

Optimizacija ekspresije i pročišćavanja atipičnih arginil-tRNA-sintetaza

Knežević, Karla

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:217:646127>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-24**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Karla Knežević

Optimizacija ekspresije i pročišćavanja atipičnih arginil-tRNA-sintetaza

Diplomski rad

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

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za biokemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Ite Gruić Sovulj i neposrednim voditeljstvom dr. sc. Igora Živkovića.

Zahvale

Prvo, mojoj obitelji. Mami, tati, baki i didi koji su me kroz sve ovo voljeli i podržavali kada sam bila i vesela i živčana i ljuta i tužna i luda. Koji su udovoljavali svakoj mojoj želji, poticali me da se odmorim, da ustrajem i ne odustajem. Koji su mi se radovali više od ikoga na ovom svijetu. Koji su glavni razlog zašto jedva čekam povratak u Slavoniju iako bih tek otišla. Koji nisu znali ništa ni o arginilu ni o tRNA ni o sintetazama, ali su razumjeli koliko mi je stalo i koliko želim biti najbolja u svemu što radim. Koji su mi dali sve. Nadam se da ću vam jednog dana uzvratiti sve što ste od sebe oduzeli da bi meni dali. Hvala vam.

Drugo, mojoj Petri. Kažu da prijateljstva koja traju 7 godina, traju zauvijek. Sva sreća da sam ja produžila studiranje na 6 godina pa uz jednu godinu bliskog prijateljstva u srednjoj eto, 7 godinica najboljeg prijateljstva. Bez tebe, ništa. Da ti zahvaljujem na svakoj uspomeni za koju si ti zaslužna, zahvala bi bila duža od sadržaja diplomskog. Hvala ti što me prihvaćaš sa svim mojim manama, hvala što si moja osoba za „nikakav problem, riješit ćemo“. I kad smo udaljene 300 kilometara i vidamo se par puta godišnje, uvijek si mi blizu. Ovo poglavlje je gotovo, a za dalje... omozi ože.

Treće, mojoj Luciji. Onoj koja je jedina razumjela i mene i koliko mi je teško i koliko ludim i koliko se radujem jer je bila uz mene svaki trenutak i sama sve prolazila. Od onog nemilog prvog komplimenta do prijateljstva koje imamo sad, prošlo je mnogo ispita, ispijanja i ispadanja kose. Jedan komad autoceste i jedna vožnja busom 207 dijelila me je od druge polovice mog kupusa. Jedva čekam podijeliti sljedeće poglavlje u životu baš s tobom, čekaju nas dobre stvari Luncija.

Četvrto, prijateljicama bez kojih posljednja godina ne bi bila tako slatka, Eleonori i Sari. Elli na svakom tajnom razgovoru na uvjetu 25/60, na milijun i jednom putu kada me nasmijala, na tome što me nije zaboravila. Sari na svemu što me naučila, na svakom zagrljaju nakon slobodnih dana, na iskrenom prijateljstvu. Toliko se neobičnih stvari moralo poklopiti da se upoznamo, ali jesmo, niste mogle doći u boljem trenutku. Hvala što ste postavile nemoguće standarde, hvala što ste mi dokazale da sam i nakon „škole“ mogla pronaći prijateljice za cijeli život. Hvala vam što ste tu.

Hvala vam svima što ste me istrpjeli ovih šest godina, volim vas.

Hvala mojim Bitangama, Kući, Kovi, Jurićima i Tomu s kojima sam provela neke od najzabavnijih trenutaka prošle godine, kolegicama s posla i svima koji su mi uljepšali barem jedan trenutak studiranja.

Hvala mentorima koji su me primili pod svoje, nadam se da ćete me pamtit i po dobrome.

I naposljetku se želim zahvaliti djevojčici. Onoj koju sam sa svim svojim uspjesima htjela učiniti ponosnom i dokazati joj da ona sve to može jer je ona ta koja me jedva čekala, sanjarila o meni i zamišljala što ću sve postići. Koliko smo daleko došle, a što nas još sve čeka. Uvijek ću ti biti blizu, kao da nikad nisam odrasla.

Ovaj rad želim posvetiti mome didi Petru. Čovjeku s kojim sam prvi put pila pivo, zbrajala i čiju sam ljubav za sladom naslijedila. On neće pročitati ovu zahvalu, ali znam da je poznavao moje srce i znao koliko se utkao u moje djetinjstvo i cijeli život kako bih danas postala magistrom kemije.

... i upamti mila, ako me ikad zatrebaš, *sreća je tek suzu daleko.*

Sadržaj

SAŽETAK.....	XI
ABSTRACT	XIII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	4
2.1. Biosinteza proteina.....	4
2.2. Struktura molekule tRNA	7
2.3. Aminoacil-tRNA-sintetaze.....	9
2.3.1. Podjela aminoacil-tRNA-sintetaza.....	9
2.3.2. Mehanizam aminoaciliranja	12
2.4. Arginil-tRNA-sintetaza.....	13
2.4.1. Struktura ArgRS i tRNA ^{Arg}	13
2.4.2. Atipične varijante ArgRS	19
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	22
3.1. Materijali	22
3.1.1. Standardne kemikalije.....	22
3.1.2. Aminokiseline i nukleotidi.....	22
3.1.3. Boje i elektroforetski markeri za molekulsku masu proteina	22
3.1.4. Enzimi i drugi proteini	23
3.1.5. Radioaktivne kemikalije	23
3.1.6. Plazmidi	23
3.1.7. Bakterijski sojevi <i>E. coli</i>	24
3.1.8. Komercijalni kompleti.....	25
3.1.9. Hranjiva podloga i medij za uzgoj bakterije <i>E. coli</i>	25
3.1.10. Kromatografski materijali	25
3.1.11. Ostali materijali.....	25
3.2. Metode.....	25
3.2.1. Metode rada s bakterijama	26
3.2.1.1. Transformacija bakterijskih sojeva elektroporacijom	26
3.2.1.2. Priprema glicerolskih bakterijskih kultura.....	27
3.2.2. Metode rada s nukleinskim kiselinama	27
3.2.2.1. Izolacija plazmidne DNA	27
3.2.2.2. Prekomjerna ekspresija i izolacija tRNA.....	27

3.2.2.3.	Dijaliza tRNA.....	28
3.2.2.4.	Poliakrilamidna gel-elektroforeza s dodatkom uree.....	29
3.2.2.5.	Pročišćavanje tRNA ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom	30
3.2.2.6.	Određivanje koncentracije tRNA spektrofotometrijom.....	31
3.2.3.	Metode rada s proteinima.....	31
3.2.3.1.	Prekomjerna ekspresija rekombinantnih proteina.....	31
3.2.3.2.	Koekspresija rekombinantnih proteina sa šaperonima.....	32
3.2.3.3.	Priprema proteinskog ekstrakta.....	32
3.2.3.4.	Afinitetna kromatografija na Ni-NTA agarozu.....	34
3.2.3.5.	Gel-filtracijska kromatografija.....	36
3.2.3.6.	Ionsko-izmjenjivačka kromatografija	38
3.2.3.7.	Ukoncentriravanje proteina ultrafiltracijom	39
3.2.3.8.	Denaturirajuća poliakrilamidna gel-elektroforeza uz dodatak natrijevog dodecilsulfata ...	39
3.2.3.9.	Određivanje koncentracije proteina spektrofotometrijom.....	40
3.2.4.	Kinetičke metode.....	41
3.2.4.1.	Aminoacilacija uz [¹⁴ C]-aminokiselinu.....	41
3.2.4.2.	Određivanje akceptorske aktivnosti tRNA uz [¹⁴ C]-aminokiselinu.....	42
§ 4.	REZULTATI.....	44
4.1.	Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje tRNA^{Arg} iz bakterija <i>E. coli</i>, <i>S. thermophilum</i> i <i>H. aurantiacus</i>.....	44
4.2.	Kinetička karakterizacija dobivenih tRNA^{Arg}.....	48
4.3.	Optimizacija prekomjerne ekspresije i pročišćavanja ArgRS iz bakterija <i>E. coli</i>, <i>S. thermophilum</i> i <i>H. aurantiacus</i>.....	50
4.3.1.	ArgRS iz bakterije <i>E. coli</i>	50
4.3.1.1.	Optimizirani postupak prekomjerne ekspresije i pročišćavanja <i>EcArgRS</i>	50
4.3.2.	ArgRS iz bakterije <i>S. thermophilum</i>	54
4.3.2.1.	Optimizacija ekspresije <i>StArgRS</i>	54
4.3.2.2.	Optimizacija lize stanica s eksprimiranim <i>StArgRS</i>	57
4.3.2.3.	Optimizacija pročišćavanja <i>StArgRS</i>	59
4.3.2.4.	Optimizirani postupak prekomjerne ekspresije i pročišćavanja <i>StArgRS</i>	65
4.3.3.	Tipični ArgRS iz bakterije <i>H. aurantiacus</i>	67
4.3.3.1.	Optimizirani postupak prekomjerne ekspresije i pročišćavanja <i>HaArgRS1</i>	67
4.3.4.	Atipični ArgRS iz bakterije <i>H. aurantiacus</i>	70
4.3.4.1.	Optimizacija ekspresije <i>HaArgRS2</i>	70
4.3.4.2.	Optimizacija lize stanica s eksprimiranim <i>HaArgRS2</i>	73
4.3.4.3.	Optimizacija pročišćavanja <i>HaArgRS2</i>	75

4.3.4.4. Optimizirani postupak prekomjerne ekspresije i pročišćavanja HaArgRS2.....	78
4.4. Kinetička karakterizacija dobivenih ArgRS	80
4.4.1. Utjecaj reverzije atipičnog motiva VLVQ u kanonski na kinetiku StArgRS.....	83
4.4.2. Utjecaj pH na kinetiku HaArgRS1	83
§ 5. RASPRAVA	85
5.1. Uspješnost ekspresije i pročišćavanja ArgRS iz bakterija <i>E. coli</i>, <i>S. thermophilum</i> i <i>H. aurantiacus</i>	85
5.2. Katalitička aktivnost izoliranih ArgRS.....	89
§ 6. ZAKLJUČAK	91
§ 7. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	93
§ 8. LITERATURNI IZVORI.....	96
§ 9. DODATAK.....	XV
§ 10. ŽIVOTOPIS	XXIII



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

OPTIMIZACIJA EKSPRESIJE I PROČIŠĆAVANJA ATIPIČNIH ARGINIL-TRNA-SINTETAZA

Karla Knežević

Arginil-tRNA-sintetaza (ArgRS) je enzim koji katalizira nastajanje arginil-tRNA, supstrata za biosintezu proteina, u dva koraka: aktivacija arginina pomoću ATP-a te njegovo prenošenje na tRNA^{Arg}. Razred aminoacil-tRNA-sintetaza (aaRS) kojemu pripada ArgRS karakterizira očuvana struktura katalitičke domene s dva kanonska motiva, His-hidrofobna aminokiselina-Gly-His (HXGH) i Lys-Met-Ser-Lys-Ser (KMSKS), koji sudjeluju u interakciji s ATP-om te adenilatnim međuproduktom. U literaturi su opisane aaRS s atipičnim motivom HXGH koje posjeduju poboljšana svojstva poput hiperrezistencije na antibiotik. U sklopu ovog diplomskog rada odabrana su dva organizma čije su se atipične ArgRS proučavale: *Symbiobacterium thermophilum* čija ArgRS umjesto kanonskog motiva HXGH posjeduje motiv Val-Leu-Val-Gln (VLVQ), te *Herpetosiphon aurantiacus* u čijem se genomu nalaze dva gena za ArgRS: jedan posjeduje kanonski motiv His-Val-Gly-His (HVGH) dok drugi protein ima atipični motiv Arg-Val-Asp-His (RVDH). Svrha ovog istraživanja je optimizacija ekspresije i pročišćavanja arginil-tRNA-sintetaza s atipičnim motivom HXGH te proučavanje kinetike enzimske katalizirane reakcije aminoacilacije. Pronađeni su uvjeti optimalne ekspresije i pročišćavanja ArgRS iz *S. thermophilum* i *H. aurantiacus* (HVGH). Proteini aminoaciliraju pripadnu tRNA^{Arg} sličnom brzinom. Atipična ArgRS iz *H. aurantiacus* (RVDH) sklona je agregaciji te nije uspješno pročišćena i kinetički okarakterizirana.

(97 stranica + XXIII, 55 slika, 25 tablica, 39 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: aminoaciliranje, arginil-tRNA-sintetaza, atipični motivi, optimizacija

Mentor: prof. dr. sc. Ita Gruić Sovulj

Neposredni voditelj: dr. sc. Igor Živković

Ocjenitelji: 1. prof. dr. sc. Ita Gruić Sovulj

2. doc. dr. sc. Ivana Kekez

3. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Zamjena: doc. dr. sc. Morana Dulić

Datum diplomskog ispita: 05. rujna 2024.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

OPTIMIZATION OF EXPRESSION AND PURIFICATION OF ATYPICAL ARGINYL-TRNA SYNTHETASES

Karla Knežević

Arginyl-tRNA synthetase (ArgRS) catalyzes the formation of arginyl-tRNA, a substrate for protein biosynthesis by a two-step mechanism: ATP-dependant activation of arginine which is followed by arginine transfer to tRNA. The class of aminoacyl tRNA synthetases (aaRS) to which ArgRS belongs is characterized by a conserved catalytic fold containing two canonical motifs which interact with ATP and the adenylate intermediate, His-hydrophobic aminoacid-Gly-His (HXGH) and Lys-Met-Ser-Lys-Ser (KMSKS). Research shows that the aaRS containing the atypical HXGH motif possesses enhanced properties such as hyper-resistance to antibiotics. This research aims to find the optimal conditions for the expression and purification of atypical ArgRS from *Symbiobacterium thermophilum* and *Herpetosiphon aurantiacus*. The former's ArgRS possesses the Val-Leu-Val-Gln (VLVQ) motif and the latter's genome has two genes for ArgRS. The primary ArgRS has the canonical His-Val-Gly-His (HVGH) motif but the secondary has the atypical Arg-Val-Asp-His (RVDH) motif. Optimal conditions for expression and purification of *S. thermophilum* and canonical ArgRS from *H. aurantiacus* were found. Kinetic characterisation shows that these enzymes have similar aminoacylation rates. *H. aurantiacus* ArgRS with the atypical RVDH motif is prone to forming soluble aggregates and hence was not successfully purified and kinetically characterized.

(97 pages + XXIII, 55 figures, 25 tables, 39 references, original in Croatian)

The Thesis is 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: aminoacylation, arginyl-tRNA synthetase, atypical motifs, optimization

Mentor: Dr Ita Gruić Sovulj, Professor

Assistant mentor: Dr Igor Živković

Reviewers: 1. Dr Ita Gruić Sovulj, Professor

2. Dr Ivana Kekez, Assistant Professor

3. Dr Iva Juranović Cindrić, Professor

Substitute: Dr Morana Dulić, Assistant Professor

Date of exam: September 5th, 2024

§ 1. UVOD

Proteini obavljaju gotovo sve procese nužne za život organizma, a njihova funkcionalnost određena je pravilnom trodimenzionalnom strukturom i ispravnim primarnim slijedom aminokiselina. Zbog toga je biosinteza proteina esencijalni proces u organizmu koji se intenzivno proučava od samih začetaka biokemijske znanosti.¹ Informacija o aminokiselinskom slijedu svakog proteina u organizmu, zapisana je u molekuli DNA (engl. *deoxyribonucleic acid*). Ta se informacija prepisuje u molekulu glasničke RNA (engl. *messenger ribonucleic acid*, mRNA), a potom prevodi u aminokiselinski slijed u procesu translacije koja se odvija na ribosomu. Aminokiseline na ribosom dolaze kovalentno vezane na odgovarajućoj prijenosnoj RNA (engl. *transport ribonucleic acid*, tRNA). Enzimi koji kataliziraju povezivanje aminokiseline s tRNA su aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS). Reakcija aminoaciliranja tRNA odvija se u dva koraka: aktivacija aminokiseline i prijenos aminokiseline na tRNA. Aminokiselina biva aktivirana pomoću ATP-a tako da je katalizirana reakcija nukleofilnog napada α -karboksilnog kisika aminokiseline na α -fosfor ATP-a pri čemu nastaje aminoacil-adenilat (aa-AMP). U drugom koraku reakcije aminoaciliranja 2' ili 3'-OH skupina riboze terminalnog adenzina tRNA vrši nukleofilni napad na α -karbonilni ugljik aminoacil-adenilata. Funkcionalnost ovih enzima važna je za vjernu translaciju genetičkog koda pa je tako i od životne važnosti za organizam.¹⁻³

Enzim koji katalizira reakciju prijenosa aminokiseline arginina na pripadajuću tRNA^{Arg} je arginil-tRNA-sintetaza (ArgRS). Na temelju mehanističkih i strukturnih obilježja, ArgRS je svrstana u razred I aminoacil-tRNA-sintetaza. Svi enzimi iz ovog razreda posjeduju karakterističnu katalitičku domenu HUP (engl. *HIGH-signature proteins*, *UspA* and *PP-ATPases*). Domena HUP je u svim ArgRS podijeljena na dva dijela zbog umetnute domene CP-1 (engl. *connective peptide 1*).⁴ HUP sudjeluje u vezanju nukleotida poput ATP-a putem visoko očuvanih motiva His-X(Ile)-Gly-His (HXGH, X je generalno bilo koja hidrofobna aminokiselina, ali je uvriježeno HIGH) koji se nalazi u prvom dijelu i Lys-Met-Ser-Lys-Ser (KMSKS) lociranog u drugom dijelu domene.⁵ Prilikom smatanja proteina, ovi motivi se približavaju jedan drugome i sinergijski djeluju u vezanju ATP-a. Oba motiva stabiliziraju prijelazno stanje tijekom formiranja aminoacil-adenilata. Motiv HIGH preko oba histidina tvori vodikove veze s ATP-om, a KMSKS putem oba lizina može stabilizirati negativan naboj.

Pokazano je da u aaRS razreda I mutacija drugog lizina (K2) u KMSKS drastično smanjuje katalitičku aktivnost enzima što objašnjava očuvanost ove aminokiseline kroz razred I. Međutim, ArgRS u mnogim organizmima ima izmijenjen motiv KMSKS u kojem je na mjesto K2 umetnuta druga aminokiselina (GMSTX, QMSGX). Pokazano je da u takvim enzimima funkciju K2 preuzima lizin koji se nalazi blizu motiva HIGH.^{5,6} Varijacije u motivu HIGH trenutno nisu istražene koliko u KMSKS. No, u nedavnim istraživanjima je pronađena bakterijska izoleucil-tRNA-sintetaza s nekanonskim motivom HIGH (GXHH) koja se pokazala hiperrezistentnom na antibiotik mupirocin.⁷ S tim saznanjem je napravljena bioinformatička analiza primarnih sljedova aaRS razreda I kroz živi svijet kako bi se otkrilo još atipičnih varijanti aaRS koje bi potencijalno nosile nova svojstva. Otkriveno je da ArgRS pokazuju veliku varijaciju u motivu HIGH. Izdvojena su dva organizma koja imaju znatnu devijaciju od kanonskog motiva: *Symbiobacterium thermophilum* posjeduje motiv VLVQ, a motiv RVDH je nađen u bakteriji *Herpetosiphon aurantiacus*. Varijacija pronađena u simbiotskoj bakteriji *S. thermophilum* (StArgRS) zanimljiva je zbog zamjene prvog histidina valinom koji ne može biti ni donor ni akceptor vodikove veze, a visoko očuvani glicin je zamijenjen manje fleksibilnim valinom. *H. aurantiacus* je predatorna bakterija iz porodice *Herpetosiphonaceae* koje koriste strategiju „vučjeg čopora“ (engl. *wolf pack*) kako bi se hranile drugim organizmima. Tijekom lova, izlučuju niz hidrolitičkih enzima kako bi razgradile mikroorganizme do hranjivih tvari.⁸ Ova bakterija posjeduje duplikaciju gena za ArgRS (HaArgRS); HaArgRS1 posjeduje kanonski motiv HVGH dok drugi protein, nazvan HaArgRS2, ima motiv RVDH. Histidin je zamijenjen argininom čiji bočni ogranak ima znatno višu pK_a vrijednost. Na mjesto glicina je uveden aspartat vrlo niske pK_a vrijednosti bočnog ogranka. Uz to, aspartat je znatno veći, što utječe na fleksibilnost proteinske okosnice motiva. Kanonski motiv HIGH sastavljen je od nenabijenih i nepolarnih aminokiselina (X/I, G) te histidina čiji pozitivno nabijeni bočni ogranak pridonosi stabilizaciji negativnog naboja ATP-a. Zbog toga je zanimljivo promatrati motiv koji posjeduje vrlo kiseli aspartat uz izrazito bazični arginin.

Cilj ovog rada je optimizirati proces proizvodnje i pročišćavanja rekombinantnih arginil-tRNA-sintetaza iz *Escherichia coli*, *Symbiobacterium thermophilum* i *Herpetosiphon aurantiacus* u dostupnim ekspresijskim sojevima bakterije *E. coli* s konačnim ciljem pripreme proteina za kinetičku i strukturnu karakterizaciju s naglaskom na StArgRS. Kinetički će se okarakterizirati i mutanti StArgRS koji predstavljaju postupni povratak u kanonski motiv

HXGH; varijacije HLVQ i HLGQ. Također, pročistit će se i kinetički okarakterizirati odgovarajuće tRNA^{Arg} iz oba organizma. Kinetički parametri i uspješnost pročišćavanja usporedit će se s modelnom arginil-tRNA-sintetazom i pripadajućom tRNA^{Arg} iz *E. coli*. Ekspresijski vektor pET28a s genom za ArgRS će se transformirati u nekoliko ekspresijskih sojeva te će se eksprimirati i analizirati u obliku fuzijskog proteina s histidinskim privjeskom na N-kraju. Proteini će prvo biti pročišćeni afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu, a zatim će se odvojiti od topljivih proteinskih agregata i ostalih nečistoća pomoću gel-filtracijske kromatografije. U pronalasku odgovarajućih uvjeta za proizvodnju navedenih proteina glavni naglasak bit će na optimizaciji pročišćavanja kromatografskim metodama pod visokim tlakom. Ionsko-izmjenjivačka kromatografija će se koristiti za purifikaciju tRNA. Ekspresija i uspješnost pročišćavanja proteina i tRNA će se analizirati kvantitativno, određivanjem masene koncentracije spektrofotometrijom te kvalitativno, denaturirajućom poliakrilamidnom gel-elektroforezom i gel-filtracijom. Određivanje kinetičkih parametara, opažene konstante brzine reakcije aminoaciliranja k_{obs} , provest će se korištenjem radioaktivno obilježenog [¹⁴C]-arginina detekcijom zračenja u otopini scintilatora. Akceptorska aktivnost pojedinih tRNA će također biti određena metodom tekućeg scintilatora uz [¹⁴C]-arginin. Ovaj rad će dati opis postupka proizvodnje čistih proteina kako bi se daljnjim istraživanjem mogla jasnije proučiti kinetika enzima s atipičnim HIGH motivima kao i potencijalno postojanje novih svojstava poput rezistencije na antibiotik i slično.⁷

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Biosinteza proteina

Genetička informacija koja određuje molekularno ustrojstvo organizma zapisana je u jedinstvenom slijedu nukleotida, osnovnih građevnih elemenata molekule DNA. Kroz dva glavna procesa, transkripciju i translaciju, genetička informacija se prevodi u slijed aminokiselina povezan peptidnom vezom – proteine. DNA se tijekom diobe stanice prvo mora replicirati, odnosno udvostručiti kako bi obje stanice kćeri dobile po jednu kopiju genetskog materijala. Replikacija u konačnici podrazumijeva razdvajanje lanaca DNA koji će svaki poslužiti kao kalup za sintezu novih, njima komplementarnih lanaca.³

Genetska informacija se tijekom pripreme za biosintezu proteina prepisuje u novu molekulu, mRNA, u procesu transkripcije. RNA-polimeraza je enzim koji će na temelju slijeda nukleotida DNA, sintetizirati mRNA komplementarnu lancu kalupu DNA. Transkripcija je proces koji se odvija u tri koraka: inicijacija, elongacija i terminacija. Proces prepisivanja DNA započinje na promotoru, određenom slijedu DNA koji prepoznaje RNA-polimeraza, a nalazi se prije regije koja sadrži gen za neki protein, tzv. kodirajući slijed. Kada prepozna promotor, RNA-polimeraza uzrokuje parcijalno razdvajanje dvolančane strukture DNA na mjestu koje se prepisuje. RNA-polimeraza sintetizira jednolančanu mRNA u smjeru 5' → 3' komplementarnu lancu kalupu DNA sve dok ne dođe do terminacijskog slijeda. Kada se taj slijed prepozna, transkripcija prestaje i mRNA se otpušta. Prokariotska mRNA je spremna za translaciju koja se najčešće događa usporedno s transkripcijom, dok se kod eukariota mRNA posttranskripcijski doraduje prije ulaska u proces translacije.³

Izgradnja polipeptidnog lanca na temelju genetičke informacije iščitane iz glasničke RNA je translacija. Prepisani gen koji će se dekodirati zapisan je u obliku tripleta nukleotida – kodona. Četiri nukleotida se na 64 različita načina mogu složiti u triplete. Postoji 20 proteinogenih aminokiselina pa neke od njih imaju više od jednog kodona koji ih definira, a tri tzv. STOP kodona označavaju kraj translacije. Genetski kod je stoga degeneriran kao što je prikazano u tablici 2.1. Ribosom ne prepoznaje izravno kodon nego se kodon na mRNA i tzv. antikodon na tRNA međusobno sparuju i tako prepoznaju. Molekula tRNA posjeduje antikodon, odnosno triplet nukleotida koji je komplementaran nekom od kodona koji

predstavlja jednu aminokiselinu. Svaka aminokiselina na ribosom dolazi kovalentno vezana na 3' kraju njoj pripadne tRNA. Unatoč degeneraciji genetskog koda, stanica ne posjeduje 61 molekulu tRNA^{aa} zbog tzv. hipoteze kolebljive baze po kojoj je dostupno odstupanje od Watson-Crickovih parova prilikom sparivanja prve baze antikodona s trećom bazom kodona.^{3,9}

Tablica 2.1. Standardni genetički kod.

Prva baza	Druga baza				Treća baza
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	STOP	STOP	A
	Leu	Ser	STOP	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

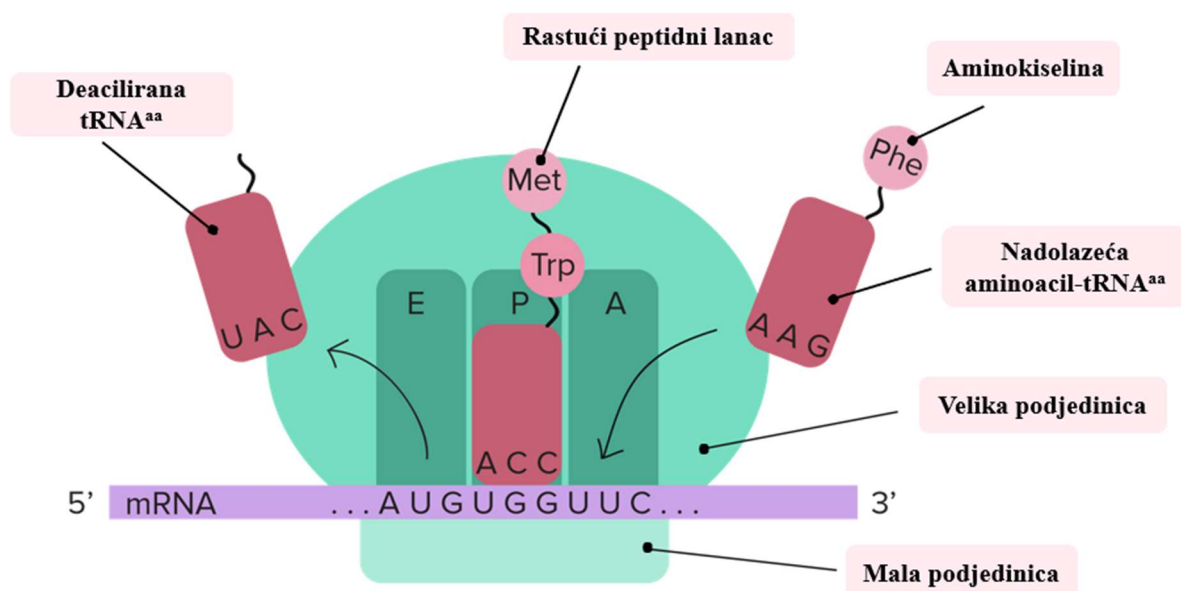
Ribosom je makromolekulski kompleks koji se sastoji od proteina i posebne molekule ribosomske RNA, rRNA, koja predstavlja katalitičku srž ribosoma. Veličina ribosoma i rRNA se izražavaju sedimentacijskim koeficijentom, jedinicom Svedberg (S) prema čemu se i imenuju.¹⁰ Bakterijski ribosomi se sastoje od tri molekule rRNA od kojih 23S i 5S uz 30-ak

proteina čine veliku podjedinicu (50S), a 16S rRNA i 20-ak ribosomskih proteina izgrađuje malu podjedinicu (30S). Sedimentacijski koeficijent cjelovitog bakterijskog ribosoma je 70S.¹¹ Mala podjedinica ribosoma je mjesto dešifriranja kodona. Dešifriranje kodona znači komplementarno sparivanje tripleta mRNA i antikodona tRNA^{aa}. Polipeptidni lanac se izgrađuje na velikoj podjedinici.³

Translacija se događa na tri mjesta u ribosomu: A, P i E (engl. *aminoacyl, peptidyl i exit*) (slika 2.1). Inicijacija translacije u prokariota počinje vezanjem inicijacijskih faktora IF-1 i IF-3 u A odnosno E mjesto na maloj ribosomskoj podjedinici i smještanjem mRNA na ribosom tako da START kodon, koji je kod prokariota ujedno i kodon za metionin, bude pozicioniran u P mjesto. Pravilno pozicioniranje START kodona je osigurano komplementarnim povezivanjem konsenzusnog purinom-bogatog Shine-Dalgarnovog slijeda na 5' kraju mRNA i 3' regije 16S rRNA koja se sastoji od pirimidina.^{3,12} Transportna RNA koja posjeduje antikodon komplementaran START kodonu, nosi aminokiselinu *N*-formilmetionin, fMet. Nakon vezanja inicijacijskog faktora IF-2, u P mjesto će se smjestiti fMet-tRNA^{fMet} što dovodi do disocijacije svih inicijacijskih faktora i asocijacije velike podjedinice ribosoma. Prva aminokiselina polipeptidnog lanca sintetiziranog u prokariotskim organizmima će uvijek biti fMet.¹³

Elongacijska faza translacije započinje dekodiranjem, odnosno dostavljanjem aminoacil-tRNA^{aa} u kompleksu s elongacijskim faktorom Tu (EF-Tu) u A mjesto na ribosomu.³ Elongacijski faktori pomažu prilikom vezanja aminoacil-tRNA^{aa} na ribosom te disociraju kada se komplementarno prepoznaju kodon i antikodon. Peptidil-transferazna aktivnost 23S rRNA katalizira nastanak peptidne veze između aminokiseline koje se nalaze u P i A mjestu. α -amino skupina aminokiseline u mjestu A nukleofilno napada karbonilni ugljikov atom aminokiseline u mjestu P i nastaje peptid vezan na tRNA^{aa} koja se nalazi u A mjestu.¹⁴ Nakon formiranja peptidne veze, elongacijski faktor G (EF-G) pomaže u translokaciji deacilirane-tRNA u mjesto E, gdje se ona može otpustiti, i peptidil-tRNA u mjesto P. Istovremeno se pomiče i mRNA tako da se sljedeći kodon pozicionira u prazno mjesto A tako da se dekodiranje vrši u smjeru 5' \rightarrow 3'. Rast polipeptidnog lanca se odvija od N- prema C-kraju ponavljanjem koraka dekodiranja i translokacije sve dok se u mjestu A ne prepozna jedan od tri STOP kodona.^{15,16} STOP kodone u A mjestu prepoznaju faktori otpuštanja (engl. *release factor*, RF) RF-1, RF-2 i RF-3. Oni ostvaruju interakciju s peptidil-transferazom i potiču hidrolizu esterske veze posljednje aminokiseline i tRNA što u konačnici rezultira otpuštanjem sintetiziranog polipeptida i deacilirane tRNA u citosol kao i disocijaciju ribosomskog kompleksa. Nascentni polipeptid se

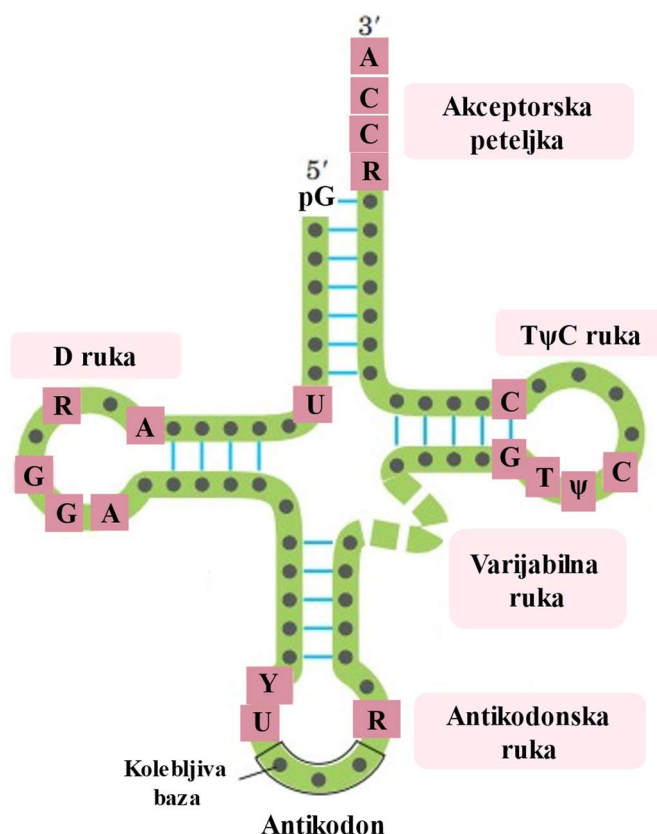
nakon sinteze dodatno procesira (posttranslacijske modifikacije) i smata u pravilnu konformaciju samostalno ili uz pomoć šaperona, proteina čija je funkcija pomoći pri smatanju drugih proteina.³



Slika 2.1. Shematski prikaz translacije (preuzeto i prilagođeno iz ref.¹⁷).

2.2. Struktura molekule tRNA

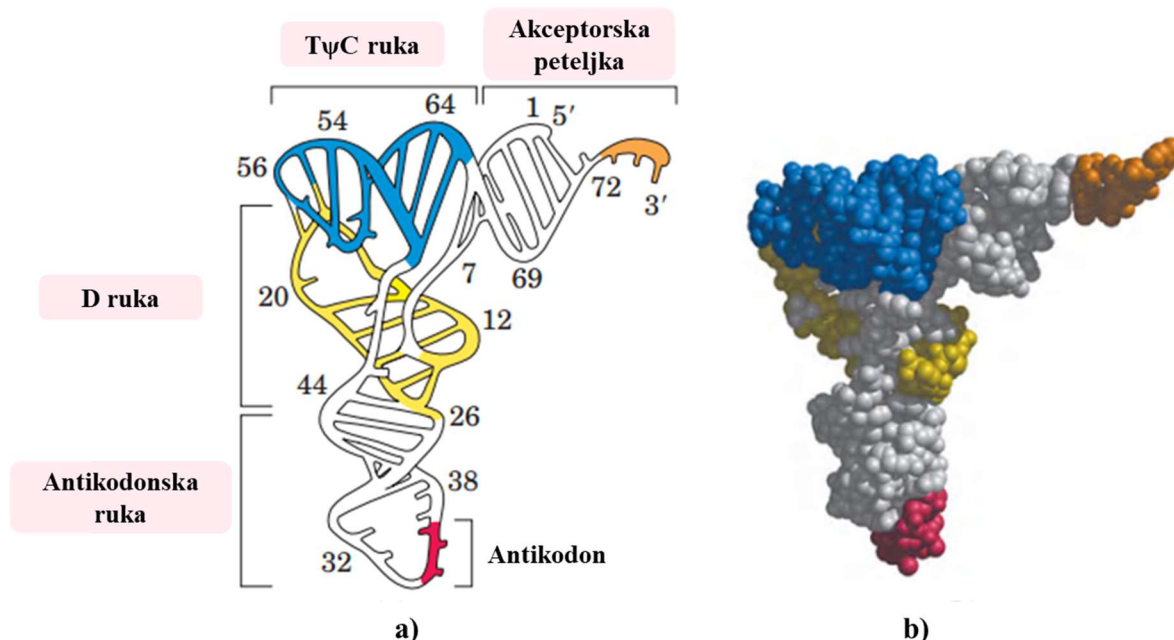
Transportne molekule RNA nazvane su adapterskim molekulama jer se njihovim posredovanjem iz slijeda nukleotida na mRNA može izgraditi odgovarajuća aminokiselinska sekvenca.¹⁸ One prenose aminokiseline iz citosola do ribosoma gdje se na temelju prepisanog genetskog koda dopremljene aminokiseline povezuju u polipeptidne lance. Nastajanje tRNA zahtijeva transkripciju dijela DNA koja sadrži gen za tu molekulu. Bakterijske tRNA su uglavnom izgrađene od 73 do 93 nukleotida od kojih neki posjeduju modificirane baze i izmjene koje se dodaju posttranskripcijski. Većina tRNA na 5' kraju posjeduje fosforilirani gvanin (pG) dok tRNA-nukleotidil-transferaza (CCA-enzim) svim tRNA na 3' kraju dodaje CCA slijed. Osam ili više nukleotida posjeduju preinačene baze (npr. metiliranje) ili šećere. Dvodimenzionalna struktura svih tRNA oblika je djeteline te sadrži tri glavne i jednu varijabilnu „ruku“ koje su prikazane na slici 2.2.³



Slika 2.2. Dvodimenzionalna struktura tRNA u obliku djeteline. Tamnoružičastim kvadratima označeni su nukleotidi karakteristični za sve tRNA, a plave linije predstavljaju vodikove veze između Watson-Crickovih parova baza. Slovom R označene su purinske baze, a slovom Y pirimidinske (preuzeto i prilagođeno iz ref. ³).

Ruka najbliže 5' kraju tRNA je izgrađena od četiri do šest parova baza i nazvana je D ruka jer na nekoliko pozicija sadrži dihidrouridin (D). Petlju antiodonske ruke čini sedam nukleotida od kojih tri nukleotida sačinjavaju antikodon. Antikodon je slijed nukleotida na tRNA koji će se komplementarno povezati s kodonom mRNA tijekom translacije. TψC ruka sadrži modifikacije u obliku ribotimidina (T) koji obično ne izgrađuje RNA molekule i pseudouridina (ψ) čija je dušična baza povezana sa šećerom neobičnom C5-C1' glikozidnom vezom. D i TψC ruka sudjeluju u procesu smatanja tRNA, a TψC ruka dodatno stupa u interakciju s velikom podjedinicom ribosoma. Mjesto vezanja aminokiseline nalazi se na akceptorskoj peteljci koja obuhvaća sedam komplementarno sparenih nukleotida 5' i 3' kraja i CCA kraj. Riboza terminalnog adenzina (A76) CCA kraja akceptorske peteljke će biti mjesto vezanja aminokiseline. Neke tRNA posjeduju i varijabilnu ruku dugu do 20 nukleotida smještenu između antiodonske i TψC ruke koja stupa u interakciju s aaRS i dodatno stabilizira

strukturu nastalog kompleksa. Sve molekule tRNA zauzimaju specifičnu trodimenzionalnu strukturu u obliku slova L prikazanu na slici 2.3. Cijela struktura stabilizirana je vodikovim vezama i interakcijama slaganja nukleotidnih baza.³



Slika 2.3. Trodimenzionalna struktura tRNA. Različitim bojama prikazani su dijelovi glavne četiri ruke a) shematski b) prostornom ispunom (preuzeto i prilagođeno iz ref. ³).

2.3. Aminoacil-tRNA-sintetaze

2.3.1. Podjela aminoacil-tRNA-sintetaza

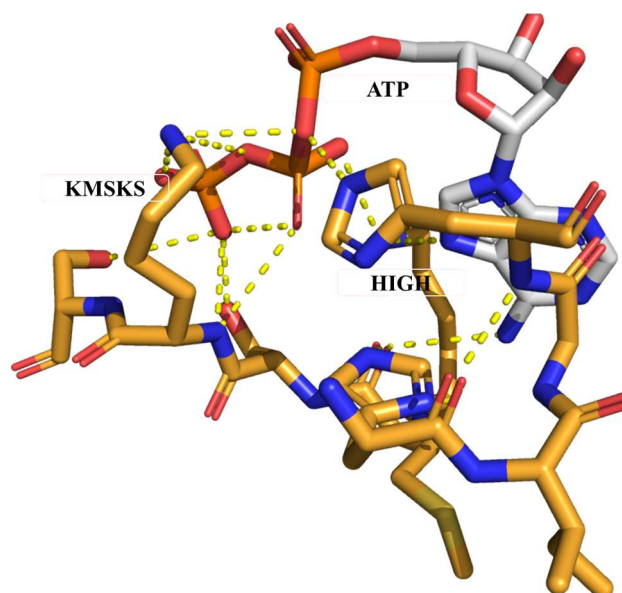
Pridruživanje aminokiseline odgovarajućoj tRNA^{aa} u konačnici osigurava pravilno dešifriranje genetskog koda u procesu translacije. Svaku proteinogenu aminokiselinu će jedna aminoacil-tRNA-sintetaza kovalentno povezati na pripadajuću tRNA^{aa}. Dvadeset aminoacil-tRNA-sintetaza se prema mehanističkim i strukturnim karakteristikama svrstavaju u razred I i razred II, a opisane su i dodatne podjele unutar svakog razreda. Lizil-tRNA-sintetaza (LysRS) predstavlja iznimku u podjeli ovih enzima prikazanoj u tablici 2.2 jer su pronađene varijante LysRS koje pripadaju obama razredima.

Tablica 2.2. Podjela proteinogenih aminoacil-tRNA-sintetaza u razrede i podrazrede s naznačenim kvaternim strukturama koje posjeduju (preuzeto i prilagođeno iz ref. ¹⁹).

Razred I			Razred II		
Podrazred	aaRS	Kvaterni struktura	Podrazred	aaRS	Kvaterni struktura
IA	IleRS	α	IIA	GlyRS	α_2
	LeuRS	α		HisRS	α_2
	MetRS	α, α_2		ProRS	α_2
	ValRS	α		SerRS	α_2
IB	CysRS	α, α_2		ThrRS	α_2
	GlnRS	α	IIB	AsnRS	α_2
	GluRS	α		AspRS	α_2
IC	TrpRS	α_2		LysRS	α_2
	TyrRS	α_2	IIC	AlaRS	α_2, α
ID	ArgRS	α		PheRS	$(\alpha\beta)_2$
IE	LysRS	α		TrpRS	α_2

Razlike u arhitekturi aktivnog mjesta jasno ukazuju na generalne razlike među razredima. Katalitičku domenu razreda I gradi karakteristična nukleotid-vezujuća domena, HUP, koja se sastoji od pet paralelnih β -lanaca povezanih α -zavojnica. Sve aaRS razreda I posjeduju umetnutu domenu CP-1 koja dijeli HUP na dva dijela. Kod monomernih aaRS, CP-1 veže 3' kraj tRNA^{aa} dok kod dimernih enzima (TyrRS i TrpRS) ova domena izgrađuje sučelje dimera.¹⁹⁻²¹ Visoko očuvani motivi HIGH i KMSKS dio su domene HUP i iznimno su važni u vezanju ATP-a kao što je prikazano na slici 2.4 te stabiliziranju prijelaznog stanja prilikom aktivacije aminokiseline.¹⁹ Motiv KMSKS se nalazi u drugom dijelu katalitičke domene i izgrađen je od konsenzuznog slijeda pet aminokiselina: Lys-Met-Ser-Lys-Ser. Najviše očuvane aminokiseline u ovom motivu jesu lizini, a posebice drugi lizin preko kojeg se ostvaruje direktna interakcija s fosfatnim skupinama ATP-a prilikom reakcije aktivacije aminokiseline.^{5,6,19} Motiv HIGH smješten je bliže u prvom dijelu katalitičke domene, a grade ga četiri aminokiseline His-X-Gly-His (X je bilo koja hidrofobna aminokiselina, uglavnom se radi o Ile pa je uvriježeno pisati HIGH) od kojih je samo glicin strogo očuvan. Fleksibilnost

glicina omogućava takvo pozicioniranje proteinske okosnice koje ostvaruje povoljne interakcije slaganja baza s adeninskim prstenom ATP-a. Bočni ogranci histidina preko vodikovih veza ostvaruju povoljne interakcije s fosfatnim skupinama ATP-a (slika 2.4). Navedeni motivi se tijekom smatanja proteina približavaju jedan drugome te ostvaruju brojne interakcije u apo formi enzima te ostaju u interakciji tijekom enzimske reakcije što može biti razlog istovremenog očuvanja oba motiva kroz evoluciju aminoacil-tRNA-sintetaza razreda I. Molekula tRNA vezana je preko velikog dijela površine monomernih enzima razreda I. Domena HUP veže akceptorsku peteljku sa strane malog utora, a 3' kraj tRNA formira strukturu ukosnice kako bi se mogao vezati u aktivno mjesto. Kod dimernih aaRS, tRNA je vezana preko obje podjedinice dok je akceptorska peteljka vezana sa strane velikog utora. Antikodonska ruka ostvaruje interakcije s C-terminalnom domenom aaRS razreda I. Zbog hipoteze kolebljive baze, aaRS često prepoznaje samo drugu i/ili treću baza antikodona. Uređenost u strukturi antikodonske ruke kompleksa tRNA i aaRS varira kroz razred I pa se interakcije s aaRS razlikuju. Ponekad se odgovarajuća tRNA ne može prepoznati samo na temelju antikodona. U tom slučaju su za točno sparivanje aminokiseline i pripadajuće tRNA potrebne specifične interakcije aaRS s bazama koje se ne nalaze nužno na antikodonskoj ruci o čemu će riječi biti u sljedećim poglavljima.^{5,19,23}

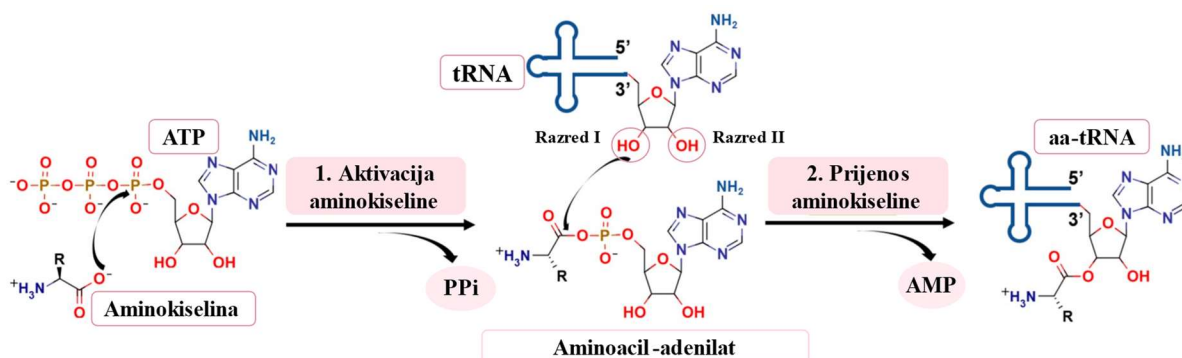


Slika 2.4. Moguće interakcije bočnih ogranaka aminokiselina iz motiva KMSKS i HIGH (narančasto) s ATP-om (sivo) u metionil-tRNA-sintetazi tipa I iz bakterije *Staphylococcus aureus* (PDB: 7WPL).

Za razliku od razreda I (s iznimkom TyrRS i TrpRS), sve aminoacil-tRNA-sintetaze razreda II posjeduju kvaternu strukturu dimera. Katalitička domena aaRS razreda II građena je od sedam antiparalelnih β -lanaca okruženih α -zavojnica. Opisana su tri očuvana motiva u strukturi enzima razreda II. Motiv 1 se najčešće nalazi na sučelju dimera, a izgrađen je od dugačke α -zavojnice iza koje se nastavlja kratki slijed koji na kraju ima visoko očuvani prolin. Motivi 2 i 3 se nalaze u aktivnom mjestu u formi antiparalelnih β -lanaca povezanih omčom. Motiv 2 ima ključnu ulogu u usklađivanju vezanja ATP-a, aminokiseline i 3' kraja tRNA. Motiv 3 sudjeluje u vezanju ATP-a te je zbog toga svojevrsan analog motivima HIGH i KMSKS iz struktura aaRS razreda I. Akceptorska peteljka tRNA je generalno vezana u aktivna mjesta enzima sa strane velikog utora. Načini interakcije i vezanja cijele tRNA su različiti u svakom podrazredu.^{5,19}

2.3.2. Mehanizam aminoaciliranja

Reakcija aminoaciliranja može se podijeliti u dva glavna koraka: aktivaciju aminokiseline pomoću ATP-a te prijenos aminokiseline na tRNA što je prikazano na slici 2.5. U prvom koraku α -karboksilni kisik aminokiseline nukleofilno napada α -fosfat ATP-a pri čemu nastaje aminoacil-adenilat (aa-AMP), a otpušta se pirofosfat (PPi). U drugom koraku 2'-OH ili 3'-OH skupina riboze terminalnog adenzina tRNA A76 nukleofilno napada karbonilni ugljikov atom aminoacil-adenilata te nastaje aminoacil-tRNA (aa-tRNA) uz otpuštanje AMP-a. ArgRS, GluRS, GlnRS i LysRS razreda I ne mogu aktivirati aminokiselinu ukoliko u reakcijskoj smjesi nije prisutna i pripadna tRNA. Sve aminokiseline koje su kovalentno vezane na 2'-OH skupinu A76 se u stanici spontanom reakcijom transesterifikacije prebacuju na 3'-OH skupinu jer se tijekom translacije na ribosomu kao supstrat prepoznaje samo 3'-OH aminoacilirana tRNA. Nastajanje esterske veze između aminokiseline i tRNA je energetski povoljan proces jer se tijekom cijelog procesa cijepaju dvije visokoenergetske P-O veze koje potječu iz ATP-a: jedna prilikom nastanka aa-AMP, i druga, sprežanjem s reakcijom anorganske pirofosfataze gdje iz pirofosfata nastaju ortofosfati.^{3,19}



Slika 2.5. Mehanizam reakcije aminoaciliranja u dva koraka (preuzeto i prilagođeno iz ref. ²⁴).

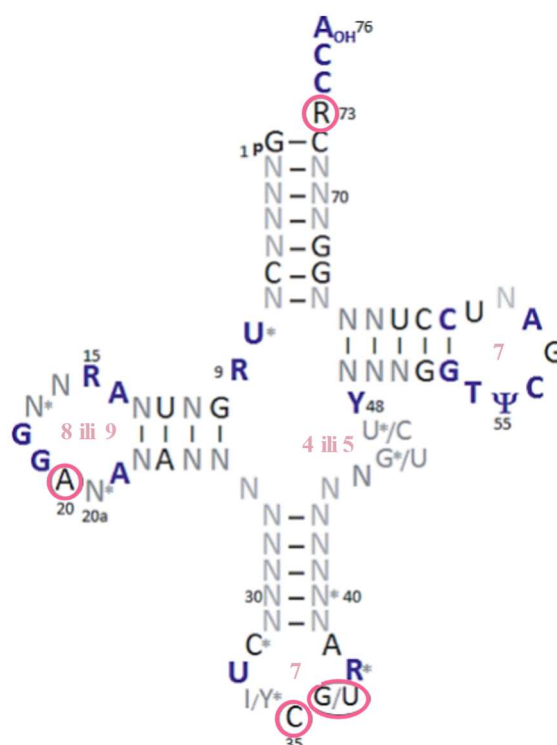
Uz navedene strukturne razlike između aminoacil-tRNA-sintetaza, opisane su i mehanističke specifičnosti za svaki razred. Sve aaRS razreda I aminoaciliraju 2'-OH skupinu riboze terminalnog adenozina tRNA (A76), dok enzimi razreda II, osim PheRS, aminoaciliraju 3'-OH skupinu. Orijentacija u kojoj se akceptorska peteljka tRNA veže u katalitičko mjesto uglavnom određuje poziciju koju enzim aminoacilira (iznimka TyrRS, TrpRS i PheRS). Korak koji određuje brzinu ukupne reakcije aminoaciliranja za aaRS razreda I je u većini slučajeva otpuštanje aminoacil-tRNA u otopinu (osim GluRS), dok je aktivacija aminokiseline najsporiji korak u reakciji koju kataliziraju enzimi razreda II.^{5,19,25}

2.4. Arginil-tRNA-sintetaza

2.4.1. Struktura ArgRS i tRNA^{Arg}

Arginil-tRNA-sintetaza pripada razredu I aminoacil-tRNA-sintetaza. Kao što joj ime nalaže, ArgRS katalizira reakciju u kojoj se aminokiselina arginin povezuje s tRNA^{Arg} tako da se arginin aktivira pomoću ATP-a, a zatim prenosi na tRNA^{Arg}. Iako tRNA^{Arg} nije supstrat prve reakcije koja se događa u aktivnom mjestu enzima, ArgRS ne može aktivirati arginin ukoliko tRNA^{Arg} nije vezana. Ovakav princip rada enzima zabilježen je još samo kod GluRS, GlnRS i LysRS razreda I. Budući da za arginin kodira čak šest kodona, ArgRS moraju moći prepoznati i aminoacilirati tzv. izoakceptore odnosno tRNA^{Arg} koje posjeduju različite antikodone za istu aminokiselinu. Kako je zbog ovog razloga prepoznavanje tRNA^{Arg} na temelju antikodona otežano, ArgRS dodatno koristi nekoliko visoko očuvanih pozicija na ostalim dijelovima tRNA^{Arg} kao elemente identiteta. Opći elementi identiteta za tRNA^{Arg} jesu specifični nukleotid

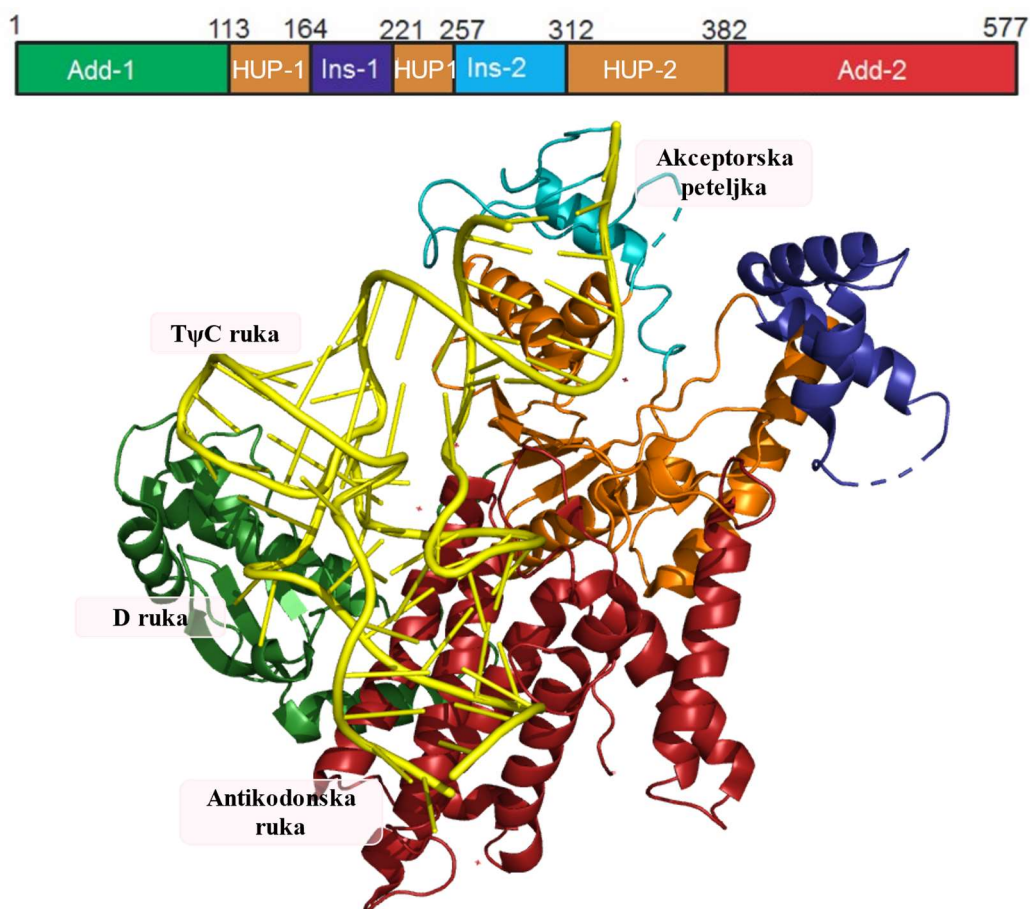
A20 koji je dio D ruke, C35 i U/C36 antikodona te diskriminatorna purinska baza R73. A20 glavni je element identiteta tRNA^{Arg} iz modelnog organizma *E. coli* (EctRNA^{Arg}) i bakterije *Thermus thermophilus* dok primjerice kod kvasca *Saccharomyces cerevisiae* su to nukleotidi 35 i 36 antikodona. Na poziciji 20a se često nalazi U koji ostvaruje specifične vodikove veze s ArgRS te tako sudjeluje u ulozi D ruke kao ključne regije vezanja i prepoznavanja tRNA^{Arg}. Na slici 2.6 se može uočiti da tRNA^{Arg} uz antikodonsku, T Ψ C i D ruku te akceptorsku peteljku posjeduje i varijabilnu ruku dugu četiri do pet nukleotida.^{25,26}



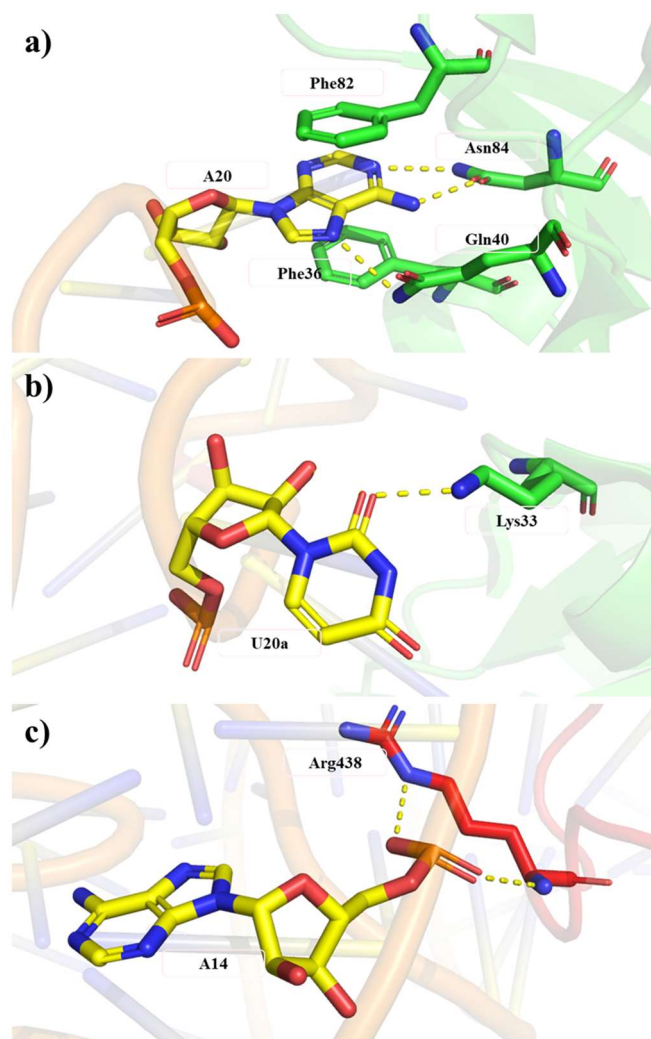
Slika 2.6. Konzensusna primarna sekvenca i sekundarna struktura izoakceptorskih tRNA^{Arg} iz bakterije *E. coli*. Plavom bojom označeno je 19 očuvanih nukleotida citosolnih tRNA dok je crnom bojom obojano 16 arginin-specifičnih nukleotida. Zaokruženi su nukleotidi koji predstavljaju elemente i identiteta EctRNA^{Arg}. Naznačen je broj nukleotida koji gradi D ruku (8 ili 9), antikodonsku (7), varijabilnu (4 ili 5) i T Ψ C ruku (7) (preuzeto i prilagođeno iz ref. ²⁶).

Sve ArgRS posjeduju tri glavne domene: Add-1, Add-2 i katalitičku domenu te dodatne dvije insercijske domene Ins-1 i Ins-2 prikazane na slici 2.7. Funkcija Add-1 domene ArgRS je prepoznavanje elemenata identiteta koji se nalaze na D ruci tRNA^{Arg}. Add-1 domena je

svojstvena samo ArgRS i nalazi se na N-kraju enzima. Izgrađena je od stotinjak aminokiselina koje većinom posjeduju sekundarnu strukturu α -zavojnice. U *E. coli* (PDB: 5YYN) A20 tRNA^{Arg} ostvaruje nekoliko važnih interakcija s aminokiselinama Add-1 domene od kojih je ključna mreža vodikovih veza s Gln40 i Asn84 te interakcije slaganja baza s fenolnim prstenom Phe36 i Phe82. U20a tvori vodikovu vezu s Lys33 i Gly35 dok G19 preko vodikove veze stupa u interakciju s Asn42. Slična Add-1 domeni je oko dvjesto aminokiselina duga Add-2 domena smještena na C-kraju enzima. Također je izgrađena od α -zavojnica te ostvaruje interakcije s antikodonskom petljom tRNA^{Arg}. Očuvani nukleotidi A14 i G19 iz D ruke su povezani vodikovim vezama s aminokiselinama Arg438 odnosno Asn437 Add-2 domene, a Asn437 je dodatno povezan s U55 iz T ψ C ruke. Iako je Add-2 domena antikodon-vezujuća, novija istraživanja pokazuju da kod ArgRS iz *E. coli* (EcArgRS), antikodon ne ostvaruje interakcije s Add-2 domenom.²⁶ To potvrđuje hipotezu da je zbog velike varijacije u strukturi antikodona, D-ruka postala primarni dio tRNA^{Arg} koji utvrđuje njezin identitet, a posebice A20 koji je prisutan kod svih tRNA^{Arg}. Katalitičku domenu gradi domena HUP koja se sastoji od dva dijela, HUP-1 i HUP-2. Ins-1 domena je umetnuta u HUP-1 i građena je od tri α -zavojnice dok se Ins-2 nalazi između HUP-1 i HUP-2 te se sastoji od antiparalelnih β -ploča. Ins-2 zapravo predstavlja domenu CP-1 koja je prisutna u ostalim aaRS razreda I, a zajedno s HUP-2 veže 3' kraj tRNA^{Arg} i akceptorsku peteljku sa strane malog utora. Formiranje strukture ukosnice CCA-kraja je nužno za reakciju, a stabilizacija strukture potječe od interakcija s ArgRS te vodikove veze 4-amino skupine C75 i fosfatnog kisika nukleotida 72. Neke od najvažnijih interakcija prikazane su na slici 2.8.²⁶⁻²⁸

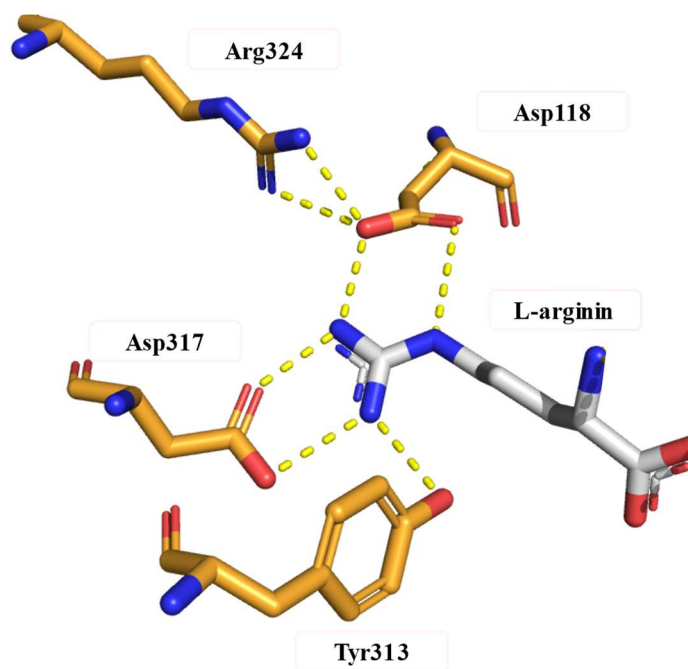


Slika 2.7. Struktura EcArgRS u kompleksu s tRNA^{Arg} iz *Bacillus stearotherophilus* (BstRNA^{Arg}) (PDB: 5YYN). Na legendi gore je bojama naznačeno pet domena EcArgRS uz duljinu primarne sekvence koju svaka obuhvaća. BstRNA^{Arg} prikazana je žutom bojom te anotirana u ružičastim pravokutnicima (preuzeto i prilagođeno iz ref. ²⁶).



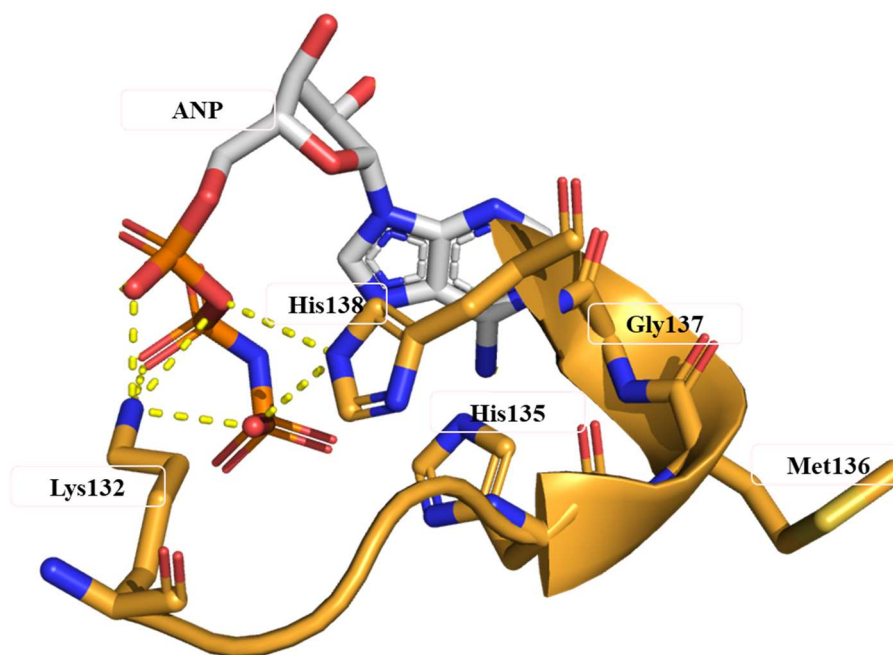
Slika 2.8. a) Najvažnije interakcije aminokiselina Add-1 domene EcArgRS (zeleno) i baze A20 BstRNA^{Arg} (žuto) i b) U20a. c) Interakcija aminokiseline iz Add-2 domene EcArgRS (crveno) s bazom A14 BstRNA^{Arg} (žuto) (PDB:5YYN).

Aminokiselina arginin je drugi supstrat ArgRS. Ona se veže u aktivno mjesto koje se nalazi u domeni HUP. Arginin se veže isključivo u jednoj relativnoj konfiguraciji, kao L-arginin. U *E. coli* (PDB ID: 4OBY), čvrsto vezanje L-arginina potpomognuto je interakcijama elektrostatske prirode bočnog ogranka s Asp317 i Asp118 koji tvori ionski most s Arg324 te tako osigurava da njegov bočni ogranak bude u povoljnoj rotamerskoj konformaciji. Tyr313 zaključava L-arginin u aktivnom mjestu tvoreći vodikovu vezu s gvanidinskom skupinom L-arginina kao što je prikazano na slici 2.9.²⁸



Slika 2.9. Aminokiseline domene HUP (narančasto) koje sudjeluju čvrstom vezanju L-arginina (sivo) u EcArgRS (PDB: 4OBY) su Asp118, Tyr317, Asp317 i Arg324.

Treći supstrat za reakciju aminoaciliranja je ATP. Vezno mjesto za ATP se nalazi u katalitičkoj domeni, a ističu se dva očuvana peptida KMSKS i HIGH koja ostvaruju važne interakcije prilikom vezanja ATP-a. Iako se HIGH nalazi u HUP-1, a KMSKS u HUP-2, fleksibilnost petlje KMSKS omogućava da se u trodimenzionalnoj strukturi enzima oni nađu dovoljno blizu kako bi vezali isti supstrat. Ovi motivi su očuvani u aaRS razreda I, no značajan broj vrsta ne posjeduje motiv KMSKS u ArgRS dok u motivu HIGH pokazuju veliku varijabilnost. Dokazano je da u ostalim aaRS razreda I, drugi lizin u motivu KMSKS na različite načine stabilizira negativno nabijeno prijelazno stanje u aktivaciji aminokiseline pa je zato strogo očuvan.²⁹ Druga strogo očuvana aminokiselina je glicin u motivu HIGH, a uz spomenuti lizin, histidini iz HIGH motiva također sudjeluju u stabilizaciji prijelaznog stanja pri nastanku arginil-adenilata. Drugi histidin iz HIGH motiva, H2, također može interagirati s α -fosfatom ATP-a. Važni kontakti aminokiseline iz petlje HIGH s nehidrolizabilnim analogom ATP-a, adenozin-5'-(β,γ -imido)trifosfatom (ANP), u aktivnom mjestu ArgRS iz bakterije *Pyrococcus horikoshii* (HMGH) koja ne posjeduje konsenzusni motiv KMSKS su prikazani na slici 2.10 (PDB: 2ZUE).³⁰ Fleksibilnost očuvanog glicina i svojstvo bočnog ogranka histidina da bude donor i akceptor vodikove veze su specifični i zamjena ovih aminokiselina drugima bi vjerojatno utjecala na funkciju motiva HIGH.³¹

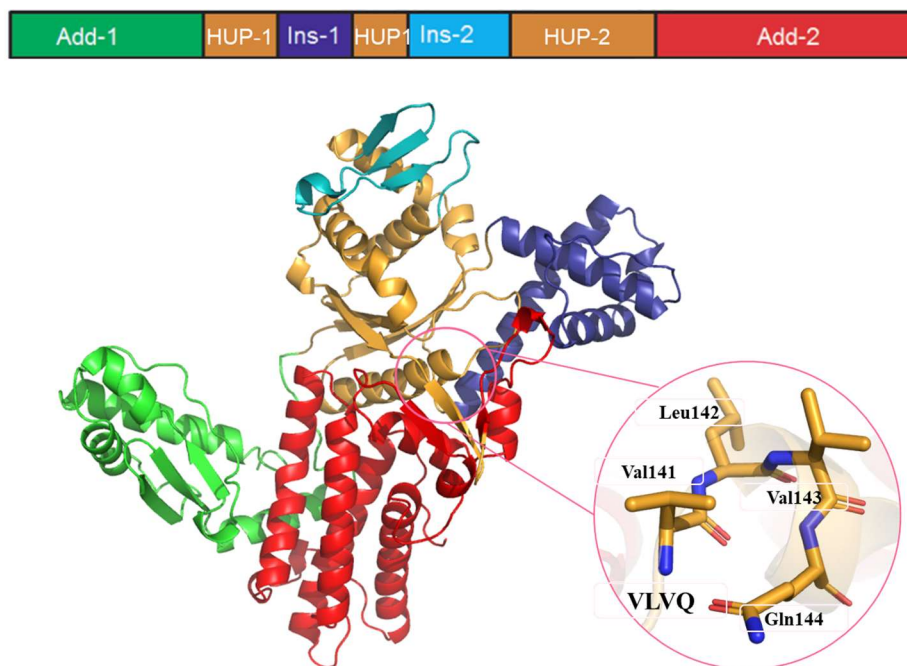


Slika 2.10. Interakcije aminokiselina petlje HIGH (narančasto) s analogom ATP-a ANP-om (sivo) u aktivnom mjestu ArgRS iz bakterije *P. horikoshii* (PhArgRS, PDB: 2ZUE). PhArgRS ne posjeduje motiv KMSKS pa Lys132 (uzvodno od motiva HMGH) preuzima ulogu KMSKS.³⁰ His138 stupa u interakciju s kisicima fosfatnog repa ANP-a.

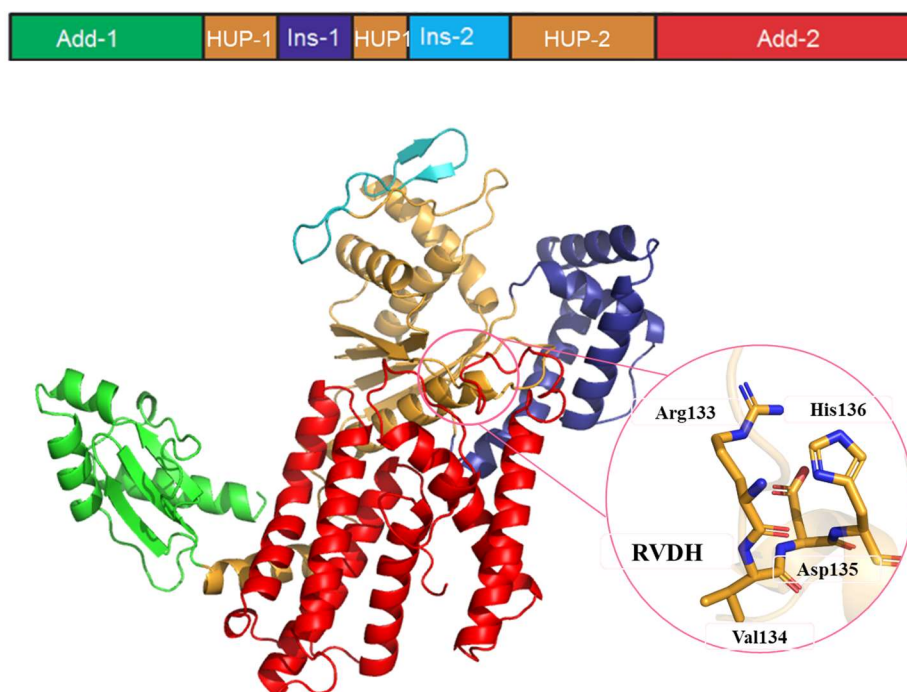
2.4.2. Atipične varijante ArgRS

Iako je motiv KMSKS konsenzusno prisutan kod svih aaRS razreda I, ArgRS mnogih organizama iz različitih domena života ga ne posjeduju. Ulogu K2 u tom slučaju preuzima očuvani lizin koji se nalazi uzvodno od motiva HIGH. ArgRS se dijele u dvije skupine ovisno o tome posjeduju li očuvani lizin koji je dio petlje HIGH ili ne. To su jednostavnije rečeno ArgRS koje nemaju motiv KMSKS, a takvi su primjeri iz modelnih organizama *E. coli*, *S. cerevisiae* i *T. thermophilus*. Usporedbom divljeg tipa i K116G mutanta ArgRS iz bakterije *T. thermophilus* pokazano je da ArgRS koje ne posjeduju KMSKS nisu aktivne osim ako posjeduju lizin iz petlje HIGH. To ide u prilog hipotezi o međusobnoj kompenzaciji pri aktivaciji aminokiseline.⁶ Ukoliko je motiv KMSKS prisutan, lizin ispred motiva HIGH zamijenjen je glicinom što je uočeno kod bakterije *Bacillus stearothermophilus*. Mutacija glicina u lizin ugasila je aktivnost ArgRS iz *B. stearothermophilus* što pokazuje da ATP-vezujuće mjesto ne može imati i K2 i lizin iz petlje HIGH.³²

ArgRS pokazuju veliku varijaciju i u sastavu motiva HIGH. Atipičnim ArgRS su nazvane one strukture koje na mjestu histidina i glicina posjeduju aminokiseline drukčijih kemijskih svojstava. Izdvojena je ArgRS iz *S. thermophilum* koja posjeduje motiv VLVQ. Ionizabilni histidin na prvom mjestu je zamijenjen hidrofobnom aminokiselinom valin. Valin je veći od strogo očuvanog glicina pa se smanjuje broj dozvoljenih kutova oko peptidne veze. Drugi histidin je zamijenjen glutaminom koji ima drukčija kiselinsko-bazna svojstva bočnog ogranka što utječe na svojstva vodikovih veza koje tvori kao i nemogućnost stabilizacije negativno nabijene fosfatnu skupinu ATP-a. Struktura StArgRS dobivena alatom *AlphaFold* s naznačenim motivom VLVQ prikazana je na slici 2.12. Drugi primjer je bakterija *H. aurantiacus* koja uz varijaciju u motivu HIGH ima i duplikaciju gena za ArgRS. Naime, jedan gen kodira za HaArgRS1 koja posjeduje kanonski motiv HVGH dok ekspresija drugog gena rezultira enzimom HaArgRS2 čiji nekanonski motiv ima slijed RVDH. Struktura HaArgRS2 dobivena alatom *AlphaFold* s naznačenim motivom RVDH prikazana je na slici 2.13. Osim zamjene histidina mnogo bazičnijim argininom i glicina velikim i vrlo kiselim aspartatom, zanimljivost se krije i u duplikaciji gena koja je već istražena u razredu I, na IleRS. Znatan broj organizama posjeduje IleRS1 s kanonskim motivom HXGH, ali i IleRS2 koji na prvom mjestu ima glicin ili alanin, na drugom hidrofobnu aminokiselinu te histidin na trećem i četvrtom mjestu, G/AXHH.⁷ IleRS2 s atipičnim motivom G/AXHH su pokazale hiperrezistenciju na antibiotik mupirocin.⁷ Duplikacija gena je jedan od mehanizama kojim se stvara novi genetički materijal tijekom evolucije. Ako se gen koji nosi nove značajke pokaže korisnim, on će se zadržati dok se drugi često neće eksprimirati. Alternativno, u posebnim uvjetima stresa, stanica će prestati s ekspresijom regularnog gena i početi sintetizirati proteine na temelju gena s novim svojstvom. Tako štedi resurse dok se ne nađe u specifičnoj situaciji koja zahtijeva korištenje novog svojstva.³³ S obzirom da je pokazano kako prisutnost atipičnog motiva G/AXHH u *B. megaterium* prati svojstvo hiperrezistencije na antibiotik, vrijedi istražiti nosi li izmjena konsenzusnog motiva u dupliciranom genu za ArgRS u *H. aurantiacus* poboljšana svojstva koja su kroz evoluciju potencijalno donijela prednost u preživljavanju.⁷



Slika 2.12. Struktura StArgRS dobivena alatom *Alpha Fold*. Bojama su u legendi anotirane domene (gore) te je prikazan nekanonski motiv VLVQ.



Slika 2.13. Struktura HaArgRS2 dobivena alatom *Alpha Fold*. Bojama su u legendi anotirane domene (gore) te je prikazan nekanonski motiv RVDH.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Standardne kemikalije

Agar (*Liofilchem*), agarozna (*Sigma*), akrilamid/bisakrilamid (*Sigma*), amonijev klorid (*GramMol*), amonijev peroksodisulfat (APS) (*Serva*), ampicilin (*Sigma*), L-arabinoza (*Sigma*), 1,4-bis(2-(4-metil-5-fenil)oksazolil)benzen (POPOP) (*Beckmann*), borna kiselina (*Zorka Šabac*), 2,5-difeniloksazol (PPO) (*Serva*), ekstrakt kvasca (*Liofilchem*), etanol (*GramMol*), etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) (*Sigma*), fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF) (*Sigma*), fenol (*Acros Organics*), glicerol (*Kemika*), glicin (*USB Corporation*), D-glukoza (*Merck*), N-(2-hidroksietil)piperazin-N'-2-etansulfonska kiselina (Hepes) (*Fischer Bioreagents*), imidazol (*Sigma*), izopropanol (*Kemika*), izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid (IPTG) (*CarlRoth*), kalijev hidroksid (*Kemika*), kalijev klorid (*Kemika*), kanamicin (*Gibco BRL*), kloramfenikol (*Sigma*), kloroform (*Carlo Erba*), klorovodična kiselina (*Kemika*), Luria-Bertani agar (LB-agar) (*Liofilchem*), magnezijev acetat (*Sigma*), magnezijev klorid heksahidrat (*Kemika*), magnezijev sulfat (*Kemika*), β -merkaptetoetanol (*Sigma*), N,N'-metilenbisakrilamid (*Sigma*), 2-(N-morfolino)etansulfonska kiselina (MES) (*Sigma*), natrijev acetat (*GramMol*), natrijev azid (*Sigma*), natrijev dodecilsulfat (SDS) (*CarlRoth*), natrijev hidroksid (*Kemika*), natrijev klorid (*GramMol*), niklov (II) sulfat (*Sigma*), octena kiselina (*Kefo*), polietilenglikol 8000 (*Sigma*), tetraciklin (*Sigma*), N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED) (*Sigma*), toluen (*GramMol*), trikloroctena kiselina (TCA) (*Kemika*), tripton (*Liofilchem*), tris(hidroksimetil)-aminometan (Tris) (*Chemsolute*), urea (*GramMol*).

3.1.2. Aminokiseline i nukleotidi

L-Arginin (*Sigma*), ATP (*Sigma*).

3.1.3. Boje i elektroforetski markeri za molekulsku masu proteina

Bromfenol plavo (*Serva*), Coomassie Brilliant Blue R-250 (*Merck Millipore*), Precision Plus Protein Standards Prestained (*BioRad*), Precision Plus Protein Standards Unstained (*BioRad*).

ksilencijanolfuorofosfat (*Serva*), toluidinsko modriilo (*Sigma*).

3.1.4. Enzimi i drugi proteini

Albumin iz goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumin*, BSA) (*NEB*), DNaza I (*Sigma*), lizozim (*Merck*), termostabilna anorganska pirofosfataza (engl. *thermostable inorganic pyrophosphatase*, TIPP) (*NEB*).

3.1.5. Radioaktivne kemikalije

[¹⁴C]-arginin (*Perkin Elmer*)

3.1.6. Plazmidi

pET28b – niskokopijski plazmid iz serije vektora pET. Plazmid sadži gen za rezistenciju na antibiotik kanamicin te slijed za histidinski privjesak na N- ili C-kraju proteina što omogućuje pročišćavanje afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu. Plazmid je pod kontrolom inducibilnog T7 promotora. Promotor prepoznaje T7-RNA-polimerazu koja je uklonjena u bakterijski kromosom, a on je pod kontrolom inducibilnog promotora *lacUV5*. Ekspresija T7-RNA-polimeraze se potiče dodatkom analoga alolaktoze, IPTG-a. IPTG se veže na *lac*-repressor te uzrokuje njegovu disocijaciju s *lac*-operatora što omogućuje vezanje bakterijske RNA-polimeraze i početak transkripcije. Plazmid je korišten za prekomjernu ekspresiju svih ArgRS u obliku fuzijskog proteina s histidinskim privjeskom na N-kraju.

ΔpET3a – niskokopijski plazmid iz serije vektora pET, derivat plazmida pET3a. Plazmid je pod kontrolom inducibilnog T7 promotora i nosi gen za rezistenciju na antibiotik ampicilin. Plazmid je korišten za prekomjernu ekspresiju svih tRNA^{Arg}.

pG-KJE8 – koristi se za prekomjernu ekspresiju šaperona DnaK, DnaJ, GrpE, GroES i GroEL pod kontrolom inducibilnog promotora *araB* (*dnaK*, *dnaJ*, *grpE*) i *Pzt-1* (*groES*, *groEL*). Plazmid nosi gene za otpornost na kloramfenikol i tetraciklin. Ekspresija se inducira dodatkom L-arabinoze (*araB*) i tetraciklina (*Pzt-1*). U daljnjem tekstu će ovaj plazmid i skupina šaperona koja se eksprimira biti predstavljena brojem 1. Plazmid je korišten za koekspresiju navedenih šaperona uz StArgRS i HaArgRS2.

pG-Tf2 – koristi se za prekomjernu ekspresiju šaperona GroES, GroEL i Tig (engl. *trigger factor*) pod kontrolom inducibilnog promotora *Pzt-1* (*groES*, *groEL*, *tig*). Plazmid nosi gen za otpornost na kloramfenikol i tetraciklin. Ekspresija se inducira dodatkom tetraciklina. U daljnjem tekstu će plazmid i skupina šaperona koja se eksprimira biti predstavljena brojem 4. Plazmid je korišten za koekspresiju navedenih šaperona uz StArgRS i HaArgRS2.

3.1.7. Bakterijski sojevi *E. coli*

BL21(DE3) (genotip: $F^- ompT hsdS_B (r_B^- m_B^-) gal dcm$ (DE3); *Novagen*) soj koji se najčešće koristi u ekspresiji rekombinantnih proteina. Soj nema gene *ompT* i *lon* za proteaze Lon i OmpT zbog čega je proteazna aktivnost smanjena te je zbog toga pogodan za prekomjernu ekspresiju gena ukloniranih u vektore iz pET serije koji su pod kontrolom promotora T7. Gen za T7-RNA-polimerazu iz bakteriofaga DE3 ugrađen je u bakterijski kromosom, a on je pod kontrolom inducibilnog promotora *lacUV5*. Ekspresija proteina potiče se dodatkom IPTG-a. Soj je korišten za prekomjernu ekspresiju svih ArgRS i tRNA^{Arg}.

Tuner (genotip: $F^- ompT hsdS_B (r_B^- m_B^-) gal dcm lacY1$ (DE3); *Novagen*) soj je *lacZY* delecijски mutant soja BL21. Lac-permeaza (*lacY*) omogućuje unos IPTG-a u stanicu. Mutacija *lacY* regulira njenu aktivnost pa unos IPTG-a u stanicu postaje ovisan o koncentraciji IPTG-a. To omogućuje bolju regulaciju prekomjerne ekspresije rekombinantnih proteina. Sporija ekspresija može doprinijeti boljoj topljivosti i kvalitetnijem smatanju proteina. Soj je korišten za optimizaciju ekspresije StArgRS i HaArgRS2.

Rosetta (genotip: $F^- ompT hsdS_B (r_B^- m_B^-) gal dcm$ (DE3) pRARE (Cam^R); *Novagen*) soj je derivat soja BL21, dizajniran za poboljšanje ekspresije eukariotskih proteina koji zahtijevaju kodone koji se rijetko koriste u *E. coli*. Soj posjeduje plazmid koji nosi rezistenciju na kloramfenikol te sadrži gene za tRNA^{aa} za kodone AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA. Soj je korišten za optimizaciju ekspresije HaArgRS2.

3.1.8. Komercijalni kompleti

BugBuster Protein Extraction Reagent Kit Plus Lysonase (Merck Millipore), komplet za izolaciju plazmidne DNA *QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)*.

3.1.9. Hranjiva podloga i medij za uzgoj bakterije *E. coli*

Tekući hranjivi medij Luria-Bertani (LB): NaCl ($\gamma = 10 \text{ g/dm}^3$), tripton ($\gamma = 10 \text{ g/dm}^3$), kvašćev ekstrakt ($\gamma = 5 \text{ g/dm}^3$); kruta hranjiva podloga Luria-Bertani (LB): NaCl ($\gamma = 10 \text{ g/dm}^3$), tripton ($\gamma = 10 \text{ g/dm}^3$), kvašćev ekstrakt ($\gamma = 5 \text{ g/dm}^3$), agar ($\gamma = 15 \text{ g/dm}^3$).

3.1.10. Kromatografski materijali

Kromatografske kolone: HiTrap Desalting 5 mL (*Cytiva*); HP HisTrap 1 mL, HP HisTrap 5 mL (*Cytiva*); Mono Q 10/100, Mono S 10/100 (*GE Healthcare*); Superdex 200 Increase 5/150 GL, Superdex 200 Increase 10/300 GL, Superdex 200 HiLoad 16/600 GL (*GE Healthcare*)

3.1.11. Ostali materijali

Celulozna membrana za dijalizu (*Sigma*), centrikoni *Amicon Ultra Centrifugal Filter Unit (Milipore)*, kromatografski papirići *Whatman 3MM Chr (GE Healthcare)*, komplet za elektroforezu *Mini PROTEAN TETRA (Biorad)*, sterilni filteri od celuloznog acetata s promjerom pora $0,22 \mu\text{m}$ (*Whatman*), sustav za filtraciju i filter papiri od celuloznog acetata promjera pora $0,22 \mu\text{m}$ (*Sartorius*).

3.2. Metode

Sve metode rada s bakterijama odvijale su se u sterilnim uvjetima u laminaru. Voda, puferi i hranjivi mediji koji su se koristili, sterilizirani su u autoklavu ili filtrirani kroz filtere s porama veličine $0,22 \mu\text{m}$. Svi puferi koji su se koristili u kromatografske svrhe su nakon filtriranja degazirani u ultrazvučnoj kadici.

3.2.1. Metode rada s bakterijama

3.2.1.1. Transformacija bakterijskih sojeva elektroporacijom

Unošenje egzogenog genetičkog materijala u bakterijsku stanicu naziva se transformacija. Elektroporacija je jedna od metoda transformacije koja se temelji na primjeni kratkotrajnog električnog pulsa uslijed čega bakterijska stijenka postane propusna za velike molekule kao što su plazmidi. Kako bi unos strane DNA bio uspješan, suspenzija bakterijskih stanica mora biti pripremljena na određen način. Uzgojena je prekonocna kultura željenog soja bakterije *E. coli* u LB mediju na 37 °C uz miješanje na 250 okretaja u minuti (engl. *rotations per minute*, rpm). Glavna kultura je inokulirana prekonocnom kulturom u omjeru 100:1 te je inkubirana na 37 °C uz miješanje pri 250 rpm dok optička gustoća na valnoj duljini 600 nm (OD₆₀₀) nije dosegla vrijednost između 0,5 i 0,7. Kultura je ohlađena na ledu 15 minuta i centrifugirana 10 minuta na 4 °C i 5000 × g. Supernatant je odliven, a talog bakterijskih stanica je resuspendiran u jednakom volumenu hladne otopine glicerola ($\varphi = 10\%$). Taloženje i resuspendiranje u otopini glicerola je ponovljeno još jednom. Ispiranje glicerolom uklanja zaostale soli iz suspenzije stanica što pomaže u sprječavanju električnog pražnjenja elektroda (engl. *arcing*) te tako pospešuje efikasnost transformacije. Talog stanica je naposljetku resuspendiran u hladnoj otopini glicerola ($\varphi = 10\%$) tako da OD₆₀₀ ima vrijednost oko 200. Suspenzija je podijeljena na alikvote od 50 µL te pohranjena na -80 °C do uporabe. Pripremljene elektrokompetentne stanice testirane su uz testni plazmid i negativnu kontrolu na način koji će biti opisan u sljedećem odlomku.

Elektroporacija je provedena na sljedeći način: u 50 µL hladne suspenzije elektrokompetentnih bakterija je dodano 50-100 ng plazmidne DNA, a zatim je smjesa prebačena u ohlađenu kivetu za elektroporaciju. Elektroporacija se izvodi na uređaju *Micro Pulser (Biorad)* primjenom električnog pulsa od 2,5 kV cm⁻¹ u trajanju od 4 do 6 ms. Bakterije su potom reususpendirane u 950 µL LB medija sobne temperature te su inkubirane 1 h na 37 °C i 300 rpm. Plazmid koji je transformiran u bakterijsku stanicu nosi gen za rezistenciju na određeni antibiotik. Uspješnost transformacije stanica provjerava se nanošenjem transformirane bakterijske kulture na hranjivu podlogu koja sadrži taj antibiotik. Proizvoljni volumen kulture se nanese na krutu hranjivu podlogu koja sadrži antibiotik te se inkubira preko noći na 37 °C. Na krutoj podlozi će narasti samo one bakterije koje su uspješno transformirane.

3.2.1.2. Priprema glicerolskih bakterijskih kultura

Glicerolske bakterijske kulture se pripremaju kako bi se pohranile bakterije koje su transformirane željenim plazmidima. Kultura je pripremljena inokulacijom 5 mL LB medija uspješno transformiranim bakterijama uz pripadni antibiotik ($\gamma = 100 \mu\text{g/mL}$) na koji je transformant rezistentan. Bakterijska kultura je pohranjena u plastičnim epruveticama za pohranu glicerolskih kultura (φ (glicerol) = 10 %) na $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.2.2. Metode rada s nukleinskim kiselinama

3.2.2.1. Izolacija plazmidne DNA

Plazmidna DNA je izolirana pomoću komercijalno dostupnog kompleta *QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)* prema uputama proizvođača. Postupak započinje alkalnom lizom bakterijskih stanica uz natrijev dodecilsulfat (SDS) i natrijevu lužinu (NaOH). Genomska DNA i denaturirani proteini se talože neutralizacijom otopine, a plazmidna DNA se pritom renaturira. Taloženje netopljivih komponenti smjese se postiže centrifugiranjem. Supernatant koji sadrži plazmidnu DNA se prenosi u posebne kolonice koje imaju membranu izrađenu od silika-gela. U prisustvu visoke koncentracije kaotropnih soli, plazmidna DNA interagira sa silanolnom skupinom preko fosfatnih skupina. Membrana se nekoliko puta ispere puferom koji sadrži etanol kako bi se uklonile zaostale soli. Elucija plazmidne DNA se postiže ispiranjem kolone malim volumenom pufera niske ionske jakosti. Niska koncentracija pozitivnih iona rezultira odbijanjem negativno nabijene molekule plazmidne DNA i silika-gela.

3.2.2.2. Prekomjerna ekspresija i izolacija tRNA

Geni za tRNA^{Arg} iz *E. coli*, *S. thermophilum* i *H. aurantiacus* uklonirani su u vektor ΔpET3a koji nosi gen za rezistenciju na antibiotik ampicilin. Proizvodnja tRNA započinje pripremom 5 mL prekončne bakterijske kulture uz dodatak ampicilina ($\gamma = 100 \mu\text{g/mL}$) na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ i 250 rpm. Glavna kultura pripremljena je u 500 mL tekućeg LB medija u koji je dodan ampicilin ($\gamma = 100 \mu\text{g/mL}$) te je inokulirana prekončnom kulturom u omjeru 100:1. Kultura je uzgajana na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ uz miješanje pri 250 rpm do $\text{OD}_{600} = 0,5$. Ekspresija tRNA je inducirana pri $30 \text{ }^\circ\text{C}$ dodatkom IPTG-a ($c = 1 \text{ mmol/dm}^3$). Bakterije su nakon indukcije uzgajane 15 h na $30 \text{ }^\circ\text{C}$ i 250 rpm, a zatim istaložene centrifugiranjem na $4 \text{ }^\circ\text{C}$ pri $5000 \times g$ u trajanju od 15 minuta.

Talog stanica resuspendiran je u puferu za izolaciju tRNA (c (Tris-HCl, pH = 8,0) = 10 mmol/dm³, c ((CH₃COO)₂Mg) = 10 mmol/dm³). Liza bakterijskih stanica provedena je dodatkom jednakog volumena fenola zasićenog vodom te je smjesa vorteksirana šest puta po 30 s uz pauze od 30 s inkubacije na ledu. Nukleinske kiseline prelaze u vodeni sloj. Slojevi se razdvajaju centrifugiranjem 15 minuta na 4 °C i 20 000 × g. Vodeni sloj je odvojen te ekstrahiran jednakim volumenom smjese fenola zasićenog vodom i kloroforma u omjeru 1:1 (fenol-kloroform). Miješanje se odvija pri sobnoj temperaturi na rotatoru *Multi Bio RS-24 (Biosan)* dva puta po pet minuta pri 100 rpm s pauzom od pet minuta na ledu. Ekstrakcija fenol-kloroformom dodatno čisti vodeni sloj od zaostalog fenola i drugih nečistoća poput proteina i lipida. Zaostala tRNA u organskim slojevima reekstrahirana je s 5 mL pufera za izolaciju tRNA. Centrifugiranjem u trajanju od 15 minuta na 4 °C i 20 000 × g su razdvojeni vodeni i organski slojevi. Taloženje nukleinskih kiselina velike molarne mase (genomska DNA, mRNA, rRNA) postignuto je dodatkom PEG₈₀₀₀ (φ = 8 %) i NaCl (c = 0,5 mol/dm³) u vodeni sloj. Smjesa je inkubirana 10 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim je centrifugirana 15 minuta pri 20 000 × g i sobnoj temperaturi. Supernatant koji sadrži tRNA je odvojen, a uspješnost izolacije provjerena je na denaturirajućoj poliakrilamidnoj gel-elektroforezi s dodatkom uree o kojoj će riječi biti u poglavlju 3.2.2.4. U svrhu taloženja tRNA, supernatantu je dodana otopina natrijeva acetata (c = 0,25 mol/dm³) i 2,5 volumena hladnog etanola. Smjesa je inkubirana preko noći na -20 °C, a zatim centrifugirana 2 h pri 13 000 × g i 25 °C. Talog tRNA je ispran hladnim etanolom (φ = 70 %), osušen u uređaju *SpeedVac DNA120 (ThermoSavant)* i otopljen u vodi. Neke tRNA su izolirane u aminoaciliranom obliku što bi utjecalo na točnost eksperimenta određivanja kinetičkih parametara za reakciju aminoacilacije. Stoga je potrebno deacilirati tRNA, a to se postiže dodatkom Tris-HCl (c = 0,125 mmol/dm³, pH = 8,5-9) te inkubacijom 1,5 h na 37 °C. Reakcija je stopirana dodatkom octene kiseline do pH približno 5.

3.2.2.3. Dijaliza tRNA

Nakon izolacije, tRNA je potrebno prevesti u odgovarajući pufer za pohranu. Dijaliza je metoda za prevođenje makromolekula iz jednog pufera u drugi, a temelji se na difuziji malih molekula i iona kroz polupropusnu membranu. Dijaliza tRNA je provodena u crijevu celulozne membrane koje je prethodno pripremljeno kuhanjem u kipućoj otopini EDTA

($c = 1 \text{ mmol/dm}^3$) kako bi se uklonili metalni ioni s površine membrane. tRNA je prevedena u otopinu Hepesa ($c = 10 \text{ mmol/dm}^3$) u tri obroka po 1,5 L pufera u ukupnom trajanju 15 h.

3.2.2.4. Poliakrilamidna gel-elektroforeza s dodatkom uree

Metoda koja se koristi za provjeru uspješnosti odvajanja tRNA od velikih nukleinskih kiselina je poliakrilamidna gel-elektroforeza s dodatkom uree (urea-PAGE). Uslijed djelovanja električnog polja, nabijene čestice se u nekom mediju kreću prema elektrodi suprotnog naboja, a to se naziva elektroforeza. Poliakrilamidni gel služi kao molekulska sito prilikom razdvajanja molekula, a priprema se polimerizacijom akrilamida i *N,N*-metilenbisakrilamida. Budući da je omjer mase i naboja za sve polinukleotide gotovo jednak, brzina gibanja nukleinskih kiselina u električnom polju ovisi samo o njihovoj veličini. Dakle, male molekule se gibaju brže od velikih. No, sposobnost nukleinskih kiselina da formiraju sekundarne strukture utječe na mobilnost molekula. Urea denaturira nukleinske kiseline, a kako bi se spriječila formacija sekundarnih struktura, elektroforeza se provodi uz prethodnu inkubaciju uzorka na visokoj temperaturi.

Za pripremu gelova i elektroforezu korištena je aparatura *Mini PROTEAN TETRA* (Biorad). Smjesa za gel se sastojala od otopine akrilamid/bisakrilamid 19:1 ($\gamma = 60 \text{ mg/mL}$) i pufera TBE (c (urea) = 8 mol/dm^3 , c (Tris-HCl) = 90 mmol/dm^3 , c (borna kiselina) = 90 mmol/dm^3 , c (EDTA, pH = 8,0) = 2 mmol/dm^3). Polimerizacija gela započela je dodatkom inicijatora reakcije, amonijeva peroksodisulfata (APS) ($\gamma = 0,07 \text{ } \mu\text{g/mL}$) i katalizatora *N,N,N',N'*-tetrametilendiamida (TEMED) ($\varphi = 0,05 \%$). Gel je nakon polimerizacije uronjen u pufer TBE te su jažice isprane od istaložene uree istim puferom. Pripremni korak elektroforeze u trajanju od 30 minuta na 80 V napravljen je kako bi iz gela izašli zaostali ioni APS-a i tako se postigla homogenost ionskog sastava gela i pufera. Uzorak se pripremio za elektroforezu tako da je pomiješan s jednakim volumenom pufera za nanošenje (c (urea) = 8 mol/dm^3 , c (EDTA, pH = 8,0) = 10 mmol/dm^3 , γ (bromfenol plavo) = 2 mg/mL , γ (ksilencijanolfosfat) = 60 mg/mL) te je inkubiran 5 minuta na $85 \text{ }^\circ\text{C}$ radi denaturacije. Uz uzorke, u posebnu jažicu je nanesen marker. Kao marker je korišten standard, tRNA^{lle} izolirana na Zavodu za biokemiju u istraživanju dr. sc. Igora Živkovića. Elektroforeza se provodila 1 h pri 120 V nakon čega je gel inkubiran 20 minuta u otopini za bojanje gela (γ (toluidinsko modriilo) = $40 \text{ } \mu\text{g/mL}$, φ (etanol) = 50% , φ (CH₃COOH) = $0,1 \%$). Nespecifično vezana boja uklonjena je kuhanjem u kipućoj vodi do pojave jasno vidljivih vrpca.

3.2.2.5. Pročišćavanje tRNA ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom

Konačno pročišćavanje prekomjerno eksprimirane tRNA^{Arg} provedeno je kromatografijom na ionskom izmjenjivaču. Ovom metodom moguće je razdvojiti ionizabilne molekule na temelju predznaka i količine naboja koju posjeduju pri određenom pH i/ili ionskoj jakosti mobilne faze. Kolona je ispunjena polimerom (najčešće celuloza) koji posjeduje pozitivno ili negativno nabijene supstituente. Anionski izmjenjivači sadrže pozitivno nabijen supstituent koji veže negativno nabijene molekule poput tRNA^{Arg}. Najjače se vežu molekule s najvećim negativnim nabojem dok pozitivno nabijene molekule prolaze kroz kolonu bez vezanja. Elucija aniona se postiže mijenjanjem pH ili ionske jakosti mobilne faze pri čemu dolazi do zasjenjenja negativnog naboja zbog čega slabe interakcije s izmjenjivačem.

Za pročišćavanje tRNA^{Arg} korištena je kolona ispunjena anionskim izmjenjivačem Mono Q 10/100 (*GE Healthcare*) (protok 2-6 mL/min, volumen kolone ~ 8 mL). Mono Q 10/100 kolona ispunjena je kvaternom amonijevom soli supstituiranim polistiren/divinil-benzenom. Pročišćavanje je provedeno na kromatografskom sustavu Äkta Pure 25 (*GE Healthcare*) pri 4-8 °C. Kromatografija je praćena spektrofotometrijski pri valnim duljinama od 260 i 280 nm (radi određivanja udjela supročišćenih proteina). Pripremljene su dvije mobilne faze: pufer IEX_{tRNA, A} i IEX_{tRNA, B} čiji su sastavi prikazani u tablici 3.1. Kolona je ekvilibrirana puferom manje ionske jakosti, IEX_{tRNA, A}. Elucija je postignuta postupnim povećanjem ionske jakosti mobilne faze na način da se udio pufera IEX_{tRNA, B} linearno povećavao kroz 20-ak volumena kolone. Cijela metoda prikazana je u tablici 3.2. Trajanje pojedine faze u metodi je definirano volumenom kolone (engl. *column volume*, CV). 1 CV znači da je kroz kolonu propušten volumen mobilne faze koji odgovara zapremnini kolone. Eluat je skupljan u automatskom sakupljaču frakcija po 1-1,5 mL.

Tablica 3.1. Sastav pufera IEX_{tRNA} za pročišćavanje tRNA^{Arg} ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom.

	Pufer IEX _{tRNA, A}	Pufer IEX _{tRNA, B}
$c(\text{NaCl}) / \text{mol/dm}^3$	0,1	1
$c(\text{Hepes, pH} = 7,5) / \text{mmol/dm}^3$	25	25

Tablica 3.2. Metoda za pročišćavanje tRNA^{Arg} ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom.

Faza	Trajanje faze / CV	IEX _{tRNA, B} / %
Ekvilibracija	4	0
Nanošenje uzorka	Volumen uzorka	/
Ispiranje	5	0
Elucija	20	30-100

3.2.2.6. Određivanje koncentracije tRNA spektrofotometrijom

Koncentracije tRNA određene su spektrofotometrijski na uređaju *NanoDrop One* (*Thermo Scientific*) koji snima apsorpcijski spektar u rasponu valnih duljina od 220 do 350 nm. Dušične baze nukleotida apsorbiraju zračenje uz karakteristični pik na 260 nm. Uređaj određuje koncentraciju tRNA te računa omjer apsorbancija na valnim duljinama 260 i 280 nm ($A_{260/280}$) te na 260 i 230 nm ($A_{260/230}$). Budući da proteini imaju karakteristični apsorpcijski pik na 280 nm, omjer $A_{260/280}$ govori o proteinskim nečistoćama u uzorku. Uzorak RNA smatra se čist s obzirom na proteine ako je taj omjer iznad 2. Ukoliko je u uzorku zaostalo nešto reagensa koji su korišteni prilikom izolacije tRNA poput fenola, omjer apsorbancija $A_{260/230}$ biti će ispod 2. Spektrofotometar je jednozračni pa je nuliran puferom u kojemu je pohranjena tRNA.

3.2.3. Metode rada s proteinima

3.2.3.1. Prekomjerna ekspresija rekombinantnih proteina

Geni za arginil-tRNA-sintetaze iz *E. coli*, *S. thermophilum* i *H. aurantiacus* su uklonirani u vektor pET28b (*Twist Bioscience*) te su eksprimirani u obliku fuzijskih proteina s histidinskim privjeskom na N-kraju. Plazmid je transformiran u standardni ekspresijski soj *E. coli* BL21(DE3) te u sojeve *Tuner* i *Rosetta* kako bi pospješila ekspresija proteina. Kvalitetnija i/ili sporija ekspresija proteina može utjecati na bolje smatanje proteina što smanjuje udio (ne)topljivih proteinskih agregata tijekom pročišćavanja. Prekonoćne kulture transformiranih bakterija uzgajane su u 5 mL LB medija uz antibiotik kanamicin ($\gamma = 100 \mu\text{g/mL}$) na 37 °C i 250 rpm. Glavna kutura pripremljena je u 500 mL LB medija u koji je dodan kanamicin

($\gamma = 100 \mu\text{g/mL}$) i alikvot prekonoćne kulture (razrjeđenje 1:100). Kultura je uzgajana na 37°C i 250 rpm do $\text{OD}_{600} \approx 0,6$ nakon čega je hlađena 1 h na 4°C . Ekspresija je potaknuta dodatkom IPTG-a ($c = 0,25 \text{ mmol/dm}^3$). Proteini su eksprimirani oko 16 h na 15°C i 250 rpm.

3.2.3.2. Koekspresija rekombinantnih proteina sa šaperonima

Vektor pET28b s genom za StArgRS ili HaArgRS2 i vektor s genima za šaperone 1 ili 4 kotransformirani su u ekspresijski soj bakterije *E. coli*. Prekonoćne kulture transformiranih bakterija uzgajale su se u 5 mL LB medija uz antibiotik kanamicin ($\gamma = 100 \mu\text{g/mL}$) i kloramfenikol ($\gamma = 100 \mu\text{g/mL}$) na 37°C i 250 rpm. Glavna kultura pripremljena je u 500 mL LB medija. Za soj kotransformiran šaperonima 1 u kulturu je dodan kanamicin ($\gamma = 100 \mu\text{g/mL}$), kloramfenikol ($\gamma = 100 \mu\text{g/mL}$), tetraciklin ($\gamma = 10 \text{ ng/mL}$) i L-arabinoza ($\gamma = 0,5 \mu\text{g/mL}$) te alikvot prekonoćne kulture (razrjeđenje 1:100). Za soj kotransformiran šaperonima 4 u kulturu je dodan kanamicin ($\gamma = 100 \mu\text{g/mL}$), kloramfenikol ($\gamma = 100 \mu\text{g/mL}$) i tetraciklin ($\gamma = 10 \text{ ng/mL}$) te alikvot prekonoćne kulture (razrjeđenje 1:100). Kultura je uzgajana na 37°C i 250 rpm do $\text{OD}_{600} \approx 0,6$ nakon čega je hlađena 1 h na 4°C . Ekspresija je potaknuta dodatkom IPTG-a ($c = 0,25 \text{ mmol/dm}^3$). Proteini su eksprimirani oko 16 h na 15°C i 250 rpm.

3.2.3.3. Priprema proteinskog ekstrakta

Suspenzija stanica je centrifugirana 30 minuta na 4°C i $5000 \times g$. Talog stanica resuspendiran je u puferu čiji je volumen i sastav ovisio o metodi razaranja stanica. Sastav pufera prikazan je u tablici 3.3. Metode koje su se koristile za razbijanje stanica su sonikacija, homogenizacija primjenom visokog tlaka u uređaju *Cell Disruptor (Constant Systems Ltd)* te enzimska liza uporabom komercijalnog reagensa *BugBuster (Merck Millipore)*.

Talog stanica dobiven iz 500 mL kulture je pripremljen za sonikaciju tako da je resuspendiran u 5 mL pufera A (tablica 3.1.). U suspenziju je dodana DNaza I ($\gamma = 3 \text{ ng}/\mu\text{L}$) koja cijepa genomsku DNA, lizozim ($\gamma = 50 \text{ ng}/\mu\text{L}$) koji razgrađuje bakterijsku staničnu stijenkku, i fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF) ($c = 0,1 \text{ mmol/dm}^3$) koji inhibira serinske proteaze i tako sprječava razgradnju proteina. Stanice su sonicirane na ledu, 6 puta u trajanju od 1 minute s razmacima od 1 minutu. Sonikacija je obavljena na ledu jer uslijed primjene ultrazvuka dolazi do zagrijavanja smjese što može dovesti do denaturacije proteina.

Druga metoda razaranja bakterijske stanice, homogenizacija u *Cell Disruptor*, zahtijevala je resuspendiranje stanica u velikom volumenu pufera A (oko 200 mL na talog iz 500 mL kulture). Ova metoda je brza i učinkovita te je najbolji izbor kada se radi s velikim uzgojima. Zbog primjene visokog tlaka, neke od komponenti suspenzije potiču pjenjenje smjese prilikom razbijanja stanica. Suspenzija stoga nije sadržavala glicerol niti PMSF, a DNaza I je dodana u trostrukoj koncentraciji kako bi se smanjila viskoznost uzorka ($\gamma = 9 \text{ ng}/\mu\text{L}$). Lizozim je dodan u suspenziju prije homogenizacije u koncentraciji $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$. Stanice su razorene na $4 \text{ }^\circ\text{C}$ primjenjujući tlak od 20 000 psi (engl. *pound-force per square inch*, $1 \text{ psi} \approx 6,895 \text{ Pa}$). Lizat je skupljen u bocu. U bocu je prethodno dodan volumen PMSF-a koji će u u smjesi s lizatom poznatog volumena imati konačnu koncentraciju $c_{\text{konačno}}(\text{PMSF}) = 0,1 \text{ mmol}/\text{dm}^3$.

BugBuster je komercijalni reagens za lizu bakterijskih stanica koji se sastoji od blagih detergenata za solubilizaciju stanične stijenke i *Lysonase* – smjese rekombinantnog lizozima i nukleaze *Benzonase*. Ovo je blaga metoda razbijanja stanica pa omogućuje izolaciju nestabilnijih proteina. Nedostatak ove metode je manja učinkovitost lize te zato nije pogodna za lizu stanica iz velikih uzgoja. Razaranja stanica reagensom *BugBuster* obavljeno je prema uputama proizvođača tako da je na 1 g taloga stanica dodana smjesa 5 mL *BugBuster*-a i otopine NaCl ($c \approx 600 \text{ mmol}/\text{dm}^3$) te lizonaza i PMSF ($c = 0,1 \text{ mmol}/\text{dm}^3$). Smjesa je inkubirana 20 minuta uz laganu rotaciju na rotatoru pri 20 rpm.

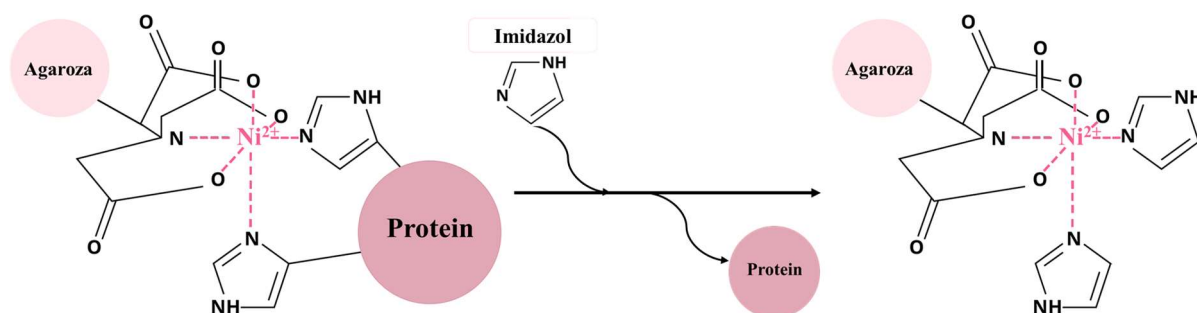
Dobiveni lizati su centrifugirani 1 h pri $4 \text{ }^\circ\text{C}$ i $10\,000 \times g$. Proteinski ekstrakt je profiltriran kroz sterilne filtere s porama veličine $0,22 \mu\text{m}$.

Tablica 3.3. Sastav pufera A za resuspendiranje taloga stanica prije lize.

Pufer A	
Sonikacija	<i>Cell Disruptor</i>
$c(\text{NaCl}) = 0,5\text{-}1 \text{ mol}/\text{dm}^3$	$c(\text{NaCl}) = 0,5\text{-}1 \text{ mol}/\text{dm}^3$
$c(\text{MES/Hepes, pH} = 6,5/7,5) = 20 \text{ mmol}/\text{dm}^3$	$c(\text{Hepes/Tris, pH} = 7,5/8,0) = 20 \text{ mmol}/\text{dm}^3$
$c(\text{imidazol}) = 10 \text{ mmol}/\text{dm}^3$	$c(\text{imidazol}) = 10 \text{ mmol}/\text{dm}^3$
$c(\text{MgCl}_2) = 20 \text{ mmol}/\text{dm}^3$	$c(\text{MgCl}_2) = 20 \text{ mmol}/\text{dm}^3$
$c(\beta\text{-merkaptetanol}) = 10 \text{ mmol}/\text{dm}^3$	$c(\beta\text{-merkaptetanol}) = 10 \text{ mmol}/\text{dm}^3$
$\varphi(\text{glicerol}) = 5 \%$	/

3.2.3.4. Afinitetna kromatografija na Ni-NTA agarozima

Afinitetna kromatografija je kromatografska metoda koje se temelji na specifičnoj interakciji proteina i kromatografskog punila. Najčešće korištena je afinitetna kromatografija s imobiliziranim metalnim ionom (engl. *Immobilized-Metal Affinity Chromatography*, IMAC), konkretno kromatografija na Ni-NTA agarozima. Ona se koristi za pročišćavanje proteina koji u svom primarnom slijedu imaju tzv. histidinski privjesak, odnosno šest histidina zaredom na N- ili C-kraju proteina. Kromatografsko punilo čini sefaroza, umreženi oblik agaroze, na koju je kovalentno vezana nitrilotriocetna kiselina (engl. *nitrilotiracetic acid*, NTA). NTA je vezana na četiri vezna mjesta u koordinacijskoj sferi Ni^{2+} iona. Na preostala dva mjesta se mogu vezati bočni ogranci histidina iz histidinskog privjeska. Specifično vezani protein se eluira imidazolom koji je strukturno sličan bočnom ogranku histidina te se umjesto njega veže na Ni^{2+} . Shema pročišćavanja proteina na Ni-NTA agarozima prikazana je na slici 3.1. Afinitetna kromatografija na Ni-NTA agarozima predstavlja prvi korak u pročišćavanju ArgRS iz proteinskog ekstrakta. Za pročišćavanje su korištene HisTrap HP 1 mL i HisTrap HP 5 mL (za veće uzgoje) kolone (Cytiva). Veća kolona je korištena za veće uzgoje zbog više veznih mjesta za rekombinantne proteine. Korišten je kromatografski sustav Äkta Pure 25 i Äkta Start (GE Healthcare). Äkta Start je korištena zbog mogućnosti kontinuiranog nanošenja velikog volumena uzorka na kolonu. Kromatografija je provedena na 4-8 °C te je praćena spektrofotometrijski pri valnim duljinama od 280 i 260 nm radi određivanja čistoće proteina. Sastav mobilnih faza A_{His} , B_{His} i C_{His} te shema protokola prikazani su u tablici 3.4 i 3.5. Ispiranjem puferom A_{His} ($c(\text{imidazol}) = 10 \text{ mmol/dm}^3$) uklonili su se nevezani proteini, puferom B_{His} ($c(\text{imidazol}) = 40 \text{ mmol/dm}^3$) slabo vezani proteini, a elucija se postigla ispiranjem kolone puferom C_{His} ($c(\text{imidazol}) = 200 \text{ mmol/dm}^3$). Pufer B_{His} nije bio zasebno pripremljen nego je miješanjem pufera A_{His} i C_{His} unutar kromatografskog sustava postignuta koncentracija imidazola 40 mmol/dm^3 . Protok kroz kolonu je iznosio 1 mL/min. Eluat je skupljan u automatskom sakupljaču frakcija po 1-1,5 mL.



Slika 3.1. Shema pročišćavanja proteina s histidinskim privjeskom na Ni-NTA agarozu.

Tablica 3.4 Puferi za pročišćavanje proteina na Ni-NTA agarozu.

	Pufer A _{His}	Pufer B _{His}	Pufer C _{His}
$c(\text{NaCl}) / \text{mol/dm}^3$	0,5-1	0,5-1	0,5-1
$c(\text{MES/Hepes/Tris})^1 / \text{mmol/dm}^3$	20	20	20
$c(\text{imidazol}) / \text{mmol/dm}^3$	10	40	200
$c(\text{MgCl}_2) / \text{mmol/dm}^3$	20	20	20
$c(\beta\text{-merkaptioetanol}) / \text{mmol/dm}^3$	10	10	10
$\varphi(\text{glicerol})$	5 %	5 %	5 %

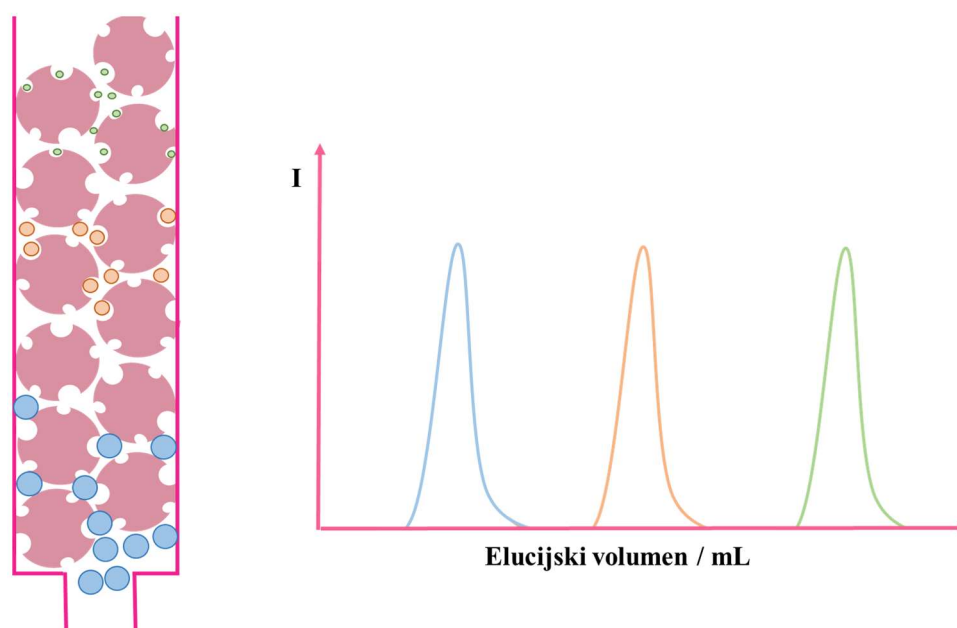
Tablica 3.5. Kromatografska metoda za pročišćavanje ArgRS na Ni-NTA agarozu.

Faza	Trajanje faze / CV	Mobilna faza
Ekvilibracija	10	Pufer A _{His}
Nanošenje uzorka	Volumen uzorka	Pufer A _{His}
Ispiranje 1	2-10	Pufer A _{His}
Ispiranje 2	2-10	Pufer B _{His}
Elucija	5	Pufer C _{His}

¹ pH (MES) = 6,5; pH (Hepes) = 7,5; pH (Tris) = 8,0

3.2.3.5. Gel-filtracijska kromatografija

Nakon afinitetne kromatografije na Ni-NTA agarozu, proteini su dodatno pročišćeni drugim kromatografskim metodama. Gel-filtracijska kromatografija je jedna od metoda kojima se proteini mogu odijeliti na temelju njihove veličine. Kromatografska kolona je ispunjena česticama inertnog i poroznog materijala. Proteini se kreću između njih te mogu ulaziti u pore. U pore ulaze oni proteini koji su veličinom manji od dimenzija pora. Najmanji proteini mogu ući u najviše pora, dok najveći proteini ulaze u najmanji broj pora. Zbog zadržavanja u porama, usporava se prolazak proteina kroz kolonu. Tako će kroz kromatografsku kolonu najbrže proći najveći proteini, a zadnji se eluiraju najmanji. Princip pročišćavanja gel-filtracijskom kromatografijom prikazan je na slici 3.2. Ova metoda je vrlo povoljna za odjeljivanje proteinskih agregata od nativnih proteina te se u tu svrhu i koristila. Za pročišćavanje su korištene Superdex 200 (*GE Healthcare*) kolone različitih dimenzija s rasponom odjeljivanja 10-600 kDa: Superdex 200 Increase 5/150 GL (protok 0,3 ml/min, volumen kolone ~ 3 mL) u analitičke svrhe za određivanje udjela proteinskih agregata i ostalih nečistoća, Superdex 200 Increase 10/300 GL (protok 0,7 mL/min, volumen kolone ~ 24 mL) i Superdex 200 HiLoad 16/600 (protok <1,0 mL/min, volumen kolone ~ 120 mL) kolone u preparativne svrhe. Korišten je kromatografski sustav *Äkta Pure 25* (*GE Healthcare*). Kromatografija je provedena na 4-8 °C te je praćena spektrofotometrijski pri valnim duljinama od 280 i 260 nm. Sastav mobilne faze (GF pufer) se mijenjao tijekom optimizacije pročišćavanja za svaki protein te je prikazan u tablici 3.6. Kromatografska metoda prikazana je u tablici 3.7. Eluat je skupljan u automatskom sakupljaču frakcija po 0,5-1,5 mL. Svi proteini od interesa su pročišćavani gel-filtracijskom kromatografijom.



Slika 3.2. Princip odjeljivanja proteina gel-filtracijskom kromatografijom.

Tablica 3.6. Sastav mobilne faze za gel-filtracijsku kromatografiju.

	Mobilna faza
$c(\text{NaCl}) / \text{mol/dm}^3$	0,1-1
$c(\text{MES/Hepes/Tris}) / \text{mmol/dm}^3$	20
$c(\beta\text{-merkaptoletanol}) / \text{mmol/dm}^3$	10
$\varphi(\text{glicerol})$	10 %

Tablica 3.7. Metoda za pročišćavanje ArgRS gel-filtracijskom kromatografijom.

Faza	Trajanje faze / CV
Ekvilibracija	2
Nanošenje uzorka	Volumen uzorka
Elucija	1,5

3.2.3.6. Ionsko-izmjenjivačka kromatografija

Za pročišćavanje ArgRS je korištena kolone ispunjene anionskim izmjenjivačem Mono Q 10/100 (*GE Healthcare*) (protok 2-6 mL/min, volumen kolone ~ 8 mL). Ovisno o *pI* proteina, koristi se anionski odnosno kationski izmjenjivač. Pročišćavanje je provedeno na kromatografskom sustavu *Äkta Pure 25* (*GE Healthcare*) pri 4 – 8 °C. Kromatografija je praćena spektrofotometrijski pri valnim duljinama od 280 i 260 nm. Pripremljene su dvije mobilne faze: pufer IEX_{ArgRS, A} i IEX_{ArgRS, B} čiji su sastavi prikazani u tablici 3.7. Protein je prije ionske izmjene prebačen u pufer niže ionske jakosti ($c(\text{NaCl}) = 0,05\text{-}0,2 \text{ mol/dm}^3$) na koloni HiTrap Desalting (odsoljavanje). Ionska jakost mora biti što niža kako ioni iz pufera ne bi zasjenili naboj na proteinu i tako onemogućili njegovo čvrsto vezanje za ionski izmjenjivač. Ionsko-izmjenjivačke kolone su ekvilibrirane mobilnom fazom čija ionska jakost odgovara uvjetu odsoljavanja. Elucija je postignuta postupnim povećanjem ionske jakosti mobilne faze na način da se udio pufera IEX_{ArgRS, B} linearno povećavao kroz 15 volumena kolone. Cijela metoda prikazana je u tablici 3.8. Eluat je skupljan u automatskom sakupljaču frakcija po 1-1,5 mL. Ovom metodom pročišćavan je StArgRS.

Tablica 3.7. Sastav pufera IEX_{ArgRS} za pročišćavanje ArgRS ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom.

	Pufer IEX _{ArgRS, A}	Pufer IEX _{ArgRS, B}
$c(\text{NaCl}) / \text{mol/dm}^3$	0,05	1
$c(\text{MES/Hepes/Tris}) / \text{mmol/dm}^3$	20	20
$c(\beta\text{-merkapttoetanol}) / \text{mmol/dm}^3$	10	10
$\varphi(\text{glicerol})$	10 %	10 %

Tablica 3.8. Metoda za pročišćavanje ArgRS ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom.

Faza	Trajanje faze / CV	$c(\text{NaCl}) / \text{mmol}/\text{dm}^3$
Ekvilibracija	4	0,05-0,2
Nanošenje uzorka	Volumen uzorka	0,05-0,2
Elucija	15	0,05-1

3.2.3.7. Ukoncentriravanje proteina ultrafiltracijom

Ultrafiltracija je metoda koja se koristi za ukoncentriravanje (ugušćivanje) proteina. Metoda se temelji na filtraciji kroz polupropusnu membranu koja ima pore definirane veličine. Korišteni su *Amicon Ultra Centrifugal Filter Unit (Milipore)* tzv. centrikoni. Kroz odabranu membranu prolaze svi proteini manji od 50 kDa. Centrikoni su najprije isprani puferom u kojem je pohranjen protein, a nakon toga su dodani uzorci proteina nakon pročišćavanja. Centrikoni s uzorkom su centrifugirani na 4 °C i 5000 × g te su tako proteini ukoncentrirani do proizvoljne koncentracije.

3.2.3.8. Denaturirajuća poliakrilamidna gel-elektroforeza uz dodatak natrijevog dodecilsulfata

Denaturirajuća poliakrilamidna gel-elektroforeza uz dodatak natrijevog dodecilsulfata (engl. *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE*) je metoda razdvajanja proteina na temelju njihove veličine. SDS je anionski detergent koji stvara komplekse s proteinima i denaturira ih. Svi kompleksi proteina i SDS-a imaju jednak omjer naboja i mase jer je količina vezanog SDS-a po jedinici mase proteina konstantna. Naboj kompleksa je određen nabojem SDS-a koji se veže tako da prekriva naboje bočnih lanaca proteina. Cijeli kompleks je negativno nabijen te se u električnom polju kreće prema pozitivno nabijenoj elektrodi. Pokretljivost različitih proteina ovisi samo o njihovoj molekularnoj masi zbog učinka molekularnog sita u gelu. Najčešća izvedba ove metode je diskontinuirani SDS-PAGE. Njome se postiže maksimalno razlučivanje pri odjeljivanju proteina. Gel je sačinjen od dva dijela: gornjeg gela za sabijanje i donjeg gela za razdvajanje. Gel za sabijanje ima veće pore i pripremljen je u puferu nižeg pH i niže ionske jakosti što doprinosi bržem gibanju molekula kroz gel. Molekule se akumuliraju u tanku početnu liniju na granici gelova te

zatim ulaze u gel za razdvajanje gdje se odjeljuju na principu molekuskog sita. Brzina kretanja proteina ovisi samo o njegovoj molekuskjoj masi. Molekulska masa analiziranog proteina procjenjuje se prema markeru molekuskkih masa.

Za izradu poliakrilamidnih gelova i elektroforezu korištena je aparatura *Mini PROTEAN TETRA* (*BioRad*). Sastav gelova za sabijanje i razdvajanje prikazan je u tablici 3.9. Sastav pufera za SDS-PAGE je sljedeći: γ (SDS) = 1 mg/mL, γ (Tris, pH = 8,3) = 3,03 mg/mL, γ (glicin) = 14,4 mg/mL. Uzorci su prije elektroforeze pripremljeni na način da je alikvot uzorka dodan u otopinu sastava c (Tris, pH = 6,8) = 62,5 mmol/dm³, γ (SDS) = 1,25 mg/mL, c (β -merkaptotanol) = 12,5 mmol/dm³, φ (glicerol) = 6,25 %, γ (bromfenol plavo) = 0,02 mg/mL. Ukupni volumen pripremljene smjese je bio 20 μ L. Uzorci su zatim inkubirani 5 minuta na 95 °C radi potpune denaturacije. U jažice je zasebno nanoseno 15 μ L uzorka i 5 μ L markera Precision Plus Protein Standards Unstained/Prestained (*BioRad*). Elektroforeza se provodila 15 minuta na 120 V kako bi se uzorak sabio, a zatim još 40 minuta na 180 V. Gel je zatim obojan u otopini γ (Coomassie Brilliant Blue R-250) = 2,5 g/dm³, φ (CH₃COOH) = 10 %, φ (etanol) = 45 %. Nespecifično vezana boja uklonjena je kuhanjem u kipućoj vodi do pojave jasno vidljivih vrpca.

Tablica 3.9. Sastav gelova za sabijanje i razdvajanje za diskontinuirani SDS-PAGE.

	Gel za sabijanje	Gel za razdvajanje
γ (akrilamid:bisakrilamid 29:1) / mg/mL	40	90
c (Tris) / mol/dm ³	0,125 (pH = 6,8)	0,385 (pH = 8,8)
γ (SDS) / mg/mL	1	1
γ (APS) / μ g/mL	0,7	0,7
φ (TEMED)	0,05 %	0,05 %

3.2.3.9. Određivanje koncentracije proteina spektrofotometrijom

Koncentracije proteina određene su spektrofotometrijski na uređaju *NanoDrop One* (*Thermo Scientific*). Karakteristični apsorpcijski pik proteina nalazi se na 280 nm, a potječe od apsorpcije bočnog ogranka aminokiseline triptofan. Triptofan najviše doprinosi

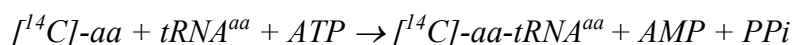
apsorpcijskom profilu proteina, ali postoje i manji apsorpcijski maksimumi koji potječu od drugih aromatskih aminokiselina. Uređaj određuje koncentraciju proteina na temelju molarne mase i molarnog ekstinkcijskog koeficijenta proteina te računa omjer apsorbancija na valnim duljinama 260 i 280 nm ($A_{260/280}$). Budući da nukleinske kiseline imaju karakteristični apsorpcijski pik na 260 nm, omjer $A_{260/280}$ govori o nečistoćama koje potječu od nukleinskih kiselina. Uzorak proteina smatra se čist ako je taj omjer oko 0,6. Spektrofotometar je jednozračni pa je nuliran puferom u kojemu je pohranjen uzorak proteina.

3.2.4. Kinetičke metode

Sve kinetičke eksperimente je napravio dr. sc. Igor Živković.

3.2.4.1. Aminoacilacija uz [^{14}C]-aminokiselinu

Ukupna reakcija aminoaciliranja se može pratiti korištenjem radioaktivno obilježene [^{14}C]-aminokiseline. Radioaktivno obilježena aminokiselina se u reakciji koju katalizira aaRS povezuje s tRNA^{aa} i nastaje radioaktivno obilježena aminoacil-tRNA ([^{14}C]-aa-tRNA^{aa}). Udio aminoaciliranih tRNA^{aa} se može odrediti mjerenjem radioaktivnosti koja potječe od [^{14}C]-aa-tRNA^{aa}. Radioaktivnost se mjeri u scintilacijskom brojaču kao broj udaraca u minuti (engl. *counts per minute*, cpm), a na temelju baždarnog pravca, konstruiranog iz uzoraka poznate količine radioaktivnosti, određuje se koncentracija [^{14}C]-aa-tRNA^{aa}. Na temelju početnih koncentracija sudionika reakcije i aminoacilirane tRNA^{aa} se mogu izračunati kinetički parametri za ukupnu reakciju aminoaciliranja: početna brzina v_0 i opažena konstanta brzine reakcije k_{obs} .



Reakcija aminoaciliranja odvijala se u otopini sastava: c (Hepes, pH= 7,5) = 20 mmol/dm³, c (MgCl₂) = 2 mmol/dm³, c (KCl) = 100 mmol/dm³, γ (BSA) = 0,1 mg/mL, c (anorganska pirofosfataza, TIPP) = 0,008 U/ μL . Anorganska pirofosfataza je enzim koji katalizira razgradnju pirofosfata te tako pomiče ravnoteža prema nastajanju aminoacil-tRNA. Koncentracije sudionika reakcije bile su sljedeće: c (tRNA^{Arg}) = 20 $\mu\text{mol/dm}^3$, c (ArgRS) = 25-200 nmol/dm³, c (Arg) = 80 $\mu\text{mol/dm}^3$, c (ATP) = 20 mmol/dm³. Reakcija se

odvija u suvišku tRNA i Arg kako bi doseg reakcije ovisio o početnoj koncentraciji enzima. tRNA^{Arg} je prethodno renaturirana u puferu (c (Hepes, pH= 7,5) = 10 mmol/dm³) inkubacijom na 85 °C u trajanju od 3 minute nakon čega joj je dodana otopina MgCl₂ (c = 5 mmol/dm³) i brzo ohlađena na ledu. Arginin je dodan u reakcijsku otopinu kao smjesa radioaktivne i neradioaktivne aminokiseline čija je specifična aktivnost u reakcijskoj otopini iznosila 50-100 mCi/mmol. Također je pripravljena otopina [¹⁴C]-Arg poznate koncentracije i specifične radioaktivnosti koja će poslužiti za izradu baždarnog pravca. Reakcija je praćena na 37 °C te je započeta dodavanjem enzima u pripremljenu reakcijsku smjesu. Tijekom reakcije su u određenim vremenskim točkama uzimani alikvoti smjese te su nanoseni na kromatografske papiriće *Whatman 3MM Chr (GE Healthcare)*. Reakcija i taloženje Arg-tRNA^{Arg} je zaustavljena uranjanjem papirića u otopinu hladne trikloroctene kiseline (w = 10 %). Papirići su zatim ispirani od neaminoaciliranog arginina 10 minuta u otopini hladne trikloroctene kiseline (w = 10 %) te još dva puta po 5 minuta u hladnoj trikloroctenoj kiselini i potom u etanolu (φ = 96 %). Papirići su sušeni u sušioniku 30 minuta na 70-80 °C, a zatim su uronjeni u scintilacijsku otopinu (γ (PPO) = 5 g/dm³, γ (POPOP) = 0,3 g/dm³ u toluenu) u staklenim bočicama. Mjerenje radioaktivnosti nastalog [¹⁴C]-Arg-tRNA^{Arg} u alikvotima reakcijske smjese u odabranim vremenskim točkama se odvijalo u scintilacijskom brojaču *Tri-Carb 2900 TR (Perkin Elmer)*. Za potrebe izrade baždarnog pravca, na papiriće je pipetirana otopina [¹⁴C]-Arg, papirići su osušeni, uronjeni u scintilacijsku otopinu i postavljeni u scintilacijski brojač.

Koncentracija [¹⁴C]-Arg-tRNA^{Arg} izračunata je na temelju broja otkućaja izmjerenih za vremenske točke uzete tijekom reakcije aminoacilacije i baždarnog dijagrama. Početna brzina reakcije izračunata je linearnom regresijom iz linearnog dijela ovisnosti koncentracije [¹⁴C]-Arg-tRNA^{Arg} o vremenu i jednaka je nagibu pravca. Opažena konstanta brzine aminoacilacije je određena iz omjera početne brzine i početne koncentracije ArgRS.

3.2.4.2. Određivanje akceptorske aktivnosti tRNA uz [¹⁴C]-aminokiselinu

Funkcionalnost pročišćene tRNA^{aa} određuje se mjerenjem akceptorske aktivnosti. Akceptorska aktivnost predstavlja udio tRNA^{aa} u smjesi koje mogu biti aminoacilirane. Reakcija se odvija u smjesi jednakog sastava navedenog u poglavlju 3.2.4.1. Koncentracije sudionika reakcije bile su: c (tRNA^{Arg}) = 5 μ mol/dm³, c (ArgRS) = 2 μ mol/dm³, c (Arg) = 80 μ mol/dm³, c (ATP) = 20 mmol/dm³. Ovaj eksperiment se izvodi u suvišku enzima kako bi se sva dostupna

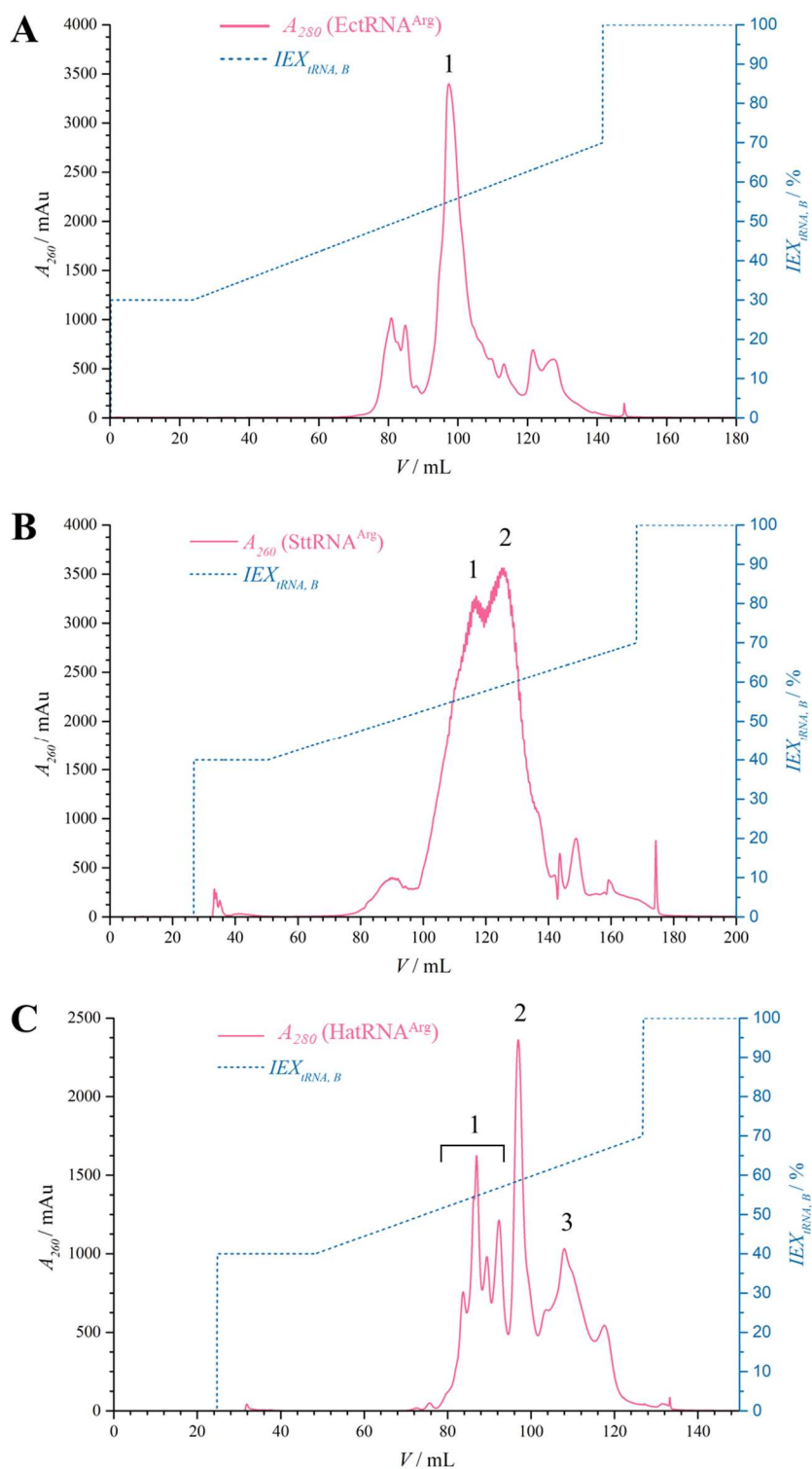
tRNA mogla aminoacilirati te da se tako dobije točna informacija o akceptorskoj aktivnosti uzorka tRNA. tRNA^{Arg} je prethodno renaturirana u puferu (c (Hepes, pH= 7,5) = 10 mmol/dm³) inkubacijom na 85 °C u trajanju od 3 minute nakon čega joj je dodana otopina MgCl₂ (c = 5 mmol/dm³) i brzo ohlađena na ledu. Reakcija je praćena na 37 °C te je započeta dodavanjem tRNA^{Arg} u pripremljenu reakcijsku smjesu. Pripremljena je i slijepa proba kojoj nije dodana tRNA^{Arg}. Postupak mjerenja opisan je u poglavlju 3.2.4.1.

Koncentracija [¹⁴C]-Arg-tRNA^{Arg} određena je iz baždarnog pravca i broja otkucaja za svaku vremensku točku umanjenog za broj otkucaja slijepa probe. Akceptorska aktivnost izračunata je iz omjera koncentracije [¹⁴C]-Arg-tRNA^{Arg} i početne koncentracije tRNA^{Arg}.

§ 4. REZULTATI

4.1. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje tRNA^{Arg} iz bakterija *E. coli*, *S. thermophilum* i *H. aurantiacus*

U poglavlju 3.2 opisani su standardni protokoli prekomjerne ekspresije i pročišćavanja tRNA^{Arg}. Postupak prekomjerne ekspresije i pročišćavanja tRNA^{Arg} u soju BL21(DE3) bakterije *E. coli* detaljno je opisan u poglavlju 3.2.2.2. Na opisani način prekomjerno su eksprimirane i pročišćene EctRNA^{Arg}, SttRNA^{Arg} i HatRNA^{Arg}. Sve tRNA^{Arg} su nakon dijalize pročišćene ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom na Mono Q 10/100 koloni prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.2.5. Dobiveni kromatogrami prikazani su na slici 4.1.



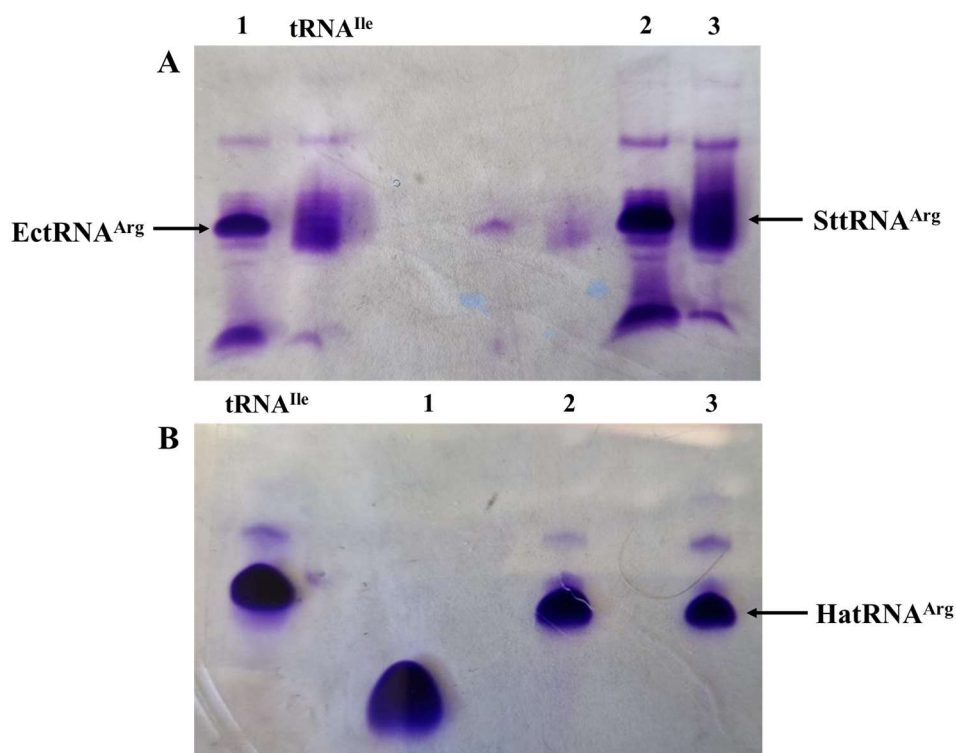
Slika 4.1. Kromatogram pročišćavanja ionsko izmjenjivačkom kromatografijom prema metodi opisanoj u poglavlju 3.2.2.5 A) EctRNA^{Arg}, B) SttRNA^{Arg}, C) HatRNA^{Arg}.

Iz kromatograma pročišćavanja EctRNA^{Arg} na slici A vidljiva je glavna karakteristična vrpca koja odgovara eluciji EctRNA^{Arg} od 55-60 % pufera IEX_{IRNA, B} odnosno

$c(\text{NaCl}) \approx 500 \text{ mmol/dm}^3$. Iz prijašnjih istraživanja je poznato da druge prisutne vrpce predstavljaju onečišćenja. EctRNA^{Arg} istaložena je pomoću otopine natrijevog acetata i hladnog etanola te otopljena u vodi, a na kraju je dijalizirana prema otopini Hepesa ($c = 10 \text{ mmol/dm}^3$) (postupci u poglavlju 3.2.2.2 i 3.2.2.3). Uspješnost pročišćavanja je analizirana denaturirajućom poliakrilamidnom gel-elektroforezom uz dodatak uree (postupak u poglavlju 3.2.2.4). Zbog slične molekulske mase svih tRNA^{aa}, kao marker je korištena pročišćena tRNA^{Ile}. Na slici 4.2.A je prikazan gel nakon provedene elektroforeze i uklanjanja nespecifično vezane boje. S obzirom na bliski položaj markera i uzorka EctRNA^{Arg} u jažici 1, utvrđeno je da je pročišćavanje EctRNA^{Arg} provedeno uspješno. Uzorku je nakon dijalize određena koncentracija i čistoća koja je prikazana u tablici 4.1 (postupak u poglavlju 3.2.2.6).

Za tRNA^{Arg} iz *S. thermophilum* su se tijekom kromatografije izdvojile dvije vrpce koji odgovaraju eluciji SttRNA^{Arg} od 53-61 % IEX_{tRNA, B}, što odgovara $c(\text{NaCl}) \approx 550 \text{ mmol/dm}^3$. Na kromatogramu prikazanom na slici 4.1 su vidljive dvije bliske vrpce koje su pohranjene kao zasebne frakcije i odvojeno analizirane. Taloženje i dijaliza SttRNA^{Arg} provedena je na jednak način kao i EctRNA^{Arg} te je metodom urea-PAGE analizirana uspješnost pročišćavanja. Gel je prikazan na slici 4.2.A Budući da obje vrpce (jažice 2 i 3) na gelu zauzimaju položaj blizak markeru, utvrđeno je da obje sadrže pročišćenu SttRNA^{Arg}. Kinetička svojstva analizirana su zasebno te im je nakon dijalize određena koncentracija i čistoća (tablica 4.1).

Razdvajanje pikova uočeno je i kod HatRNA^{Arg}. Tijekom kromatografije izdvojila su se tri karakteristična pika koja su zasebno skupljena. Vrpca #1 odgovara eluciji HatRNA^{Arg} pri 53-56 % IEX_{tRNA, B} odnosno $c(\text{NaCl}) \approx 400 \text{ mmol/dm}^3$, vrpca #2 eluira pri 57-60 % IEX_{tRNA, B} odnosno $c(\text{NaCl}) \approx 500 \text{ mmol/dm}^3$ dok vrpca #3 eluira pri 61-64% što odgovara $c(\text{NaCl}) \approx 600 \text{ mmol/dm}^3$. HatRNA^{Arg} iz svake frakcije je istaložena i otopljena u vodi prema standardnom postupku. Uspješnost pročišćavanja je analizirana metodom urea-PAGE. Na slici 4.2.B je prikazan gel nakon provedene elektroforeze i uklanjanja nespecifično vezane boje. Usporedbom položaja tRNA^{Ile} i analiziranog uzorka, vidljivo je da se HatRNA^{Arg} iz vrpce #1 izdvaja uz neki drugi produkt dok je u vrpcama #2 i #3 u najviše zastupljena HatRNA^{Arg}. Vrpca #1 je odbačena iz daljnjih analiza, a vrpcama #2 i #3 je nakon dijalize spektrofotometrijski određena koncentracija i čistoća (tablica 4.1).



Slika 4.2. Gel dobiven urea-PAGE metodom za analizu uspješnosti pročišćavanja tRNA^{Arg} nakon ionsko-izmjenjivačke kromatografije. A) U jažici 1 –uzorak koji odgovara vrpce EctRNA^{Arg}, marker molekulske mase tRNA^{Ile}, 2 –vrpca #1 SttRNA^{Arg}, 3 –vrpca #2 SttRNA^{Arg}. B) marker molekulske mase tRNA^{Ile}, 1 –vrpca #1 HatRNA^{Arg}, 2 –vrpca #2 HatRNA^{Arg}, 3 –vrpca #3 HatRNA^{Arg}.

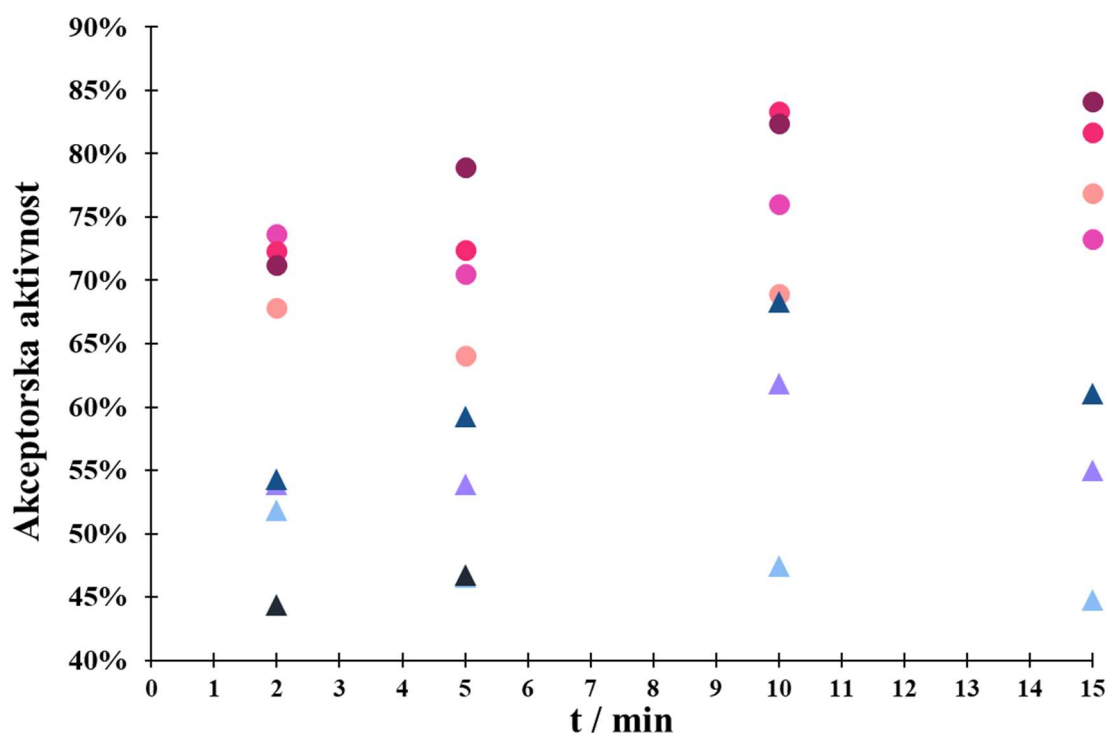
Tablica 4.1. Spektrofotometrijski određena koncentracija i čistoća pročišćenih uzoraka EctRNA^{Arg}, SttRNA^{Arg} i HatRNA^{Arg}.

	$\gamma_0 / \mu\text{g}/\mu\text{l}$	$A_{260/230}$	$A_{260/280}$
EctRNA ^{Arg}	12,98	2,22	2,09
SttRNA ^{Arg} #1	11,37	2,20	2,07
SttRNA ^{Arg} #2	12,23	2,18	2,05
HatRNA ^{Arg} #2	18,61	2,21	2,01
HatRNA ^{Arg} #3	9,35	2,15	2,03

4.2. Kinetička karakterizacija dobivenih tRNA^{Arg}

Akceptorska aktivnost predstavlja udio tRNA^{aa} u smjesi koje mogu biti aminoacilirane te tako daje informaciju o funkcionalnosti pročišćene tRNA^{aa}. Akceptorska aktivnost EctRNA^{Arg}, SttRNA^{Arg} i HatRNA^{Arg} određena uz [¹⁴C]-aminokiselinu (postupak u poglavlju 3.2.4.2). Prvo su nađeni uvjeti optimalne renaturacije. Koristeći utvrđeni protokol, određene su akceptorske aktivnosti za sve tRNA^{Arg}.

Optimalni uvjet za renaturaciju dobiven je nakon provedbe *screening* testa za nekoliko različitih uvjeta: zagrijavanje 3 minute na 60 °C ili 85 °C te brzo hlađenje na ledu ili sporo hlađenje na radnoj površini do sobne temperature. Usporedbe radi, određene su akceptorske aktivnosti bez prethodne renaturacije. Pretraživanje optimalnih uvjeta je provedeno s HatRNA^{Arg} (IEX vrpce #2 i #3 nakon dijalize) i enzimom HaArgRS1 (HVGH). Točke su uzimane na 2, 5, 10 i 15 minuta. Rezultati su prikazani na slici 4.3.



Slika 4.3. Akceptorska aktivnost HatRNA^{Arg} iz dijaliziranih IEX frakcija 2 i 3 nakon različitih uvjeta renaturacije. Vrpca #2: ● bez renaturacije, ● zagrijavanjem 3 minute na 60 °C i sporim hlađenjem do sobne temperature, ● 85 °C i sporim hlađenjem, ● 85 °C i brzim hlađenjem na ledu. Vrpca #3: ▲ bez renaturacije, ▲ 60 °C i sporo hlađenje, ▲ 85 °C i sporo hlađenje, ▲ 85 °C i brzo hlađenje.

Akceptorska aktivnost $\text{HatRNA}^{\text{Arg}}$ iz vrpce #2 je na svim uvjetima znatno viša od vrpce #3. Akceptorska aktivnost $\text{HatRNA}^{\text{Arg}}$ iz vrpce #3 ni na jednom uvjetu renaturacije ne prelazi 70% što je relativno nepovoljno za točnost u određivanju kinetičkih parametara ukupne reakcije aminoacilacije. Zbog toga je vrpca #3 odbačena za daljnje eksperimente. Iz rezultata je vidljivo kako $\text{HatRNA}^{\text{Arg}}$ iz vrpce #2 posjeduje najveću akceptorsku aktivnost kada se renaturira zagrijavajući 3 minute na 85 °C i brzo ohladi na ledu. Ovaj uvjet je proglašen optimalnim za renaturaciju tRNA^{Arg} i korišten je za renaturaciju svih tRNA^{Arg} prije ostalih kinetičkih eksperimenata.

Konačna kinetička karakterizacija svih pročišćenih tRNA^{Arg} obavljena je prema standardnom protokolu. Svaka tRNA^{Arg} aminoacilirana je vlastitom ArgRS (vidi kasnije). Rezultati kinetičkog eksperimenta prikazani su u tablici 4.2.

Tablica 4.2. Akceptorske aktivnosti $\text{EctRNA}^{\text{Arg}}$, $\text{SttRNA}^{\text{Arg}}$ #1, $\text{SttRNA}^{\text{Arg}}$ #2 i $\text{HatRNA}^{\text{Arg}}$ #2 određena aminoaciliranjem pripadajućim enzimima (HaArgRS1 u slučaju $\text{HatRNA}^{\text{Arg}}$).

	Akceptorska aktivnost / %
$\text{EctRNA}^{\text{Arg}}$	90
$\text{SttRNA}^{\text{Arg}}$ #1	69
$\text{SttRNA}^{\text{Arg}}$ #2	81
$\text{HatRNA}^{\text{Arg}}$ #2	86

$\text{EctRNA}^{\text{Arg}}$ posjeduje vrlo visoku akceptorsku aktivnost od oko 90 %. Akceptorska aktivnost određena za vrpce #1 i #2 $\text{SttRNA}^{\text{Arg}}$ je slična i poprima vrijednost od 70-80 % što nije idealno, ali je dovoljno za daljnje analize. Ponovljeno određivanje akceptorske aktivnosti $\text{HatRNA}^{\text{Arg}}$ #2 dalo je bolje rezultate, a ona ima vrijednost oko 85 % što je izvrsno za kasniju kinetičku karakterizaciju reakcije aminoacilacije obje varijante HaArgRS.

4.3. Optimizacija prekomjerne ekspresije i pročišćavanja ArgRS iz bakterija *E. coli*, *S. thermophilum* i *H. aurantiacus*

Kako bi se pronašli idealni uvjeti za dobivanje rekombinantnih ArgRS iz *E. coli*, *S. thermophilum* i *H. aurantiacus*, istraženi su uvjeti prekomjerne ekspresije, lize bakterijskih stanica i pročišćavanja koji daju najveći prinos proteina visoke čistoće. Za svaku ArgRS iz navedenih bakterija su na probnim uzgojima prvo određeni uvjeti optimalne ekspresije zatim najbolja metoda lize i konačno uvjeti u kojima se postiže najbolje razdvajanje od ostalih staničnih komponenti i drugih proteina. Na temelju dobivenih rezultata je izabrana optimalna kombinacija uvjeta ekspresije, lize i pročišćavanja koja je korištena u preparativne svrhe.

Detaljne metode i sastavi svih korištenih pufera prikazani su u poglavlju 3.2.3, a u daljnjem tekstu će biti naznačena samo vrsta pufera koja je korištena (Hepes, MES, Tris) i koncentracija soli jer su to jedini parametri koji će se mijenjati tijekom optimizacije.

Jedan od konačnih ciljeva ovog rada je priprema proteina za kristalizaciju. Imajući to na umu, pokušalo se optimirati postupak pročišćavanja tako da se pročišćeni protein u konačnici nalazi u puferu koji sadrži što manje detergenata i kriprotektanata te nisku ionsku jakost. Takva otopina proteina može poslužiti kao dobra početna točka kristalizacije.

4.3.1. ArgRS iz bakterije *E. coli*

Budući da je *E. coli* modelni organizam čiji su proteini vrlo stabilni, nije bilo potrebno znatno mijenjati početne uvjete ekspresije, lize i pročišćavanja koji su navedeni u poglavlju 3.2.3.

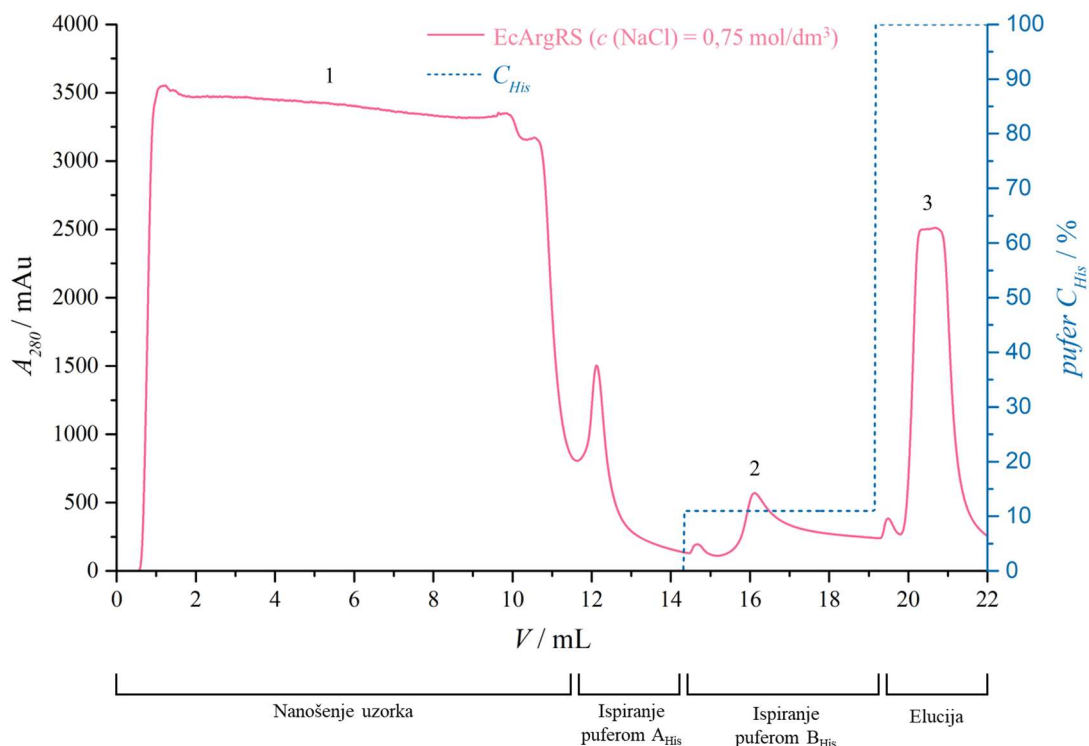
4.3.1.1. Optimizirani postupak prekomjerne ekspresije i pročišćavanja *EcArgRS*

Uzgoj bakterijske kulture i ekspresija rekombinantnog *EcArgRS* u plazmidu pET28b, provedena je u soju BL21(DE3) bakterije *E. coli* prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.3.1.

Metoda razbijanja bakterijske stanice koje je korištena za izolaciju *EcArgRS* u probnom uzgoju je sonikacija u Hepes puferu A (tablica 3.3) visoke ionske jakosti ($c(\text{NaCl}) = 0,75 \text{ mol/dm}^3$). Detaljan postupak pripreme proteinskog ekstrakta prikazan je u poglavlju 3.2.3.3.

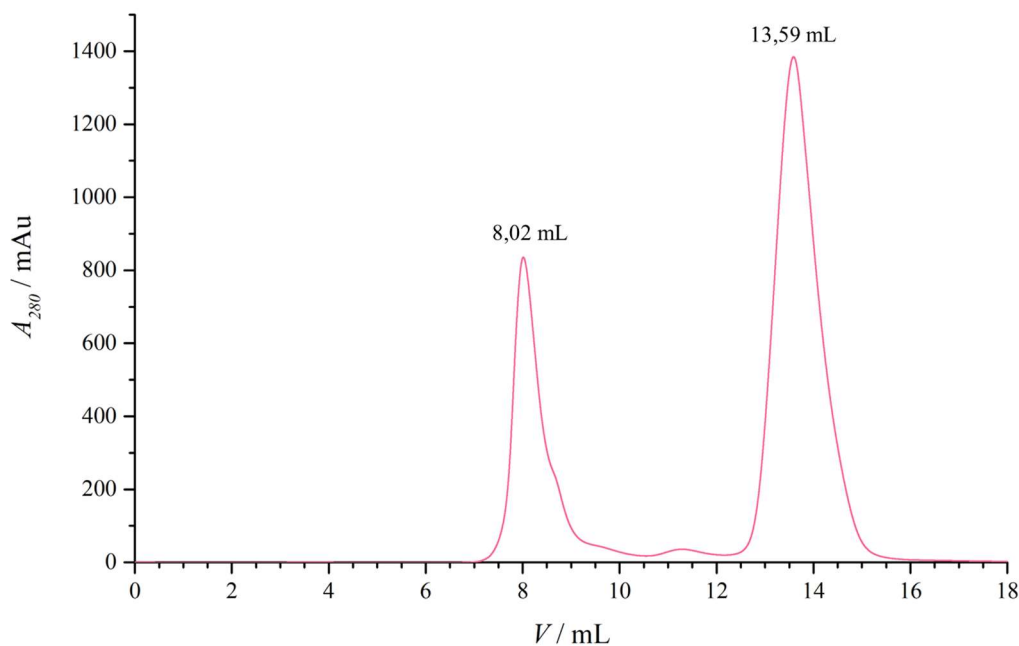
Prvi korak u pročišćavanju probnog uzgoja *EcArgRS* je afinitetna kromatografija na Ni-NTA agarozu, na koloni HisTrap 1 mL i uređaju *Äkta Pure 25*. Sastav pufera A_{His}, B_{His} i C_{His} prikazan je u tablici 3.4. Korišteni su puferi s Hepesom pri uvjetu ionske jakosti koji odgovara

$c(\text{NaCl}) = 0,75 \text{ mol/dm}^3$. Metoda je opisana u tablici 3.5. Rezultati kromatografije prikazani su na slici 4.4.



Slika 4.4. Kromatogram pročišćavanja afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu za probni uzgoj EcArgRS prema standardnoj metodi i standardnim puferima (Hepes, $c(\text{NaCl}) = 0,75 \text{ mol/dm}^3$). Vrpca #1 predstavlja nevezane stanične proteine, #2 nespecifično vezane proteine koji eluiraju tijekom ispiranja puferom B_{His} ($c(\text{imidazol}) = 40 \text{ mmol/dm}^3$), #3 EcArgRS.

Stanični proteini (1) se ne vežu na kolonu pa izlaze tijekom nanošenja uzorka na kolonu. Većina nespecifično vezanih proteina je eluirala s kolone u fazama ispiranja (2), a onečišćenje koje je izašlo u fazi elucije se dobro razlučuje od proteina od interesa (3) pa ih je bilo moguće razdvojeno skupiti u frakcijama. Skupljene su frakcije koje odgovaraju glavnom piku te je potom srednja frakcija pročišćena gel-filtracijskom kromatografijom prema metodi u tablici 3.7 na koloni Superdex 200 Increase 10/300 GL. Sastav mobilne faze prikazan je u tablici 3.6 (Hepes, $c(\text{NaCl}) = 0,75 \text{ mol/dm}^3$). Rezultati preparativne gel-filtracijske kromatografije su prikazani na slici 4.5.



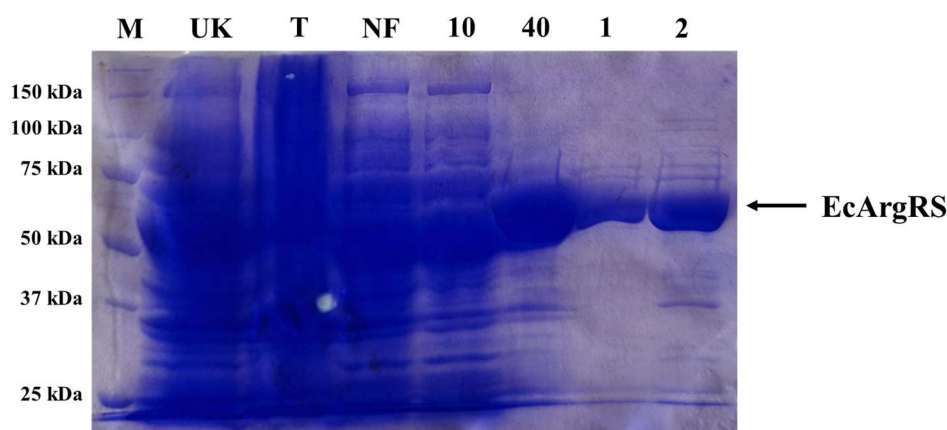
Slika 4.5. Kromatogram preparativne gel-filtracijske kromatografije na koloni Superdex 200 Increase 10/300 GL prema metodi opisanoj u tablici 3.7 u standardnoj mobilnoj fazi (Hepes, (NaCl) = 0,75 mol/dm³) nakon afinitetne kromatografije probnog uzgoja EcArgRS. Vrpca na 8,02 mL odgovara proteinskim agregatima dok na 13,59 mL eluira EcArgRS.

Kromatogram kalibracije svih korištenih gel-filtracijskih kolona prikazan je u dodatku D1. Kolone je potrebno kalibrirati uz smjesu proteina poznatih molekulskih masa kako bi se mogao utvrditi volumen pri kojem protein od interesa eluira i koja mu je molekulska masa. Korišten je standard tvrtke *Bio-Rad* čiji je sastav naveden u dodatku. Omjer razlika volumena elucije svakog proteina iz standarda i mrtvog volumena ($V_e - V_0$) te volumena kolone i mrtvog volumena ($V_c - V_0$) pokazuje linearnu ovisnost o logaritmu molekulskih masa proteina iz standarda. Baždarni dijagram iz dodatka D2 pokazuje ovisnost omjera razlika navedenih volumena o logaritmu molekulskih masa. Molarna masa proteina od interesa se može izračunati kada se u jednadžbu pravca uvrsti volumen elucije proteina od interesa.

Uspoređujući kromatogram na slici 4.5 s kalibracijskim kromatogramom i baždarnim dijagramom, utvrđeno je da pik na 13,59 mL odgovara EcArgRS (≈ 60 kDa) dok u mrtvom volumenu (8,01 mL) izlaze proteinski agregati i onečišćenja velike molekulske mase.

Pročišćavanjem probnog uzgoja EcArgRS utvrđeno je da EcArgRS ne pokazuje veliku nestabilnost u probnim uvjetima te da se preparativni uzgoj može provesti u istim uvjetima.

Pripremljeno je 6 L kulture. Ovaj volumen zahtijeva bržu i učinkovitiju metodu razbijanja stanica od sonikacije, stoga je korišten uređaj *Cell Disruptor*. Homogenizacija na uređaju *Cell Disruptor* je automatizirana metoda prilagođena za velike volumene kulture koje će biti uzgajane za preparativno pročišćavanje proteina. Ekstrakt proteina je nakon centrifugiranja filtriran pod vakuumom kroz pore veličine 0,22 μm . Za afinitetnu kromatografiju je korištena kolona HisTrap 5 mL te uređaj *Äkta Start*. Metoda i sastav pufera identični su gore navedenim. Preparativno pročišćavanje je dalo jednake rezultate kao i probno. Nakon afinitetne kromatografije, odrađena je SDS-PAGE analiza prema protokolu u poglavlju 3.2.3.8. Gel je prikazan na slici 4.6. Vidljivo je da je došlo do ispiranja EcArgRS i u fazi ispiranja puferom B_{His} ($c(\text{imidazol}) = 40 \text{ mmol/dm}^3$), vjerojatno radi preopterećenosti kolone, stoga je skupljeni eluat iz te faze ponovno podvrgnut afinitetnoj kromatografiji radi većeg prinosa. Preparativna gel-filtracijska kromatografija je provedena na koloni Superdex 200 HiLoad 16/600 prema standardnoj metodi i u standardnoj mobilnoj fazi niske ionske jakosti (Hepes, $c(\text{NaCl}) = 0,05 \text{ mol/dm}^3$). Rezultat analogan probnom pročišćavanju je prikazan u dodatku D5. Skupljene frakcije su ukoncentrirane u centrikonima prema postupku u poglavlju 3.2.3.9. Proteinu je određena čistoća i koncentracija u uređaju *NanoDrop One*. Dobiveni podaci su prikazani u tablici 4.3.



Slika 4.6. Gel dobiven SDS-PAGE metodom za analizu uspješnosti pročišćavanja EcArgRS. U jažicama se redom nalaze: M – marker, UK – suspenzija stanica nakon lize, T – talog netopljivih staničnih komponenti, NF – nevezana frakcija, 10 – ispiranje puferom A_{His} ($c(\text{imidazol}) = 10 \text{ mmol/dm}^3$), 40 – frakcija na početku ispiranja puferom B_{His} ($c(\text{imidazol}) = 40 \text{ mmol/dm}^3$), 1 – srednja frakcija u fazi ispiranja puferom B_{His} ($c(\text{imidazol}) = 40 \text{ mmol/dm}^3$), 2 – srednja frakcija u fazi elucije.

Tablica 4.3. Spektrofotometrijski određena koncentracija i čistoća te volumen pročišćenog uzorka EcArgRS.

	γ_0 / $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	$V_{\text{pročišćeno}}$ / μL	$A_{260/280}$
EcArgRS	23	2000	0,57

4.3.2. ArgRS iz bakterije *S. thermophilum*

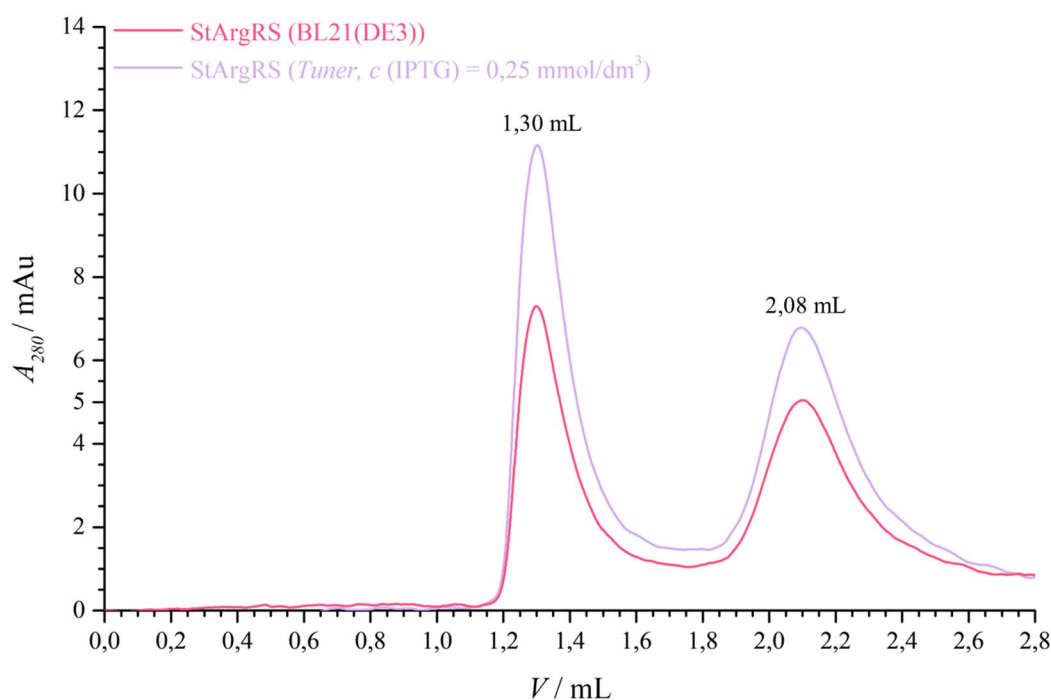
4.3.2.1. Optimizacija ekspresije StArgRS

Preliminarna istraživanja su pokazala da je StArgRS sklon agregaciji tijekom pročišćavanja. Kako bi se pronašli optimalni uvjeti u kojima će StArgRS biti stabilniji, najprije su istraženi različiti uvjeti ekspresije koji su prikazani u tablici 4.4. Uspoređen je udio monomera StArgRS eksprimiranog u soju BL21(DE3) *E. coli* te koeksprimiranog sa šaperonima 1 i 4. Prisutnost šaperona rezultira boljim smatanjem proteina pa se smanjuje mogućnost ostanka „ljepljivih“ hidrofobnih regija na površini proteina što uzrokuje nastanak proteinskih agregata. Nepravilno smatanje proteina može biti posljedica prebrze prekomjerne ekspresije pa je zbog toga uspoređena ekspresija u soju *Tuner* u odnosu na BL21(DE3). Soj *Tuner* posjeduje mutirani enzim permeazu pa za razliku od BL21(DE3), unos IPTG-a u stanicu ovisi o njegovoj koncentraciji u mediju. Koncentracija IPTG-a regulira brzinu ekspresije proteina. U daljnjem tekstu će radi preglednosti biti naznačena kombinacija proteina i korištenih šaperona kao StArgRS + Ch1/Ch4 (engl. *chaperone*)

Tablica 4.4. Probni uvjeti prekomjerne ekspresije StArgRS. Znakom + označena je kombinacija soja i šaperona koja je isprobana.

	soj <i>Tuner</i>	soj BL21(DE3)
bez šaperona	+	+
šaperoni 1 (DnaK, DnaJ, GrpE, GroES, GroEL)	-	+
šaperoni 4 (GroES, GroEL, Tig)	-	+

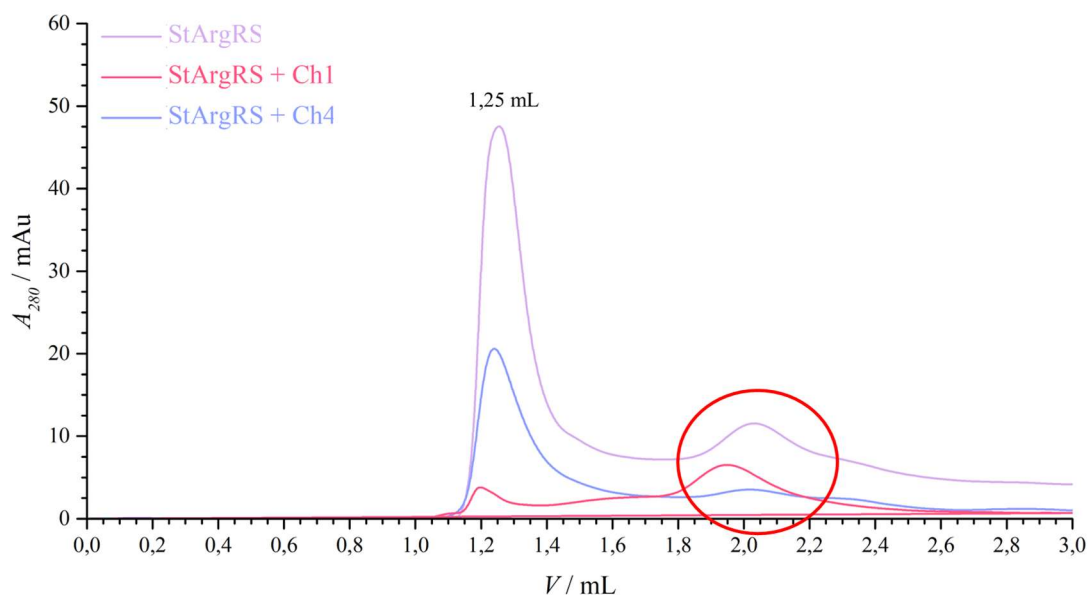
Plazmid pET28b koji nosi gen za StArgRS je transformiran u soj *Tuner* prema postupku u poglavlju 3.2.1.1. Ekspresija u soju *Tuner* je inducirana u uvjetu c (IPTG) = 0,25 mmol/dm³). Stanice su po standardnom postupku pripremljene za homogenizaciju na uređaju *Cell Disruptor* i afinitetnu kromatografiju u Hepes puferu visoke ionske jakosti (c (NaCl) = 0,75 mol/dm³) dok je za analitičku gel-filtracijsku kromatografiju korišten isti pufer niske ionske jakosti (c (NaCl) = 0,2 mol/dm³). Iz kromatograma prikazanog na slici 4.7 je izračunat udio monomera koji u oba slučaja iznosi oko 50 %.



Slika 4.7. Kromatogram analitičke gel-filtracijske kromatografije na koloni Superdex 200 Increase 5/150 GL uzoraka StArgRS uzgojenog u soju BL21(DE3) i StArgRS uzgojenog u soju *Tuner* (c (IPTG) = 0,25 mmol/dm³) u standardnoj mobilnoj fazi (Hepes, c (NaCl) = 0,2 mol/dm³) nakon afinitetne kromatografije na Ni-NTA agarozu. Na 1,30 mL eluiraju proteinski agregati, na 2,08 mL StArgRS.

Stanice BL21(DE3) bez i s koekspresijom šaperona su uzgajane prema postupku opisanom u poglavljima 3.2.3.1 i 3.2.3.2. Sonikacija, afinitetna i analitička gel-filtracijska kromatografija su provedene po standardnom postupku u Hepes puferima visoke ionske jakosti (c (NaCl) = 1 mol/dm³). Udio monomera se može odrediti iz kromatograma dobivenog gel-filtracijskom kromatografijom, a jednak je udjelu površine ispod pika koji odgovara

proteinu u ukupnoj površini ispod odgovarajuće krivulje (udio izračunat u programu *OriginPro 2016*). Na slici 4.8. prikazani su dobiveni kromatogrami.

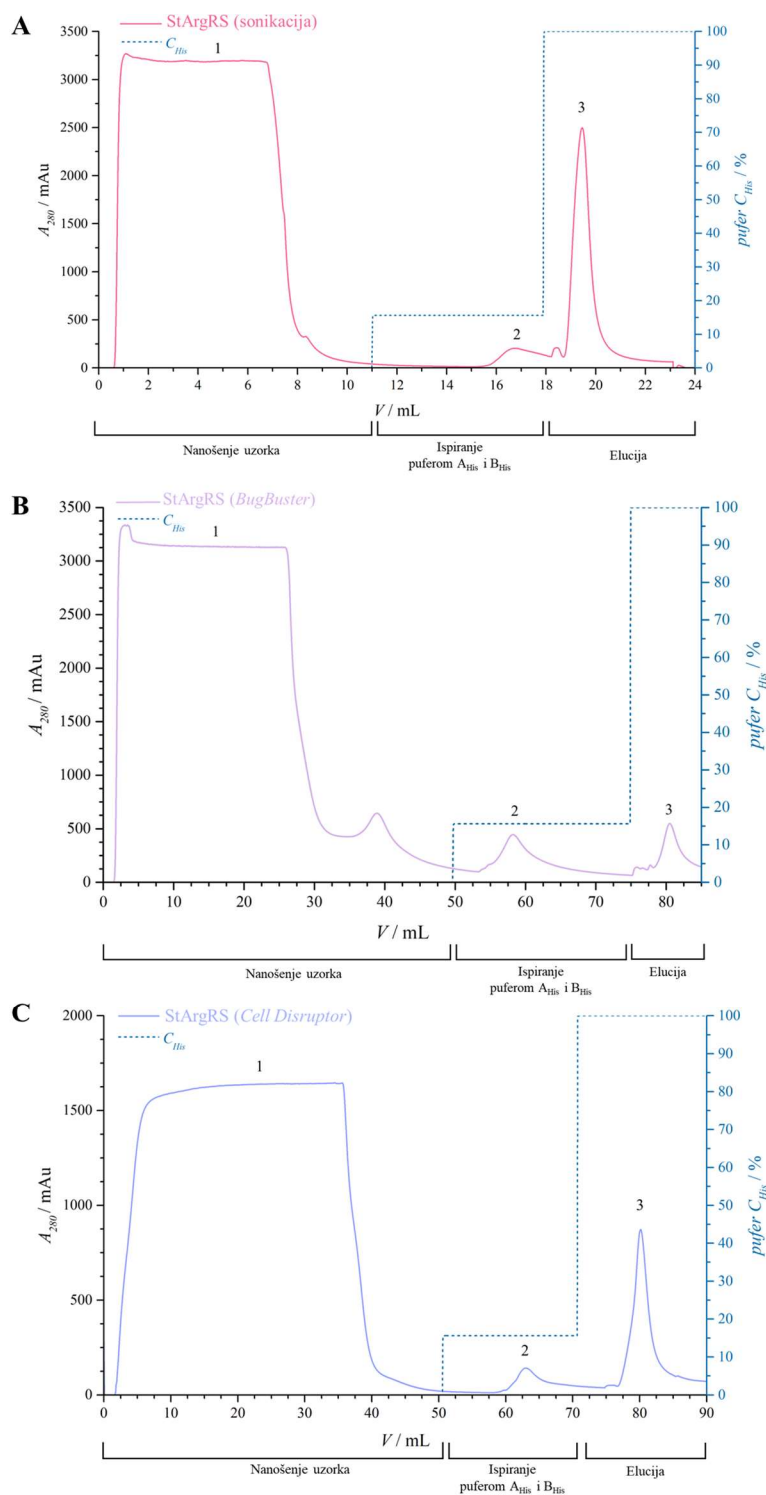


Slika 4.8. Kromatogrami dobiveni analitičkom gel-filtracijskom kromatografijom na koloni Superdex 200 Increase 5/150 GL uzoraka StArgRS, StArgRS + Ch1, StArgRS + Ch4 u standardnoj mobilnoj fazi (Hepes, $c(\text{NaCl}) = 1 \text{ mol/dm}^3$) nakon afinitetne kromatografije na Ni-NTA agarozu. Na 1,25 mL eluiraju proteinski agregati, u rasponu od 1,90 mL do 2,10 mL eluira različito eksprimiran StArgRS (zaokruženo crvenom bojom).

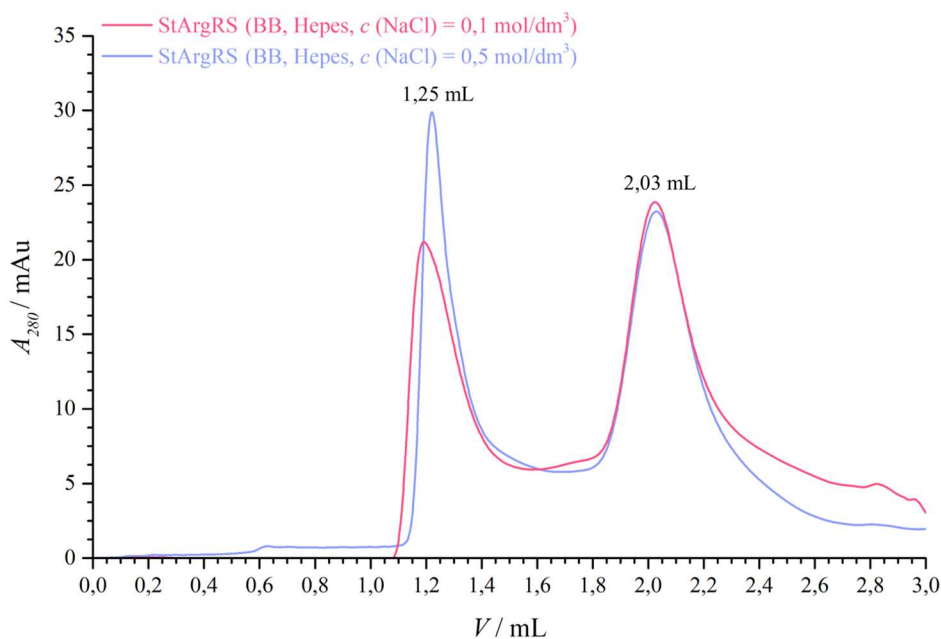
Iz kromatograma je vidljiv znatno manji prinos proteina StArgRS u slučaju koekspresije sa šaperonima. To je očekivano jer se stanice uzgajaju u mediju s dva antibiotika te se koekspresijom u stanici, uz protein od interesa, prekomjerno proizvode i proteini odgovorni za rezistenciju te šaperoni, a to rezultira bržom potrošnjom staničnih resursa i manjim prinosom proteina od interesa. StArgRS ($\approx 66 \text{ kDa}$) eluira s kolone u rasponu od 1,90 mL do 2,10 mL što je na slici zaokruženo crveno. Apsorpcijski maksimum za StArgRS koji je koekspimiran sa šaperonima 1 i 4 nije jednak samom StArgRS što može ukazivati na formiranje kompleksa sa šaperonima, najuočljivije sa šaperonom 1. Udio monomera StArgRS i StArgRS + Ch4 iznosi oko 30 % dok je za StArgRS + Ch1 udio monomera gotovo 85 %.

4.3.2.2. Optimizacija lize stanica s eksprimiranim StArgRS

Provjeren je utjecaj metode lize na prinos, čistoću i stabilnost StArgRS. Uspoređene su tri metode lize: sonikacija, liza komercijalnim reagensom *BugBuster* i homogenizacija u uređaju *Cell Disruptor*. Za ovaj eksperiment korišten je soj BL21(DE3). Stanice su pripremljene za lizu prema postupku navedenom u poglavlju 3.2.3.3. Pufer A, korišten za resuspendiranje bakterijske kulture prije razbijanja stanica sonikacijom i *Cell Disruptor*-om, sadržavao je Hepes i visoku koncentraciju soli ($c(\text{NaCl}) = 0,75 \text{ mol/dm}^3$). Liza pomoću reagensa *BugBuster* je provedena prema uputama proizvođača u uvjetu ionske jakosti koja odgovara $c(\text{NaCl}) \approx 0,5 \text{ mol/dm}^3$. Ionska jakost je niža jer u uvjetu visoke koncentracije soli može doći do precipitacije reagensa. Na slici 4.9 prikazani su kromatogrami afinitetne kromatografije proteinskog ekstrakta dobivenog svakom od navedenih metoda lize. Korišteni su Hepes puferi visoke ionske jakosti ($c(\text{NaCl}) = 0,75 \text{ mol/dm}^3$). Na slici 4.10 prikazani su rezultati analitičke gel-filtracijske kromatografije provedene u Hepes puferima u uvjetima niske ($c(\text{NaCl}) = 0,1 \text{ mol/dm}^3$) i srednje ionske jakosti ($c(\text{NaCl}) = 0,5 \text{ mol/dm}^3$). Kako bi se utvrdila čistoća dobivenog proteina, provedena je SDS-PAGE analiza čiji je rezultat prikazan u dodatku D5.



Slika 4.9. Afinitetna kromatografija StArgRS nakon lize a) sonikacijom, b) reagensom *BugBuster* i c) na uređaju *Cell Disruptor*. Vrpca #1 predstavlja nevezane stanične proteine, #2 nespecifično vezane proteine koji eluiraju tijekom ispiranja puferom B_{His} ($c(\text{imidazol}) = 40 \text{ mmol/dm}^3$), #3 StArgRS.



Slika 4.10. Kromatogrami dobiveni analitičkom gel-filtracijskom kromatografijom na koloni Superdex 200 Increase 5/150 GL uzoraka StArgRS ($V_e = 2,03$ mL) prema metodi opisanoj u tablici 3.5. nakon afinitetne kromatografije i lize reagensom *BugBuster* u standardnim Hepes puferima i a) $c(\text{NaCl}) = 0,1$ mol/dm³ i b) $c(\text{NaCl}) = 0,5$ mol/dm³. Proteinski agregati eluiraju na 1,25 mL.

Iako je gel-filtracijskom kromatografijom i analizom SDS-PAGE pokazano da je pročišćavanje nakon lize reagensom *BugBuster* dalo vrlo stabilne proteine visoke čistoće, visoka cijena reagensa i mali prinos proteina presudio je u odluci da se *BugBuster* ne koristi u daljnjim eksperimentima. Svi uzorci su analizirani analitičkom gel-filtracijskom kromatografijom te nije uočeno da metoda lize znatno utječe na agregaciju StArgRS. Homogenizacija stanica na uređaju *Cell Disruptor* se pokazala boljom metodom od sonikacije zbog visoke protočnosti i učinkovitosti.

4.3.2.3. Optimizacija pročišćavanja StArgRS

Prvi korak pročišćavanja je afinitetna kromatografija na Ni-NTA agarozu. Analitička gel-filtracijska kromatografija korištena je u svrhe provjere stabilnosti proteina i udjela monomera nakon afinitetne kromatografije. Za razdvajanje StArgRS (≈ 65 kDa) od agregata i supročišćenih proteina je isprobana ionsko-izmjenjivačka kromatografija jer su SDS-PAGE analize dobivenih frakcija nakon gel-filtracijske kromatografije pokazale prisutnost

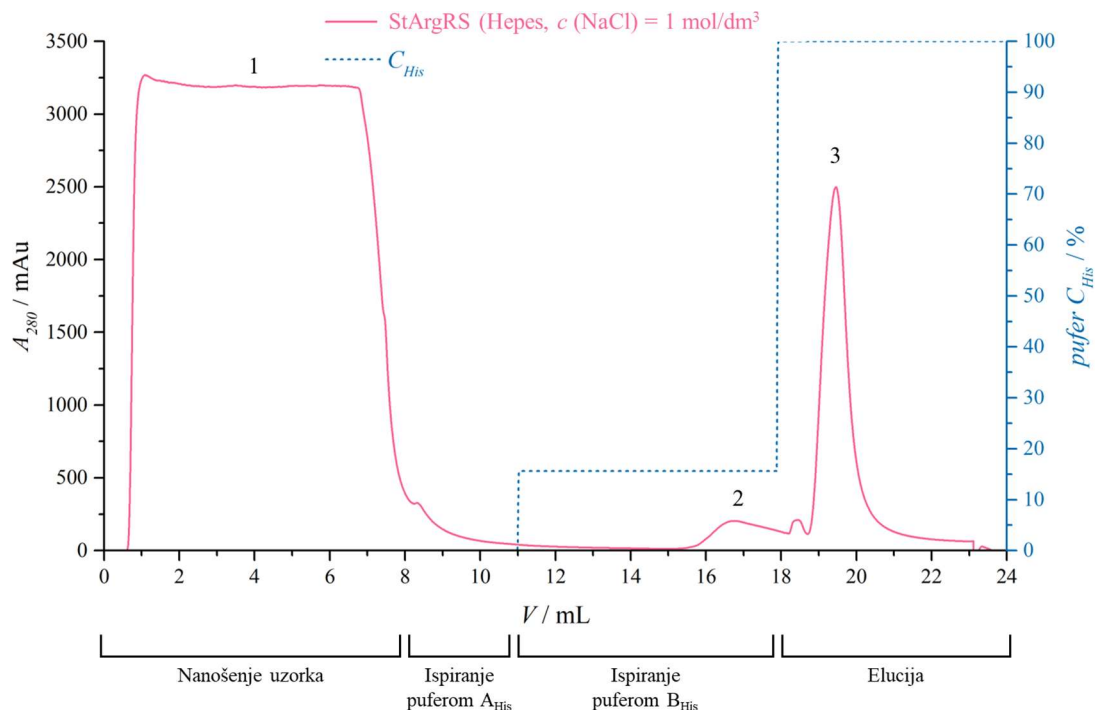
supročišćenih proteina. U puferu koji sadržava Hepes (pH = 7,5), StArgRS je ukupno negativno nabijena molekula te je zbog toga korištena kolona MonoQ s anionskim izmjenjivačem (pI (StArgRS) = 5,38)². U tablicama 4.5 i 4.6 su navedeni uvjeti ionske jakosti koji su isprobani za svaku od metoda pročišćavanja.

Tablica 4.5. Uvjeti ionske jakosti i udio monomera nakon afinitetne i ionsko-izmjenjivačke kromatografije u prvom probnom pročišćavanju StArgRS.

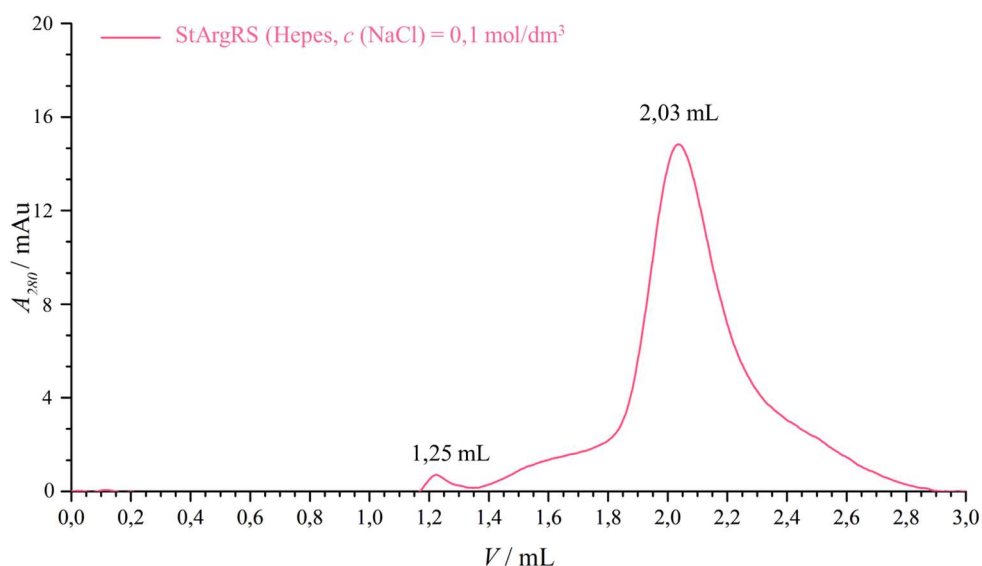
	Afinitetna kromatografija	Gel-filtracijska kromatografija	Ionsko-izmjenjivačka kromatografija
c (NaCl) / mol/dm ³	1	0,1	0,05
Udio monomera / %	≈ 100		/

Rezultat afinitetne kromatografije prvog probnog pročišćavanja u Hepes puferu visoke ionske jakosti je prikazan na slici 4.11. Analitičkom gel-filtracijskom kromatografijom je pokazano da udio monomera StArgRS u Hepes puferu niske ionske jakosti (c (NaCl) = 0,1 mol/dm³) nakon afinitetne kromatografije iznosi gotovo 100 % (slika 4.12). Frakcije StArgRS skupljene tijekom afinitetne kromatografije su prevedene u pufer IEX_{ArgRS, B} (Hepes, c (NaCl) = 0,1 mol/dm³). Odsoljavanje je provedeno na HiTrap Desalting koloni, a uzorak je zatim nanesen na MonoQ kolonu. Ionsko-izmjenjivačka kromatografija provedena je prema protokolu iz tablice 3.8, a rezultat je prikazan na slici 4.13. Gradijent pufera IEX_{ArgRS, B} je strmiji nakon 30 % jer ostatak nečistoća i agregata eluira u tom dijelu. Vrpca 1 koja eluira pri 15 % pufera IEX_{ArgRS, B} (c (NaCl) ≈ 0,45 mol/dm³) odgovara StArgRS. Vrpca je preširoka i nepravilna što znači da je vjerojatno došlo do supročišćavanja drugih proteina i agregata uslijed preniske ionske jakosti.

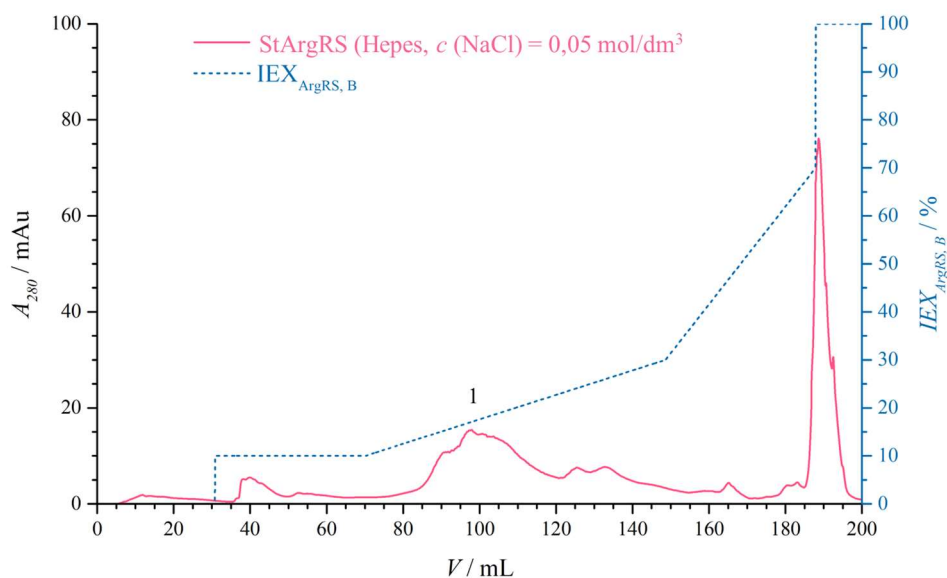
² Vrijednost pI dobivena uz pomoć alata ExPASy, https://web.expasy.org/compute_pi/



Slika 4.11. Kromatogram pročišćavanja StArgRS afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu u standardnom Hepes puferu ($c(\text{NaCl}) = 1 \text{ mol/dm}^3$). Vrpca #1 predstavlja nevezane stanične proteine, #2 nespecifično vezane proteine koji eluiraju tijekom ispiranja puferom B_{His} ($c(\text{imidazol}) = 40 \text{ mmol/dm}^3$), #3 StArgRS.



Slika 4.12. Kromatogram analitičke gel-filtracijske kromatografije StArgRS na koloni Superdex 200 Increase 5/150 GL nakon afinitetne kromatografije, u standardnoj mobilnoj fazi (Hepes, $c(\text{NaCl}) = 0,1 \text{ mol/dm}^3$). Proteinski agregati eluiraju na 1,25 mL, a StArgRS na 2,03 mL.



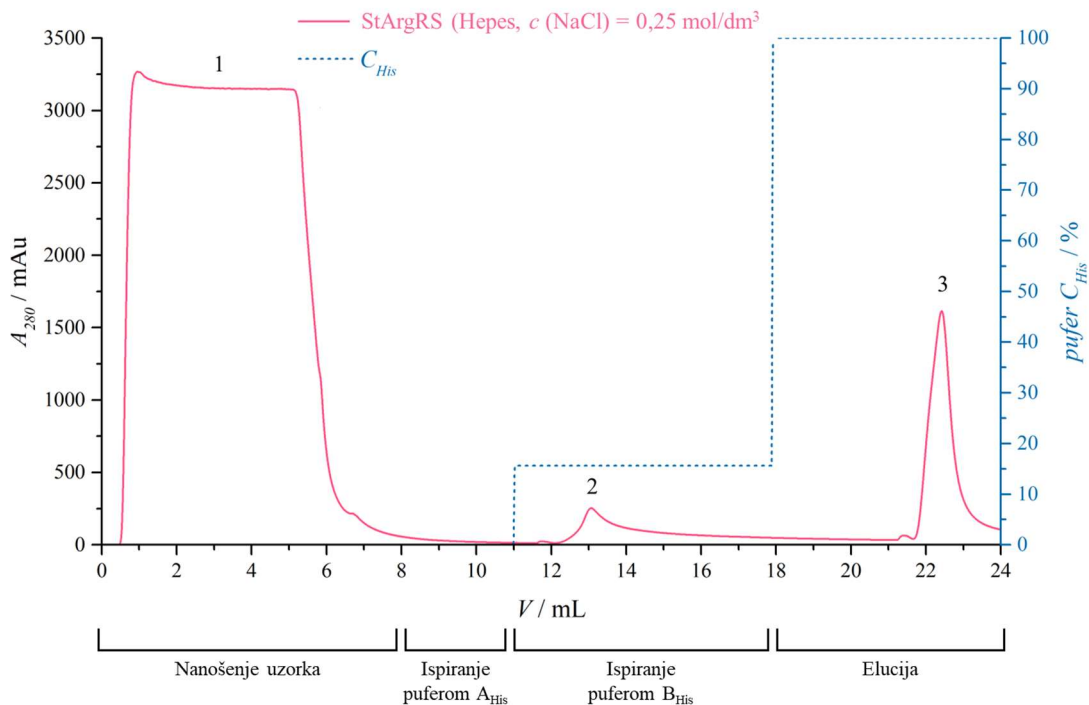
Slika 4.13. Kromatogram ionsko-izmjenjivačke kromatografije StArgRS nakon afinitetne kromatografije, u puferu IEX_{ArgRS, A} (Hepes, $c(\text{NaCl}) = 0,05 \text{ mol/dm}^3$) s linearnim povećanjima udjela pufera IEX_{ArgRS, B} (Hepes, $c(\text{NaCl}) = 1 \text{ mol/dm}^3$). Vrpca #1 predstavlja StArgRS.

Tablica 4.6. Uvjeti ionske jakosti i udio monomera nakon afinitetne i ionsko-izmjenjivačke kromatografije u drugom probnom pročišćavanju StArgRS.

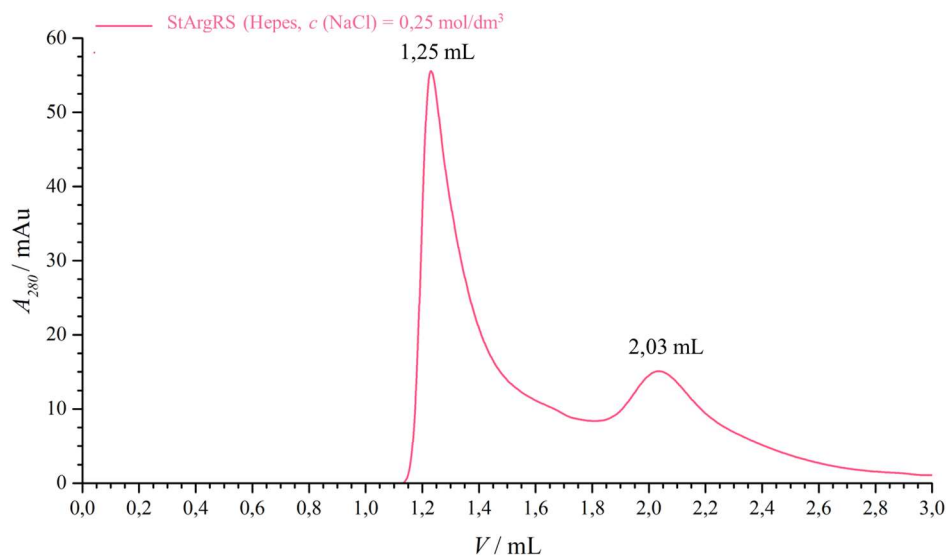
	Afinitetna kromatografija	Gel-filtracijska kromatografija	Ionsko-izmjenjivačka kromatografija
$c(\text{NaCl}) / \text{mol/dm}^3$	0,25	0,25	0,25
Udio monomera / %	30		30

Rezultat afinitetne kromatografije drugog probnog pročišćavanja u Hepes puferu niske ionske jakosti je prikazan na slici 4.14. Analitičkom gel-filtracijskom kromatografijom je pokazano da udio monomera StArgRS u Hepes puferu niske ionske jakosti ($c(\text{NaCl}) = 0,25 \text{ mol/dm}^3$) nakon afinitetne kromatografije iznosi oko 30 % (slika 4.15). Frakcije dobivene afinitetnom kromatografijom su u drugom koraku pročišćene ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom što je prikazano na slici 4.16. Budući da se protein nalazi u puferu niže koncentracije soli, nije bilo potrebe za odsoljavanjem te je kolona ekvilibrirana puferom IEX_{ArgRS} s $c(\text{NaCl}) = 0,25 \text{ mol/dm}^3$. StArgRS tip eluira pri 15 % pufera IEX_{ArgRS, B}

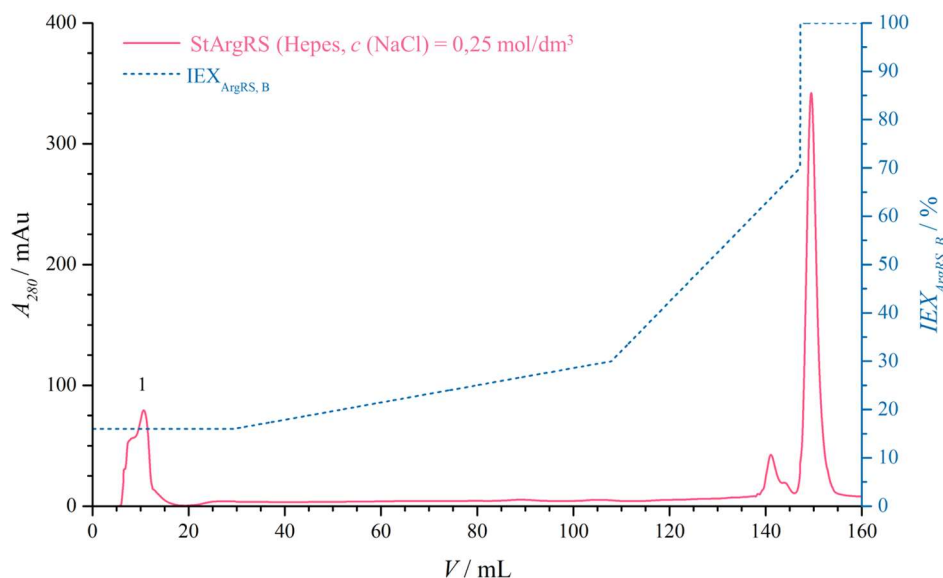
($c(\text{NaCl}) \approx 0,45 \text{ mol/dm}^3$). Rezultat ionsko-izmjenjivačke kromatografije je bolji nego u prethodnom pokusu. Vrpca je još uvijek široka, ali je prinos bolji.



Slika 4.14. Kromatogram pročišćavanja StArgRS afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu u standardnom Hepes puferu ($c(\text{NaCl}) = 0,25 \text{ mol/dm}^3$). Vrpca #1 predstavlja nevezane stanične proteine, #2 nespecifično vezane proteine koji eluiraju tijekom ispiranja puferom B_{His} ($c(\text{imidazol}) = 40 \text{ mmol/dm}^3$), #3 StArgRS.



Slika 4.15. Kromatogram analitičke gel-filtracijske kromatografije StArgRS na koloni Superdex 200 Increase 5/150 GL nakon afinitetne kromatografije, u standardnoj mobilnoj fazi (Hepes, $c(\text{NaCl}) = 0,25 \text{ mol/dm}^3$). Proteinski agregati eluiraju na 1,25 mL, a StArgRS na 2,03 mL.



Slika 4.16. Kromatogram ionsko-izmjenjivačke kromatografije uzorka StArgRS nakon afinitetne kromatografije, u puferu IEX_{ArgRS, A} (Hepes, $c(\text{NaCl}) = 0,25 \text{ mol/dm}^3$) s linearnim povećanjima udjela pufera IEX_{ArgRS, B} (Hepes, $c(\text{NaCl}) = 1 \text{ mol/dm}^3$). Vrpca #1 predstavlja StArgRS.

Na temelju dobivenih rezultata, utvrđeno je da bi najbolji protokol za pročišćavanje uključivao afinitetnu kromatografiju u puferu visoke ionske jakosti jer su gotovo svi proteini u tom slučaju

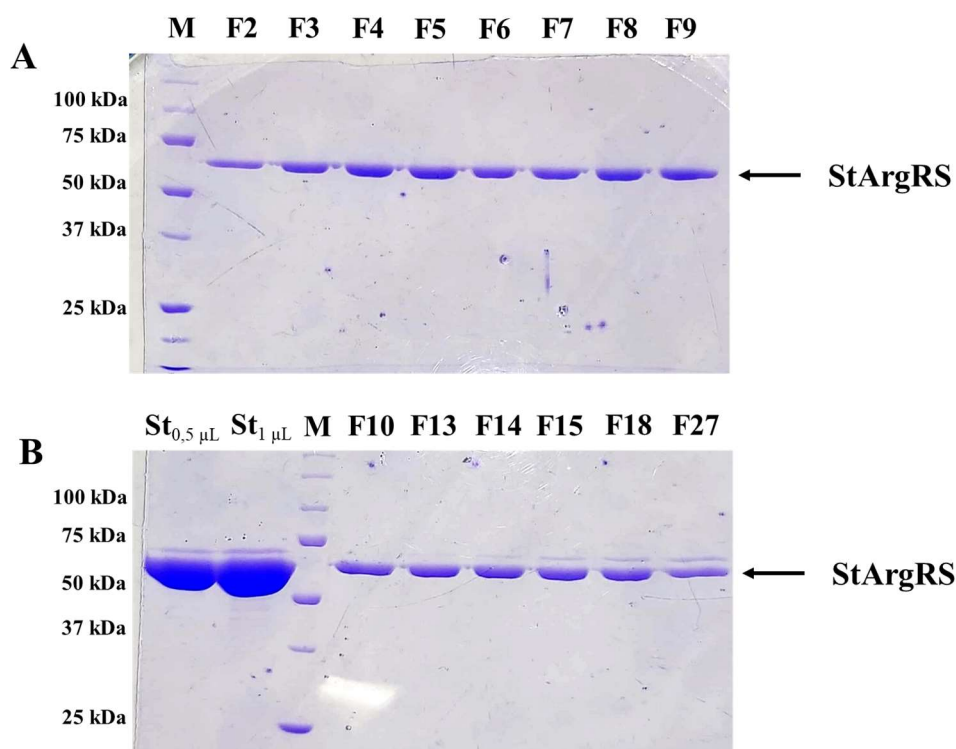
u formi monomera. Nakon afinitetne kromatografije u puferu niske ionske jakosti, samo 30-ak % proteina se nalazi u monomernom obliku. Visoka ionska jakost zasjenjuje naboje na površini proteina čime se umanjuje količina privlačnih sila između proteina i tako postiže veća stabilizacija. Ionska izmjena trebala bi se provoditi u puferu najniže moguće ionske jakosti, no u puferu s $c(\text{NaCl}) = 0,05 \text{ mol/dm}^3$ StArgRS izgledno agregira, stoga je najbolje upotrijebiti pufer bliži $c(\text{NaCl}) = 0,25 \text{ mol/dm}^3$. Konačno pročišćavanje bi trebalo uključivati blaži porast koncentracije pufera IEX_{ArgRS, B} od 0 % do 20-ak %.

4.3.2.4. Optimizirani postupak prekomjerne ekspresije i pročišćavanja StArgRS

Za konačni uzgoj StArgRS pripremljeno je 6 L kulture BL21(DE3) stanica transformiranih plazmidom pET28 s genom za StArgRS. Nije upotrijebljena koekspresija sa šaperonima 1 jer se u kasnijim eksperimentima nije mogao reproducirati rezultat dobiven u poglavlju 4.3.2.1. Moguće je da je pozitivan utjecaj šaperona 1 na stabilnost StArgRS zasjenjen prilikom uzgoja većih volumena bakterijske kulture u odnosu na male probne uzgoje.

Stanice su nakon centrifugiranja resuspendirane u Hepes puferu A visoke ionske jakosti ($c(\text{NaCl}) = 0,75 \text{ mol/dm}^3$). Liza stanica je provedena u uređaju *Cell Disruptor*. Afinitetna kromatografija na koloni HisTrap 5 mL je odrađena na kromatografskom sustavu *Äkta Start* po standardnom postupku. Rezultat je prikazan u dodatku D6. Sve frakcije su skupljene i pročišćene u obrocima od 1-5 mL preparativnom gel-filtracijskom kromatografijom na koloni Superdex 200 HiLoad 16/600 što je prikazano u dodatku D7. Korištena je standardna Hepes mobilna faza niže ionske jakosti ($c(\text{NaCl}) = 0,1 \text{ mol/dm}^3$). Ovaj korak je dodan kako bi se uklonili agregati i promijenio pufer, ali i zbog opetovane precipitacije proteina na koloni za odsoljavanje HiTrap. Elucija StArgRS postiže se pri 79,1 mL. Uzorak je nanesen na MonoQ kolonu u obrocima od 500 μL i pročišćen prema standardnom postupku počevši s $c(\text{NaCl}) = 0,1 \text{ mol/dm}^3$. Iz kromatograma na slici D8 se može vidjeti da je StArgRS eluirao od 14 % do 20 % pufera IEX_{ArgRS, B}. Frakcije su analizirane metodom SDS-PAGE kako bi se potvrdila prisutnost StArgRS i utvrdila količina nečistoća. Analizirane su frakcije s ionsko-izmjenjivačke kromatografije (F2-F27) i alikvot ukoncentriranog uzorka ($\text{St}_{0,5} \mu\text{L}$, $\text{St}_1 \mu\text{L}$). Očekivana pozicija StArgRS je između 75 kDa i 50 kDa. Na gelu sa slike 4.17 je vidljiva je jedna pruga iznad glavne koja dolazi do izražaja u frakcijama pred kraj vrpce na ionsko-izmjenjivačkoj kromatografiji kada je ionska jakost viša (F14-F27). Kako bi se ispitalo o kojem se proteinu radi, onečišćenje je analizirano na spektrometru masa. Radi se o dvama

proteinima ArnA i SlyD koji se često supročišćavaju uz rekombinantne proteine s histidinskim privjeskom.³⁴ Podaci o koncentraciji i čistoći uzoraka prikazani su u tablici 4.7.



Slika 4.17. Gel dobiven SDS-PAGE metodom za analizu uspješnosti pročišćavanja StArgRS. U jažicama se nalaze A) M – marker, F2-F9 – frakcije 2-9 dobivene ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom, B) St 0,5 μL/1 μL – naneseo 0,5/1 μL ukoncentriranog pročišćenog StArgRS, F10-F27 – odabrane frakcije iz raspona 10-27 dobivene ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom.

Tablica 4.7. Spektrofotometrijski određena koncentracija i čistoća te volumen pročišćenog uzorka StArgRS iz 6 L kulture.

	γ_0 / $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	$V_{\text{pročišćeno}}$ / μL	$A_{260/280}$
StArgRS	7,9	400	0,58

Nakon određivanja optimalnog postupka ekspresije, lize i pročišćavanja StArgRS, dva mutanta ovog enzima su pripremljena u istim uvjetima. Plazmidi pET28b s ukloniranim genima za mutante StArgRS koji umjesto motiva VLVQ sadrže HLVQ odnosno HLGQ motiv, su bili pripremljeni tijekom istraživačkog rada dr. sc. Vladimira Zankija. Dobiveni proteini su

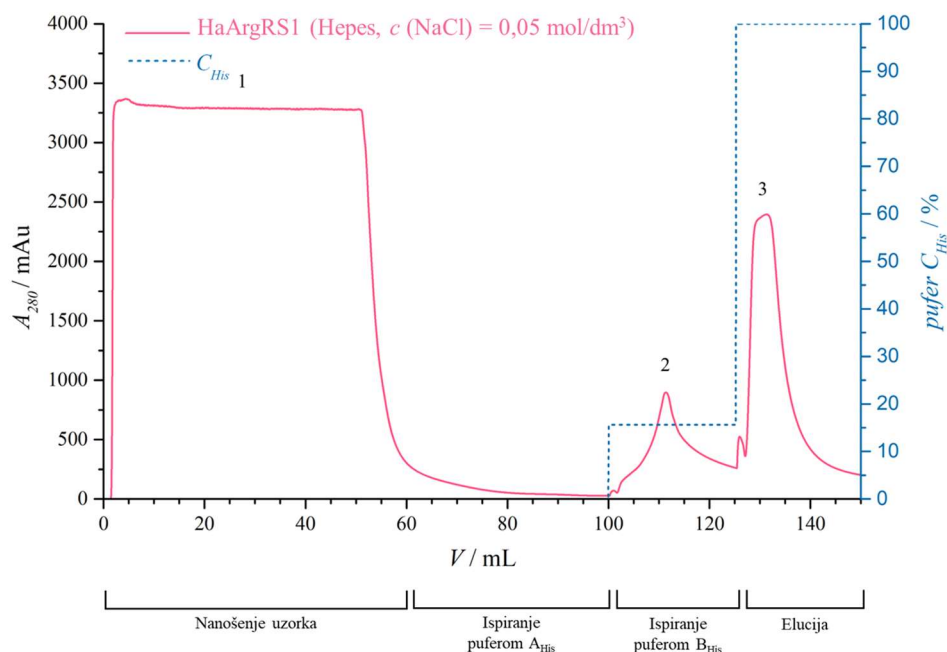
poslužili za proučavanje utjecaja povratka motiva VLVQ u kanonski HXGH na funkcionalnost enzima. Podaci o koncentraciji i čistoći uzorka te SDS-PAGE nalaze se u dodatku D9 i D10.

4.3.3. Tipični ArgRS iz bakterije *H. aurantiacus*

Probni uzgoj HaArgRS1 odrađen je u jednakim uvjetima kao i EcArgRS. Pokazalo se da je HaArgRS1 stabilan protein te daljnja optimizacija prekomjerne ekspresije, lize i pročišćavanja nije bila potrebna. Preparativni uzgoj proveden je u puferima niže ionske jakosti te se pokazalo da je protein stabilan u puferu najniže ispitane ionske jakosti ($c(\text{NaCl}) = 0,05 \text{ mol/dm}^3$).

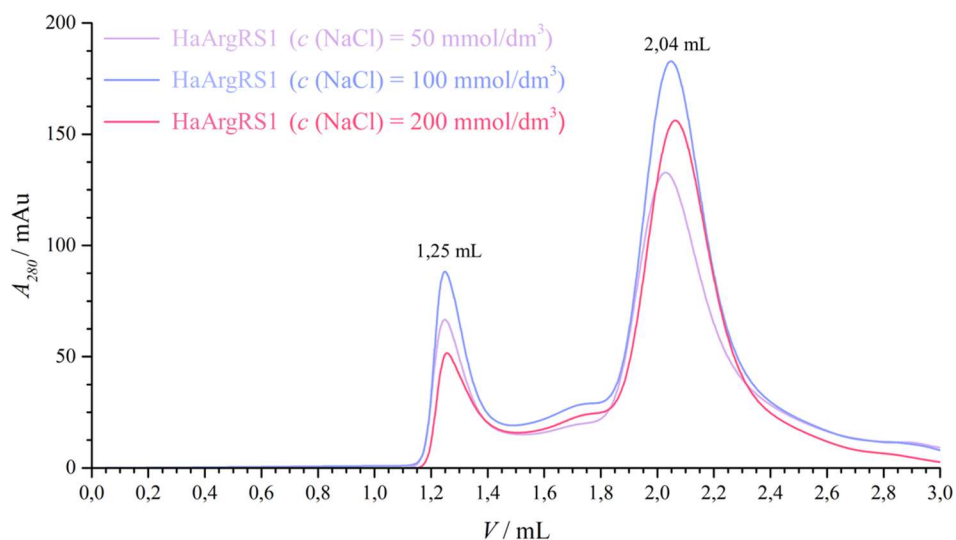
4.3.3.1. Optimizirani postupak prekomjerne ekspresije i pročišćavanja HaArgRS1

Prekomjerna ekspresija arginil-tRNA-sintetaze s kanonskim motivom HVGH iz *H. aurantiacus* (HaArgRS1) provedena je u soju BL21(DE3) bakterije *E. coli* po standardnom postupku. Uzgojeno je 6 L bakterijske kulture koja je centrifugirana te resuspendirana u Hepes puferu A srednje ionske jakosti ($c(\text{NaCl}) = 0,5 \text{ mol/dm}^3$). Razbijanje bakterijskih stanica je provedeno u uređaju *Cell Disruptor*. Afinitetna kromatografija napravljena je u standardnim puferima (Hepes, $c(\text{NaCl}) = 0,5 \text{ mol/dm}^3$) i po standardnoj metodi na uređaju *Äkta Start*. Rezultat afinitetne kromatografije je prikazan na slici 4.18.

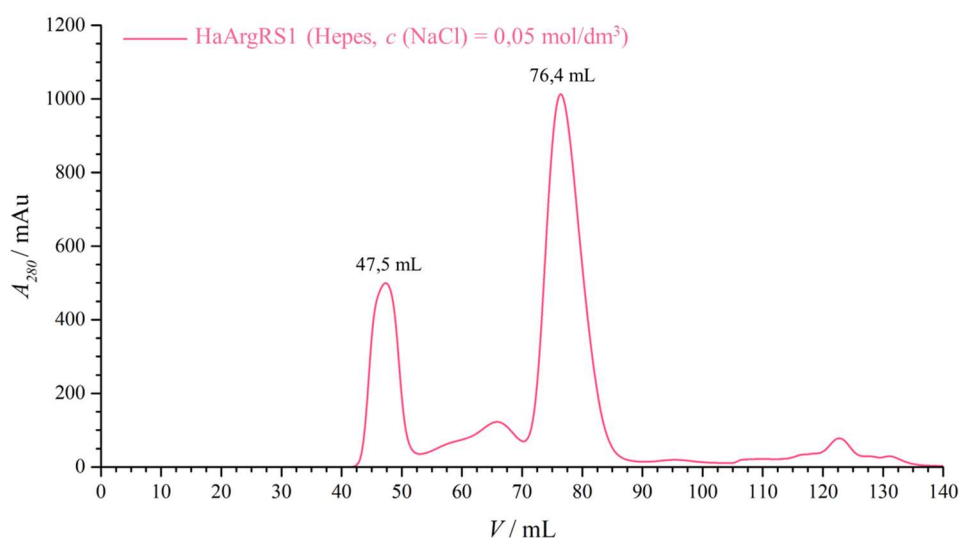


Slika 4.18. Kromatogram pročišćavanja HaArgRS1 afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu u standardnom Hepes puferu ($c(\text{NaCl}) = 0,5 \text{ mol/dm}^3$). Vrpca #1 predstavlja nevezane stanične proteine, #2 nespecifično vezane proteine koji eluiraju tijekom ispiranja puferom B_{His} ($c(\text{imidazol}) = 40 \text{ mmol/dm}^3$), #3 HaArgRS1.

Stabilnost proteina u puferu niže ionske jakosti provjerena je analitičkom gel-filtracijskom kromatografijom na koloni Superdex 200 Increase 5/150 GL u puferima različite ionske jakosti: $c(\text{NaCl}) = 0,05 \text{ mol/dm}^3$, $c(\text{NaCl}) = 0,1 \text{ mol/dm}^3$ i $c(\text{NaCl}) = 0,2 \text{ mol/dm}^3$. Iz kromatograma na slici 4.19 se može utvrditi da je protein stabilan u svim uvjetima jer je udio monomera u sva tri slučaja veći od 85 %. Za pripremu proteina za kristalizaciju, poželjno je imati što niži udio soli u otopini pa je pročišćavanje nastavljeno u puferu najniže ionske jakosti ($c(\text{NaCl}) = 0,05 \text{ mol/dm}^3$). Drugi korak pročišćavanja HaArgRS1 je preparativna gel-filtracijska kromatografija na koloni Superdex 200 HiLoad 16/600 u standardnoj mobilnoj fazi (Hepes, $c(\text{NaCl}) = 0,05 \text{ mol/dm}^3$). Dobiveni kromatogram je prikazan na slici 4.20. HaArgRS1 ($\approx 65 \text{ kDa}$) eluira pri 76,4 mL. Udio monomera iznosi oko 70 %. Sve frakcije su skupljene i ukoncentrirane u centrikonima. Proteinu je na uređaju *NanoDrop One* izmjerena koncentracija i čistoća koja je prikazana u tablici 4.8.



Slika 4.19. Kromatogram dobiven analitičkom gel-filtracijskom kromatografijom na koloni Superdex 200 Increase 5/150 GL uzorka HaArgRS1 ($V_e = 2,04$ mL) nakon afinitetne kromatografije, u standardnoj mobilnoj fazi pri različitim koncentracijama soli. Na 1,25 mL eluiraju proteinski agregati.



Slika 4.20. Kromatogram dobiven preparativnom gel-filtracijskom kromatografijom na koloni Superdex 200 HiLoad 16/600 uzorka HaArgRS1 ($V_e = 76,4$ mL) u standardnoj mobilnoj fazi (Hepes, $c(\text{NaCl}) = 0,05$ mol/dm³) nakon afinitetne kromatografije. Na 47,5 mL eluiraju proteinski agregati.

Tablica 4.8. Spektrofotometrijski određena koncentracija i čistoća te volumen pročišćenog uzorka HaArgRS1 iz 6 L kulture.

	$\gamma_0 / \mu\text{g}/\mu\text{L}$	$V_{\text{pročišćeno}} / \mu\text{L}$	$A_{260/280}$
HaArgRS1	47	3000	0,54

4.3.4. Atipični ArgRS iz bakterije *H. aurantiacus*

4.3.4.1. Optimizacija ekspresije HaArgRS2

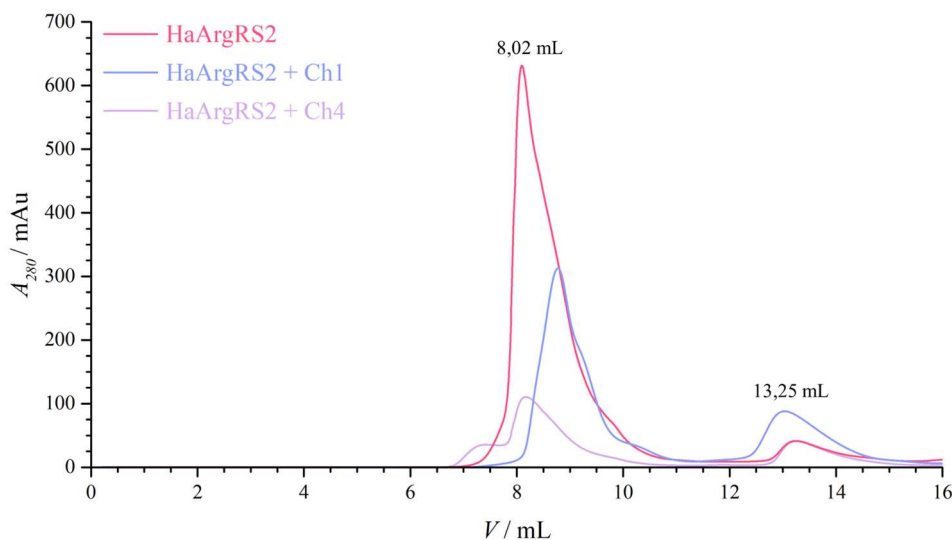
Prethodno dobiveni rezultati istraživačke grupe ukazuju na činjenicu da je HaArgRS2 izrazito nestabilan protein koji u većini ispitanih uvjeta gotovo sav prelazi u proteinske agregate. Krivo smotani proteini često su uzrok neobjašnjive tendencije agregiranju. Protein je koekspimiran sa šaperonima iz skupine 1 i 4 te bez šaperona u osnovnom ekspresijskom soju BL21(DE3). Ukoliko je ekspresija proteina prebrza, svi se proteini čak ni uz pomoć šaperona ne mogu ispravno smotati pa su već u stanici prisutni u obliku agregata. Kako bi se provjerila ova teorija, pET28a plazmid koji sadrži gen za HaArgRS2 je (ko)transformiran u ekspresijske sojeve *Tuner* i *Rosetta* bakterije *E. coli*. Soj *Rosetta* je optimiran za translaciju eukariotskih kodona pa je biosinteza prokariotskog proteina usporena zbog dohvaćanja odgovarajućih tRNA^{aa}. Probni uvjeti prekomjerne ekspresije HaArgRS2 su prikazani u tablici 4.9.

Tablica 4.9. Probni uvjeti prekomjerne ekspresije HaArgRS2. Znakom + označena je kombinacija uvjeta koja je isprobana.

	soj BL21(DE3)	soj <i>Tuner</i>	soj <i>Rosetta</i>
bez šaperona	+	-	+
šaperoni 1 (DnaK, DnaJ, GrpE, GroES, GroEL)	+	$c(\text{IPTG}) = 0,05 \text{ mmol}/\text{dm}^3$	+
		$c(\text{IPTG}) = 0,25 \text{ mmol}/\text{dm}^3$	+
šaperoni 4 (GroES, GroEL, Tig)	+	-	-

Stanice BL21(DE3) bez i s koekspresijom šaperona su uzgajane prema postupku opisanom u poglavljima 3.2.3.1 i 3.2.3.2. Sonikacija je provedena u blažim uvjetima 5 puta po 20 sekundi

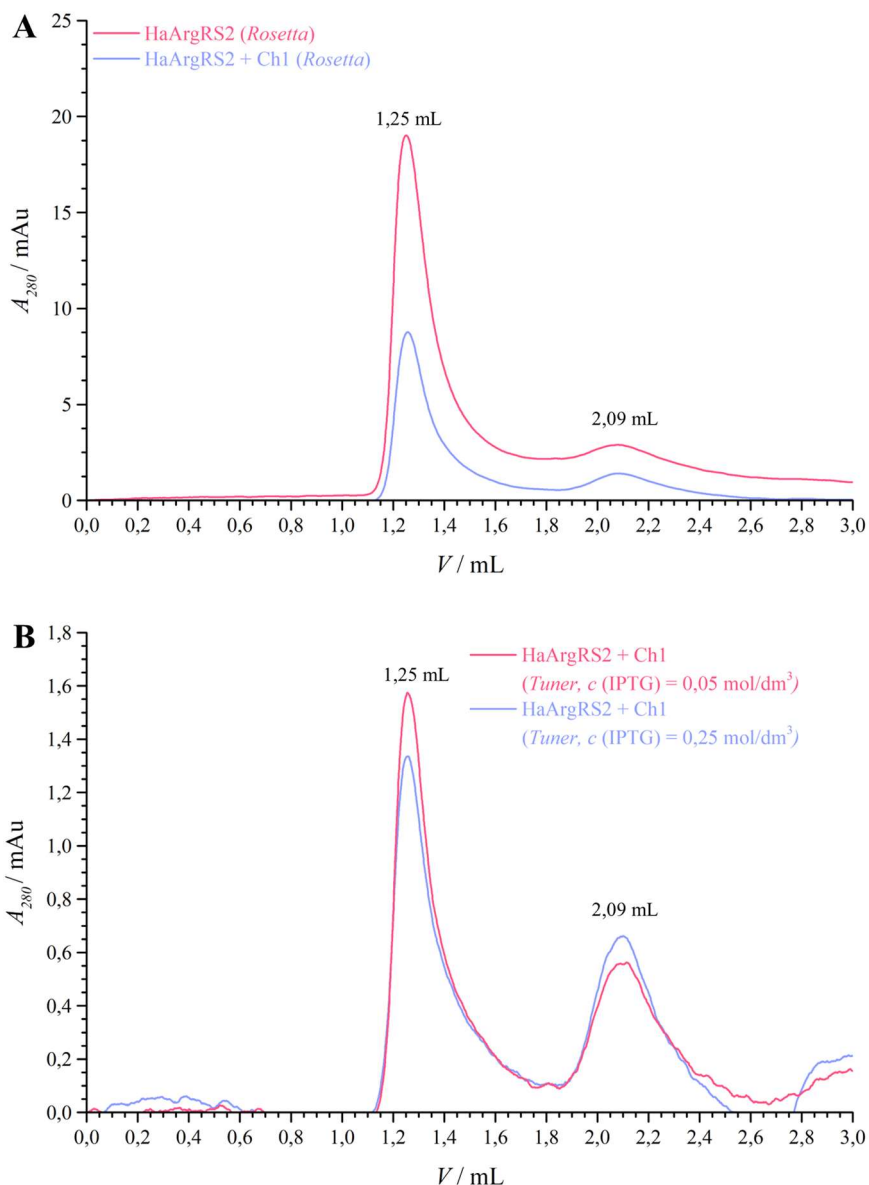
s 1 minutom pauze. Afinitetna i gel-filtracijska kromatografija su provedene po standardnom postupku u MES puferima visoke ionske jakosti ($c(\text{NaCl}) = 1 \text{ mol/dm}^3$). Iz omjera površina ispod pikova dobivenih preparativnom gel-filtracijskom kromatografijom na slici 4.21 je utvrđeno da udio monomera HaArgRS2 ($\approx 64 \text{ kDa}$, $13,25 \text{ mL}$) u uzorcima dobivenim koekspresijom sa šaperonima 1 i 4 iznosi oko 30 %. U uvjetima bez šaperona gotovo sav HaArgRS2 agregira.



Slika 4.21. Kromatogrami dobiveni preparativnom gel-filtracijskom kromatografijom na koloni Superdex 200 Increase 10/300 GL uzoraka HaArgRS2, HaArgRS2 + Ch1, HaArgRS2 + Ch4 u standardnoj mobilnoj fazi (MES, $c(\text{NaCl}) = 1 \text{ mol/dm}^3$) nakon afinitetne kromatografije. HaArgRS2 eluira na 13,25 mL dok na 8,02 mL eluiraju proteinski agregati.

U sojeve *Rosetta* i *Tuner* su transformirani plazmidi pET28a koji sadrži gen za HaArgRS2 i plazmid koji sadrži gene za šaperone iz skupine 1 po postupku opisanom u poglavlju 3.2.1.1. Indukcija ekspresije obavljena je prema standardnom postupku. Uzgojene su dvije kulture od soja *Tuner* (HaArgRS2 + Ch1) od kojih je jedna eksprimirana pri koncentraciji IPTG-a $c = 0,05 \text{ mmol/dm}^3$, a druga pri $c = 0,25 \text{ mmol/dm}^3$. Liza na uređaju *Cell Disruptor*, afinitetna kromatografija i gel-filtracijska kromatografija odrađene su prema standardnim postupcima u Tris puferu srednje ionske jakosti ($c(\text{NaCl}) = 0,5 \text{ mol/dm}^3$). Rezultati prikazani na slici 4.22 pokazuju da uzgoj u soju *Rosetta* daje oko 20 % monomernih HaArgRS2 ($V_e = 2,09 \text{ mL}$) dok koekspresija HaArgRS sa šaperonima 1 u soju *Tuner* daje značajno bolje

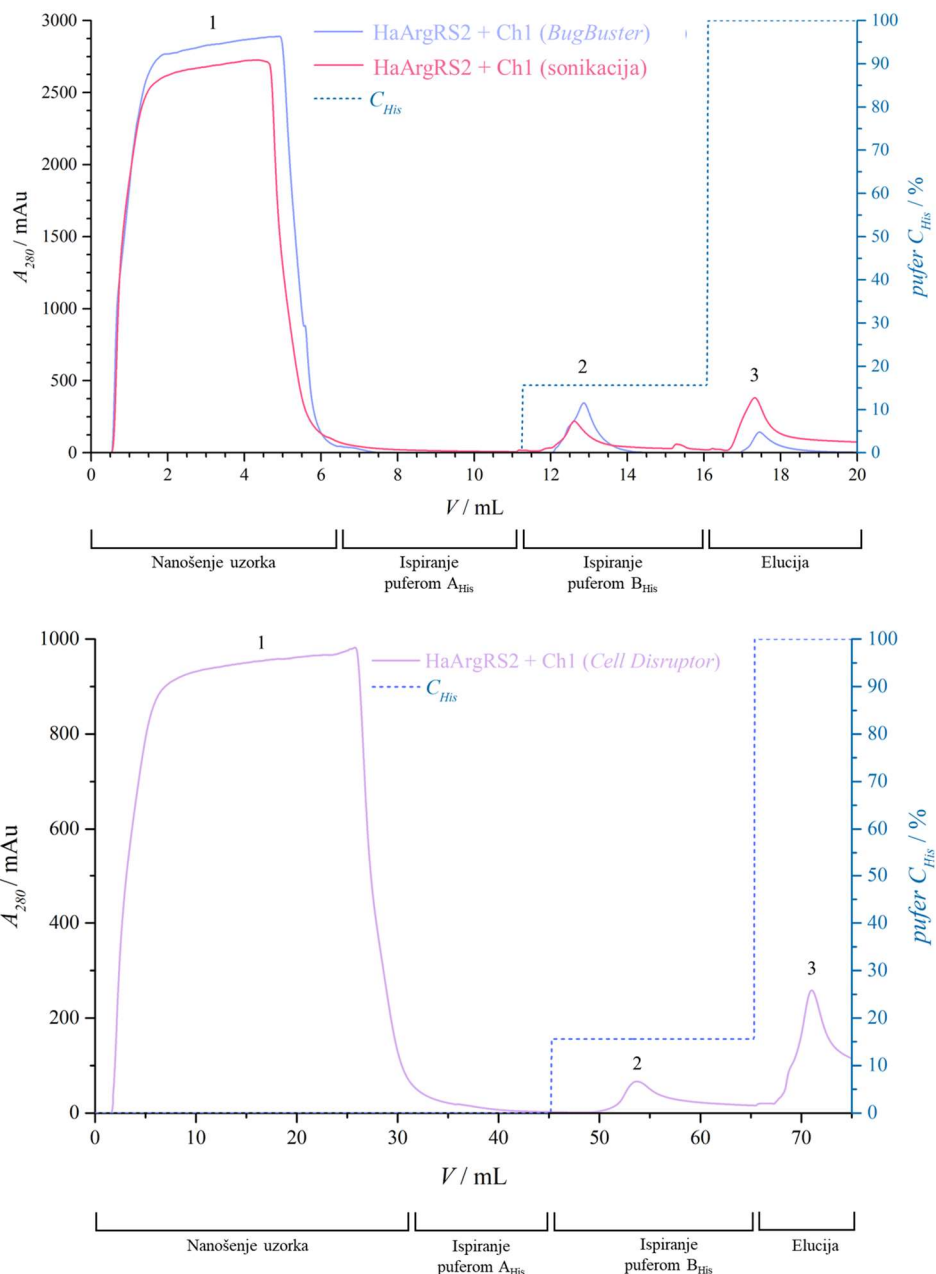
rezultate u odnosu na soj *Rosetta* i BL21(DE3). Udio monomera u oba slučaja ($c(\text{IPTG}) = 0,05 \text{ mmol/dm}^3$ i $c(\text{IPTG}) = 0,25 \text{ mmol/dm}^3$) iznosi oko 50 %.



Slika 4.22. Kromatogrami dobiven analitičkom gel-filtracijskom kromatografijom na koloni Superdex 200 Increase 5/150 GL nakon afinitetne kromatografije proteinskog ekstrakta dobivenog iz soja A) *Rosetta* transformiranog plazmidima s 1) genom za HaArgRS2 2) genima za HaArgRS2 + Ch1 i B) *Tuner* transformiranog plazmidima s genom za HaArgRS2 + Ch1. Indukcija je provedena u 1) $c(\text{IPTG}) = 0,05 \text{ mmol/dm}^3$, 2) $c(\text{IPTG}) = 0,25 \text{ mmol/dm}^3$ u standardnim puferima (Tris, $c(\text{NaCl}) = 0,5 \text{ mol/dm}^3$). HaArgRS 2 eluira na 2,09 mL, proteinski agregati eluiraju na 1,25 mL.

4.3.4.2. Optimizacija lize stanica s eksprimiranim HaArgRS2

Uspoređene su tri metode lize stanica: sonikacija, kemijska liza reagensom *BugBuster* i homogenizacija u uređaju *Cell Disruptor*. Za ovaj eksperiment korišten je soj BL21(DE3) te koekspresija HaArgRS2 + Ch1 jer je teško uspoređivati efektivnost metode lize bez šaperona zbog vrlo niskog prinosa monomernih proteina. Stanice su pripremljene za lizu prema postupku navedenom u poglavlju 3.2.3.3. Stanice su sonicirane u blažim uvjetima: 6 puta u trajanju od 20 sekundi s razmacima od 1 minutu. Pufer A korišten za resuspendiranje bakterijske kulture prije razbijanja stanica sonikacijom i *Cell Disruptor*-om sadržavao je MES i srednju koncentraciju soli ($c(\text{NaCl}) = 0,5 \text{ mol/dm}^3$). Liza pomoću reagensa *BugBuster* je provedena prema uputama proizvođača u uvjetu ionske jakosti koja odgovara $c(\text{NaCl}) \approx 0,5 \text{ mol/dm}^3$. Na slici 4.23 prikazani su kromatogrami nakon afinitetne kromatografije proteinskog ekstrakta dobivenog svakom od navedenih metoda lize. Korišteni su MES puferi srednje ionske jakosti ($c(\text{NaCl}) = 0,5 \text{ mol/dm}^3$).



Slika 4.23. Afinitetna kromatografija na Ni-NTA agarozu HaArgRS2 + Ch1 nakon lize sonikacijom, i reagensom *BugBuster* (gore) te na uređaju *Cell Disruptor* (dolje). Vrpca #1 predstavlja nevezane stanične proteine, #2 nespecifično vezane proteine koji eluiraju tijekom ispiranja puferom B_{His} (c (imidazol) = 40 mmol/dm³), #3 HaArgRS2.

Količina proteina dobivena lizom stanica reagensom *BugBuster* je niska u odnosu na sonikaciju i *Cell Disruptor*. Iako *BugBuster* razara stanice u blagim uvjetima povoljnim za nestabilne proteine, u slučaju HaArgRS2, ne pridonosi stabilizaciji (dodatak D11).

Homogenizacija na uređaju *Cell Disruptor* je učinkovita metoda koja je jednostavnija i brža od sonikacije. Nije uočena dodatna destabilizacija proteina u odnosu na sonikaciju (dodatak D12).

4.3.4.3. Optimizacija pročišćavanja *HaArgRS2*

Ispitan je utjecaj pH na stabilnost *HaArgRS2*. Uz Hepes, korišteni su MES (pH = 6,5) i Tris (pH = 8,0) puferi. Budući da je pI (*HaArgRS2*) = 7,68³, proteini će u navedenim uvjetima nositi više negativnog (pH = 6,5) odnosno pozitivnog (pH = 8,0) naboja nego u pH = 7,5 pa će tako odbojne sile među njima biti veće i tendencija agregiranja manja. U istom eksperimentu je promatrao se utjecaj niske (c (NaCl) = 0,5 mol/dm³) i visoke ionske jakosti (c (NaCl) = 1 mol/dm³) na stabilnost. Visoka ionska jakost pufera (c (NaCl) = 1 mol/dm³) bi trebala pridonijeti stabilizaciji proteina. U tablici 4.10 prikazano je pet uvjeta u kojima će *HaArgRS2* biti pročišćen.

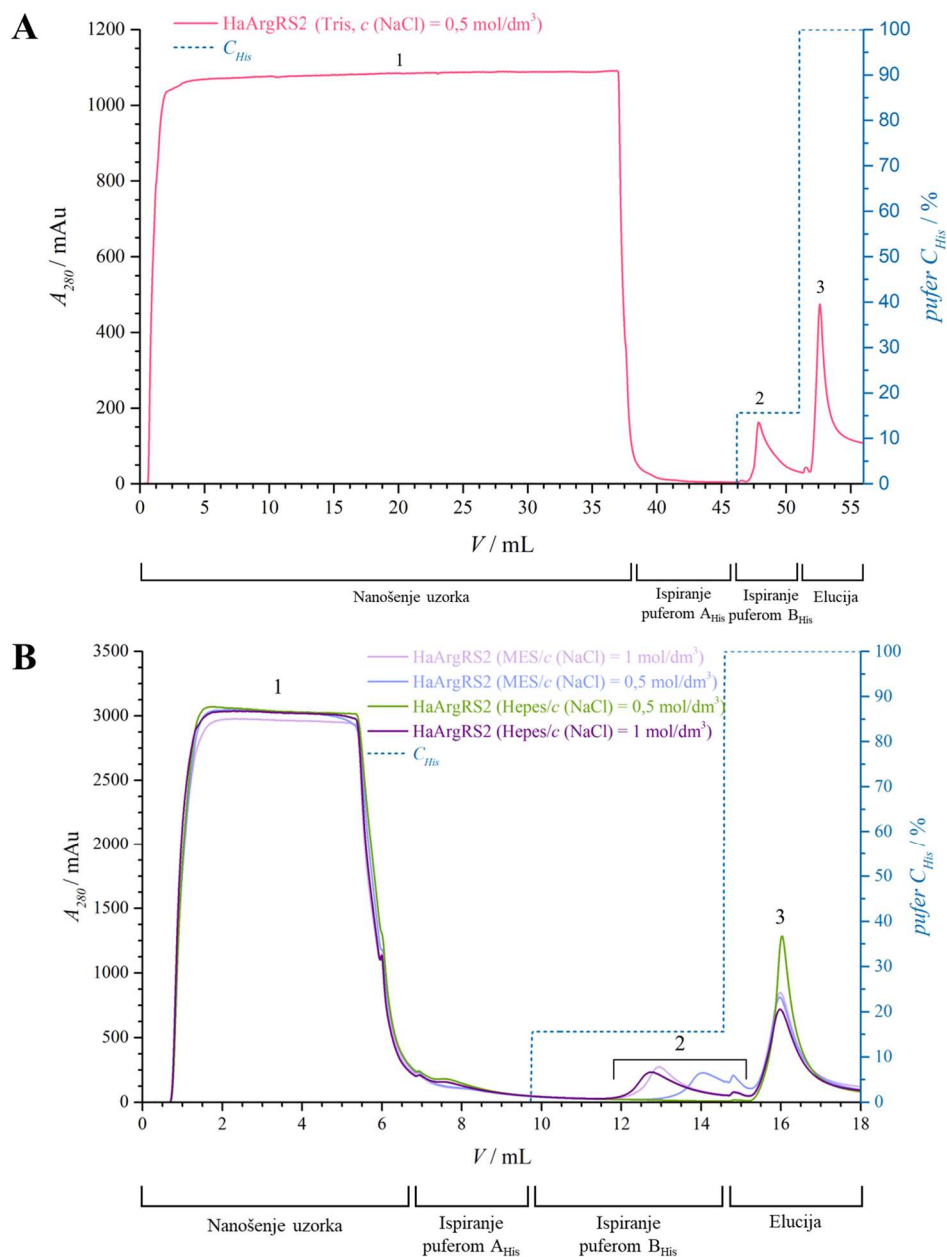
Tablica 4.10. Probni uvjeti pH i ionske jakosti pufera korištenih za pročišćavanje *HaArgRS2* afinitetnom i gel-filtracijskom kromatografijom.

	<i>Low salt</i> MES	<i>High salt</i> MES	<i>Low salt</i> Hepes	<i>High salt</i> Hepes	<i>Low salt</i> Tris
$c(\text{NaCl}) / \text{mol/dm}^3$	0,5	1	0,5	1	0,5
MES, pH = 6,5	+	+	/	/	/
Hepes, pH = 7,5	/	/	+	+	/
Tris, pH = 8,0	/	/	/	/	+

Sve suspenzije bakterija su resuspendirane u puferu A čiji sastav odgovara jednom od uvjeta navedenih u tablici 4.10. Proteinski ekstrakti su pročišćeni afinitetnom kromatografijom na koloni HisTrap 1 mL prema standardnoj metodi. Svaki kromatografski pufer pripremljen je u *low/high salt* verziji uz Hepes, MES ili Tris, a kolona je između pročišćavanja ispirana u više

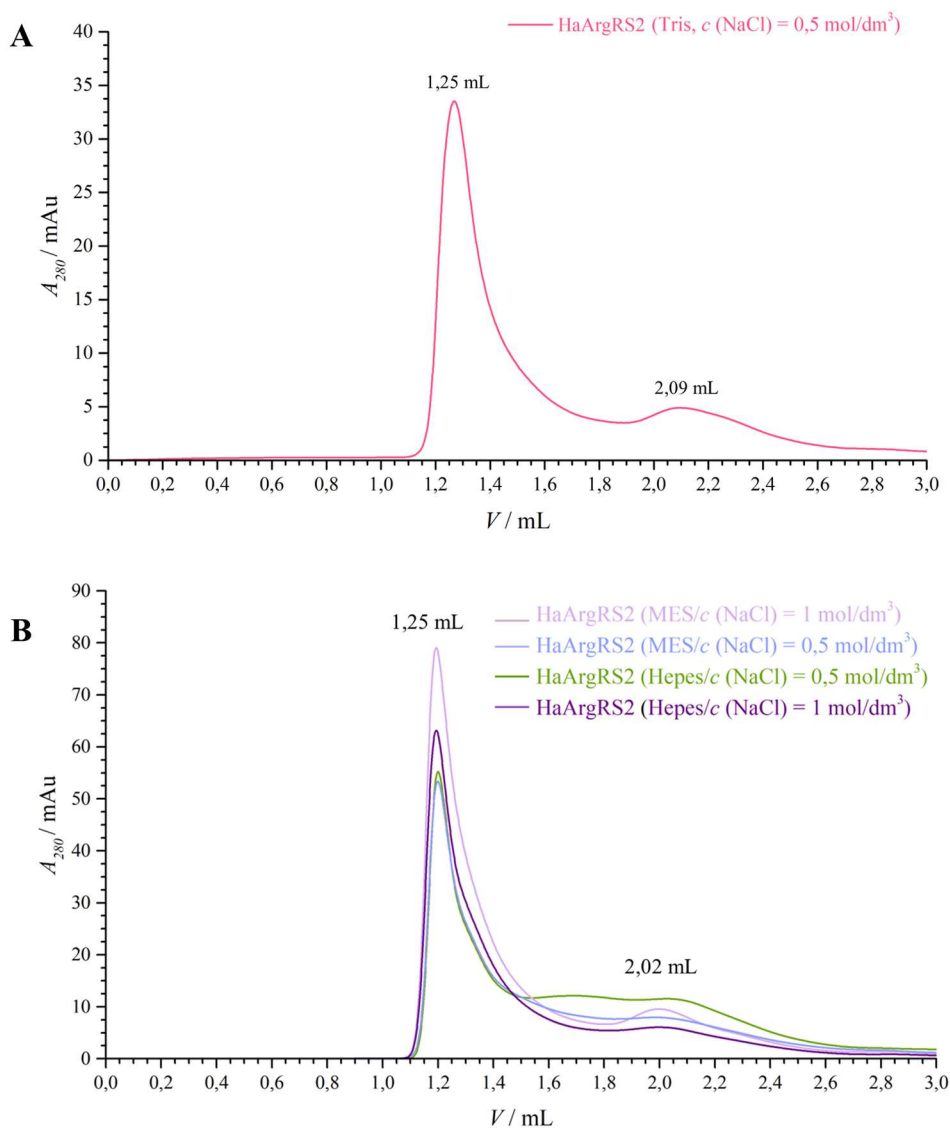
³ Vrijednost pI dobivena uz pomoć alata ExPASy, https://web.expasy.org/compute_pi/

volumena kolone s odgovarajućim puferom A_{His} . Rezultati afinitetne kromatografije prikazani su na slici 4.24. Tris uvjet je prikazan na posebnom kromatogramu jer je za Hepes/MES uvjete uzgojena jedna bakterijska kultura koja je razdijeljena na četiri dijela.



Slika 4.24. Kromatogrami dobiveni afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu HaArgRS2 u uvjetima A) $c(\text{NaCl}) = 0,5 \text{ mol/dm}^3$ uz Tris ($\text{pH} = 8,0$), B) $c(\text{NaCl}) = 1 \text{ mol/dm}^3$ uz MES ($\text{pH} = 6,5$); $c(\text{NaCl}) = 0,5 \text{ mol/dm}^3$ uz MES ($\text{pH} = 6,5$), $c(\text{NaCl}) = 0,5 \text{ mol/dm}^3$ uz Hepes ($\text{pH} = 7,5$); $c(\text{NaCl}) = 1 \text{ mol/dm}^3$ uz Hepes ($\text{pH} = 7,5$). Vrpca #1 predstavlja nevezane stanične proteine, #2 nespecifično vezane proteine koji eluiraju tijekom ispiranja puferom B_{His} ($c(\text{imidazol}) = 40 \text{ mmol/dm}^3$), #3 HaArgRS2.

U svim uvjetima su se nespecifično vezani proteini dobro razlučili od HaArgRS2. Naočigled veći prinos u uvjetu *low salt* Hepes vjerojatno je posljedica nepreciznog razdjeljivanja glavne kulture u četiri dijela. Glavne frakcije svakog uvjeta analizirane su prema standardnom postupku na Superdex 200 Increase 5/150 GL koloni kako bi se utvrdio udio agregata/monomera u uzorku. Preklapljeni kromatogrami prikazani su na slici 4.25.



Slika 4.25. Kromatogrami dobiveni analitičkom gel-filtracijskom kromatografijom uzoraka HaArgRS2 ($V_e = 2,02 \text{ mL}$ i $2,09 \text{ mL}$) na koloni Superdex 5/150 nakon afinitetne kromatografije, u uvjetima A) $c(\text{NaCl}) = 0,5 \text{ mol/dm}^3$ uz Tris (pH = 8,0), B) $c(\text{NaCl}) = 1 \text{ mol/dm}^3$ uz MES (pH = 6,5); $c(\text{NaCl}) = 0,5 \text{ mol/dm}^3$ uz MES (pH = 6,5), $c(\text{NaCl}) = 0,5 \text{ mol/dm}^3$ uz Hepes (pH = 7,5); $c(\text{NaCl}) = 1 \text{ mol/dm}^3$ uz Hepes (pH = 7,5).

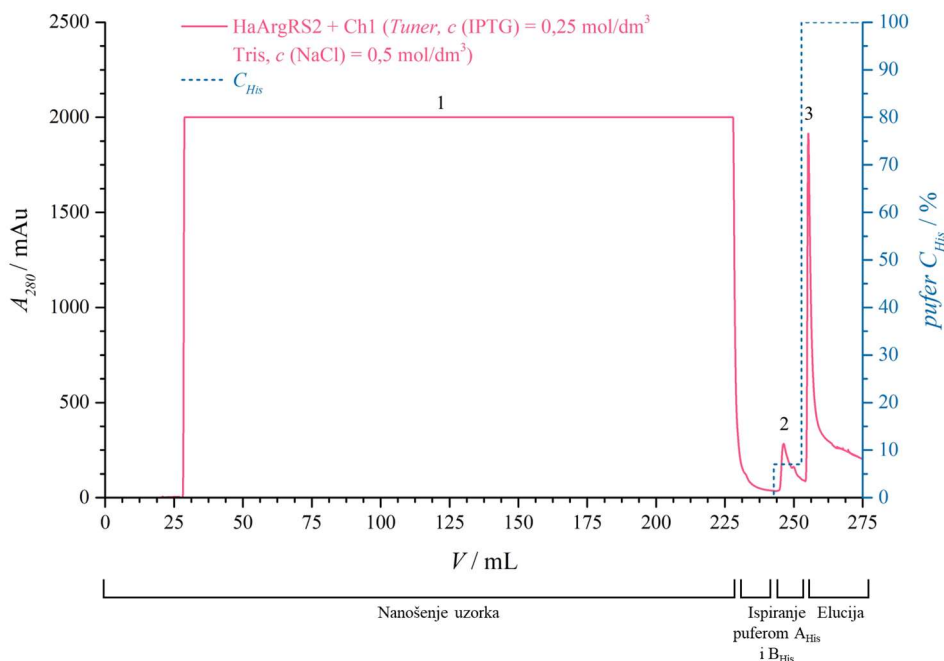
Apsorpcijski maksimum za HaArgRS2 koji je koeksprimiran sa šaperonima 1 i 4 nije jednak samom HaArgRS2 što može ukazivati na formiranje kompleksa sa šaperonima pa HaArgRS2 eluira u rasponu od 2,01 mL do 2,09 mL. Iako je razlučivanje dosta slabo i rezultati su vrlo slični, čini se kako *low salt* MES uvjet najbolje stabilizira HaArgRS2 jer je udio monomera u ukupnoj količini pročišćenih proteina najveći. Međutim, razlučivanje monomera od agregata je u *low salt* MES uvjetu najlošije pa nije moguće precizno odrediti gdje jedan pik završava gdje drugi počinje. Pročišćavanje u Tris puferu daje slične rezultate kao i MES, ali je razlučivanje znatno bolje. Ukupan prinos monomernog HaArgRS2 je još uvijek nizak, ali je izgledno da je pročišćavanje u Tris puferu najbolji izbor. Udio monomera u svakom uvjetu je prikazan u tablici 4.11.

Tablica 4.11. Udio monomera HaArgRS2 u ispitanim uvjetima pH i ionske jakosti nakon pročišćavanja afinitetnom i gel-filtracijskom kromatografijom.

	<i>Low salt</i> MES	<i>High salt</i> MES	<i>Low salt</i> Hepes	<i>High salt</i> Hepes	<i>Low salt</i> Tris
Udio monomera HaArgRS2 /%	30	22	22	20	27

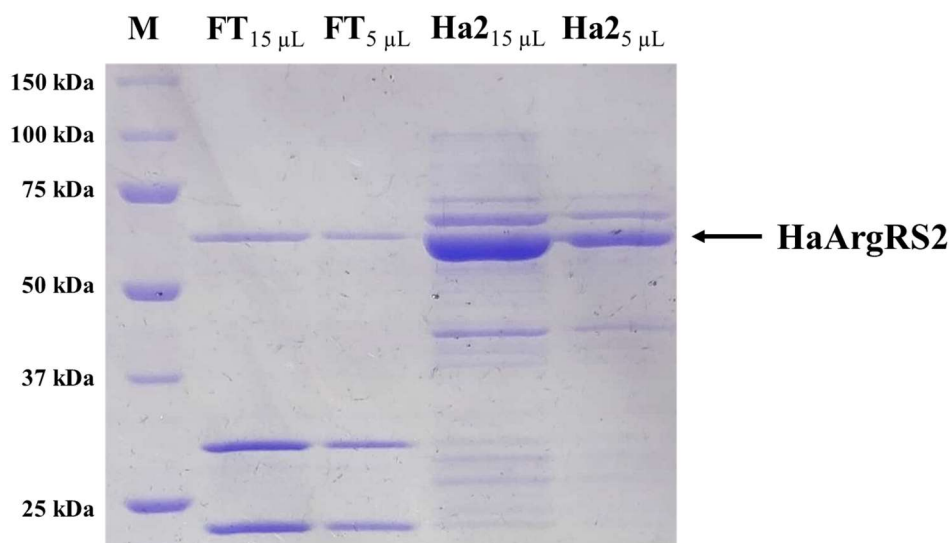
4.3.4.4. Optimizirani postupak prekomjerne ekspresije i pročišćavanja HaArgRS2

Konačnim eksperimentom HaArgRS2 je prekomjerno eksprimiran uz šaperone 1 iz 6 L kulture soja *Tuner* uz indukciju ekspresije pri $c(\text{IPTG}) = 0,25 \text{ mmol/dm}^3$. Talog stanica je reuspendiran u puferu A (Tris, $c(\text{NaCl}) = 0,5 \text{ mol/dm}^3$), a liza je provedena u uređaju *Cell Disruptor*. Proteinski ekstrakt je pripremljen za afinitetnu kromatografiju po standardnom postupku. Afinitetna kromatografija je provedena prema standardnom postupku i u *low salt* Tris puferu ($c(\text{NaCl}) = 0,5 \text{ mol/dm}^3$). Kromatogram je prikazan na slici 4.26.



Slika 4.26. Kromatogram pročišćavanja HaArgRS2 + Ch1 iz 6 L bakterijske kulture soja *Tuner* ($c(\text{IPTG}) = 0,25 \text{ mmol/dm}^3$) afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu u standardnim puferima (Tris, $c(\text{NaCl}) = 0,5 \text{ mol/dm}^3$). Vrpca #1 predstavlja nevezane stanične proteine, #2 nespecifično vezane proteine koji eluiraju tijekom ispiranja puferom B_{His} ($c(\text{imidazol}) = 40 \text{ mmol/dm}^3$), #3 HaArgRS2.

Preparativnom gel-filtracijskom kromatografijom alikvota frakcija iz vrpce 3, uočena je izrazito niska količina proteina. Eksperiment je ponovljen nekoliko puta te je uvijek iz nepoznatih razloga uočen velik gubitak proteina tijekom gel-filtracijske kromatografije. Uočena je i precipitacija proteina na kolonama i kasnije na centrikonima. Kromatogram stoga nije prikazan. Ukoncentrirane su sve frakcije koje odgovaraju vrpci 3 tijekom afinitetne kromatografije te su dva alikvota od $5 \mu\text{L}$ i $15 \mu\text{L}$ ukoncentriranog HaArgRS2 i filtrata analizirane metodom SDS-PAGE. Na gelu sa slike 4.27 je vidljivo da se HaArgRS2 supročišćava s nekoliko različitih proteina. Za nanoseni volumen otopine proteina bi debljina pruge koja odgovara HaArgRS2 nakon afinitetne kromatografije 6 L kulture i ukoncentriranja trebala biti izrazito veća. Na uređaju *NanoDrop One* je utvrđeno da je koncentracija i čistoća proteina nakon afinitetne kromatografije izrazito niska. Protein nije dodatno pročišćavan.



Slika 4.27. Gel dobiven SDS-PAGE metodom za analizu uspješnosti pročišćavanja HaArgRS2. U jažicama se redom nalaze: M – marker, FT_{15 µL} i FT_{5 µL} – 15 µL / 5 µL filtrata dobivenog tijekom ukoncentriravanja proteina, Ha_{215 µL} i Ha_{25 µL} – 15 µL / 5 µL otopine HaArgRS2 nakon ukoncentriranja.

4.4. Kinetička karakterizacija dobivenih ArgRS

Kinetički parametri koji su određeni za pročišćene arginil-tRNA-sintetaze su opažena konstanta brzine (k_{obs}) i početna brzina (v_0) ukupne reakcije aminoaciliranja. Ukupna reakcija aminoaciliranja je praćena uz radioaktivni obilježeni [¹⁴C]-arginin na način opisan u poglavlju 3.2.4.1. Radioaktivnost nastalog [¹⁴C]-Arg-tRNA^{Arg} u alikvotima reakcijske smjese u vremenu je mjerena u scintilacijskom brojaču Tri-Carb 2900 TR (*Perkin Elmer*). Na temelju baždarnog dijagrama je određena koncentracija [¹⁴C]-Arg-tRNA^{Arg}. Korištene su odgovarajuće tRNA^{Arg} pročišćene i kinetički okarakterizirane kako je navedeno u poglavljima 4.1 i 4.2. Pokazano je da su svi enzimi kojima su pronađeni optimalni uvjeti ekspresije, lize i pročišćavanja, kinetički aktivni: EcArgRS (poglavlje 4.3.1.1), StArgRS (poglavlje 4.3.2.4) i HaArgRS1 (poglavlje 4.3.3.1). Iz vremenske ovisnosti koncentracije [¹⁴C]-Arg-tRNA^{Arg} prikazane na slici 4.28 je izračunata početna brzina. Opažena konstanta brzine aminoacilacije je određena iz omjera početne brzine i ukupne koncentracije enzima. U tablici 4.12 su navedeni dobivene vrijednosti početne brzine i opažene konstante brzine za svaki enzim.

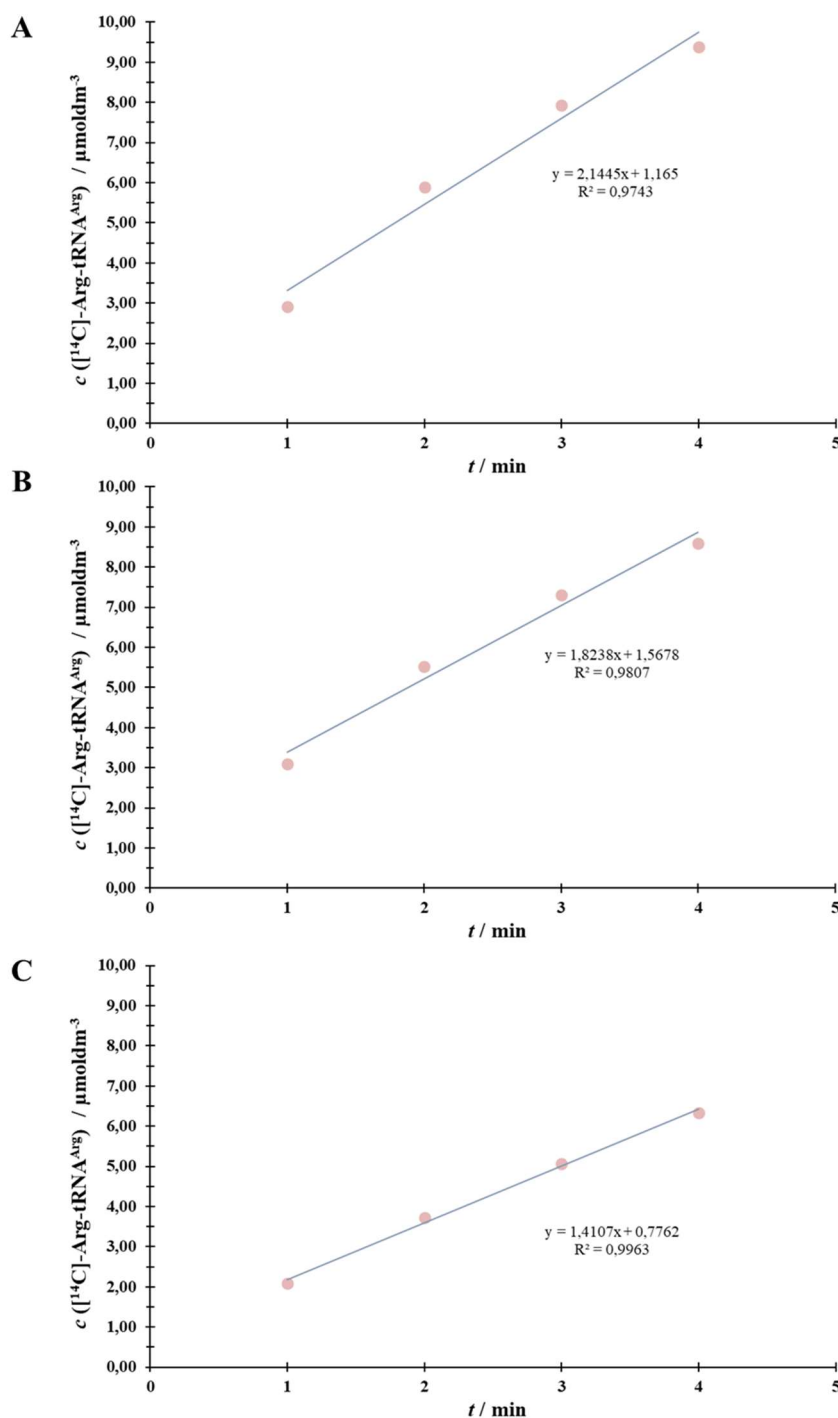
U uvjetima u kojima je testirana reakcija aminoaciliranja EctRNA^{Arg} uz EcArgRS, većina tRNA^{Arg} je bila aminoacilirana već u prvoj vremenskoj točki. Iz tog razloga nije bilo

moгуće precizno odrediti brzinu aminoaciliranja, a da bi se to postiglo potrebno je ili proučavati reakciju na kraćoj vremenskoj skali ili smanjiti koncentraciju enzima. S obzirom da eksperiment nije proveden u optimalnim uvjetima, iz linearnog dijela krivulje vremenske ovisnosti koncentracije [^{14}C]-Arg-tRNA^{Arg} se nisu mogle odrediti početna brzina aminoaciliranja i opažena konstanta brzine te one nisu navedene. U drugom eksperimentu su određeni kinetički parametri za EcArgRS u uvjetima kada heterologno aminoacilira HatRNA^{Arg}.

Određivanje kinetičkih parametara HaArgRS2 bilo je neuspješno. Eksperimenti su ponovljeni nekoliko puta s uzorcima pročišćenim u različitim uvjetima, ali su rezultati u većini slučajeva pokazali da je enzim neaktivan. Vrlo nizak konačni prinos nakon pročišćavanja te sklonost agregaciji, otežali su proučavanje kinetike HaArgRS2 stoga rezultati nisu prikazani.

Tablica 4.12. Opažena konstanta brzine ukupne reakcije aminoaciliranja dobivene praćenjem nastanka [^{14}C]-Arg-tRNA^{Arg} prema uvjetima opisanim u poglavlju 3.2.4.1 pri 37 °C.

	k_{obs} / s^{-1}
EcArgRS (uz HatRNA^{Arg}) (HVGH)	0,68
StArgRS (VLVQ)	0,37
HaArgRS1 (HVGH)	0,69



Slika 4.28. Promjena koncentracije $[^{14}\text{C}]\text{-Arg-tRNA}^{\text{Arg}}$ u vremenu tijekom reakcija aminoacilacije. Nagib pravca odgovara početnoj brzini u uvjetima navedenim u poglavlju 3.2.4.1 i A) $c(\text{EcArgRS}) = 25 \text{ nmol/dm}^3$ kada heterologono aminoacilira $\text{HatRNA}^{\text{Arg}}$, B) $c(\text{StArgRS}) = 50 \text{ nmol/dm}^3$ aminoacilira $\text{SttRNA}^{\text{Arg}}$, C) $c(\text{HaArgRS1}) = 50 \text{ nmol/dm}^3$ aminoacilira $\text{HatRNA}^{\text{Arg}}$.

4.4.1. Utjecaj reverzije atipičnog motiva VLVQ u kanonski na kinetiku StArgRS

Određena je opažena konstanta brzine aminoacilacije divljeg tipa StArgRS te dva mutanta StArgRS_HLVQ i StArgRS_HLGQ prema metodi navedenoj u poglavlju 3.2.4.1. Eksperiment je odrađen pri povišenoj temperaturi od 60 °C jer je *S. thermophilum*, kako joj ima ukazuje, termofilna bakterija čiji su optimalni uvjeti rasta pri navedenoj temperaturi.³⁵ Iz tablice 4.13 se može vidjeti da enzim ima znatno veću opaženu konstantu brzine u usporedbi s rezultatom pri 37 °C u tablici 4.12. Katalitička aktivnost je desetak puta manja kada se napravi samo jedna zamjena u VLVQ motivu, a uz dvije mutacije aktivnost enzima je gotovo 60 puta manja.

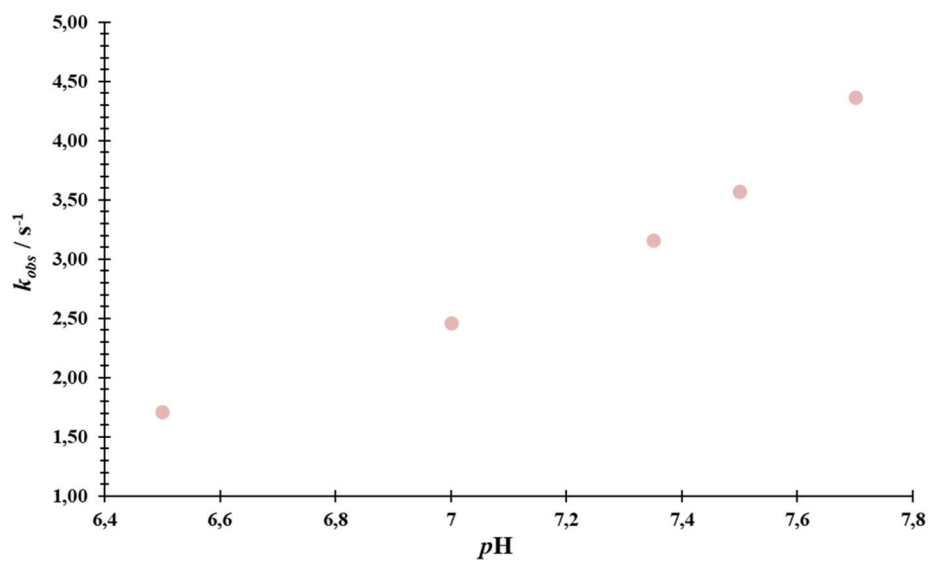
Tablica 4.13. Utjecaj mutacija u motivu VLVQ na kinetiku StArgRS pri 60 °C.

	k_{obs} / s^{-1}
StArgRS	4,99
StArgRS_HLVQ	0,44
StArgRS_HLGQ	0,076

4.4.2. Utjecaj pH na kinetiku HaArgRS1

Sličnost u primarnoj strukturi tipičnog i atipičnog HaArgRS ukazuje na sličnu ili istu funkciju enzima pa je zanimljivo primijetiti veliku razliku u *pI* vrijednosti HaArgRS1 (*pI* = 5,40)⁴ i HaArgRS2 (*pI* = 7,68). HaArgRS1 u neutralnim i blago lužnatim uvjetima pufera nosi veći pozitivan naboj. To bi moglo utjecati na bolju interakciju s tRNA^{Arg} pa je za HaArgRS1 zbog toga ispitan i utjecaj pH na brzinu reakcije aminoaciliranja. Na slici 4.29 se može uočiti da se brzina reakcije povećava s povećanjem pH.

⁴ Vrijednost *pI* dobivena uz pomoć alata ExPASy, https://web.expasy.org/compute_pi/



Slika 4.29. Ovisnost opažene konstante brzine aminoaciliranja HaArgRS1 pripadne HatRNA^{Arg} o pH.

§ 5. RASPRAVA

5.1. Uspješnost ekspresije i pročišćavanja ArgRS iz bakterija *E. coli*, *S. thermophilum* i *H. aurantiacus*

Određeni su najbolji uvjeti prekomjerne ekspresije, lize stanica i pročišćavanja rekombinantnih arginil-tRNA-sintetaza s histidinskim privjeskom na N-kraju iz bakterija *E. coli*, *S. thermophilum* i *H. aurantiacus* s kanonskim motivom HXGH. Svi proteini su izolirani iz proteinskog ekstrakta afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu, a zatim odvojeni od proteinskih agregata preparativnom gel-filtracijskom kromatografijom. Rekombinantni proteini su skloni agregaciji pa je gel-filtracijska kromatografija nužna za pročišćavanje ArgRS. Svaki protein je pohranjen u puferu najniže ionske jakosti u kojem je stabilan u svrhu pripreme za kristalizacijske eksperimente.

Početni uvjeti ekspresije i pročišćavanja **EcArgRS** su se pokazali odgovarajućima za taj protein. Protein je uspješno ekspimiran u soju BL21(DE3) bakterije *E. coli*. Mehaničke metode lize stanica, sonikacija i homogenizacija na uređaju *Cell Disruptor*, dale su dobre rezultate. Homogenizacija na uređaju *Cell Disruptor* je zbog brzine, učinkovitosti i reproducibilnosti odabrana kao optimalna. Odabrane su dvije metode pročišćavanja: afinitetna kromatografija na Ni-NTA agarozu i gel-filtracijska kromatografija. Za afinitetnu kromatografiju je odabran pufer pH = 7,5 i $c(\text{NaCl}) = 0,75 \text{ mol/dm}^3$. Visoka ionska jakost pufera u prvom koraku pročišćavanja pridonosi dodatnoj stabilizaciji proteina, a s obzirom na to da su proteini bakterije *E. coli* obično vrlo stabilni, udio agregata nakon afinitetne kromatografije nije velik. Kako bi se pripremio za kristalizaciju, protein je u zadnjem koraku pročišćavanja prebačen u pufer s niskom koncentracijom soli. Tako je za preparativnu gel-filtracijsku kromatografiju EcArgRS korišten pufer niske ionske jakosti ($c(\text{NaCl}) = 0,05 \text{ mol/dm}^3$) u kojemu je protein ukoncentriran i pohranjen. Gel-filtracijskom kromatografijom uspješno su uklonjeni gotovo svi proteinski agregati.

Optimizacija proizvodnje **StArgRS** započela je određivanjem najboljih uvjeta prekomjerne ekspresije. Uspoređen je utjecaj koekspresije StArgRS sa šaperonima DnaK, DnaJ, GrpE, GroES i GroEL (šaperoni 1) te GroES, GroEL i Tig (šaperoni 4) na tendenciju proteina agregiranju usporedbom udjela monomera StArgRS u uvjetima ekspresije sa i bez

šaperona. Pokazalo se da koekspresija uz šaperone 1, rezultira s oko 85 % proteina u formi monomera. Iako je prinos koeksprimiranih proteina bio nizak, visok udio monomera ima prioritet kada se radi s relativno nestabilnim proteinima. Međutim, rezultati tog eksperimenta se u daljnjem radu nisu mogli reproducirati. Uspoređen je udio monomernih proteina dobivenih u soju *Tuner* pri c (IPTG) = 0,25 mmol/dm³ u odnosu na BL21(DE3). Rezultati su pokazali da je udio monomera u oba slučaja gotovo jednak i iznosi oko 50 %. Iz dobivenog rezultata se utvrdilo da brzina ekspresije nema utjecaja na kvalitetu smatanja StArgRS te da velik udio agregata vjerojatno nije posljedica lijepljenja krivo smotanih proteina. Također, ovaj eksperiment je pridonio zaključku da vjerojatno ni koekspresija sa šaperonima u slučaju StArgRS ne može značajno utjecati na veću količinu monomera kada se radi o velikom preparativnom uzgoju. Na temelju svih dobivenih rezultata, odlučeno je da je ekspresija StArgRS u soju BL21(DE3) najbolji izbor.

Odabrana je najbolja metoda za razbijanje stanica s eksprimiranim **StArgRS**. Sonikacija je osnovna metoda kojom je provođena liza stanica. Metoda je efikasna, ali nije prilagođena za velike volumene kulture, zahtijeva puno vremena i nije reproducibilna. Iz prijašnjih istraživanja je utvrđeno da uzgoji u kojima su stanice razbijene reagensom *BugBuster* daju vrlo čiste proteine s visokim udjelom monomera. Efikasnost razbijanja stanica reagensom *BugBuster* se pokazala vrlo niskom. Unatoč visokom udjelu monomera, nezadovoljavajuća efikasnost lize stanica te visoka cijena reagensa doprinijela je odluci da *BugBuster* nije najbolja metoda lize za ovu svrhu. Homogenizacija na uređaju *Cell Disruptor* je jednostavna, automatizirana metoda prilagođena za velike volumene bakterijske kulture. Metoda se pokazala efikasnom i nije uočeno da pridonosi destabilizaciji proteina. Zbog toga je odabrana kao optimalna.

Pročišćavanje **StArgRS** je, uz afinitetnu kromatografiju za izolaciju iz proteinskog ekstrakta i gel-filtracijsku kromatografiju za odvajanje od proteinskih agregata, uključivalo i ionsko-izmjenjivačku kromatografiju kako bi se StArgRS razdvojio od proteina s kojima se supročišćava. Protein je prvo pročišćen afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu, provjerena mu je stabilnost analitičkom gel-filtracijskom kromatografijom, a zatim je pročišćen u odgovarajućem uvjetu ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom. Naime, metodom spektrometrije mase, utvrđeno je da se uz StArgRS supročišćavaju proteini ArnA i SlyD^{36,37}. ArnA je bifunkcionalni protein koji sudjeluje modifikaciji fosfata lipida A s aminoarabinozom. Produkti ovog enzima su nužni za pojavu rezistencije na antibiotik polimiksin i kationske antimikrobne peptide. SlyD posjeduje aktivnost sličnu šaperonima i peptidil-prolil-cis/trans

izomeraznu aktivnost (PPI). Šaperonska aktivnost sprječava agregaciju nesmotanih ili djelomično smotanih proteina i potiče njihovo pravilno smatanje. PPI aktivnost katalizira cis-trans izomerizaciju X-Pro veza peptida, što ubrzava spore korake smatanja proteina. Oba proteina su bogata histidinom te se natječu za vezna mjesta na Ni-NTA agarozu s rekombinantnim StArgRS s histidinskim privjeskom. Kada je ekspresija proteina od interesa niska, proteini domaćina, posebno ArnA i SlyD, imaju sličnu zastupljenost i natječu se za vezanje na Ni-smolu te se zbog toga ArnA i SlyD pročišćavaju u gotovo jednakim količinama kao i protein od interesa.³⁴

Udio monomera **StArgRS** nakon afinitetne kromatografije u puferu niske ionske jakosti je vrlo nizak. Stoga je najbolji uvjet za afinitetnu kromatografiju pufer visoke ionske jakosti. Protein je stabilan tijekom gel-filtracijske kromatografije u puferu s $c(\text{NaCl}) = 0,1 \text{ mol/dm}^3$. Kako bi se uklonila većina supročišćenih ArnA i SlyD, ionsko-izmjenjivačku kromatografiju najbolje je provesti u puferu niže ionske jakosti. Isprobana ionska jakost koja odgovara $c(\text{NaCl}) = 0,05 \text{ mol/dm}^3$ dovodi do elucije proteina uz agregate i nečistoće. Niska ionska jakost pufera u kojem je pohranjen protein, preduvjet je za uspješnu ionsko-izmjenjivačku kromatografiju pa je stoga određeno da je $c(\text{NaCl}) = 0,1 \text{ mol/dm}^3$ najniži uvjet ionske jakosti u kojem se uspješno može pročistiti StArgRS. Gradijent pufera IEX_{ArgRS, B} trebao bi se blago povećavati kroz nekoliko volumena kolone od 0 % do 20 % kako bi se postiglo maksimalno razlučivanje.

Na temelju svih testiranih uvjeta, određeni su optimalni uvjeti pročišćavanja **StArgRS**. Protein je uzgojen u BL21(DE3) soju, a bakterijske stanice su razbijene homogenizacijom na uređaju *Cell Disruptor*. Tijekom afinitetne kromatografije je korišten pufer visoke ionske jakosti ($c(\text{NaCl}) = 0,75 \text{ mol/dm}^3$). U svrhu odvajanja monomera od proteinskih agregata i sprječavanja precipitacije proteina, provedena je preparativna gel-filtracijska kromatografija u puferu niže ionske jakosti ($c(\text{NaCl}) = 0,1 \text{ mol/dm}^3$). StArgRS je uspješno pročišćen na ionskom izmjenjivaču uz linearni gradijent počevši s 0 % IEX_{ArgRS, B}. Analizom SDS-PAGE utvrđeno je da protein posjeduje vrlo visoku čistoću na početku gradijenta pufera IEX_{ArgRS, B} što odgovara nižoj ionskoj jakosti. Supročišćeni proteini ArnA i SlyD bliske molekulske mase eluiraju bolje pri višoj ionskoj jakosti pred kraj vrpce te nisu prisutni u visokoj koncentraciji. Također su prema opisanoj optimalnoj metodi uspješno su pročišćeni mutanti StArgRS s motivima HLVQ odnosno HLGQ.

Uvjeti pročišćavanja **HaArgRS1** nisu detaljno testirani jer je protein pokazao odlične rezultate u početnim uvjetima. Protein je uzgojen u soju BL21(DE3). Stanice su razbijene u uređaju *Cell Disruptor*. Afinitetna kromatografija je provedena u puferu srednje ionske jakosti ($c(\text{NaCl}) = 0,5 \text{ mol/dm}^3$) i $\text{pH} = 7,5$. Protein je preparativnom gel-filtracijskom kromatografijom odvojen od agregata i prebačen u pufer niske ionske jakosti ($c(\text{NaCl}) = 0,05 \text{ mol/dm}^3$) nakon čega je ukoncentriran. Protein je sav prisutan u formi monomera nakon ukoncentriranja.

Ispitan je utjecaj uvjeta (ko)ekspresije u različitim ekspresijskim sojevima na stabilnost **HaArgRS2**. Protein je koekspimiran uz šaperone 1 i 4 u soju BL21(DE3) te uz šaperone 1 u sojevima *Tuner* i *Rosetta*. Visok udio agregiranih proteina se pojavljuje ukoliko se protein eksprimira vrlo brzo i ne stigne se pravilno smotati. U uvjetima bez šaperona gotovo sav HaArgRS2 agregira, a udio monomera sa šaperonima u BL21(DE3) soju iznosi 30 %. Rezultati iz soja *Rosetta* nisu bili zadovoljavajući dok udio monomera HaArgRS2 ekspimiranog u soju *Tuner* pri $c(\text{IPTG}) = 0,05 \text{ mmol/dm}^3$ i $c(\text{IPTG}) = 0,25 \text{ mmol/dm}^3$ iznosi 50 %. Najbolje rezultate pokazala je koekspresija uz šaperone 1 u soju *Tuner*.

Testirane su tri dostupne metode lize za dobivanje **HaArgRS2**. Rezultati su vrlo slični kao u slučaju StArgRS. Liza regensom *BugBuster* dala je uzorak veće čistoće, ali s obzirom da se radi o vrlo blagoj metodi, prinos proteina je vrlo nizak u odnosu na sonikaciju. Homogenizacija na uređaju *Cell Disruptor* nije imala utjecaja na udio agregata, ali je zbog brzine i efikasnosti predstavljala najbolji izbor. Na temelju svih rezultata, zaključeno je da izbor metode lize u konačnici nije imao utjecaj na količinu nastalih agregata.

Pročišćavanje **HaArgRS2** afinitetnom i gel-filtracijskom kromatografijom provedeno je u pet različitih uvjeta: niska/visoka ionska jakost i niži/viši pH. Pokazano je da je HaArgRS2 nestabilan u svim ispitanim uvjetima, ali da je najveći udio monomera neočekivano prisutan u uvjetu niže ionske jakosti ($c(\text{NaCl}) = 0,5 \text{ mol/dm}^3$) i višeg pH ($\text{pH}(\text{Tris}) = 8,0$). Iako rezultat nije idealan, zaključeno je da je u ovakvom uvjetu HaArgRS2 stabilniji. Pokazalo se da ionska jakost, pH i metoda lize nemaju značajan utjecaj na stabilnost HaArgRS2.

Preparativni uzgoj i pročišćavanje **HaArgRS2** nije uspješno odrađeno. Protein je uzgojen uz šaperone 1 u soju *Tuner* uz $c(\text{IPTG}) = 0,25 \text{ mmol/dm}^3$. Nakon prvog koraka pročišćavanja, razbijanja stanica na uređaju *Cell Disruptor* te afinitetne kromatografije u puferu niže ionske jakosti ($c(\text{NaCl}) = 0,5 \text{ mol/dm}^3$) i visokog pH ($\text{pH}(\text{Tris}) = 8,0$), prinos proteina je bio izrazito nizak. SDS-PAGE analizom je utvrđeno da se HaArgRS supročistio s nekoliko

različitih proteina. Tijekom gel-filtracijske kromatografije dolazi do gubitka proteina. Protein precipitira iz otopine tijekom promjene pufera i prilikom ukoncentriranja. Potrebno je detaljnije ugađati uvjete pročišćavanja kako bi se dobila količina proteina koja je dovoljno stabilna za ispitivanje njegovih svojstava.

Iz svega navedenog se može zaključiti da su svi ArgRS proučavani u ovom radu skloni agregaciji u većem (HaArgRS2) ili manjem (HaArgRS1) obujmu. Ipak, manju stabilnost i veću tendenciju agregaciji pokazuju ArgRS s atipičnim motivom. Zbog toga, potrebna su najmanje dva koraka pročišćavanja: afinitetna kromatografija za izolaciju iz proteinskog ekstrakta i gel-filtracijska kromatografija za odvajanje od agregata. Proteinski agregati su vjerojatno enzimski inaktivni te kao takvi ne bi mogli poslužiti za kinetička i druga istraživanja.

5.2. Katalitička aktivnost izoliranih ArgRS

Testirana je katalitička aktivnost pročišćenih rekombinantnih arginil-tRNA-sintetaza u ukupnoj reakciji aminoacilacije. Reakcija je praćena uz radioaktivno obilježeni [^{14}C]-arginin, a vremenski ovisna koncentracija [^{14}C]-Arg-tRNA^{Arg} je mjerena u scintilacijskoj otopini putem scintilacijskog brojača. Svi proteini kojima su uspješno određeni optimalni uvjeti ekspresije, lize i pročišćavanja, su kinetički aktivni.

Pokazano je da **EcArgRS** aminoacilira EctRNA^{Arg} u skladu s literaturnim podacima^{38,39}. Kinetički parametri nisu određeni jer je u mjerenom vremenskom rasponu vremenska ovisnost koncentracije [^{14}C]-Arg-tRNA^{Arg} eksponencijalna. Odabrani uvjeti stoga nisu optimalni za kinetičku karakterizaciju EcArgRS u reakciji aminoaciliranja pripadne EctRNA^{Arg}. EcArgRS može heterologno aminoacilirati HatRNA^{Arg} uz opaženu konstantu brzine 0,68 s⁻¹.

StArgRS koji posjeduje atipični motiv VLVQ, aminoacilira SttRNA^{Arg} uz opaženu konstantu brzine 0,37 s⁻¹. Pokazano je da je kinetička aktivnost StArgRS desetak puta veća kada je eksperiment proveden pri 60 °C. To se može povezati s termofilnom prirodom *S. thermophilum*.³⁵ Kinetičkim eksperimentom s mutantima StArgRS_HLVQ i StArgRS_HLGQ koji predstavljaju postupni povratak motiva VLVQ u kanonski HXGH pokazano je da se taj motiv ne može revertirati u kanonski bez djelomičnog gubitka funkcije.

HaArgRS1 s kanonskim motivnom HVGH, aminoacilira HatRNA^{Arg} uz opaženu konstantu brzine 0,69 s⁻¹. Porast pH otopine vrlo vjerojatno utječe na porast brzine reakcije aminoaciliranja. Metodom opisanom u poglavlju 3.2.4.1 se prati ukupna brzina reakcije. U

literaturi je pokazano da je disocijacija vrlo vjerojatno najsporiji korak te stoga on određuje brzinu ukupne reakcije. Što je niži pH, enzim ($pI = 5,20$) nosi više negativnog naboja pa su odbojne sile između enzima i negativno nabijene $tRNA^{Arg}$ veće i disocijacija je brža kao i ukupna reakcija.^{19,39}

Nisu pronađeni uvjeti u kojima je **HaArgRS2**, koji posjeduje atipični motiv RVDH, kinetički aktivan. Mali prinos nakon izolacije iz bakterijske kulture i onečišćenost dobivenih uzoraka je negativno utjecala na uspješnost kinetičke karakterizacije HaArgRS2. Najprije je potrebno pronaći prave uvjete izolacije kako bi se mogla proučavati katalitička aktivnost ovog enzima.

§ 6. ZAKLJUČAK

- Tipične rekombinantne arginil-tRNA-sintetaze iz bakterija *E. coli*, *H. aurantiacus* i atipična arginil-tRNA-sintetaza iz *S. thermophilum*, su uspješno prekomjerno eksprimirane u ekspresijskom soju BL21(DE3) bakterije *E. coli*. Taj soj se pokazao najboljim ekspresijskim sojem za navedene proteine. Enzimi s atipičnim motivom HXGH, StArgRS (VLVQ) i HaArgRS2 (RVDH), uspješno su prekomjerno eksprimirani u soju *Tuner*.
- Homogenizacija u uređaju *Cell Disruptor* se pokazala kao najbolja metoda lize za sve proučavane proteine. Afinitetna kromatografija na Ni-NTA agarozu je najbolja metoda za izolaciju ArgRS iz proteinskog ekstrakta. Sve arginil-tRNA-sintetaze su sklone stvaranju topljivih proteinskih agregata stoga su potrebni dodatni koraci pročišćavanja. Gel-filtracijska kromatografija je nužan korak za izolaciju monomernih ArgRS.
- Određeni su optimalni uvjeti pročišćavanja za **EcArgRS**. Afinitetna kromatografija provedena u puferu s visokom ionskom jakosti ($c(\text{NaCl}) = 0,75 \text{ mol/dm}^3$) i $\text{pH} = 7,5$ se pokazala najboljom. 60 % proteina je prisutno u formi monomera nakon prvog koraka. EcArgRS je stabilan protein te se može pročistiti gel-filtracijskom kromatografijom u puferu vrlo niske ionske jakosti ($c(\text{NaCl}) = 0,05 \text{ mol/dm}^3$). Gel-filtracijskom kromatografijom su proteinski agregati potpuno odvojeni od monomera. EcArgRS velikom brzinom aminoacilira pripadnu EctRNA^{Arg} pa u isprobanim uvjetima nije bilo moguće odrediti kinetičke parametre. EcArgRS heterologno aminoacilira HatRNA^{Arg} uz opaženu konstantu brzine $0,68 \text{ s}^{-1}$.
- Optimalan postupak pročišćavanja **StArgRS** uključuje afinitetnu kromatografiju u puferu visoke ionske jakosti ($c(\text{NaCl}) = 0,75 \text{ mol/dm}^3$) i $\text{pH} = 7,5$, odvajanje proteinskih agregata gel-filtracijskom kromatografijom pri $c(\text{NaCl}) = 0,1 \text{ mol/dm}^3$ te dodatan korak pročišćavanja ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom na anionskom izmjenjivaču. Oko 50 % proteina je prisutno u formi monomera nakon afinitetne kromatografije. Uz StArgRS se supročišćavaju proteini bliske molekulske mase: ArnA, koji je uključen u sintezu molekula koje su zaslužne za rezistenciju bakterija na antibiotik polimiksin, i SlyD koji posjeduje svojstva slična šaperonima. StArgRS aminoacilira pripadnu SttRNA^{Arg} uz opaženu konstantu brzine $0,37 \text{ s}^{-1}$ pri $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Pri povišenoj temperaturi od $60 \text{ }^\circ\text{C}$, StArgRS

ima desetak puta veću kinetičku aktivnost. Prilikom povratka atipičnog motiva VLVQ u kanonski HXGH, dolazi do djelomičnog gubitka funkcionalnosti enzima.

- Optimalan postupak pročišćavanja **HaArgRS1** koji posjeduje kanonski motiv HVGH uključuje afinitetnu kromatografiju na Ni-NTA agarozu u puferu srednje ionske jakosti ($c(\text{NaCl}) = 0,5 \text{ mol/dm}^3$) i $\text{pH} = 7,5$ te gel-filtracijsku kromatografiju u puferu niske ionske jakosti ($c(\text{NaCl}) = 0,05 \text{ mol/dm}^3$). Udio monomera nakon afinitetne kromatografije iznosi oko 85 %. HaArgRS1 aminoacilira pripadnu HatRNA^{Arg} uz opaženu konstantu brzine $0,69 \text{ s}^{-1}$.
- **HaArgRS2** koji posjeduje atipični motiv RVDH je izrazito nestabilan protein koji u svim analiziranim uvjetima gotovo sav prelazi u proteinske agregate. Najbolje rezultate pokazuje koekspresija sa šaperonima iz skupine 1 u soju *Tuner*. Usporavanje ekspresije i prisutnost šaperona utječu na bolje smatanje proteina što smanjuje vjerojatnost za nastanak agregata. Nisu pronađeni optimalni uvjeti ekspresije i pročišćavanja HaArgRS2 te zbog toga nije uspješno kinetički okarakteriziran.

§ 7. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

Popis kratica za aminokiseline:

Ala (A)	Alanin
Arg (R)	Arginin
Asn (N)	Asparagin
Asp (D)	Aspartat
Cys (C)	Cistein
Gln (Q)	Glutamin
Glu (E)	Glutamat
Gly (G)	Glicin
His (H)	Histidin
Ile (I)	Izoleucin
Leu (L)	Leucin
Lys (K)	Lizin
Met (M)	Metionin
Phe (F)	Fenilalanin
Pro (P)	Prolin
Ser (S)	Serin
Thr (T)	Treonin
Trp (W)	Triptofan
Tyr (Y)	Tirozin
Val (V)	Valin

Popis ostalih kratica:

aa	aminokiselina
aa-AMP	aminoacil-adenilat
aaRS	aminoacil-tRNA-sintetaza
aa-tRNA ^{aa}	aminoacilirana transporna RNA
AMP	adenozin-5'-monofosfat
APS	amonijev peroksodisulfat
ArgRS	arginil-tRNA-sintetaza
ATP	adenozin-5'-trifosfat
BSA	goveđi serumski albumin
Ch1	šaperoni <i>DnaK</i> , <i>DnaJ</i> , <i>GrpE</i> , <i>GroES</i> i <i>GroEL</i>
Ch4	šaperoni <i>GroES</i> , <i>GroEL</i> i <i>Tig</i>
cpm	broj otkucaja u minuti u scintilacijskom brojaču
DNA	deoksiribonukelinska kiselina
EcArgRS	arginil-tRNA-sintetaza iz bakterije <i>E. coli</i>
EctRNA ^{Arg}	transportna RNA za arginin iz bakterije <i>E. coli</i>
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
fMet	<i>N</i> -formilmetionin
HaArgRS1	arginil-tRNA-sintetaza iz bakterije <i>H. aurantiacus</i> s kanonskim motivom HVGH
HaArgRS2	arginil-tRNA-sintetaza iz bakterije <i>H. aurantiacus</i> s atipičnim motivom RVDH
HatRNA ^{Arg}	transportna RNA za arginin iz bakterije <i>H. aurantiacus</i>
Hepes	<i>N</i> -(2-hidroksietil)piperazin- <i>N'</i> -2-etansulfonska kiselina
IF	inicijacijski faktor
IPTG	izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid
k_{obs}	opažena konstanta brzine enzimski katalizirane reakcije
LB	Luria-Bertrani
MES	2-(<i>N</i> -morfolino)etansulfonska kiselina
mRNA	glasnička RNA
Ni-NTA	nikal-nitrilotrioctena kiselina
OD ₆₀₀	optička gustoća pri valnoj duljini od 600 nm

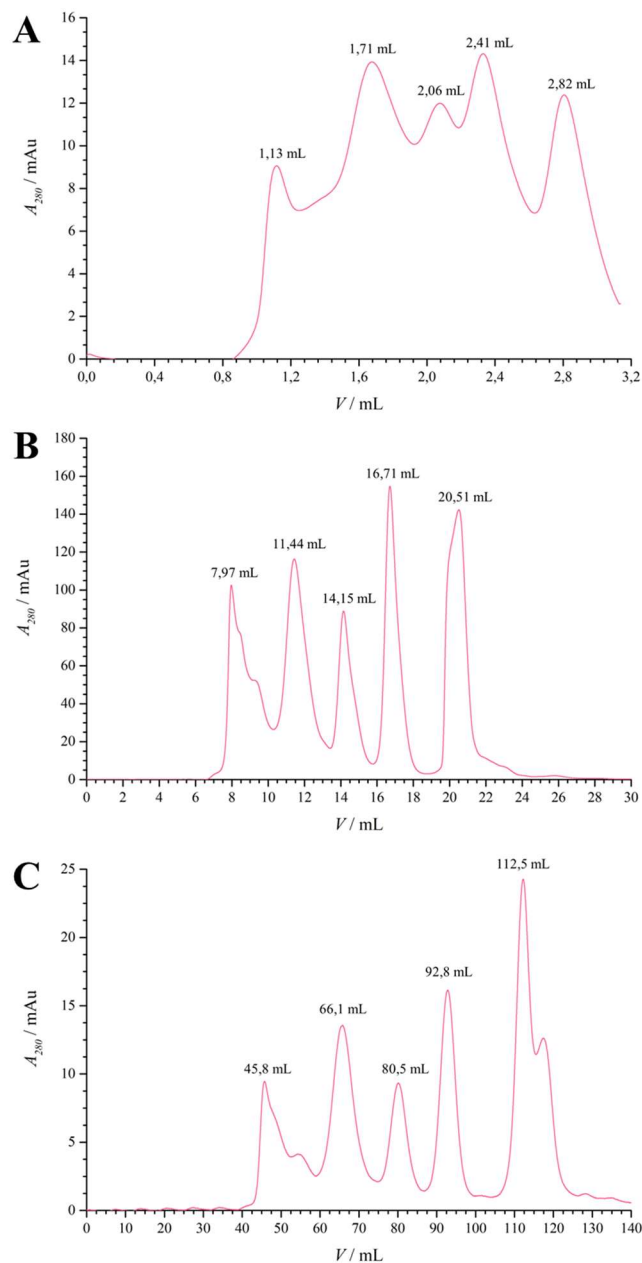
PMSF	fenilmetilsulfonil-fluorid
POPOP	1,4-bis(2-(4-metil-5-fenil)oksazolil)benzen
PPi	pirofosfat
RF	faktor otpuštanja
RNA	ribonukleinska kiselina
rRNA	ribosomska ribonukleinska kiselina
SDS	natrijev dodecilsulfat
SDS-PAGE	elektroforeza na poliakrilamidnom gelu uz prisutnost natrijevog dodecilsulfata
StArgRS	arginil-tRNA-sintetaza iz bakterije <i>S. thermophilum</i> s atpičnim motivom VLVQ
SttRNA ^{Arg}	transportna RNA za arginin iz bakterije <i>S. thermophilum</i>
TCA	trikloroctena kiselina
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletildiamin
TIPP	termostabilna anorganska pirofosfataza
Tris	tris(hidroksimetil)-aminometan
tRNA	transportna ribonukleinska kiselina
v_0	početna brzina enzimski katalizirane reakcije

§ 8. LITERATURNI IZVORI

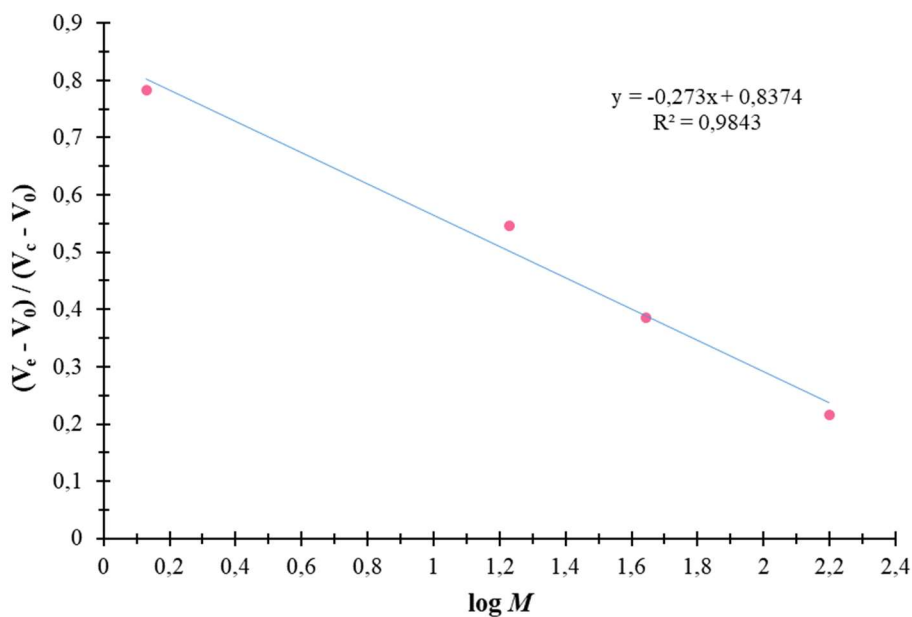
1. P. Lengyel, A. D. Soil, *Mechanism of Protein Biosynthesis*. vol. 33 (1969)
2. Y. Manickam *et al.* *Drug Discovery Today* **23** (2018) 1233–1240.
3. D.L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, Vol. 5, W.H. Freeman & Company, New York, 2008
4. I. Gruić-Sovulj, M. L. Longo, J. Jabłońska, D. S. Tawfik, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **57** (2022) 1–15.
5. J. J. Perona, A. Hadd, *Biochemistry* **51** (2012) 8705–8729.
6. S. I. Sekine *et al.* *J. Biol. Chem.* **276** (2001) 3723–3726.
7. A. Brkić M. Leibundgut, J. Jablonska, V. Zanki, Ž. Car, V. Petrović-Peroković, A. Maršavelski, N. Ban, I. Gruić-Sovulj, *Nat. Commun.* **14** 5498 (2023)
8. P. G. Livingstone, R. M. Morpew, A. R. Cookson, D. E. Whitworth, *Appl. Environ. Microbiol.* **84** (2018) e01040-18.
9. F. H. C. Crick, *J. Mol. Biol.* **19** (1966) 548–555.
10. T. A. Steitz, P. B. Moore, *Trends Biochem. Sci.* **28** (2003) 411–418.
11. A. Antoun, M. Y. Pavlov, M. Lovmar, M. Ehrenberg, *EMBO J.* **25** (2006) 2539–2550.
12. J. A. Steitz, K. Jakest, *Biochemistry* **25** (1975).
13. C. O. Gualerzi, C. L. Pon, *Biochemistry* **29** (1990) 5881-5889.
14. P. Milon *et al.* *Methods Enzymol.* **430** (2007) 1–30.
15. H. Gao *et al.* *Cell* **113** (2003) 789-801.
16. J. Frank, H. Gao, J. Sengupta, N. Gao, D. J. Taylor, *PNAS* **104** (2007) 19671-19678.
17. <https://www.khanacademy.org/science/biology/gene-expression-central-dogma/translation-polypeptides/a/trna-and-ribosomes> (datum pristupa 17. rujna 2023).
18. F. H. Crick. *Symp. Soc Exp. Biol.* **12** (1958) 138–162.
19. J. J. Perona, I. Gruic-Sovulj, *Top. Curr. Chem.* (2014) 1–41.
20. P. Brick, T. N. Bhatt, D. M. Blow, *J. Mol. Biol.* **208** (1988) 90090-90099.
21. S. Doublié, G. Bricogne, C. Gilmore, C. W. Carter, *Structure* **3** (1995) 17-31.
22. S. S. Yadavalli, M. Ibba, *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* **86** (2012) 1–43.

23. S. Fukai, *et al. RNA* **9** (2003) 100–111.
24. C. S. Francklyn, P. Mullen, *J. Biol. Chem.* **294**, (2019) 5365–5385.
25. C. A. Aldinger, A. K. Leisinger, G. L. Igloi, *FEBS J.* **279** (2012) 3622–3638.
26. P. Stephen *et al. J. Mol. Biol.* **430** (2018) 1590–1606.
27. D. Moras, J. Cavarelli, B. Delagouette, B. Né Dicte Delagoutte, *EMBO J.* **19** (2000) 5599–5610.
28. K. Bi *et al. Protein Cell* **5** (2014) 151–159.
29. J. J. Perona, M. A. Rould, T. A. Steitz, *Biochemistry* **32** (1993) 8758–8771.
30. M. Konno *et al. FEBS J.* **276** (2009) 4763–4779.
31. J. Cavarelli, B. Né Dicte Delagoutte, G. Eriani, J. Gangloff, D. Moras, *EMBO J.* **17** (1998) 5438–5448.
32. J. Li, Y.-N. Yao, M.-F. Liu, E.-D. Wang, *Biochem. J.* **376** (2003) 773–779.
33. G. C. Conant, K. H. Wolfe, *Nat. Rev. Genet.* **9** (2008) 938–950.
34. K. R. Andersen, N. C. Leksa, T. U. Schwartz, *Proteins* **81** (2013) 1857–1861.
35. A. Hirata *et al. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50** (2000) 1829–1832.
36. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P0A9K9/entry> (datum pristupa 03. svibnja 2024.)
37. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/B1IXT2/entry> (datum pristupa 03. svibnja 2024.)
38. J. Charlier, E. Gerlo, *Biochemistry* **18** (1979) 3171–3178.
39. A. R. Fersht, J. Gangloff, G. Dirheimer, *Biochemistry* **17** (1978) 3740–3746.

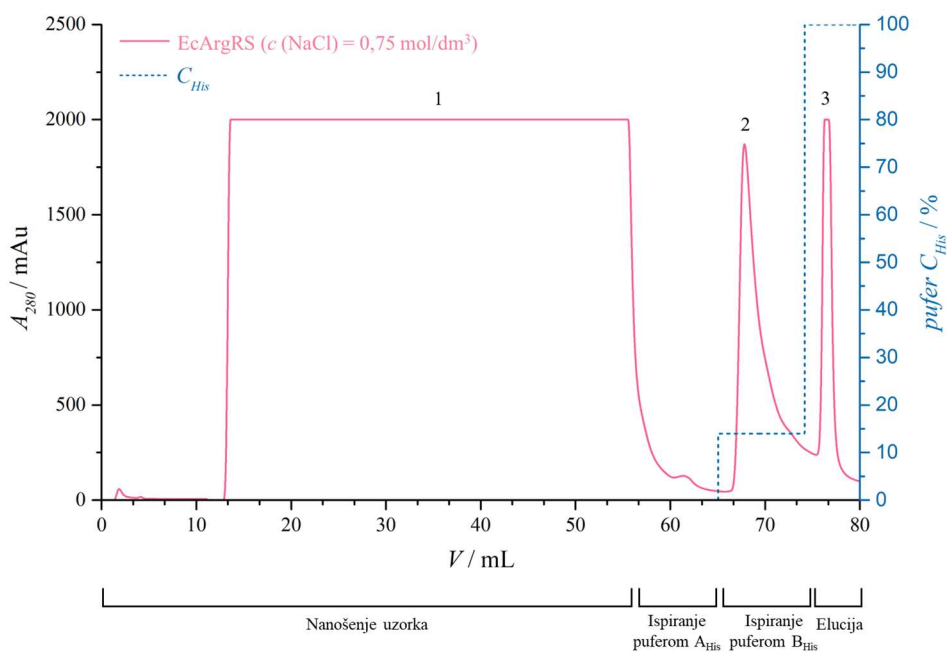
§ 9. DODATAK



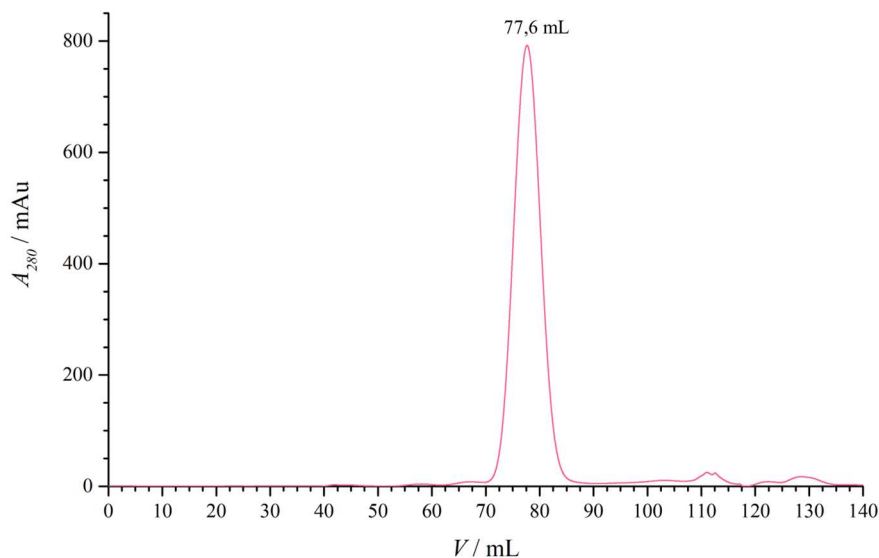
Slika D1. Kromatogrami kalibracije gel-filtracijskih kolona A) Superdex 200 Increase 5/150 GL, B) Superdex 200 Increase 10/300 GL i C) Superdex 200 HiLoad 16/600 . Kolone su kalibrirane *Bio-Rad* standardom koji sadrži redom s lijeva na desno: tiroglobulin goveda (670 kDa), γ -globulin goveda (158 kDa), ovalbumin kokoši (44 kDa), mioglobin konja (17 kDa) i vitamin B12 (1,35 kDa).



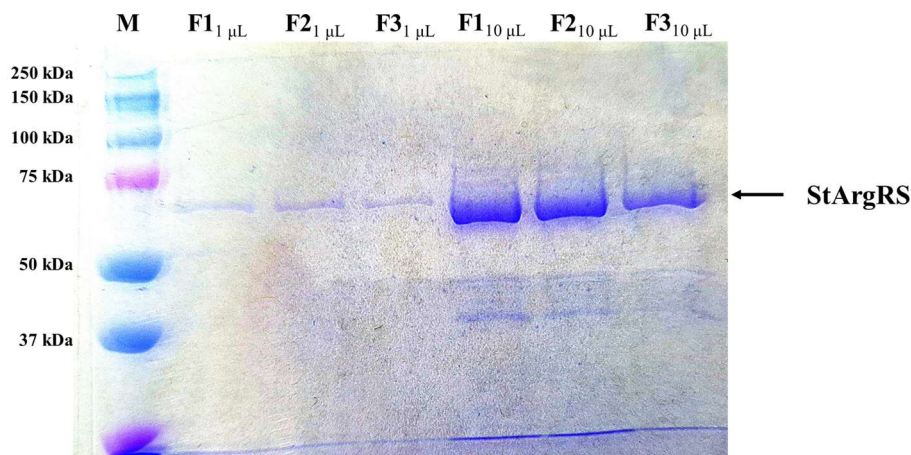
Slika D2. Baždarni dijagram kalibracije gel-filtracijskih kolona *Bio-Rad* standardom.



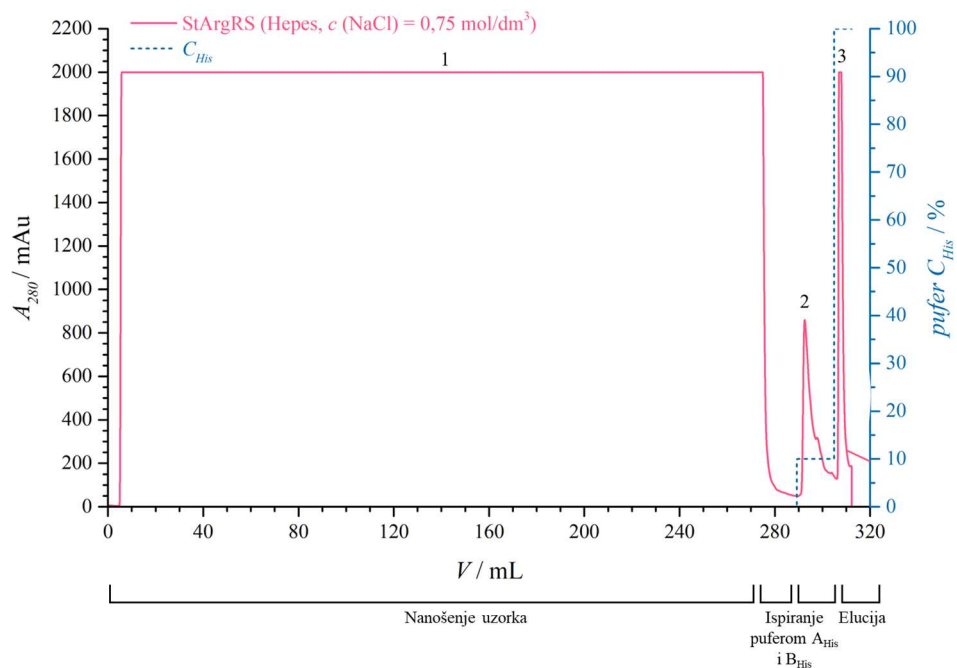
Slika D3. Kromatogram pročišćavanja *EcArgRS* afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu prema metodi opisanoj u tablici 3.5. i u standardnim pufferima (Hepes, $(\text{NaCl}) = 0,75 \text{ mol/dm}^3$). 1 – nevezana frakcija, 2 – nespecifično vezani proteini, 3 – *EcArgRS*.



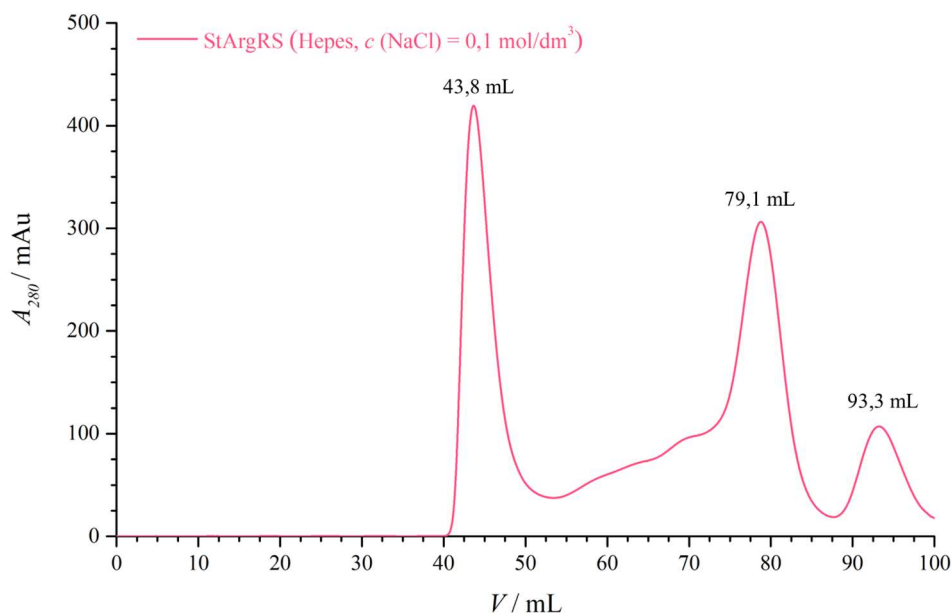
Slika D4. Kromatogram dobiven preparativnom gel-filtracijskom kromatografijom na koloni Superdex 200 HiLoad 16/600 uzorka EcArgRS ($V_e = 77,6$ mL) prema standardnoj metodi u standardnoj mobilnoj fazi (Hepes, c (NaCl) = $0,05$ mol/dm³) nakon afinitetne kromatografije.



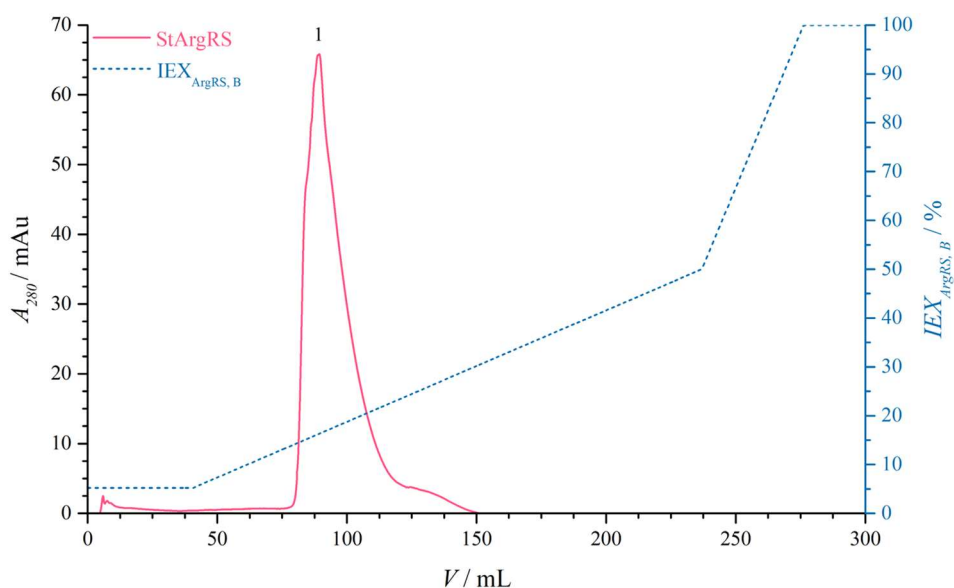
Slika D5. Gel dobiven SDS-PAGE metodom za analizu uspješnosti pročišćavanja StArgRS nakon lize reagensom *BugBuster*. U jažicama se redom nalaze: M – marker te frakcije dobivene nakon ionsko-izmjenjivačke kromatografije na koloni MonoQ F1₁ μL – F3₁₀ μL – alikvot od 1 μL / 10 μL frakcija 1, 2 i 3.



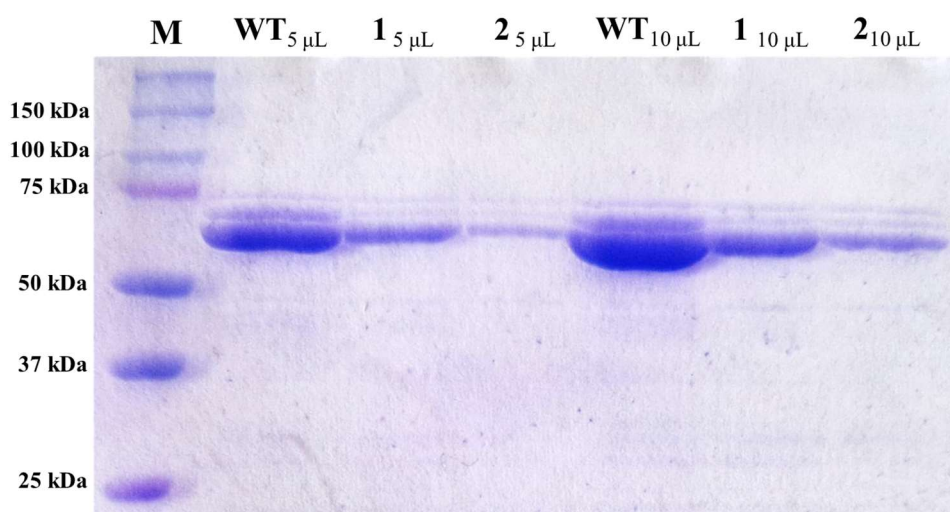
Slika D6. Kromatogram pročišćavanja StArgRS iz 6 L kulture afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu u standardnom Hepes puferu ($c(\text{NaCl}) = 0,75 \text{ mol/dm}^3$). Vrpca #1 predstavlja nevezane stanične proteine, #2 nespecifično vezane proteine koji eluiraju tijekom ispiranja puferom B_{His} ($c(\text{imidazol}) = 40 \text{ mmol/dm}^3$), #3 StArgRS.



Slika D7. Kromatogram preparativne gel-filtracijske kromatografije StArgRS na koloni Superdex 200 HiLoad 16/600 uzorka StArgRS ($V_e = 79,1 \text{ mL}$) nakon afinitetne kromatografije, u standardnoj mobilnoj fazi (Hepes, $c(\text{NaCl}) = 0,1 \text{ mol/dm}^3$) i prema standardnom postupku. Na 43,8 mL i 93,3 mL eluiraju se proteinski agregati i druge nečistoće.



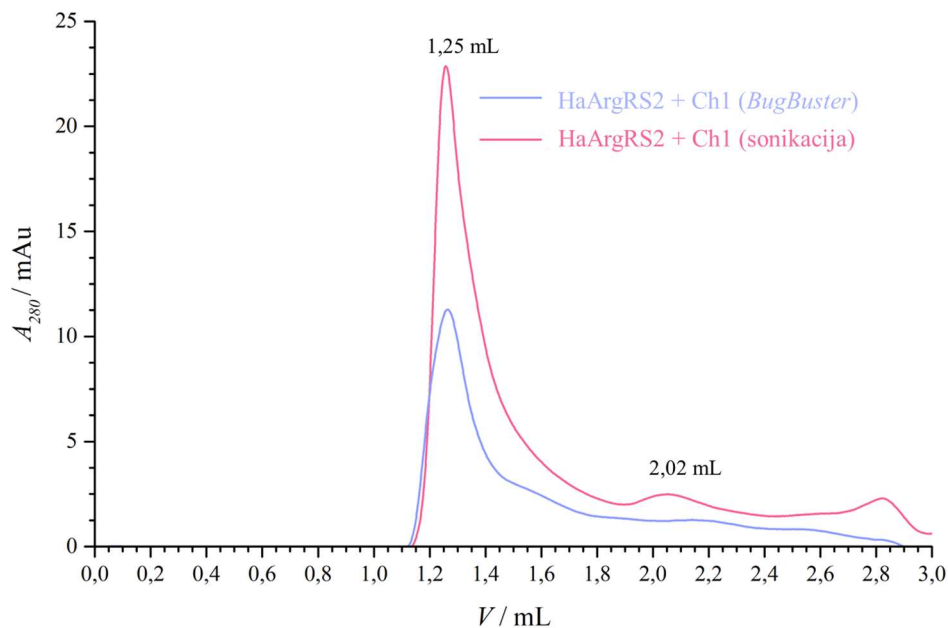
Slika D8. Kromatogram ionsko-izmjenjivačke kromatografije uzorka StArgRS nakon afinitetne i preparativne gel-filtracijske kromatografije, u puferu IEX_{ArgRS} (Hepes, $c(\text{NaCl}) = 0,1 \text{ mol/dm}^3$) s linearnim povećanjima udjela pufera IEX_{ArgRS, B} (Hepes, $c(\text{NaCl}) = 1 \text{ mol/dm}^3$). Vrpeca #1 predstavlja StArgRS.



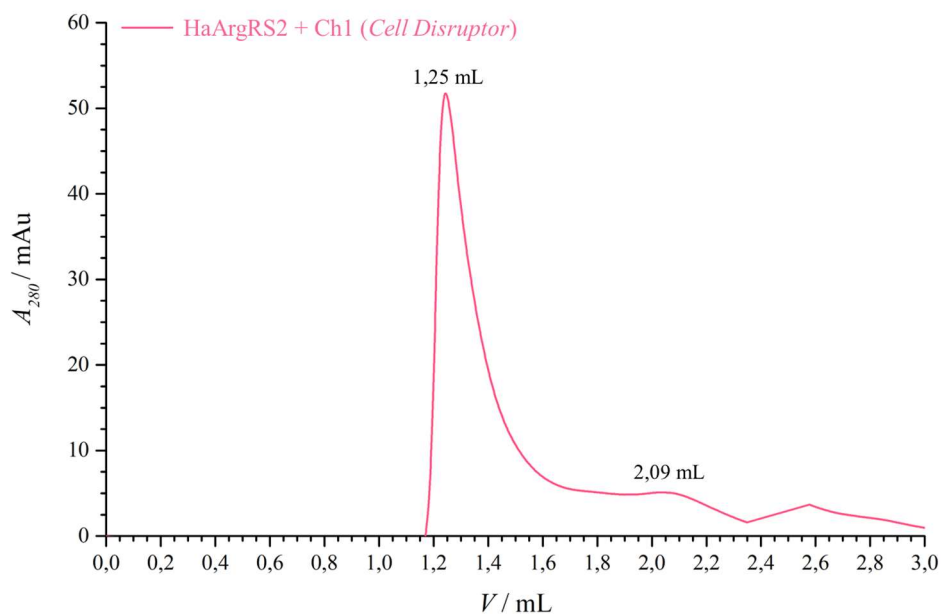
Slika D9. Gel dobiven SDS-PAGE metodom za analizu uspješnosti pročišćavanja divljeg tipa StArgRS i mutanata StArgRS_HLVQ (1) i StArgRS_HLGQ (2). U jažicama se nalaze: M – marker, WT_{5 μL/10 μL} – naneseo 5/10 μL ukoncentriranog uzorka StArgRS divljeg tipa, 1_{5 μL/10 μL} – naneseo 5/10 μL ukoncentriranog uzorka StArgRS_HLVQ, 2_{5 μL/10 μL} – naneseo 5/10 μL ukoncentriranog uzorka StArgRS_HLGQ.

Tablica D10. Spektrofotometrijski određena koncentracija i čistoća te volumen pročišćenog uzorka iz 250 mL kulture mutanata StArgRS (HLVQ) i StArgRS (HLGQ).

	$\gamma_0 / \mu\text{g}/\mu\text{L}$	$V_{\text{pročišćeno}} / \mu\text{L}$	$A_{260/280}$
StArgRS_HLVQ	0,84	100	0,79
StArgRS_HLGQ	0,48	100	0,89



Slika D11. Kromatogrami dobiveni analitičkom gel-filtracijskom kromatografijom HaArgRS2 + Ch1 na koloni Superdex 5/150 nakon afinitetne kromatografije i lize bakterijskih stanica a) komercijalnim reagensom *BugBuster* i b) sonikacijom u standardnoj mobilnoj fazi (MES, $c(\text{NaCl}) = 0,5 \text{ mol/dm}^3$). HaArgRS2 eluira na 2,02 mL, a proteinski agregati na 1,25 mL.



Slika D12. Kromatogram dobiveni analitičkom gel-filtracijskom kromatografijom HaArgRS2 + Ch1 na koloni Superdex 5/150 nakon afinitetne kromatografije i lize bakterijskih stanica na uređaju *Cell Disruptor* u standardnoj mobilnoj fazi (MES, $c(\text{NaCl}) = 0,5 \text{ mol/dm}^3$). HaArgRS2 eluira na 2,09 mL, a proteinski agregati na 1,25 mL

§ 10. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci

Ime i prezime: Karla Knežević

Datum rođenja: 13. kolovoza 1999.

Mjesto rođenja: Slavonski Brod

Obrazovanje

2006.-2014. Osnovna škola Ivana Kozarca, Županja

2014.-2018. Gimnazija Županja, Županja

2018.-2021. Sveučilišni preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

2021.-2024. Sveučilišni diplomski studij, smjer: istraživačka kemija, grane: biokemija i fizikalna kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Nagrade i priznanja

2020. 10 % najuspješnijih studenata na Sveučilišnom preddiplomskom studiju kemije 2019./2020.

2023. 10 % najuspješnijih studenata na Sveučilišnom diplomskom studiju istraživačke kemije 2022./2023.

2023. Medalja Kemijskog odsjeka za izvrsnost tijekom studiranja

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2019. Dan i noć na PMF-u (Otvoreni dan kemije)

2023. Dan i noć na PMF-u (Otvoreni dan kemije)

2023. Smotra Sveučilišta u Zagrebu