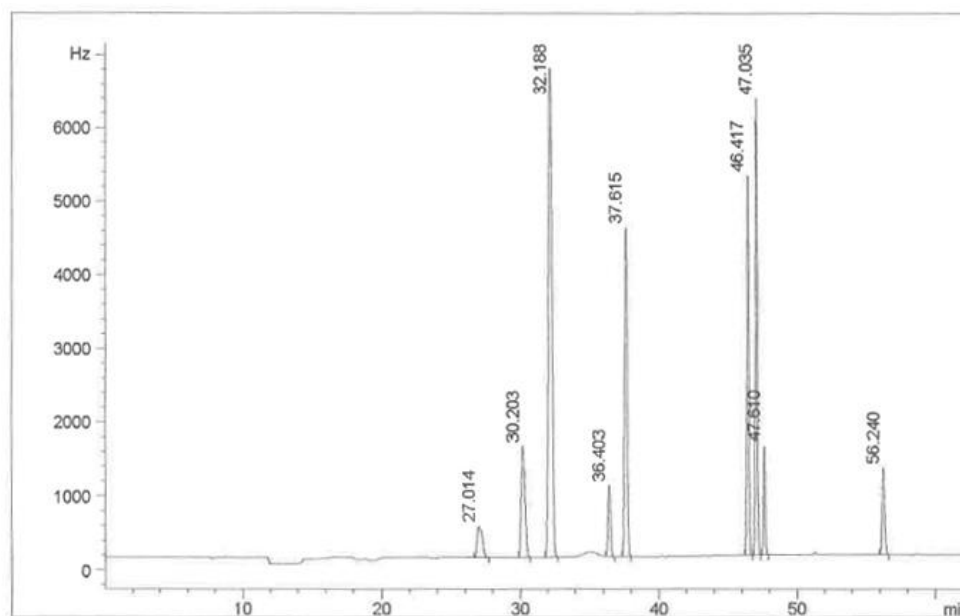
Mobilna faza plinske kromatografije sastoji se od inertnog plina, npr. helija, argona ili dušika. Stacionarna faza sastoji se od upakiranog stupca u koje je pakirana čvrsta podloga koja djeluje kao stacionarna faza ili je presvučena tekućom stacionarnom fazom (polimeri visokog vrelišta).

Pomozi Marku riješiti radne zadatke...

ZADATAK 1 Došavši na posao, za radnim stolom, Marka su dočekala tri kromatograma dobivena nakon plinske kromatografije i ceduljica na kojoj piše: „Provjeri koji bazen je dobar za kupanje.“. Prvi kromatogram predstavlja standard, maksimumi standarda odgovaraju spojevima koji nastaju nakon kloriranja bazena (klor reagira s organskom tvari prisutnoj u bazenskoj vodi), iznad maksimuma navedena su vremena zaostajanja (retencijsko vrijeme) spojeva, koje govori koliko se pojedini spoj zadržava na stacionarnoj podlozi. Površina pojedinih maksimuma proporcionalna je masenoj koncentraciji određenog spoja u uzorku. Bazenska voda je dobra za kupanja, ako je zbroj masenih koncentracija svih komponenti standarda manji od $100 \mu\text{g dm}^{-3}$. U otopinu standarda dodano je $50 \mu\text{g dm}^{-3}$ pojedinog spoja, a površine njima pripadnih maksimuma navedene su u tablici 1 prema redosljedu javljanja u kromatogramu (slijeva na desno).

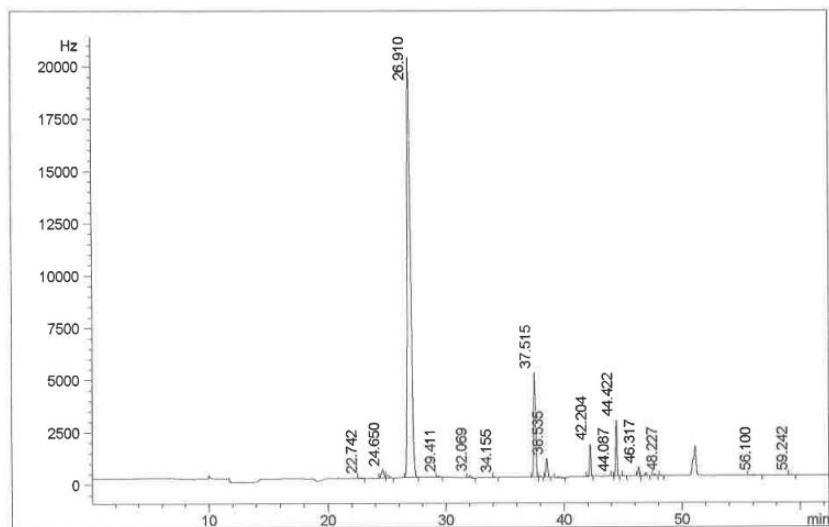
Tablica 1. Retencijska vremena i površine kromatografskih maksimuma standardnog uzorka.

Ime spoja	Retencijsko vrijeme / min	Površina maksimuma / mm^2
kloroform	27,014	111 220
1,1,1-trikloreten	30,203	27 960
tetraklorugljik	32,188	117 600
trikloreten	36,403	12 220
bromdiklormetan	37,615	55 600
dibromklormetan	46,417	47 140
tetrakloreten	47,035	57 470
bromoform	47,610	14 030
kloroform	56,240	14 950



Kromatogram 1 (kromatogram standardnog uzorka)

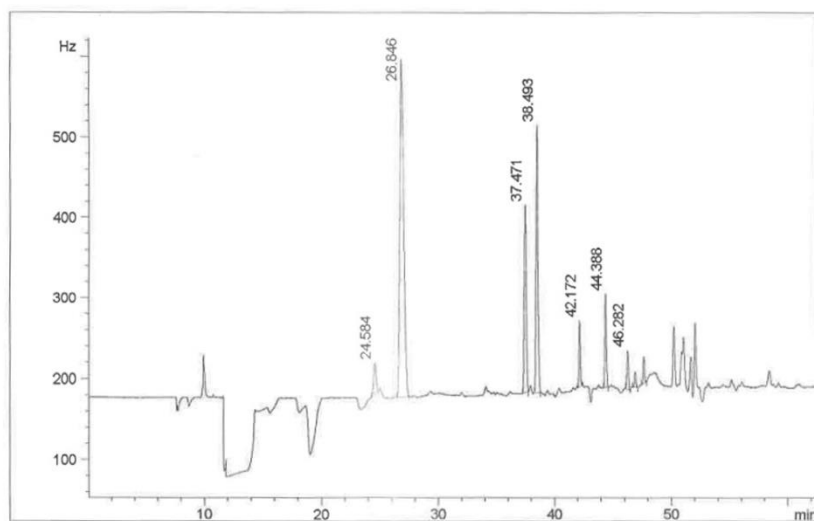
Spasi Marka i analiziraj kromatograme 2 i 3. U tablicama 2 i 3 dane su površine kromatografskih maksimuma. Retencijska vremena navedena su u kromatogramima. Svoja rješenja upiši u tablicu 4.



Kromatogram 2 (bazen 1)

Tablica 2. Površine kromatografskih maksimuma u kromatogramu 2 (dane u mm² i navedene redosljedom javljanja maksimuma (slijeva na desno, od **a**) do **o**)).

a) 339,9	b) 6546	c) 2458	d) 384 900	e) 468,9
f) 1727	g) 412,1	h) 54 190	i) 665,8	j) 9939
k) 1302	l) 12 330	m) 89,45	n) 22 800	o) 117,5



Kromatogram 3 (bazen 2)

Tablica 3. Površine kromatografskih maksimuma u kromatogramu 3 (dane u mm² i navedene redosljedom javljanja maksimuma (slijeva na desno, od **a**) do **g**)).

a) 532,6	b) 9311	c) 2697	d) 3860
e) 652,9	f) 1042	g) 403,2	

Tablica 4.a) Rješenja za Markov spas (uzorak 1).

Ime spoja	Retencijsko vrijeme / min	Površina maksimuma / mm ²
Kloroform	26,910	384 900
1,1,1-trikloreten	29,441	486,9
Tetraklorugljik	32,069	17 270
Trikloreten	nije prisutan	nije prisutan
Bromdiklormetan	37,515	54 190
Dibromklormetan	46,317	12 330
Tetrakloreten	nije prisutan	nije prisutan
Bromoform	nije prisutan	nije prisutan
Kloroform	56,100	22 800

$$\text{Kloroform: } \frac{50 \mu\text{g dm}^{-3} \times 384900 \text{ mm}^2}{112200 \text{ mm}^2} = 171,5 \mu\text{g dm}^{-3}$$

$$1,1,1 \text{ trikloreten: } \frac{50 \mu\text{g dm}^{-3} \times 486,9 \text{ mm}^2}{27960 \text{ mm}^2} = 0,8711 \mu\text{g dm}^{-3}$$

$$\text{Tetraklorugljik: } \frac{50 \mu\text{g dm}^{-3} \times 17270 \text{ mm}^2}{117600 \text{ mm}^2} = 7,343 \mu\text{g dm}^{-3}$$

$$\text{Bromdiklormetan: } \frac{50 \mu\text{g dm}^{-3} \times 54190 \text{ mm}^2}{55600 \text{ mm}^2} = 48,73 \mu\text{g dm}^{-3}$$

$$\text{Dibromklormetan: } \frac{50 \mu\text{g dm}^{-3} \times 12330 \text{ mm}^2}{47140 \text{ mm}^2} = 13,07 \mu\text{g dm}^{-3}$$

$$\text{Kloroform: } \frac{50 \mu\text{g dm}^{-3} \times 22800 \text{ mm}^2}{14950 \text{ mm}^2} = 7,625 \mu\text{g dm}^{-3}$$

$$\Sigma(\text{svih}) = (171,5 \mu\text{g dm}^{-3} + 0,8711 \mu\text{g dm}^{-3} + 7,343 \mu\text{g dm}^{-3} + 48,73 \mu\text{g dm}^{-3} + 13,07 \mu\text{g dm}^{-3} + 7,625 \mu\text{g dm}^{-3}) - 100 \mu\text{g dm}^{-3} = 149,1 \mu\text{g dm}^{-3}$$

Ova bazenska voda nije dobra za kupanje.

Tablica 4.b) Rješenja za Markov spas (uzorak 2).

Ime spoja	Retencijsko vrijeme / min	Površina maksimuma / mm ²
Kloroform	26,846	9311
1,1,1-trikloreten	nije prisutan	nije prisutan
Tetraklorugljik	nije prisutan	nije prisutan
Trikloreten	nije prisutan	nije prisutan
Bromdiklormetan	37,471	2697
Dibromklormetan	46,282	403,2
Tetrakloreten	nije prisutan	nije prisutan
Bromoform	nije prisutan	nije prisutan
Kloroform	nije prisutan	nije prisutan

$$\text{Kloroform: } \frac{50 \mu\text{g dm}^{-3} \times 9311 \text{ mm}^2}{112200 \text{ mm}^2} = 4,149 \mu\text{g dm}^{-3}$$

$$\text{Bromdiklormetan: } \frac{50 \mu\text{g dm}^{-3} \times 2697 \text{ mm}^2}{55600 \text{ mm}^2} = 2,425 \mu\text{g dm}^{-3}$$

$$\text{Dibromklormetan: } \frac{50 \mu\text{g dm}^{-3} \times 403,2 \text{ mm}^2}{47140 \text{ mm}^2} = 0,4277 \mu\text{g dm}^{-3}$$

$$\Sigma(\text{svih}) = (4,149 \mu\text{g dm}^{-3} + 2,425 \mu\text{g dm}^{-3} + 0,4277 \mu\text{g dm}^{-3}) - 100 \mu\text{g dm}^{-3} = -92,99 \mu\text{g dm}^{-3}$$

Ova bazenska voda je dobra za kupanje.

ZADATAK 2 Sljedeći Markov zadatak bio je izolirati protein **X** iz smjese sa sljedećim proteinima:

Citiokrom C 12 400 Da, $c = 80 \mu\text{M}$ Hemoglobin 68 000 Da, $c = 44 \mu\text{M}$

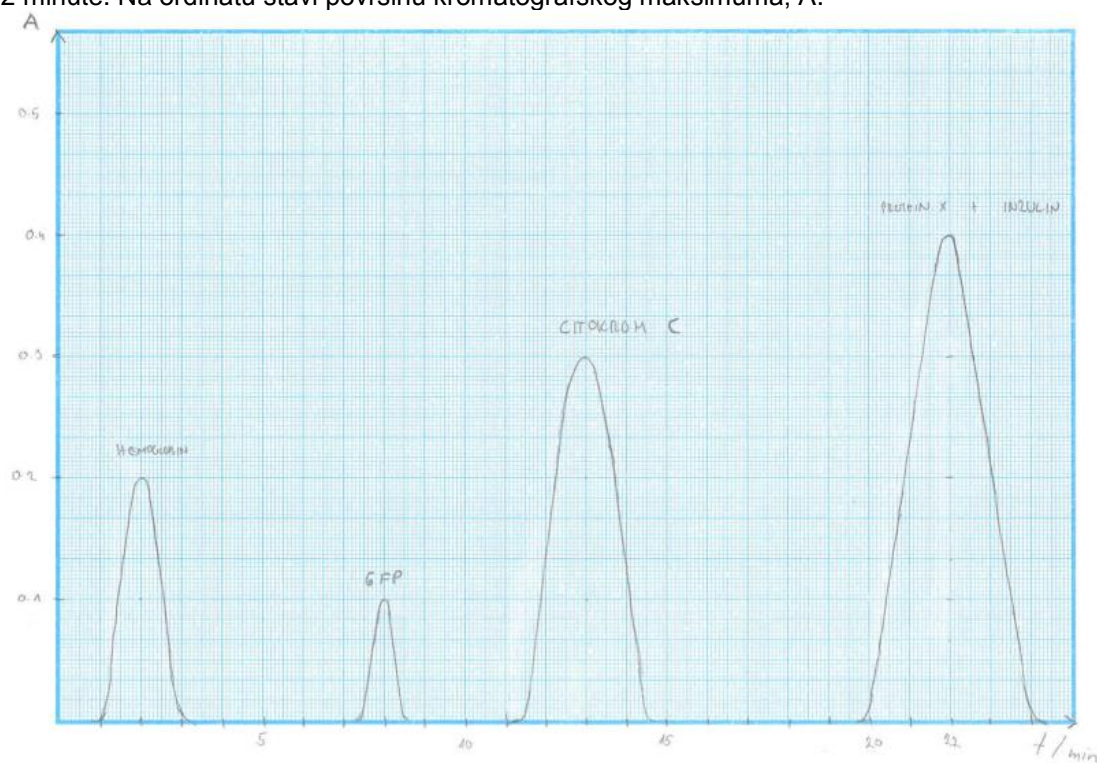
GFP 26 900 Da, $c = 21 \mu\text{M}$ Inzulin 5 808 Da $c = 22 \mu\text{M}$

Marko zna da je protein X slične molekulske mase kao i inzulin te da je njegova koncentracija $82 \mu\text{M}$.

PITANJE 1 Kojom kromatografskom metodom Marko može odvojiti protein **X** iz smjese? Objasni svoj odgovor.

Gel-filtracijom. Zato jer je razlika u molekulskoj masi između proteina X i ostalih proteina dovoljno velika. Ali, tako će samo dobiti smjesu inzulina i proteina X.

ZADATAK 3 Skiciraj kako će izgledati kromatogram smjese proteina nakon što Marko provede metodu predloženu u odgovoru na PITANJE 1. Pri tome uzmi u obzir da je kromatografski maksimum inzulina pri 22 minute. Na ordinatu stavi površinu kromatografskog maksimuma, A.



PITANJE 2 Koja je uloga inzulina u tijelu?

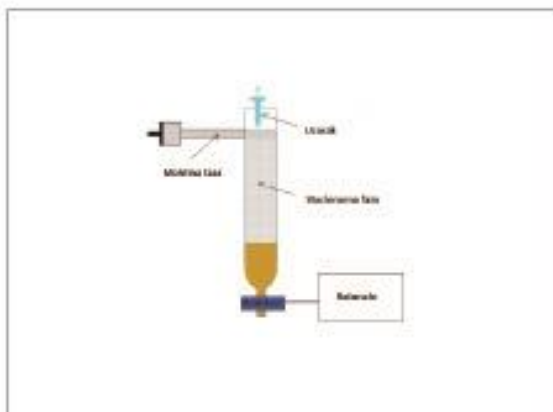
Inzulin ima ključnu ulogu u regulaciji glukoze u krvi.

PITANJE 3 Inzulin svoju ulogu ostvaruje vezanjem na transmembranski protein koji je zove inzulinski receptor (IR). Vezanjem inzulina ovaj protein signalizira stanici prisutnost supstrata u izvanstaničnom prostoru. Može li, i kako, Marko iskoristiti ovu ulogu inzulina za pročišćavanje proteina **X**?

Marko bi mogao odvojiti protein **X** od inzulina uporabom afinitetne kromatografije uz stacionarnu fazu koja ima svojstva inzulinskog receptora.

ZADATAK 3 Opiši koji je zadnji korak kojim će Marko uspješno dobiti protein **X**?

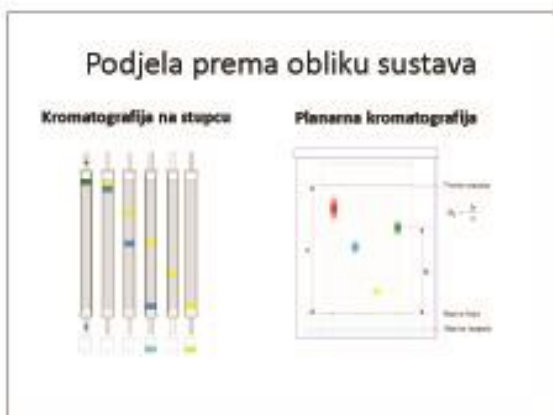
Kromatografski stupac je potrebno ispuniti stacionarnom fazom koja na sebi ima vezani inzulinski receptor. Mobilnu fazu činit će smjesa proteina X i inzulina. Prolaskom mobilne faze inzulin će se vezati za stacionarnu fazu, a željeni protein X će proteći (eluirat će).



- **VRSTE KROMATOGRAFIJE:**

- **Podjela prema fizikalnom stanju faza:**

- Tekućinska kromatografija
- Plinska kromatografija
- Superkritična fluidna kromatografija



- **Podjela prema mehanizmu odvajanja komponenti:**

- Adsorpcijska kromatografija (razdjela zbog vezanja komponenti smjese na čvrstoj podlozi)
- Afinitetna kromatografija (odvajanje prema afinitetu jedne molekule prema pojedinim malim molekulama)
- Gel-kromatografija (razdvajanje prema veličini molekula)
- Kromatografija s ionskim izmjenjivačima (kemijsko vezanje komponente na nepokretnu fazu)

6. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci**Ime i prezime: Ivan Antičević****Datum rođenja: 28. siječnja. 1995.****Mjesto rođenja: Split****Obrazovanje****2001–2009 Osnovna škola Josip Pupačić Omiš, Omiš****2009–2013 Srednja škola 1. Gimnazija Split, Split****2013-danas Integrirani preddiplomski i diplomski studij biologije i kemije****Sudjelovanja u popularizaciji znanosti****2015–2018 Voditelj sekcije za edukaciju BIUS (Udruga studenata biologije)****2016 Otvoreni dan kemije****2017 Otvoreni dan kemije****2018 Otvoreni dan kemije**