

# Važnost aminokiselina Arg295 i Met367 za stabilnost enzima auksin-amidohidrolaze BrILL2 iz kupusa *Brassica rapa* ssp. *pekinensis*

---

Rubić, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:217:708208>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Ivana Rubić

**VAŽNOST AMINOKISELINA Arg295 I  
Met367 ZA STABILNOST ENZIMA AUKSIN-  
AMIDOHIDROLAZE BrILL2 IZ KUPUSA  
*Brassica rapa ssp. pekinensis***

**Diplomski rad**

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

Zagreb, 2018. godina

Ovaj diplomski rad izrađen je na Institutu Ruđer Bošković, u Laboratoriju za kemijsku biologiju Zavoda za molekularnu biologiju, pod mentorstvom dr. sc. Branke SalopekSondi, zn. savj. i neposrednim voditeljstvom dipl. ing. bio. Ane Smolko. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je doc. dr. sc. Jasmina Rokov-Plavec.

Rad je izrađen u okviru projekta “Fitohormoni u abiotskom stresu kupusnjača: mehanizam tolerancije i primjena” (PhytoBraCro), Hrvatske zaklade za znanost (broj: IP-2014-09-4359) te je predan na ocjenu Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar kemije.

## Zahvale

Veliko hvala *doc. dr. sc. Jasmini Rokov- Plavec* na usmjerenju u Laboratorij za kemijsku biologiju Instituta „Ruđer Bošković“, kao i na susretljivosti, ljubaznosti, strpljenju te velikoj pomoći oko svih formalnih stvari vezanih za obranu

Veliko hvala *dipl. ing. bio. Ani Smolko* na pomoći, susretljivosti, ljubaznosti, velikom strpljenju, korisnim savjetima te prijateljskom odnosu tokom izrade eksperimentalnog dijela diplomskog rada

Veliko hvala voditeljici Laboratorija za kemijsku biologiju, *dr. sc. Branki Salopek-Sondi* na susretljivosti, ljubaznosti, srdačnosti te stručnim savjetima vezanim za izradu diplomskog rada

Veliko hvala *svim članovima* Laboratorija za kemijsku biologiju na primanju u njihovu malu zajednicu

Veliko hvala *mojoj obitelji* na razumijevanju, strpljenju, financijskoj pomoći te ohrabrenju tokom studiranja

Veliko hvala *mojoj majci* koja je moja najveća podrška kako tijekom studiranja tako i cijeli moj život

Veliko hvala *svim mojim kolegama* koji su mi uljepšavali studiranje, s kojima sam dijelila predavaonice, laboratorije, nervozu pred ispite, smijeh, suze, hvala im na svim ispijenim kavama i druženjima

Veliko hvala *mom Ivanu* na velikom strpljenju, ohrabrenju i pomoći tokom studiranja kad god je trebala

Veliko hvala *svim mojim dragim prijateljima*, koji su uvijek tu za mene

# Sadržaj

<b>SAŽETAK</b> .....	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vii</b>
<b>§ 1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED</b> .....	<b>2</b>
2.1. <i>Biljni hormoni</i> .....	2
2.1.1. Auksini .....	2
2.2. <i>Auksin-amidohidrolaze</i> .....	9
2.2.1. Auksin-amidohidrolaza iz kineskog kupusa ( <i>Brassica rapa</i> ), BrILL2 .....	11
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>14</b>
3.1. <i>Materijali</i> .....	14
3.1.1. Bakterijski sojevi.....	14
3.1.2. Plazmidni vektor .....	14
3.1.3. Hranjive podloge: Luria-Bertani (LB) podloga .....	16
3.1.4. Otopine i puferi za molekularno-biološke, biokemijske i biofizičke pokuse.....	16
3.1.5. Komplet za izolaciju plazmidne DNA (GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma)).....	17
3.1.6. Otopine za elektroforezu DNA u agaroznom gelu.....	17
3.1.7. Puferi za izolaciju i pročišćavanje rekombinantnih proteina .....	19
3.1.8. Puferi i otopine za razdvajanje i analizu proteina u SDS poliakrilamidnom gelu.....	21
3.1.9. Puferi za dijalizu.....	23
3.1.10. Otopine za određivanje koncentracije proteina .....	24
3.2. <i>Metode</i> .....	24
3.2.1. Sravnjivanje primarnih sljedova auksin-amidohidrolaza iz uročnjaka i kineskog kupusa.....	24
3.2.2. Izrada filogenetskog stabla auksin-amidohidrolaza iz uročnjaka i kineskog kupusa.....	25
3.2.3. Rješavanje tercijarne strukture BrILL2 homolognim modeliranjem s online alatom Phyre.....	25
3.2.4. Priprema hranjivih podloga za uzgoj bakterija .....	25
3.2.5. Priprema kompetentnih stanica BL21((DE3)RIL) <sup>+</sup> .....	26
3.2.6. Izolacija plazmidne DNA .....	27
3.2.7. Elektroforeza u agaroznom gelu .....	28
3.2.8. Transformacija bakterijskih stanica plazmidom .....	28
3.2.9. Uzgoj i heterologna ekspresija rekombinantnog proteina BrILL2.....	29
3.2.10. Priprema kolone Ni-NTA u svrhu pročišćavanja proteina.....	30
3.2.11. Priprema lizata <i>E. coli</i> za pročišćavanje putem His-kolona.....	30
3.2.12. Afinitetna kromatografija na His-koloni .....	30
3.2.13. Elektroforeza u denaturirajućim uvjetima (SDS-PAGE) .....	31

3.2.14. Dijaliza u fosfatnom i kakodilatnom puferu .....	32
3.2.15. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu .....	33
3.2.16. DSC (diferencijalna pretražna kalorimetrija) .....	34
3.2.17. CD (cirkularni dikroizam) .....	35
<b>§ 4. Rezultati i rasprava .....</b>	<b>37</b>
<i>4.1. Rezultati.....</i>	<i>37</i>
4.1.1. Srađivanje sekvenci auksin-amidohidrolaza iz B.rapa i A. thaliana .....	37
4.1.2. Izrada filograma auksin-amidohidrolaza iz Brassica rapa i Arabidopsis thaliana	39
4.1.3. Predviđanje terciarne strukture auksin-amidohidrolaze BrILL2 iz kineskog kupusa (Brassica rapa) .....	40
4.1.4. Izolacija plazmida .....	41
4.1.5. Izolacija i pročišćavanje prekomjerno eksprimiranih rekombinantnih proteina (divljeg tipa i mutiranih varijanti) .....	42
4.1.6. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu .....	44
4.1.7. Analiza termičke stabilnosti eksprimiranih rekombinantnih proteina (divljeg tipa i mutiranih varijanti).....	45
4.1.8. Analiza očuvanosti sekundarne strukture divljeg tipa (BrILL2).....	48
<i>4.2. Rasprava.....</i>	<i>49</i>
<b>§ 5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>52</b>
<b>§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA .....</b>	<b>53</b>
<b>§ 7. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>liv</b>
<b>§ 8. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>lviii</b>



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

Diplomski rad

## SAŽETAK

### VAŽNOST AMINOKISELINA Arg295 I Met367 ZA STABILNOST ENZIMA AUKSIN-AMIDOHIDROLAZE BrILL2 IZ KUPUSA *Brassica rapa ssp. pekinensis*

*Ivana Rubić*

Istražena je uloga aminokiselina R295 i M367 za stabilnost enzima auksin-amidohidrolaze BrILL2 iz kineskog kupusa (*Brassica rapa L.*). U tu svrhu korišteni su konstrukti R295A i M367A prethodno dobiveni mjesno-specifičnom mutagenezom. Rekombinantni proteini, divlji tip i mutirane varijante, su proizvedeni heterolognom ekspresijom u bakteriji *Escherichia coli*, pročišćeni afinitetnom kromatografijom pomoću Ni-NTA agaroze i provjereni elektroforezom u poliakrilamidnom gelu. Modeliranjem je predložen model, odnosno tercijarna struktura divljeg tipa BrILL2, a kao predložak korištena je auksin-amidohidrolaza iz *Arabidopsis thaliana*. Aminokiseline R295 i M367 stvaraju međusobnu interakciju u blizini aktivnog mjesta koja potpomaže postizanju stabilnije zatvorene konformacije enzima. Njihova mutacija u alanin dovodi do perturbacija u sekundarnoj strukturi mutiranih varijanata u odnosu na divlji tip što je dokazano metodom cirkularnog dikroizma. Diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom pokazano je da promjene u sekundarnoj strukturi uzrokovane mutacijama utječu na stabilnost enzima.

(53 stranica, 21 slika, 24 tablica, 75 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: auksin-amidohidrolaza, arginin 295, BrILL2, cirkularni dikroizam, diferencijalna pretražna kalorimetrija, metionin 367

Mentor: dr. sc. Branka SalopekSondi, zn.savj.

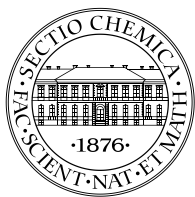
Neposredni voditelj: Ana Smolko, dipl. ing. bio.

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): doc. dr. sc. Jasmina Rokov-Plavec

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec
  2. izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković
  3. prof. dr. sc. Biserka Prugovečki
- Zamjena: doc. dr. sc. Marko Močibob

Datum diplomskog ispita: 18. lipnja 2018.



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

Diploma Thesis

## ABSTRACT

### THE IMPORTANCE OF Arg295 AND Met365 AMINO ACIDS FOR THE STABILITY OF AUXIN-AMIDOHYDROLASE BRILL2 ENZYME FROM CABBAGE *Brassica rapa ssp. pekinensis*

*Ivana Rubić*

The role of amino acids R295 and M367 was investigated for the stability of auxin-amidohydrolase BrILL2 from Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.). Constructs R295A and M367A, previously prepared by site specific mutagenesis, were used. The recombinant proteins were produced by heterologous expression in *Escherichia coli* bacteria, purified by affinity chromatography using Ni-NTA agarose resin and confirmed by electrophoresis in polyacrylamide gel. Tertiary structure of wild type BrILL2 was modeled on the basis of auxin-amidohydrolase from *Arabidopsis thaliana*. Amino acids R295 and M367 interact in the proximity of the active site and this interaction participate in stabilization of closed conformation. Their mutation to alanine results in the perturbation of secondary structure of the mutants in comparison to the wild type which was proven by circular dichroism. Differential scanning calorimetry determined that the change of secondary structure affects the stability of the enzyme.

(53 pages, 21 figures, 24 tables, 75 references, original in Croatian)

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

Keywords: auxin-amidohydrolase, arginine 295, BrILL2, circular dichroism, differential scanning calorimetry, methionine 367

Mentor: Dr. Branka Salopek Sondi, Senior Scientist

Assistant mentor: Ana Smolko, dipl. ing. biol.

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Jasmina Rokov-Plavec, Assistant Professor

Reviewers:

1. Dr. Jasmina Rokov Plavec, Assistant Professor
  2. Dr. Vesna Petrović Peroković., Associate Professor
  3. Dr. Biserka Prugovečki, Professor
- Substitute: Dr. Marko Močibob, Assistant Professor

Date of exam: 18th of June 2018



## § 1. UVOD

Auksini su biljni hormoni odgovorni za procese rasta i razvoja biljaka. Prvi otkriveni auksin i ujedno najzastupljeniji u biljkama je indol-3-octena kiselina (IAA).<sup>1</sup> Pojavljuju se u slobodnoj, aktivnoj formi ili u obliku neaktivnih konjugata. Visoka koncentracija auksina toksična je za biljku te su stoga slobodne forme zastupljene samo s 5% dok su konjugati zastupljeni s 95% u biljkama.

Enzimi auksin-amidohidrolaze, koji hidroliziraju konjugate auksina, otpuštajući slobodne forme auksina pripadaju velikoj skupini metalopeptidaza (M20) prema bazi MEROPS i prepoznatljivi su po karakterističnoj strukturi koja se sastoji od dvije domene, katalitičke i satelitne domene.<sup>2-4</sup> Prva otkrivena auksin-amidohidrolaza bila je ILR1 auksin-amidohidrolaza (od engl. skraćenice IAA-Leucine resistant) iz biljke uročnjaka, *Arabidopsis thaliana*.<sup>5</sup> Auksin-amidohidrolaza iz kineskog kupusa (*Brassica rapa* L.), BrILL2, katalizira hidrolizu aminokiselinskih konjugata auksina te ima značajnu ulogu u metabolizmu auksina.

Cilj istraživanja ovoga diplomskog rada bio je saznati ulogu aminokiselina arginin 295 (R295) i metionin 367 (M367) za stabilnost enzima auksin-amidohidrolaze BrILL2 iz kineskog kupusa (*B. rapa*). U tu svrhu prethodno su pripremljeni konstrukti koji sadrže mjesno specifične mutacije R295A i M367A u *BrILL2* genu. Razlog zbog kojeg je odabran R295 je potencijalna uloga te aminokiseline u mehanizmu zatvaranja satelitne domene proteina.<sup>6</sup> Bočni lanac R295 i atomi polipeptidne okosnice aminokiselina tvore petlju u blizini aktivnog mjesta, a najčešća interakcija je između R295 i M367.<sup>6</sup> Kako bi se provelo istraživanje, bilo je potrebno proizvesti protein divljeg tipa auksin-amidohidrolaze, te proteine koji sadrže spomenute jednostruke mutacije. Proteini su proizvedeni u bakteriji *Escherichia coli*, pročišćeni afinitetnom kromatografijom, provjereni poliakrilamidnom gel elektroforezom te je njihova stabilnost istražena metodom diferencijalne pretražne kalorimetrije i cirkularnim dikroizmom.

## § 2. LITERATURNI PREGLED

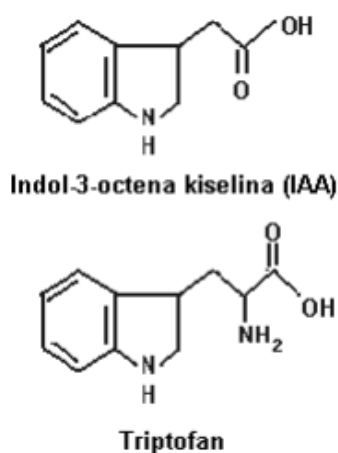
### 2.1. Biljni hormoni

U fiziološki aktivne tvari kod biljaka spadaju tvari koje djeluju na fiziološko-biokemijske procese na način da ih stimuliraju ili inhibiraju. To djelovanje dovodi prvo do metaboličkih promjena, a kasnije i do morfoloških.

Biljni hormoni ili fitohormoni su spojevi koji se prirodno pojavljuju u biljkama i reguliraju njihov rast i razvitak. Sinteza biljnih hormona je lokalizirana, ali se mogu transportirati u tkiva, pa se nazivaju i transportni kemijski glasnici.<sup>7</sup> Prvotna istraživanja otkrivene biljne hormone su podijelila u pet skupina: auksini, apscizinska kiselina, citokinini, giberelini i etilen<sup>8</sup>, a kasnija istraživanja uvela su brasinosteroide, jasmonate, salicilnu kiselinu i poliamine.<sup>9</sup> Svi su male molekulske mase i djeluju pri niskim koncentracijama. U visokim koncentracijama ne djeluju stimulacijski, već inhibicijski.

#### 2.1.1. Auksini

Auksini su prvi otkriveni biljni hormoni koji djeluju stimulacijski na rast i razvitak biljke. Auksini utječu na rast, diobu, elongaciju i diferencijaciju stanice, sudjeluju u apikalnoj (vršnoj) dominaciji, potiču cvjetanje, djeluju na nastanak i razvoj korijena, sinkroniziraju sazrijevanje i opadanje plodova.<sup>10</sup> Kao glavni biosintetski put auksina smatra se tzv. Trp-ovisni put gdje je prekursor auksina aminokiselina triptofan (slika 1).<sup>1</sup> Auksini se također mogu sintetizirati i tzv. Trp-neovisnim putem. Male su molekulske mase te mogu djelovati pri niskim koncentracijama. Proizvode se u izdancima i meristemima korijena te se transportiraju na velike udaljenosti provodnim tkivom do ostalih dijelova biljke. Od posebne važnosti su nositelji auksina poznati kao PIN (PINOID) proteini koji stvaraju auksinske gradijente unutar i izvan stanica te pomažu uspostaviti polarne transportne puteve.<sup>10</sup> Najrasprostranjeniji i prvi otkriveni prirodni auksin je indol-3-octena kiselina (IAA).<sup>1</sup>



Slika 1. Kemijska struktura auksina (gore) i aminokiseline triptofan (dolje). Preuzeto i priagođeno iz Vukadinović (2011)<sup>7</sup>

### *Otkriće auksina*

Prve rane eksperimente s auksinima izvodio je Charles Darwin tako da je proučavao savijanje koleoptile prema izvoru svjetlosti. Boysen Jensen je došao do zaključka da je savijanje koleoptile rezultat neproporcionalnog produžnog rasta.<sup>7</sup> Godine 1882. Theophil Cziesielki proučavao je savijanje korijena prema gravitaciji, te u svome istraživanju pretpostavio, kao i Darwin, postojanje auksina. 1931. Kógl i Haagen Smit su otkrili spojeve u ljudskom urinu koji moduliraju rast biljaka te su ih nazvali auksin A i B (riječ auksin potječe od grčke riječi „auxein”, što znači rasti).<sup>11</sup> Nadalje, spoj s auksinskom aktivnošću izoliran iz gljiva, nazvan heteroauksin, Kenneth V. Thimann je 1937. god. izolirao i riješio kemijsku strukturu auksina tj. utvrdio da se radi o indol-3-octenoj kiselini (IAA).<sup>12</sup>

### *Vrste auksina*

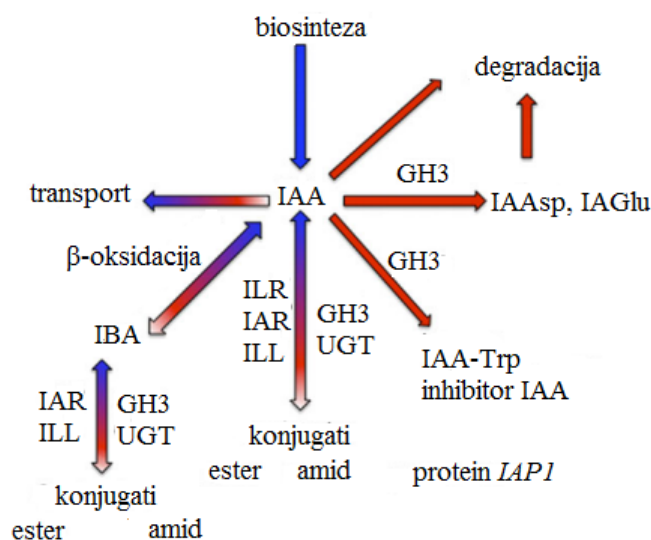
Postoje prirodni te sintetski proizvedeni analozi auksina. Kakav će biti učinak auksina na biljku ovisi o vrsti auksina i koncentraciji. Pored IAA kao najzastupljenijeg prirodnog auksina, identificirani su za sada indol-3-maslačna kiselina (IBA) u nekoliko biljnih vrsta i indol-3-propionska kiselina (IPA) u nekih mikroorganizama i uročnjaka uslijed stresa. Nadalje, u grašku je otkriven auksin 4-klor-indol-3-octena kiselina (4Cl-IAA), u suncokretu i duhanu fenil-octena kiselina (PAA).<sup>7</sup>

U sintetski proizvedene auksine spadaju 1-naftalooctena kiselina (NAA) i 2,4-diklorofenoksiocetna kiselina (2,4-D) često korišteni u hortikulturi i biotehnologiji uzgoja biljaka *in vitro*. Neki od sintetski proizvedenih auksina kao npr. 2,4-D i 2,4,5-triklorofenoksiocetna kiselina (2,4,5-T) koriste se i kao herbicidi jer imaju sposobnost uništavanja korova.<sup>7</sup>

### Homeostaza auksina

Homeostaza je proces održavanja stalnih unutarnjih uvjeta u stanici ili živom biću. Održava stalnu temperaturu, brzinu metabolizma, sastav, razinu i tlak tjelesnih tekućina.<sup>13</sup> Unutarnji uvjeti moraju biti stabilni i relativno konstantni. Predstavlja stanje uravnoteženosti i teži stanju postizanja uravnoteženosti ukoliko dođe do njegovog narušavanja, te su uključeni svi mehanizmi koji će dovesti do postizanja ponovne uravnoteženosti.<sup>13</sup> Tako je za biljku važna kontrola razine auksina i drugih fitohormona jer prevelika koncentracija može djelovati inhibicijski ili izazvati toksične efekte.

U regulaciji homeostaze auksina sudjeluju sljedeći procesi: metabolizam auksina (biosinteza i razgradnja), konjugacija auksina te njihov transport (slika 2).



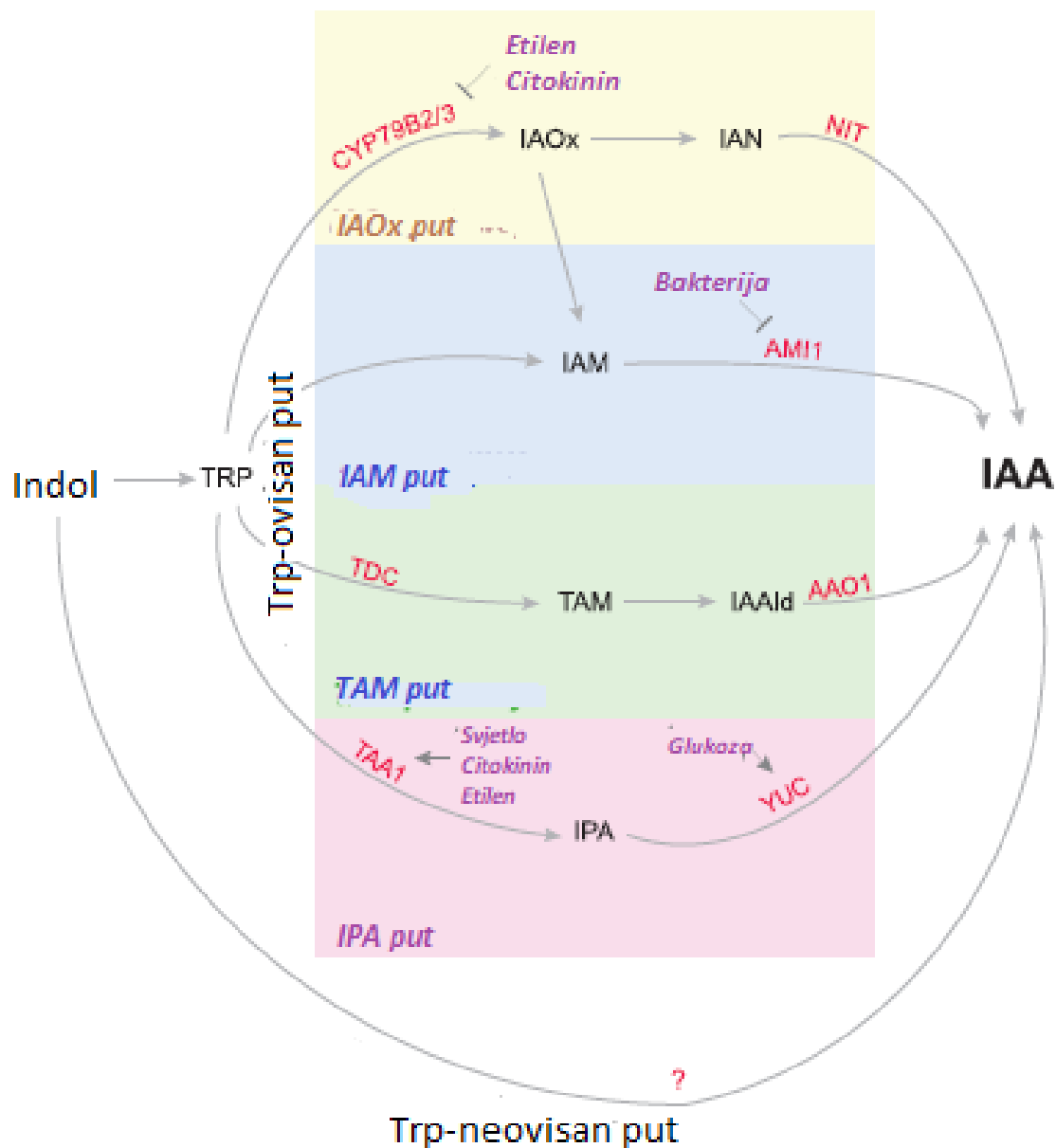
Slika 2. Shema prikazuje procese uključene u homeostazu auksina. Plave strelice simboliziraju reakcije koje dovode do povećanja razine aktivne forme auksina IAA, dok crvene do smanjenja. Auksin-amidohidrolaze (ILR, IAR, ILL) sudjeluju u povećanju razine aktivne IAA hidrolizirajući neaktivne konjugate. Preuzeto i prilagođeno iz Ludwig-Müller (2011)<sup>13</sup>

*Biosinteza auksina*

S obzirom da su auksini uključeni u sve aspekte biljnog razvoja, može ih se nazvati i „kućepaziteljima“ biljaka. Mehanizam biosinteze auksina nije još u potpunosti razjašnjen.<sup>14</sup> Do sada su otkrivena dva biosintetska puta IAA prema prepoznatljivim središnjim međuproduktima: biosintetski put auksina ovisan o triptofanu (Trp-ovisan) i biosintetski put auksina neovisan o triptofanu (Trp-neovisan) (slika 3).<sup>14</sup>

Trp-ovisan put smatra se glavnim putem biosinteze auksina u biljaka. Prema glavnim međuproduktima može se podijeliti u nekoliko puteva, a to su indol-3-acetaldoksimski (IAOx) put, indol-3-acetamidni (IAM) put, triptaminski (TAM) put te put indol-3-piruvatne kiseline (IPA) (slika 3.). Veliki broj predloženih puteva biosinteze auksina može odgovarati različitim strategijama kako bi se osigurala proizvodnja auksina<sup>14</sup>, kao što je uključivanje faktora okoliša (temperatura, uvjeti tla, vodni režim itd.). Ove strategije su uobičajeni mehanizam za prilagodbu rasta biljke promjenjivim uvjetima okoliša. Nadalje, u vrsti *Lemna gibba* Trp-ovisan put dominira pri niskim (15 °C), a Trp-neovisan put dominira pri visokim (30 °C) temperaturama.<sup>17</sup>

Trp-neovisan put biosinteze auksina slabije je istražen i manje zastupljen u biljaka. Pretpostavlja se da se uključuje u specifičnim situacijama prilikom biljnog rasta i razvitka. Michalczuk i suradnici<sup>15</sup> su otkrili da je biosintetski put auksina neovisan o triptofanu odgovoran za proizvodnju IAA u mrkvama i to tijekom somatske embriogeneze. Indol je prvo predložen kao prekursor, ali su daljnja istraživanja to opovrgnula i predložila indol-3-glicerol fosfat kao prekursor. Iako brojni enzimi i međuprodukti koji sudjeluju u ovome putu nisu još do kraja identificirani, istraživanja na auksotrofima *Arabidopsis thaliana* su pokazala kako je biosinteza IAA uglavnom neovisna o triptofanu.<sup>16</sup>



Slika 3. Biosinteza auksina. U Trp-ovisan put spadaju IAOx put (žuto), IAM put (plavo), TAM put (zeleno) i IPA put (ružičasto). Međuprodukti koji sudjeluju u biosintezi prikazani su crnom bojom, enzimi crvenom bojom. Ljubičastom bojom su prikazani unutarnji i vanjski čimbenici koji reguliraju ekspresiju gena. Enzimi koji kataliziraju neke od predloženih reakcija još uvijek nisu otkriveni. AAO-acetaldehid oksidaza, AMI1-amidaza 1, CYP79B2/3-citokrom P450, IAN-indol-3-acetonitril, NIT-nitrilaza, TAA1-triptofan aminotransferaza iz *Arabidopsis*, TAM-triptamin, TDC-triptofan dekarboksilaza, TRP-triptofan, IPA-indol-3-piruvatska kiselina, IAA-indol-3-octena kiselina, IAAld-indol-3-acetaldehid, IAM-indol-3-acetamid, IAOx-indol-3-acetaldoksim. Preuzeto i prilagođeno iz Rosquete (2012)<sup>14</sup>

*Konjugacija auksina*

Mali udio auksina, oko 5% od ukupne koncentracije auksina u biljkama nalazi se u slobodnom obliku (aktivnom), dok je preostali udio auksina pohranjen u obliku konjugata i može se hidrolizirati u slobodne auksine, ovisno o potrebama biljke. Postoje dvije vrste konjugacije: reverzibilna i ireverzibilna konjugacija. Reverzibilnom konjugacijom se dobivaju konjugati koji služe kao skladišna forma te se mogu ponovno hidrolizirati u aktivan oblik, dok se ireverzibilnom konjugacijom auksini obilježavaju za razgradnju.<sup>3,13</sup>

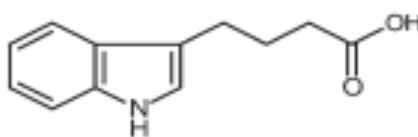
Do sada su opisane tri grupe auksinskih konjugata u biljaka: (i) esterski konjugati malih molekulskih masa auksina sa šećerima, (ii) amidni konjugati malih molekulskih masa auksina s aminokiselinama i (iii) konjugati velikih molekulskih masa auksina s peptidima ili proteinima.<sup>13</sup> Hidrolizom amidne (pseudo-peptidne) veze u aminokiselinskim konjugatima s IAA može se dobiti aktivni oblik auksina. Koji od ova tri oblika konjugata će se pojaviti, ovisi o biljnoj vrsti i istraživanome tkivu. Npr. u sjemenci kukuruza, kao i većinom u jednosupnica, auksini su pohranjeni u obliku esterskih konjugata sa šećerima, dok u *A. thaliana*, kao i većinom u dvosupnicama, pretežno prevladavaju amidni konjugati auksina sa aminokiselinama.<sup>13</sup>

Konjugati sa šećerima identificirani su u biljkama iz skupine jednosupnica i iz skupine dvosupnica. Imaju ulogu u pohrani auksina, ali i u inaktivaciji IAA.<sup>18</sup> Aminokiselinski konjugati identificirani su u mnogim biljnim vrstama. IAA-Asp nađen je u škotskom boru<sup>19</sup>, IAA-Glu i IAA-Asp u krastavcima i soji<sup>20</sup>, IAA-Ala u smreci<sup>21</sup>. U biljkama *Arabidopsis thaliana* i *Helleborus niger* identificiran je i istraživan širok raspon aminokiselinskih konjugata, a neki od njih su: IAAsp, IAGly, IAAala, IAPhe, IAVal, IAAlle i IAGlu.<sup>22,23</sup> Konjugati proteina i peptida su velike molekulske mase, kao što su IAA-polipeptidni konjugati otkriveni u jagodama i grašku.<sup>18</sup>

Spomenuto je da se hidrolizom auksinskih konjugata može dobiti aktivni oblik auksina. Međutim, postoje konjugati koji neće dati aktivan oblik auksina. Njihova uloga je jako važna za biljku jer tako sprječavaju stvaranje prevelike koncentracije auksina koja je toksična za biljku. Konjugati IAA s aspartatom i glutamatom (IAA-Asp i IAA-Glu) smatraju se ireverzibilnim kataboličkim konjugatima obilježenima za daljnu detoksifikaciju iz biljaka, dok se ostali konjugati smatraju sporo-otpuštajućim izvorom slobodne IAA.<sup>13</sup>

### *β-oksidacija indol-3-maslačne kiseline*

Osim što se aktivni, slobodni auksin proizvodi biosintezom i hidrolizom reverzibilnih konjugata, postoji i treći način proizvodnje auksina, odnosno IAA, a to je β-oksidacija indol-3-maslačne kiseline (IBA).<sup>24</sup> Indol-3-maslačna kiselina se razlikuje od indol-3-octene kiseline samo prema duljini bočnog lanca koji sadrži dodatne dvije CH<sub>2</sub> skupine (slika 4). IBA je prvotno sintetizirana te je otkriveno da u različitim biljnim vrstama (rajčica, suncokret, artičoka, duhan, itd.) izaziva rast korijena.<sup>24</sup> Kasnije je pretpostavljeno da je IBA endogeni auksin u gomolju krumpira<sup>25</sup> te je potom vezanim sustavom plinske kromatografije-masene spektrometrije identificirana u grašku, čempresu, kukuruzu, mrkvi, duhanu i *A. thaliana*.<sup>26</sup> Aktivnost auksina IBA ovisi o pretvorbi IBA u IAA, iako se smatra da i sama IBA ima neke biološke aktivnosti, poput stimulacije diobe BY-2 stanica.<sup>27</sup> U hipokotilu *A. thaliana* pretpostavljeno je kretanje egzogeno dodane obilježene IBA,<sup>28</sup> a prisustvo endogene IBA u vrsti *A. thaliana* se u posljednje vrijeme osporava i predmet je diskusija i daljnjih istraživanja.<sup>29</sup>



Slika 4. Struktura indol-3-maslačne kiseline (IBA).<sup>30</sup> Preuzeto i prilagođeno iz L. C. Strader (2011)

### *Razgradnja auksina*

Razgradnja ima važnu ulogu u održavanju homeostaze auksina i u regulaciji razvoja. Kada je razina auksina previsoka, biljke koriste mehanizme za deaktivaciju IAA. IAA se deaktivira procesom razgradnje.<sup>31</sup> Razgradnja IAA može se odvijati na dva načina: ili dekarboksilacijom na bočnom lancu ili oksidacijom indolnog prstena.<sup>31</sup> Istraživano je da peroksidaze mogu biti uključene u oksidacijsku degradaciju auksina.<sup>32</sup>

Najčešći oksidacijski međuprodukt u ovom procesu je OxIAA, a otkriven je u biljkama, npr. u endospermu kukuruza<sup>33</sup>, u biljci *Arabidopsis*<sup>34,35</sup>. Smatra se, da se ovim međuproduktom smanjuje koncentracija auksina, jer OxIAA pokazuje vrlo slabu auksinsku



aktivnost.<sup>31</sup> Prekursori za razgradnju su auksini koji stvaraju konjugate sa aminokiselinama Asp i Glu.<sup>13</sup> Iako je ovaj proces izrazito važan za regulaciju razine auksina u biljci, mehanizmi koji u njemu sudjeluju nisu do kraja razjašnjeni.

### *Transport auksina*

Jedan od mehanizama koji utječe na homeostazu auksina je i transport. Sinteza auksina je lokalizirana, ali je za normalan razvoj biljke, potrebno dovesti auksine i na udaljenija mjesta od mjesta njihove sinteze.<sup>31</sup> Transport auksina kroz stanice i tkiva (osim razvijenih provodnih elemenata) je vrlo polaran. Svojstvo polarnosti daje auksinskom signalu usmjerenje, te je ovakav vektorski transport IAA važan u regulaciji prostornih aspekata razvoja biljke.<sup>11</sup> Dva fiziološki različita mehanizma postoje za transport auksina na velike udaljenosti kroz biljku. Prvi je način brzog transporta da se auksin brzo transportira sistemom provodnih elemenata zajedno sa ostalim metabolitima. Drugi je način sporijeg i polarnog transporta kojim se auksin transportira u smjeru od mjesta sinteze u izdanku prema korijenju (bazipetalno) putem proteina transporterera auksina (AUX/LAX, PIN te ABCB skupine proteina).<sup>31</sup>

## **2.2. Auksin-amidohidrolaze**

Auksin-amidohidrolaze pripadaju u porodicu metalopeptidaza M20, u podskupinu M20D prema MEROPS (MEROPS: the Peptidase Database) bazi podataka.<sup>36</sup> Hidrolaze iz te porodice mogu katalizirati hidrolizu raznovrsnog raspona supstrata koji sadrže amidne ili esterske funkcionalne skupine vezane na ugljični ili fosfatni centar. Auksin-amidohidrolaze cijepaju amidnu vezu aminokiselinskih konjugata auksina te otpuštaju slobodne auksine utječući na taj način na reguliranje njegove razine.<sup>3</sup> Za aktivnost ovih enzima potreban je Mn<sup>2+</sup> kao metalni kofaktor<sup>2,3,37</sup>, dok većina bakterijskih hidrolaza kao ko-faktor treba cink.<sup>6</sup> Bakterijska hidrolaza iz *Bacillus subtilis* sadrži Ni<sup>2+</sup>.<sup>38</sup>

Prva otkrivena hidrolaza bila je AtILR1 u biljci *A.thaliana*<sup>5</sup> i dokazana je aktivnost ILR1 prema IAA-Leu kao najboljem supstratu, kako *in vitro* s heterologno eksprimiranim rekombinantnim proteinom, tako i *in vivo* na razini testa inhibicije rasta korijena na mutantu *ilr-1* koji pokazuje neosjetljivost na inhibiciju produžnog rasta korijena pri tretmanu sa IAA-Leu u odnosu na divlji tip biljaka.<sup>5</sup> Auksin-amidohidrolaze iz kineskog kupusa (BrIAR3 i BrILL2) pokazuju veću supstratnu specifičnost i aktivnost prema aminokiselinskim konjugatima dugolančanih auksina kao što je indol-3-propionska kiselina (IPA-Ala) i indol-3-maslačna kiselina (IBA-Ala) u odnosu na indol-3-octenu kiselinu (IAA-Ala).<sup>3</sup> Indol-3-propionska kiselina je bolji supstrat za obje auksin-amidohidrolaze (BrILL2 i BrIAR3), ali je

BrILL2 bio puno aktivniji od BrIAR3, što su i pokazale vrijednosti dobivene mjerenjem aktivnosti BrILL2 i BrIAR3 enzima.<sup>3</sup> Auksin-amidohidrolaze iz *A. thaliana*, AtILL2 i AtIAR3, kao supstrat preferiraju IAA-Ala<sup>39,40</sup>, u odnosu na auksin-amidohidrolaze iz *B. rapa*, BrIAR3 i BrILL2, ali AtILL2 pokazuje specifičnost i prema širokom rasponu supstrata, a neki od njih su: IAA-Asn, IAA-Cys, IAA-Asp, itd.<sup>40</sup> AtIAR3 hidrolizira i kratkolančane aminokiselinske konjugate (IAA-Cys, IAA-Gly, itd.)<sup>40</sup>, a preliminarni pokusi predlažu aminokiselinske konjugate jasmonske kiseline kao supstrate.<sup>41</sup> Auksin-amidohidrolaze pokazuju različite, ali preklapajuće supstratne specifičnosti. Primjerice uspoređujući supstratnu specifičnost amidohidrolaza iz biljke *Arabidopsis*, IAA-Phe i IAA-Leu su najbolji supstrati za AtILR1, IAA-Ala, IAA-Asn i IAA-Tyr su supstrati za AtILL1, IAA-Ala za AtILL2 i AtIAR3.<sup>40</sup> AtIAR3 i TaIAR3 iz pšenice (*Triticum aestivum* L.) imaju visoku homologiju DNA i proteinske sekvence (49% i 79%), ali različitu supstratnu specifičnost. TaIAR3 preferira dugolančane IBA i IPA konjugate auksina, dok je za AtIAR3 karakterističan IAA-Ala.<sup>42</sup> BrILL2 ima visoku homologiju aminokiselinske sekvence s TaIAR3, ali i sličnu supstratnu specifičnost.<sup>3</sup> MtIAR31 iz biljke *Medicago truncatula* nosi strukturnu sličnost sa TaIAR3, ali obje amidohidrolaze preferiraju IBA konjugat auksina kao supstrat.<sup>43</sup>

Što se tiče strukture ovih enzima, dugo vremena se nisu znali detalji o veznom mjestu supstrata, kao ni o aminokiselinskim ostacima važnim za supstratnu specifičnost. Detalji o veznom mjestu supstrata dobiveni su rješavanjem kristalne strukture AtILL2,<sup>4</sup> ali riješena je struktura enzima kao apoenzima (bez metala u aktivnom mjestu). Za razjašnjavanje aktivnosti i evolucije enzima auksin-amidohidrolaza važni podaci o aminokiselinskim ostacima, pogotovo onima važnima za supstratnu specifičnost, predloženi su na osnovu homolognog modeliranja auksin-amidohidrolaze BrILL2 s AtILL2 s kojom dijeli 76% homologije.<sup>2,3,6</sup> Rezultati temeljeni na kristalnoj strukturi AtILL2,<sup>4</sup> kao i predloženim modelima BrILL2<sup>2,3,6</sup> dobivenim homolognim modeliranjem, pokazuju da se auksin-amidohidrolaze sastoje od dvije domene: katalitičke koja obuhvaća aktivno mjesto enzima te kraće satelitne domene koja služi kao oligomerizacijska domena, ali uloga oligomerizacije auksin-amidohidrolaza nije još razjašnjena.

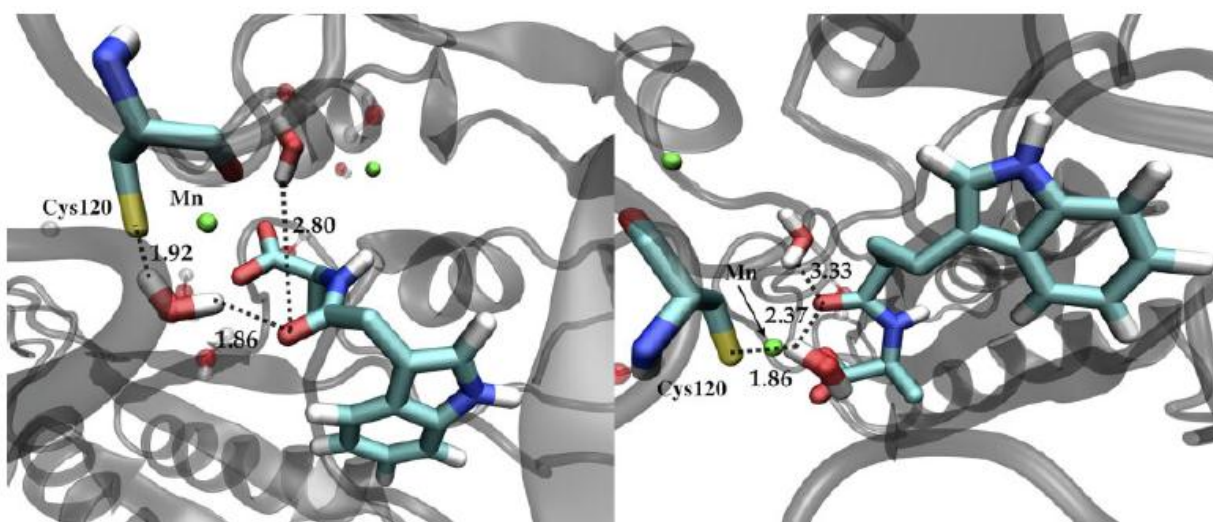
### 2.2.1. Auksin-amidohidrolaza iz kineskog kupusa (*Brassica rapa*), BrILL2

Auksin-amidohidrolaza iz kineskog kupusa (*Brassica rapa*), BrILL2 regulira koncentraciju slobodnih auksina cijepanjem amidne veze između aminokiseline i auksina, te upravo zbog toga ima važnu ulogu u metaboličkoj kontroli koncentracije slobodnih auksina.<sup>6</sup> AtILL2 pokazuje visoku supstratnu specifičnost prema IAA-Ala, IAA-Ser, IAA-Thr, IAA-Met<sup>44</sup> dok BrILL2 pokazuje aktivnost prema konjugatima alanina koji se razlikuju prema veličini: IAA-Ala kao kratkolančani do IPA-Ala i IBA-Ala kao dugolančanih auksina. Iako pokazuje aktivnost prema IAA-Ala, istraživanja su pokazala da preferira IPA-Ala i IBA-Ala kao supstrate.<sup>3</sup> Katalitički je najučinkovitija auksin-amidohidrolaza iz *Brassica rapa*, tj. omjer konstante katalize i Michaelisove konstante ( $k_{cat}/K_M$ ) joj je najveći.<sup>6</sup> Sadrži dva očuvana Cys ostatka (Cys139 i Cys320) koji imaju važnu ulogu u aktivnosti i stabilnosti enzima. Cys320 odgovoran je za stabilnost proteina, dok je Cys139 ključan za njegovu aktivnost.<sup>2</sup>

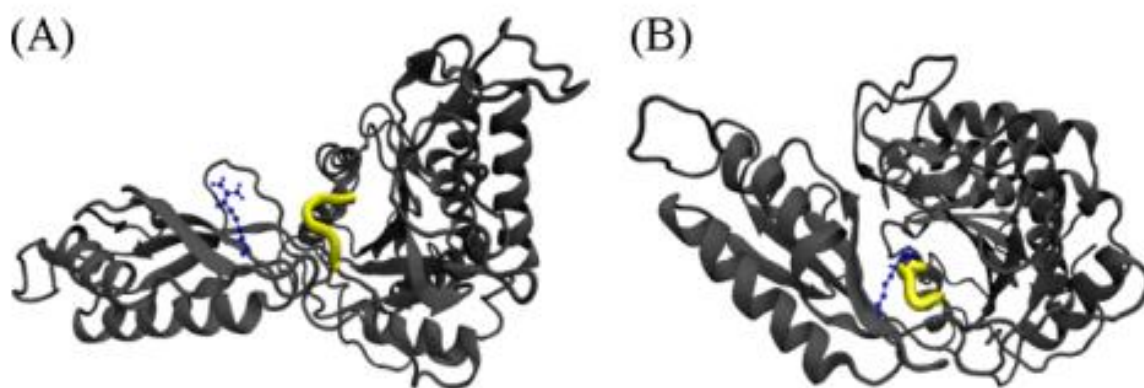
Molekularna dinamika pokazala je da postoje dva moguća načina vezanja liganada, karbonilni i karboksilni.<sup>6</sup> U karbonilnom načinu vezanja ligandi se vežu na  $\alpha$ -Mn kation preko karbonilnog kisikovog atoma peptidne veze, dok se u karboksilnom načinu vezanja ligandi vežu na  $\alpha$ -Mn kation preko karboksilnog kisikovog atoma (slika 5). Eksperimentalni dokazi pokazuju kako je vjerojatniji karbonilni način vezanja.<sup>6</sup>

MD simulacije su pokazale da je aminokiselina arginin očuvana u 99,7% svih dostupnih proteinskih sekvenci M20D proteina, što govori o njegovoj važnosti.<sup>6</sup> Primijećeno je da u aminoacilazi-1 (M20A protein) mutacijom ostatka arginina u satelitnoj domeni, enzim gubi svoju aktivnost.<sup>45</sup> Prije provođenja MD simulacija za BrILL2, u primarnom slijedu aminokiselina za BrILL2 maknuta je signalna sekvenca, tako da je broj ostataka bio manji za 19 u odnosu na originalan primarni slijed. Prema tome, MD simulacije BrILL2 pretpostavile su da je Arg276 ključni ostatak za poticanje ili olakšavanje mehanizma zatvaranja, na način da Arg276 stvara interakciju sa petljom koja povezuje dvije  $\alpha$ -zavojnice u blizini aktivnog mjesta.<sup>6</sup> Kada je prisutan supstrat, Arg276 stvara interakciju sa njim, čime je protein u aktivnom mjestu podložan mehanizmu zatvaranja. Mehanizam zatvaranja i kut između dviju domena u korelaciji je sa veličinom supstrata. MD simulacije su pokazale da kada se usporede supstrati IBA-Ala, IPA-Ala i IAA-Ala, najmanje zatvaranja primijećeno je kod supstrata IAA-Ala (50%), najviše kod supstrata IBA-Ala, a i kut se smanjio za 52° za IBA-Ala. Iz toga se može zaključiti da veći supstrati povećavaju vjerojatnost i snagu interakcije između dvije domene. Petlju koja povezuje dvije domene pored aktivnog mjesta čine ostaci Pro346 i

Glu351, te M348 s kojim Arg276 iz bočnog lanca najčešće stvara interakciju (vodikovu vezu).<sup>6</sup> Pravilno vezani supstrat u ovakvoj konstrukciji mijenja konformaciju do zatvorenog stanja. Pretpostavilo se da BrILL2 postoji u ravnoteži između otvorene i zatvorene konformacije<sup>46</sup>, te vezanjem supstrata u aktivno mjesto zatvorena konformacija postaje stabilnija. U tu svrhu provedene su MD simulacije slobodnog BrILL2 pri visokim temperaturama (300K, 340K i 380K) koje su pokazale da je protein stabilan pri visokim temperaturama, da je došlo do pojave zatvorene konformacije, ali i da je iz te zatvorene konformacije došlo do ponovnog otvaranja, što je u skladu sa pretpostavkom da BrILL2 postoji u ravnoteži između otvorene i zatvorene konformacije (slika 6).<sup>6</sup>



Slika 5. Karbonilni i karboksilni način vezanja liganda u BrILL2 enzimu. Preuzeto i prilagođeno iz Šimunović (2010)<sup>6</sup>



Slika 6. Konformacije enzima BrILL2 pri temperaturi od 340K: (A) otvorena i (B) zatvorena konformacija . U zatvorenoj konformaciji, Arg276 (predstavljen kao model kugle i štapića, plavo) stvara interakciju sa polipeptidnom okosnicom (Pro346, Glu351 i Met348) premosne petlje (gusto žuta linija). Preuzeto i prilagođeno iz Šimunović (2010)<sup>6</sup>

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Bakterijski sojevi

Bakterijski soj *E.coli* DH10B (*Stratagene*) korišten je za umnažanje plazmidnog vektora. Plazmid pTrcHis2-TOPO s ukloniranim genom za BrILL2 bio je čuvan na -80 °C. Genotip ovog bakterijskog soja glasi: F<sup>-</sup> mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK λ<sup>-</sup> rpsL(Str<sup>r</sup>) nupG.<sup>47</sup>

Bakterijski soj *E.coli* BL21((DE3)RIL)<sup>+</sup> korišten je kao domaćin ekspresijskog vektora pTrcHis2-TOPO. DE3 oznaka predstavlja sojeve koji sadrže lambdaDE3 lizogen koji nosi gen za T7-RNA-polimerazu pod kontrolom lac promotora. IPTG je potreban kako bi se maksimalno inducirala ekspresija T7-RNA-polimeraze.<sup>48</sup>

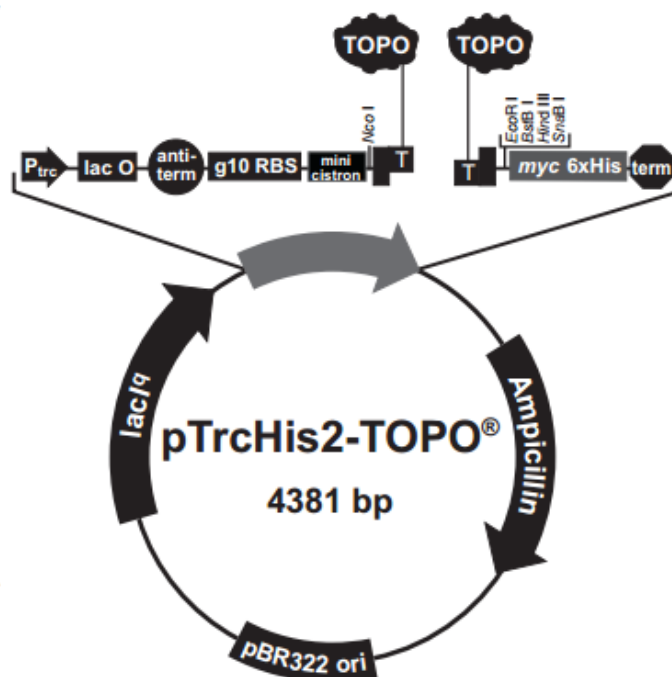
BL21RIL<sup>+</sup> omogućava heterolognu ekspresiju gena koji su dobiveni iz genoma bogatih parovima aminokiselina AT i GC. BL21<sup>+</sup> sojevi sadrže dodatne kopije gena koji kodiraju tRNA koje najčešće ograničavaju translaciju heterolognih proteina. Što je veća dostupnost tRNA, jače je izraženija ekspresija proteina koji su slabije eksprimirani u uobičajenim BL21 sojevima.<sup>49</sup> Bakterijski soj BL21((DE3)RIL)<sup>+</sup> sadrži gene argU, ileY i leuW za tRNA koje prepoznaju rijetke kodone za aminokiseline arginin, izoleucin i leucin. Održavaju neke od značajki stanica od kojih su proizvedene a to su deficijencija Lon i OmpT proteaza, endA1 te sadrže Hte fenotip.<sup>50</sup> Genotip spomenutog bakterijskog soja glasi: F<sup>-</sup> ompT hsdS (rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>) dcm<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> gal λ(DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam<sup>r</sup>].

#### 3.1.2. Plazmidni vektor

Plazmidni vektor korišten za heterolognu ekspresiju rekombinantnog proteina BrILL2 bio je pTrcHis2-TOPO koji sadrži uklonirani gen za auksin-amidohidrolazu BrILL2 iz kineskog kupusa čija je ekspresija pod kontrolom promotora *P<sub>trc</sub>* te je kloniranjem u vektor omogućeno da protein na C-terminusu bude obilježen histidinskim privjeskom. Veličine je 4381 parova baza, a sa ukloniranim genom za BrILL2 veličine je oko 5600 parova baza. Glavne sastavnice plazmidnog vektora su: His privjesak na C-kraju proteina, promotor *trc* koji omogućuje inducibilnu ekspresiju rekombinantnog proteina u *E.coli*, *rrnB* antiterminacijski signal koji omogućuje da ne dođe do prijevremenog prekida transkripcije,

pBR322 izvorište replikacije, minicistron i ribosomsko vezno mjesto (RBS) su mjesta na kojima se odvija sinteza proteina, početni kodon ATG, T7 gen 10 pojačivač translacije-optimizira inicijaciju translacije, *myc* C-terminalni epitop služi za prepoznavanje fuzijskog proteina od strane anti-*myc*-antitijela, gen za rezistenciju na antibiotik ampicilin, a koji služi kao selekcijski biljeg, gen *lacI* koji kodira Lac represor, koji omogućuje blokadu transkripcije u slučajevima kada u podlozi za uzgoj nema prisutnog induktora.<sup>51</sup> Njegova mapa zajedno sa svim njegovim važnim sastavnicama prikazana je na slici 7.

Za heterolognu ekspresiju proteina u *E.coli* je korišten i plazmidni vektor pTrcHis2-TOPO+R295A. Vektor sadrži slijed za protein BrILL2 pod kontrolom *Trc* promotora, s time da je u slijedu gena za BrILL2 promijenjen kodon za aminokiselinu arginin na položaju 295 u kodon za aminokiselinu alanin s ciljem dobivanja mutiranog proteina BrILL2 postupkom mjesno-specifične mutageneze. Plazmid je priređen prije početka izrade ovog diplomskog rada te stoga postupak mjesno-specifične mutageneze nije ovdje opisan. Korišten je i plazmidni vektor pTrcHis2-TOPO+M367A sa unesenim slijedom za BrILL2 protein u kojem je aminokiselina metionin na položaju 367 promijenjena u alanin, a proizveden je također mjesno-specifičnom mutagenezom.



Slika 7. Mapa plazmidnog vektora pTrcHis2-TOPO. Preuzeto i prilagođeno iz Invitrogen™ (2006)<sup>51</sup>

### 3.1.3. Hranjive podloge: Luria-Bertani (LB) podloga

Tablica 1. Sastojci LB podloge

Sastav	$\gamma/\text{g L}^{-1}$
Baktotripton	10
Ekstrakt kvasca	5
NaCl	5

### 3.1.4. Otopine i puferi za molekularno-biološke, biokemijske i biofizičke pokuse

Sterilna otopina ampicilina dobivena je otapanjem praha ampicilin natrijeve soli (*Carl Roth, Njemačka*) u  $\text{mqH}_2\text{O}$  ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) te propuštena kroz  $0,2 \mu\text{m}$  PES filter (*Carl Roth*).

Izopropil-tiogalaktopiranozid (IPTG) (*Carl Roth*) pripremljen je otapanjem IPTG-a u sterilnoj  $\text{mqH}_2\text{O}$  do konačne koncentracije  $0,9 \text{ mol L}^{-1}$  te filtriranjem kroz  $0,2 \mu\text{m}$  PES filter (*Carl Roth*) uz plamenik.

Deoksiribonukleaza I (Dnaza I) iz goveđe gušterače (*Sigma Aldrich*) pripremljena je otapanjem DNaze I u  $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$  Tris-a pH 7,5,  $3 \text{ mol dm}^{-3}$  NaCl-u,  $100 \text{ mmol dm}^{-3}$   $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $100 \text{ mmol dm}^{-3}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{mqH}_2\text{O}$  i glicerolu ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ).

Lizozim (*Sigma Aldrich*) koncentracije  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  pripremljen je otapanjem stock otopine lizozima (*Sigma*) koncentracije  $100 \text{ mg mL}^{-1}$  u redestiliranoj vodi.

Fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF) (*Fluka*) koncentracije  $1 \text{ mmol dm}^{-3}$  pripremljen je otapanjem PMSF-a (*Fluka*) u etanolu.



*3.1.5. Komplet za izolaciju plazmidne DNA (GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma))*

Tablica 2. Komplet za izolaciju plazmidne DNA

Sastojci	V/ $\mu$ L
Otopina za resuspendiranje	250
Otopina za lizu stanica	250
Otopina za neutralizaciju	350
Otopina za ispiranje	1000
MqH <sub>2</sub> O	75

*3.1.6. Otopine za elektroforezu DNA u agaroznom gelu**TAE pufer*

Tablica 3. TAE pufer

Sastojci	
Trihidroksimetilaminometan (Tris)( <i>Sigma</i> )	242 g
Octena kiselina	57,1 mL
Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA), pH 8,0 ( <i>Kemika</i> )	100 mL
MqH <sub>2</sub> O	do 1L

*0,7% agarozu u TAE puferu*

Tablica 4. Agarozu (0,7%) u TAE puferu

Sastojci	
Agarozu ( <i>Invitrogen</i> )	0,7 g
TAE pufer	100 mL

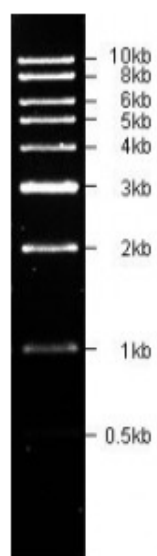
6x otopina za nanošenje gela u jažice (6x loading dye) (Thermo Scientific™)

Tablica 5. 6x „loading dye“ puffer

Sastojci
Bromfenol plavi
Ksilen cijanol FF (XCFF)
Glicerol
EDTA

Biljezi molekulskih masa DNA ( Bio Basic Inc.)

Biljezi molekulskih masa sastoje se od 9 fragmenata DNA veličina od 0,5 kb do 10 kb. Fragmente DNA koji služe kao standard prema kojima se odredila veličina naših plazmida prikazuje slika 8.



Slika 8. Marker za elektroforezu plazmidne DNA<sup>52</sup>

*Otopina etidij-bromida za bojanje gelova*

Tablica 6. Etidij-bromid

Sastojci	V/ mL
Etidij-bromid, $\gamma = 500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ( <i>Sigma</i> )	0,1
mqH <sub>2</sub> O, sterilna	do 100

*3.1.7. Puferi za izolaciju i pročišćavanje rekombinantnih proteina**Trihidroksimetilaminometan (Tris) pufer za lizu stanica*

Sastojci pufera prikazani su u tablici 7. Pripremljeno je 200 mL.

Tablica 7. Tris-HCl pufer

Sastojci	$c/\text{mol L}^{-1}$ , $\gamma/\text{mg mL}^{-1}$
Tris-HCl, pH 8,0 ( <i>Sigma</i> )	50 mmolL <sup>-1</sup>
NaCl ( <i>Kemika</i> )	300 mmolL <sup>-1</sup>
Imidazol ( <i>Carl Roth</i> )	10 mmolL <sup>-1</sup>
PMSF ( <i>Fluka</i> )	1 mmolL <sup>-1</sup>
Lizozim ( <i>Sigma</i> )	1 mgmL <sup>-1</sup>
Triton X-100 ( <i>Invitrogen</i> )	$\varphi = 0,001$

Neposredno prije upotrebe u Tris-HCl pufer dodaju se: PMSF, lizozim i Triton X-100

*Tris-HCl pufer za ispiranje kolone*

Sastojci su prikazani u tablici 8. Pripremljeno je 100 mL pufera.

Tablica 8. Tris-HCl pufer za ispiranje

Sastojci	$c/\text{mmol L}^{-1}$
Tris-HCl, pH 8,0 ( <i>Sigma</i> )	50
NaCl ( <i>Kemika</i> )	300
Imidazol ( <i>Carl Roth</i> )	20

*Tris-HCl pufer za eluciju*

Sastojci su prikazani u tablici 9. Pripremljeno je 100 ml pufera.

Tablica 9. Tris-HCl pufer za eluciju

Sastojci	$c/\text{mmol L}^{-1}$
Tris-HCl, pH 8,0 ( <i>Sigma</i> )	50
NaCl ( <i>Kemika</i> )	300
Imidazol ( <i>Carl Roth</i> )	250

*Fosfatni pufer*

Fosfatni pufer za lizu stanica, za ispiranje kolone i za eluciju sadrži natrijev dihidrogen fosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), pH 8,0, umjesto Trisa. Koncentracije svih ostalih sastojaka identične su prethodno navedenim koncentracijama u Tris-HCl puferima. Puferi su pripremljeni na identičan način kao i Tris-puferi, pH 8,0.

*Fosfatni pufer za lizu stanica*

Sastojci pufera prikazani su u tablici 10. Pripremljeno je 200 mL.

Tablica 10. Fosfatni pufer za lizu stanica

Sastojci	$c/\text{mmol L}^{-1}, \gamma/\text{mg mL}^{-1}$
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , pH 8,0 ( <i>Kemika</i> )	$50 \text{ mmolL}^{-1}$
NaCl ( <i>Kemika</i> )	$300 \text{ mmolL}^{-1}$
Imidazol ( <i>Carl Roth</i> )	$10 \text{ mmolL}^{-1}$
PMSF ( <i>Fluka</i> )	$1 \text{ mmolL}^{-1}$
Lizozim ( <i>Sigma</i> )	$1 \text{ mgmL}^{-1}$
Triton X-100 ( <i>Invitrogen</i> )	$\varphi = 0,001$

*Fosfatni pufer za ispiranje kolone*

Sastojci su prikazani u tablici 11. Pripremljeno je 100 mL pufera.

Tablica 11. Fosfatni pufer za ispiranje kolone

Sastojci	$c/\text{mmol L}^{-1}$
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , pH 8,0 ( <i>Kemika</i> )	50
NaCl ( <i>Kemika</i> )	300
Imidazol ( <i>Carl Roth</i> )	20

*Fosfatni pufer za eluciju*

Sastojci su prikazani u tablici 12. Pripremljeno je 100 ml pufera.

Tablica 12. Fosfatni pufer za eluciju

Sastojci	$c/\text{mmol L}^{-1}$
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , pH 8,0 ( <i>Kemika</i> )	50
$\text{NaCl}$ ( <i>Kemika</i> )	300
Imidazol ( <i>Carl Roth</i> )	250

3.1.8. *Puferi i otopine za razdvajanje i analizu proteina u SDS poliakrilamidnom gelu*

*Pufer za denaturaciju uzoraka*

Tablica 13. SB pufer

Sastojci	V/mL
Tris-HCl, $c = 0,5 \text{ mol}^{-1}$ pH 6,8 ( <i>Sigma</i> )	1
Glicerol ( <i>Kemika</i> )	0,8
SDS, $\varphi = 0,10$ ( <i>Sigma</i> )	1,6
$\beta$ -merkaptoetanol ( <i>Merck</i> )	0,4
Bromfenol plavo, $\varphi = 0,010$	0,4
Re- $\text{H}_2\text{O}$	3,8

*Gel za razdvajanje (12%)*

Tablica 14. Gel za razdvajanje

Sastojci	V/ $\mu\text{L}$
$\text{MqH}_2\text{O}$	3350
$1,5 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris, pH 8,0	2500
Akrlamid/bisakrlamid, $\varphi = 0,30$ ( <i>Carl Roth</i> )	4000
SDS (Na-dodecilsulfat), $\varphi = 0,10$ ( <i>Sigma</i> )	100
APS (amonij-persulfat), $\varphi = 0,10$ ( <i>Fluka</i> )	50
TEMED ( <i>Sigma</i> )	5

*Gel za sabijanje (4%)*

Tablica 15. Gel za sabijanje

Sastojci	V/ $\mu$ l
MqH <sub>2</sub> O	3050
0,5 mol dm <sup>-3</sup> Tris, pH 8,0	1250
Akrilamid/bisakrilamid $\varphi = 0,30$ ( <i>Carl Roth</i> )	660
SDS, $\varphi = 0,10$ ( <i>Sigma</i> )	50
APS, $\varphi = 0,10$ ( <i>Fluka</i> )	50
TEMED ( <i>Sigma</i> )	5

*Pufer za elektroforezu*

Tablica 16. Sastav 5x pufera za elektroforezu

Sastojci	$\gamma/g L^{-1}$
Tris-HCl ( <i>Sigma</i> )	15
Glicin ( <i>Sigma</i> )	72
SDS ( <i>Sigma</i> )	5

1x pufer za elektroforezu priređen je od 200 mL 5x pufera za elektroforezu i 800 mL deH<sub>2</sub>O.

*Otopina Coomassie Brilliant Blue R-250 boje za bojanje gelova*

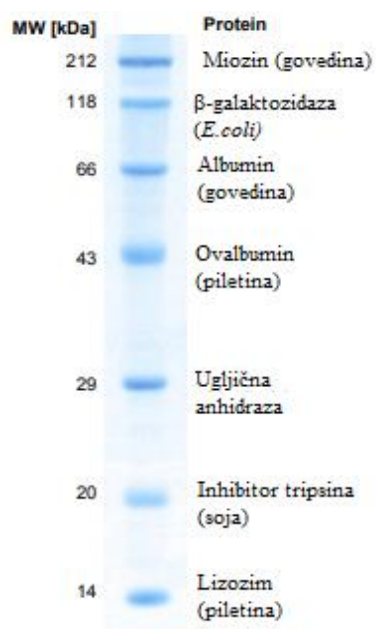
Tablica 17. Coomassie Brilliant Blue R-250 boja

Sastav	
Coomassie Brilliant Blue R-250 ( <i>Biorad</i> )	1 g L <sup>-1</sup>
Metanol ( <i>Kemika</i> )	$\varphi = 0,40$
Ledena octena kiselina ( <i>Kemika</i> )	$\varphi = 0,10$
MqH <sub>2</sub> O	Do 1 L

Smjesa markera Roti-Mark (Carl Roth)

Tablica 18. Marker Roti-Mark

Protein	M/kDa
Miozin	212,0
$\beta$ -galaktozidaza	118,0
Serum albumina	66,0
Ovalbumin	43,0
Ugljična anhidraza	29,0
Inhibitor tripsina	20,0
Lizozim	14,0



Slika 9. Biljezi molekularnih masa proteina markera Roti-Mark<sup>53</sup>

### 3.1.9. Puferi za dijalizu

#### Fosfatni pufer

Tablica 19. Fosfatni pufer, 10 mmoldm<sup>-3</sup>, pH 8,0

Sastojci	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2 H <sub>2</sub> O (Kemika)	0,11 g L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2 H <sub>2</sub> O (Kemika)	1,66 g L <sup>-1</sup>
MqH <sub>2</sub> O	do 1 L

*Kakodilatni pufer*Tablica 20. Kakodilatni pufer, 50 mmoldm<sup>-1</sup>, pH 8,0

Sastojci	
Natrijev kakodilat	10,70 g L <sup>-1</sup>
MqH <sub>2</sub> O	Do 1L

*3.1.10. Otopine za određivanje koncentracije proteina**Bradfordov reagens*

Tablica 21. Bradfordov reagens

Sastojci	
Coomassie Brilliant Blue G-250 ( <i>Merck</i> )	100 mg
Etanol, $\varphi = 0,10$ ( <i>Kemika</i> )	50 mL
Fosfatna kiselina (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ) ( <i>Kemika</i> )	100 mL
MqH <sub>2</sub> O	Do 1 L

*Otopina govedeg albumina*

Otopina govedeg albumina (BSA) koncentracije 2  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ , pripremljena je otapanjem govedeg albumina (*Sigma*) u mqH<sub>2</sub>O.

**3.2. Metode***3.2.1. Sravnjivanje primarnih sljedova auksin-amidohidrolaza iz uročnjaka i kineskog kupusa*

Za sravnjivanje primarnih sljedova auksin-amidohidrolaza iz uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) i kineskog kupusa (*Brassica rapa*), korišten je program Jalview (<http://www.jalview.org/>).<sup>54</sup> Korišteni sljedovi su preuzeti iz Uniprot<sup>55</sup> baze podataka uz pomoć integrirane tražilice u Jalview programu (BrILL2, AtILL2, AtILR1, AtILL4, AtILL1, AtILL3 i AtILL5, a njihovi Uniprot ID su redom: M4FHN0, P54970, P54968, O04373, P54969, O81641, Q9SWX9. Kada su pronađene željene sekvence, iz programa Jalview pokrenut je Muscle<sup>56</sup> algoritam za sravnjivanje tih sekvenci sa zadanim postavkama te su sravnjene sekvence obojane prema postotku sličnosti.



### 3.2.2. Izrada filogenetskog stabla auksin-amidohidrolaza iz uročnjaka i kineskog kupusa

Filogenetsko stablo je izrađeno pomoću programa Jalview (<http://www.jalview.org/>).<sup>54</sup> Željene proteinske sekvence dohvaćene iz Uniprot<sup>55</sup> baze podataka za sravnjivanje iskorištene su i za izračun filogenetskog stabla. Stablo je izračunato na osnovi mjere sličnosti između parova sekvenci u sravnjenju uz pomoć BLOSUM62 supstitucijske matrice metodom srednjih udaljenosti.<sup>57</sup>

### 3.2.3. Rješavanje tercijarne strukture BrILL2 homolognim modeliranjem s online alatom Phyre

Za dobivanje trodimenzionalne strukture BrILL2 korišten je program Phyre (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>).<sup>58</sup> U programu Phyre unešena je sekvenca proteina BrILL2 u FASTA formatu. Za obradu prikaza dobivenog modela i vizualizaciju aminokiselina R295 i M367 korišten je program Pymol (<https://pymol.org/2/>).<sup>59</sup>

### 3.2.4. Priprema hranjivih podloga za uzgoj bakterija

LB podloga svojim sastavom omogućava rast i razvoj bakterija. Sastoji od glukoze, soli, aminokiselina, vitamina. Također, *E.coli* može rasti i na jednostavnijim medijima koji sadržavaju samo soli, amonijak i glukozu.<sup>60</sup>

#### Tekuća LB podloga

Tekuća LB podloga pripremljena je otapanjem komercijalne smjese (LB broth (Lennox); Carl Roth), čiji je sastav prikazan u tablici 1., u mqH<sub>2</sub>O. LB podloga može se prirediti i otapanjem pojedinačnih komponenti u vodi prema istoj tablici. Tako pripremljena podloga sterilizirana je 20' na temperaturi 121°C, pri tlaku od 1,5 atm-a. Sterilna otopina antibiotika ampicilina konačne koncentracije 100 µg mL<sup>-1</sup> dodaje se u sterilnu tekuću LB podlogu, ohlađenu na otprilike 55 °C, neposredno prije uzgoja bakterija.

#### Kruta LB podloga

Kruta LB podloga pripremljena je na isti način kao i tekuća, samo što je potrebno dodati agar (*Difco*) (15 g L<sup>-1</sup>). Nakon autoklaviranja, kada se ohladi, u LB podlogu se dodaje sterilna otopina ampicilina do konačne koncentracije 100 µg mL<sup>-1</sup> te se tako pripremljena otopina izlijeva u plastične sterilne Petrijeve zdjelice (u volumenu od otprilike 20 mL po ploči), a koje će služiti za uzgoj bakterija *E.coli* na krutim podlogama.

Ampicilin je antibiotik važan za proizvodnju rekombinantnog proteina jer transformirana bakterija *E.coli* na plazmidnom vektoru sadrži gen za rezistenciju na ovaj antibiotik. Pripremljen je otapanjem antibiotika ampicilina u sterilnoj mqH<sub>2</sub>O te filtriranjem kroz 0,22 µm filtar pored plamenika da bi se osigurali sterilni uvjeti.

### 3.2.5. Priprema kompetentnih stanica BL21((DE3)RIL)<sup>+</sup>

Kompetentne stanice, dizajnirane su da sa visokom učinkovitošću uzimaju stranu DNA iz okoline. Rutinski se koriste u molekularnom kloniranju kako bi propagirale i održavale kloniranu DNA u plazmidima.<sup>61</sup>

Korištene su kompetentne stanice bakterije *Escherichia coli*, BL21((DE3)RIL)<sup>+</sup> koje su domaćin ekspresijskog vektora pTrcHis2-TOPO, a pripremljene iz permanentne kulture čuvane u glicerolu,  $\varphi = 0,50$  na -80°C. Priprema kompetentnih stanica BL21((DE3)RIL)<sup>+</sup> traje tri dana, a pripremljene su prema postupku opisanom u sljedećem odlomku.

Prvi dan:

Stanice *E.coli* inokulirane su iz permanentne kulture pomoću eze na krutu LB podlogu na koju je dodan antibiotik kloramfenikol (konačne koncentracije 20 µg mL<sup>-1</sup>) jer stanice BL21(DE3)RIL)<sup>+</sup> sadrže rezistenciju na ovaj antibiotik. Bakterije su uzgojene preko noći na 37 °C.

Drugi dan:

U 5 ml tekuće LB podloge dodana je jedna bakterijska kolonija sa krute LB podloge uzgojene prethodne noći. Tekuća LB podloga sa bakterijskom kolonijom ostavljena je preko noći na 250 rpm na 37 °C u tresilici.

Treći dan:

Od priređene prekonoćne bakterijske kulture uzeto je 700 µl i dodano 300 µl sterilnog glicerola ( $\varphi = 0,50$ ). Tako je pripremljena permanentna kultura te je pohranjena je na -80°C. Ostatak prekonoćne bakterijske kulture (4 mL) dodan je u 200 mL svježje sterilne tekuće LB podloge. Bakterije su uzgojene na 37°C u tresilici uz 250 okretaja po minuti. Kada je postignuta vrijednost optičke gustoće OD<sub>600</sub> između 0,4 i 0,6 (bliže 0,4), stanice su pothlađene 20' na ledu, prebačene u 4 konusne epruvete i oborene centrifugiranjem 20' na 2000 g pri 4°C. Otklonjen je supernatant i stanice su nježno resuspendirane u 200 ml hladne sterilne mqH<sub>2</sub>O koja je razdijeljena u 4 konusne epruvete. Postupci centrifugiranja i resuspendiranja ponovljeni su još tri puta, ali svaki puta u sve manjem volumenu mqH<sub>2</sub>O od 150ml, 100 ml i

50 ml. Dobiveni talozi resuspendirani su u 20 ml pothlađenog i sterilnog glicerola ( $\varphi = 0,10$ ) te su centrifugirani 15 minuta na 2000 g pri 4°C. Uklonjen je supernatant te su talozi spojeni i otopljeni u 2 ml glicerola,  $\varphi = 0,50$ . Stanice su razdijeljene u alikvotne od 40  $\mu$ l u pothlađene Eppendorf tubice. Zaleđene su u tekućem dušiku i pohranjene na -80°C do upotrebe.

### 3.2.6. Izolacija plazmidne DNA

Za izolaciju plazmida korištene su stanice iz permanentne kulture *E.coli* soja DH10B transformirane plazmidom pTrcHis2-TOPO+R295A i pTrcHis2-TOPO+M367A, čuvane na -80°C. 20  $\mu$ l svake permanentne kulture razmazano je po LB/amp pločama te su inkubirane, u termostatu/inkubatoru na 37°C preko noći. Jedna bakterijska kolonija prenesena je ezom u 5 ml tekuće LB podloge sa dodanim ampicilinom do konačne koncentracije 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. Pripremljene bakterijske kulture inkubirane su preko noći u termostatiranoj tresilici na 37°C uz trešnju od 250 okretaja u minuti.

Izolacija plazmida pTrcHis2-TOPO+R295A i pTrcHis2-TOPO+M367A provedena je pomoću kompleta GenElute™ Plasmid Miniprep Kit prema uputama proizvođača.<sup>62</sup> Princip kompleta je izolacija plazmidne DNA na osnovu alkalne lize. Čine ga otopina za resuspendiranje stanica, otopina za lizu stanica, otopina za neutralizaciju, otopina za ispiranje, m<sup>q</sup>H<sub>2</sub>O te GENEJET kolona. Otopina za resuspendiranje čuvana je na 4 °C, a omogućuje resuspendiranje taloga. Otopina za lizu stanica osigurava lizu stanica i oslobađanje plazmidne DNA iz stanica pomoću pufera koji sadrži SDS i NaOH. Pod djelovanjem jake lužine i deterdženta (SDS) na suspenziju stanica *E. coli*, dolazi do pucanja bakterijske stijenke, denaturacije proteina i genomske DNA, te oslobađanja plazmidne DNA u otopinu. Otopinom za neutralizaciju koja sadrži veliku koncentraciju soli dolazi do taloženja kompleksa nastalog između denaturiranih proteina, SDS-a i denaturirane genomske DNA. Plazmidna DNA se zahvaljujući svojoj maloj veličini renaturira i veže na silika membranu.<sup>63</sup>

Otopina za ispiranje služi za uklanjanje nečistoća. Plazmidna DNA eluirana je sa membrane pomoću sterilne m<sup>q</sup>H<sub>2</sub>O. Uspješnost izolacije provjerena je elektroforezom u agaroznom gelu, a prinos plazmidne DNA provjeren je mjerenjem apsorbancije pri 260 nm pomoću UV/VIS Nanodrop™ spektrofotometra (*Thermo Scientific*™).

### 3.2.7. Elektroforeza u agaroznom gelu

Jedan od osnovnih tipova gel-elektroforeze je agarozna gel-elektroforeza, koja kao „molekulsko sito“ za razdvajanje makromolekula koristi agarozu. Koristi se za razdvajanje fragmenata DNA veličine od 100 pb do 20 kb.<sup>64</sup> Nije dovoljno osjetljiva metoda ukoliko su fragmenti DNA veći od 20 kb jer ta veličina premašuje veličinu pora agaroznog gela. U tom slučaju koristi se gel-elektroforeza u pulsirajućem polju. Veličina pora gela može biti kontrolirana jednostavnim podešavanjem koncentracije agaroze kako bi se pripremili gelovi koji su prikladni za odjeljivanje širokog raspona različitih veličina DNA. Na migraciju nukleinskih kiselina u agaroznim gelovima utječe također i izbor pufera te primijenjen napon.<sup>64</sup>

Elektroforeza u agaroznom gelu u ovom diplomskom radu korištena je za provjeru uspješnosti izolacije plazmida pTrcHis2-TOPO+R295A i pTrcHis2-TOPO+M367A. 0,7% agarozni gel dobiven je otapanjem 0,7g agaroze u 100 ml 1x TAE pufera. Agarozni gel uronjen je u 1xTAE pufer u kadicu za elektroforezu. Uzorci za agaroznu gel-elektroforezu pripremljeni su na sljedeći način: na komad parafilma (*Parafilm® M, Sigma Aldrich*) ispipetirano 1 µl 6x pufera za nanošenje uzoraka, 4 µl sterilne mqH<sub>2</sub>O i 1 µl uzorka plazmida. Uzorci sa parafilma preneseni su u jažice 0,7% agaroznog gela, kao i 5 µL biljega molekularnih masa (*Bio Basic inc*).

Elektroforeza DNA provedena je u 1× TAE puferu pri naponu od 100 V, u trajanju od otprilike 20 minuta, tj. dok fronta elektroforeze nije doputovala do kraja gela. Kako bi se mogla vizualizirati DNA u gelu, gel je 5 minuta bojan u otopini etidij-bromida, interkalirajućeg agensa koji se umeće između dvaju parova baza DNA. Etidij-bromid je snažni mutagen i kancerogen te je potreban oprez pri radu sa ovim agensom. Identificira se pobudom svjetlom pri čemu fluorescira narančasto<sup>65</sup> te je vizualizacija DNA vrpce napravljena uređajem Syngene *Image master*.

### 3.2.8. Transformacija bakterijskih stanica plazmidom

Transformacija je jedan od načina unosa strane DNA u bakterijsku stanicu. U tu svrhu koriste se kompetentne stanice, koje su sposobne primiti stranu DNA u unutrašnjost stanice. Bakterijske stanice se podvrgavaju jakom električnom polju, koje omogućuje stvaranje prolaznih pora na membrani bakterijskih stanica.<sup>66</sup> Kratkotrajne pore omogućavaju ulazak strane DNA u bakterijsku stanicu. Ova fizikalna metoda naziva se elektroporacija. Metoda je

lagana za korištenje, brza, učinkovita i pouzdana za transformaciju bakterijskih stanica sa stranom DNA.<sup>66</sup>

Transformacija je provedena u elektroporatoru Gene Pulser X cell<sup>TM</sup> (*BioRad*) na smjesi alikvota kompetentnih stanica BL21((DE3)RIL)<sup>+</sup> pripremljenog prema opisu u 3.2.5, te plazmida pTrcHis2-TOPO+BrILL2, pTrcHis2-TOPO+R295A, pTrcHis2-TOPO+M367A opisanih u 3.2.6.

Cijeli postupak napravljen je za svaki od triju plazmidnih vektora zasebno. U Eppendorf tubici pomiješano je 40  $\mu$ l kompetentnih stanica sa 1  $\mu$ l jednog od triju plazmida. Tako dobivena smjesa prebačena je u prethodno ohlađenu kivetu za elektroporaciju (*Bio Rad*, *Gene Pulser Cuvette*, širina 0,2 cm). Smjesa u kiveti stavljena je u elektroporator i podvrgnuta je kratkotrajnom pulsus električne struje od 2500 V. Nakon elektroporacije, u kivetu je dodan 1 mL LB tekuće podloge prethodno zagrijan na 37°C. Sadržaj kivete dobro je resuspendiran te prebačen u plastičnu tubicu i inkubiran 1h na 37°C uz trešnju od 250 okretaja u minuti, kako bi se bakterije oporavile od elektrošoka. Nakon završetka inkubacije, stanice su razmazane po prethodno pripremljenim LB/amp pločama uz plamenik. Stanice su ostavljene na inkubaciji preko noći (~16h) na 37°C.

### 3.2.9. Uzgoj i heterologna ekspresija rekombinantnog proteina BrILL2

#### *Prekonoćna kultura*

Sa ploča pripremljenih u koracima pod 3.2.4 pokupljeno je nekoliko kolonija transformiranih bakterija BL21((DE3)RIL)<sup>+</sup> koje nose plazmid od interesa uz plamenik pomoću eze te su iste dodane u pripremljenih 5 mL LB/amp tekućeg medija. Tako pripremljene kulture uzgajane su preko noći u termostatiranoj tresilici na 37°C uz trešnju od 250 okretaja u minuti.

#### *Velika kultura i indukcija*

U 500 mL tekuće LB/Amp podloge dodano je 10 ml prekonoćne kulture te su kulture uzgajane u termostatiranoj tresilici na 37°C uz 250 okretaja u minuti. Bakterije su uzgajane sve dok vrijednost apsorbancije mjerena na spektrofotometru pri valnoj duljini od 600 nm, nije dostigla vrijednost između 0,6 i 0,8. Kada je dostignuta spomenuta vrijednost optičke gustoće između 0,6 i 0,8, bakterije su najsposobnije za heterolognu ekspresiju rekombinantnog proteina te je u kulturu dodan IPTG do konačne koncentracije 0,5 mmol L<sup>-1</sup>. Bakterije su inkubirane 3-4 h na temperaturi od 20°C uz trešnju od 150 okretaja u minuti.

Nakon 3-4 sata, prebačene su u autoklavirane bučice i oborene centrifugiranjem 20 minuta na 5000 g na temperaturi od 4°C. Talozni su pohranjeni na -20°C do izolacije. Od bakterijske suspenzije prije i poslije indukcije uzeto je po 200 µL za provjeru indukcije ciljnog proteina elektroforezom te su ti uzorci pohranjeni na -20 °C do upotrebe.

#### *3.2.10. Priprema kolone Ni-NTA u svrhu pročišćavanja proteina*

Kolone za pročišćavanje proteina pripremljene su tako da se na dno staklene kolonice postavlja staklena vuna. Niz kolonu propušten je etanol ( $\varphi = 0,30$ ) i u etanol dodano je 500 µl homogene suspenzije Ni-NTA agaroze (*Qiagen*) ovisno o očekivanom prinosu proteina s obzirom na masu razbijanog taloga i volumen pufera za lizu bakterijskih stanica. Kada je agarozna sedimentirala na dno, kolona se isprala sa 2-3 volumena pufera za lizu bez PMSF-a, lizozima i tritona. Ekvilibrirala se sa 3x4 ml pufera za lizu ( ukupan pufer za lizu sa svim sastojcima). Tako pripremljena kolona čuvala se u hladnjaku na +4 °C do upotrebe.

#### *3.2.11. Priprema lizata E. coli za pročišćavanje putem His-kolona*

Pohranjeni talozni su prebačeni u epruvete od 50 mL, izvagani i resuspendirani u puferu za lizu (10 mL pufera na gram taloga). Resuspendirani talog sa puferom za lizu ostavljen je 30 minuta na ledu uz blago protresanje. Nakon toga je slijedio ciklus zamrzavanja u tekućem dušiku i odmrzavanja u rukama, koji je ponovljen tri puta. U otopljenu suspenziju dodano je 10 µl DNaze (koncentracije 10 mg mL<sup>-1</sup>) i bakterijski lizati ostavljeni su 20 minuta na ljujalici na ledu uz njihanje pri 45 okretaja u minuti ili po potrebi duže ukoliko je lizat bio i dalje viskozan. Lizat je centrifugiran 40 minuta na 8400 g pri temperaturi od 4 °C. Dobiveni supernatant je odvojen od taloga i spremljen na +4 °C do pročišćavanja proteina afinitetnom kromatografijom. Od supernatanta uzeto je 50 µL kao uzorak za provjeru pročišćavanja proteina SDS-poliakrilamidnom gel elektroforezom. Talog preostao nakon centrifugiranja lizata bakterije *E.coli* resuspendiran je u mqH<sub>2</sub>O, otprilike u pola volumena korištenog pufera za lizu i sačuvan na +4°C kao uzorak za elektroforetsku provjeru pročišćavanja proteina.

#### *3.2.12. Afinitetna kromatografija na His-koloni*

Afinitetna kromatografija odvaja proteine prema interakciji između proteina i specifičnog liganda vezanog za kromatografsku matricu. Tehnika je visoko selektivna, visoke rezolucije i uglavnom visokog kapaciteta za proteine od interesa. Afinitetna kromatografija je jedinstvena

u tehnologiji razdvajanja budući da je jedina metoda koja omogućava pročišćavanje biomolekule na osnovi njene biološke funkcije ili individualne kemijske strukture.<sup>67</sup> Ni-NTA agaroz je smola za afinitetnu kromatografiju koja se koristi za pročišćavanje rekombinantnih proteina koji sadrže polihistidinsku (6xHis) sekvencu. Histidinski ostaci u His-privjesku se vežu na slobodna mjesta u koordinacijskoj sferi imobiliziranih niklovih iona sa visokom specifičnošću i afinitetom.<sup>67</sup>

Kroz pripremljenu kolonu propušten je supernatant, dobiven nakon centrifugiranja, opisanog u koraku 3.2.II. Nakon skupljanja eluata kroz kolonu je propušteno 5 puta po 2 mL pufera za ispiranje kolone. Prije propuštanja pufera za eluciju, provjerena je efikasnost ispiranja kolone od nespecifično vezanih proteina zaostalih iz lizata na sljedeći način: na komad parafilma nanese se 5 µl Bradfordovog reagensa i 5 µl svake frakcije propuštenog pufera za ispiranje, kao i čistog nepropuštenog pufera kao kontrole. Kada je intenzitet plavog obojenja od nespecifično vezanih proteina na kolonu u frakcijama ispiranja znatno smanjen u odnosu na početnu frakciju sakupljenog pufera za ispiranje, započeto je eluiranje rekombinantnog proteina sa kolone. Propušteno je 5 puta po 2 mL pufera za eluciju te u plastične tubice (*Protein low binding tubes, Eppendorf*) sakupljeno 8 frakcija po 500 µl te 1 po 1000 µl. Frakcije su pohranjene na +4 °C. Kolona je isprana sa 2 mL pufera za eluciju, 4 mL mqH<sub>2</sub>O i 4 mL 30%-tnog etanola. Pohranjena je na +4 °C u 30 %-tnom etanolu. Tako pročišćena kolona može se koristiti još nekoliko puta. Od svih frakcija sakupljenih tijekom pročišćavanja rekombinantnog His-obilježenog proteina iz lizata *E.coli*, uzeto je 50 µl za elektroforezu. Svi alikvoti za elektroforezu pohranjeni su na -20 °C.

### 3.2.13. Elektroforeza u denaturirajućim uvjetima (SDS-PAGE)

Elektroforeza u SDS-poliakrilamidnom gelu je učestalo korištena tehnika za razdvajanje proteina. Razdvajanje molekula proteina ne provodi se na temelju električnog naboja i veličine, već na temelju molekulske mase proteina. Natrijev-dodecil sulfat (SDS) denaturira protein na način da svojim dugim ugljikovodičnim lancima okružuje hidrofobne dijelove proteina, čime potiče razmatanje i denaturaciju proteina.<sup>68</sup> Protein zauzima izduženi oblik i putuje kroz gel. Količina vezanog SDS-a u nastalim micelama je proporcionalna masi proteina, a naboj micela ovisi o količini vezanog SDS-a. Pošto je omjer mase i naboja svih proteina konstantan, svi proteini imaju sličan oblik, pokretljivost proteina u gelu ovisi samo o

molekulskoj masi proteina. Proteini manje molekulske mase kreću se brže kroz pore gela koji ima učinak molekuskog sita, nego proteini veće molekulske mase.<sup>68</sup>

Sve frakcije za kontrolu pročišćavanja proteina pomiješane su sa puferom za denaturaciju proteina u omjeru 1:1, izuzev elucijskih frakcija koje su pomiješane u omjeru 2:1, resuspendirane te centrifugirane kratko na 8000 g. Nakon toga provedena je denaturacija u termobloku, na 95 °C u trajanju od 10 minuta. Ponovljeno je centrifugiranje kratko na 8000 g. Tako pripremljeni uzorci nanoseni su u jažice pripremljenih gelova. U prvu jažicu nanoseno je 5 µl biljega molekulskih masa, a u preostale jažice po 15 µl uzoraka za elektroforezu. Gelovi su postavljeni u kadu ispunjenu puferom za elektroforezu. Elektroforeza je provedena na 100 V prvih deset minuta, te na 200 V otprilike 40 minuta, tj. dok fronta nije doputovala do ruba gela. Nakon završetka elektroforeze, gelovi su bojani u otopini Coomassie brilliant blue boje 10 minuta na tresilici pri brzini od 45 okretaja u minuti. Nakon 10 minuta, gelovi su prebačeni u čaše sa vrućom mqH<sub>2</sub>O kako bi se odbojali. Nakon odbojavanja, gelovi su skenirani.

#### *3.2.14. Dijaliza u fosfatnom i kakodilatnom puferu*

Kada eksperimenti uključuju proteine i nukleinske kiseline, često je potrebno eliminirati molekule male molekulske mase u otopini koje su neželjene za daljnje eksperimentalne postupke, a svojom pojavom mogu utjecati na uzorak. U dijalizi, neželjene molekule unutar otopine uzorka difundiraju kroz polupropusnu membranu u tekućinu, odnosno dijalizat. Budući da velike molekule ne mogu proći kroz pore membrane, ostat će u otopini uzorka.<sup>69</sup> Za razliku od njih, male molekule će slobodno difundirati preko membrane i zadobiti ravnotežu preko cijelog volumena otopine, učinkovito smanjivajući koncentraciju tih molekula unutar uzorka.<sup>69</sup> Tubica za dijalizu je u suštini cilindrična membrana koja sadrži pore. Veličina ovih pora određuje granicu mase molekula koje mogu proći kroz tubicu. Tipične granice su za mase molekula od 5000 Da, 10 000 Da, 30 000 Da i 100 000 Da. Prema tome, ako se odabere tubica sa granicom od 30 000 Da, sve molekule manje od 30 kDa moći će slobodno proći kroz membranu.<sup>70</sup>

Frakcije koje sadrže rekombinantni protein dobivene provođenjem afinitetne kromatografije, spojene su i stavljene su u plastičnu tubu Tube-O-Dialyzer (8000 Da MW cut-off, *G-Biosciences*) i začepljene sa čepom koji sadrži polupropusnu membranu. Membrana je prethodno isprana sa 30 %-tnim etanolom, te zatim sa mqH<sub>2</sub>O i ekvilibrirana puferom za



eluciju. Tubice za dijalizu sa proteinima provučene su kroz nosače, okrenute membranom prema dolje te uronjene u pufer za dijalizu. Dijaliza je provedena uz tri izmjene pufera: jedan sat nakon početka dijalize na magnetskoj mješalici na +4 °C, zatim dva sata nakon prve izmjene pufera, dok je treća izmjena napravljena nakon prekonoćnog dijaliziranja otopine proteina. Pufer korišten u zadnjoj izmjeni pufera čuvan je za određivanje koncentracije proteina. Cilj dijalize bio je ukloniti imidazol i ostale soli iz otopine proteina koji se nakon provođenja afinitetne kromatografije nalazi u elucijskom puferu. Po završetku dijalize, izmjerena je koncentracija proteina metodom po Bradfordu.<sup>71</sup>

### 3.2.15. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

Metoda po Bradfordu jedan je od načina određivanja koncentracije proteina koji uključuje vezanje boje Coomassie Brilliant Blue G-250 na proteine. Boja postoji u 3 oblika: kationskom (crvenom), neutralnom (zelenom) i anionskom (plavom).<sup>71</sup> Od tri nabijena oblika boje, više kationskih crvenih i zelenih oblika ima maksimalnu apsorpciju pri 470 nm, odnosno 650 nm. Anionski plavi oblik boje veže protein, ima maksimalnu apsorpciju pri 590 nm. Kvantifikacija proteina može se procijeniti određivanjem količine boje u plavom ionskom obliku. To se postiže mjerenjem apsorpcije pri 595 nm na spektrofotometru. Metoda je kolorimetrijska. Što je više proteina prisutno, više se boje veže, pa se intenzitet boje ispitivanog uzorka povećava. Koncentracija proteina ispitivanog uzorka određuje se u usporedbi sa nizom poznatih standardnih proteina kako bi se iznijela reproducibilnost linearnog apsorpcijskog profila u analizi. Iako se mogu koristiti različiti proteini kao standardi, najčešća bjelančevina koja se koristi kao standard je goveđi serumski albumin (BSA) jer daje boju sličnu kao ispitivani uzorak proteina.<sup>71</sup>

Prvo su načinjena mjerenja apsorpcije pri valnoj duljini 595 nm ( $A_{595\text{nm}}$ ) otopine BSA u nizu koncentracija za izradu baždarne krivulju. Na 96-jažičnu pločicu (*Copan*) nanoseni su redom standard BSA odgovarajuće koncentracije te fosfatni ili kakodilatni pufer u odgovarajućim volumenima prema tablici, potrebnim za postizanje konačnih koncentracija otopina BSA datih u tablici 22. Na tako priređene otopine BSA dodano je 200  $\mu\text{L}$  Bradfordovog reagensa. Fosfatni ili kakodilatni pufer koristili su se i kao slijepa probe za mjerenje apsorpcije, ovisno o puferu koji se koristio za dijalizu. Slijepa proba priređena je od 10  $\mu\text{L}$  odgovarajućeg pufera i 200  $\mu\text{L}$  Bradfordovog reagensa. Mjerenja su ponovljena u triplikatima na spektrofotometrijskom čitaču (*Microplate reader*).

Tablica 22. Tablica uzoraka za izradu baždarne krivulje

$\gamma$ (BSA)/ $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$	$V(\text{standard})/\mu\text{L}$	$V(\text{H}_2\text{O})/\mu\text{L}$	$m(\text{BSA})/\mu\text{g}$	$\gamma$ (BSA)/ $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$
0,1	2	8	0.2	0,02
0,1	8	2	0.8	0,08
0,1	10	0	1.0	0,1
0,5	3	7	1.5	0,15
0,5	4	6	2.0	0,2
0,5	6	4	3.0	0,3
0,5	8	2	4.0	0,4
0,5	10	0	5.0	0,5

Uzorci proteina razrijeđeni su pet ili deset puta da bi im koncentracija približno bila u rasponu apsorbancija baždarne krivulje. Koncentracija proteina u dijaliziranim uzorcima određena je usporedbom izmjerenih apsorbancija za uzorke sa baždarnom krivuljom te uzimajući u obzir nagib baždarne krivulje koji je u našem slučaju iznosio  $a$ , a prema jednadžbi pravca  $y=a*x+b$ , gdje je  $a$  nagib baždarne krivulje,  $y$  je apsorbancija pri 595nm, a  $x$  konačna koncentracija otopine BSA. Dobivene koncentracije proteina pomnožene su s faktorom razrjeđenja  $R=5$  ili  $R=10$ , ovisno o napravljenom razrjeđenju.

### 3.2.16. DSC (diferencijalna pretražna kalorimetrija)

Diferencijalna pretražna kalorimetrija je tehnika koja se koristi za karakterizaciju stabilnosti proteina ili ostalih biomolekula koji su u svom prirodnom obliku. Mjeri se promjena topline povezana sa termičkom denaturacijom molekula kada se zagrijava pri konstantnoj brzini. Precizni i visoko kvalitetni podaci dobiveni mjerenjem na DSC-u daju vitalne informacije o stabilnosti proteina u procesu razvoja i u formulaciji potencijalnih terapijskih kandidata.<sup>72</sup>

Biomolekule su u otopini u ravnoteži između njihove prirodne i denaturirane konformacije. Što je viša srednja točka termičke tranzicije ( $T_m$ ), molekula je stabilnija. Termičke tranzicije su promjene koje se odvijaju unutar proteina ili biomolekula kada ih se zagrijava. DSC mjeri entalpiju ( $\Delta H$ ) nastalu kao posljedica denaturacije izazvane topline. Može i objasniti faktore koji doprinose smatanju i stabilnosti prirodnih biomolekula. To uključuje hidrofobne interakcije, vodikove veze, entropiju konformacije i fizičko okruženje.<sup>73</sup>

Makromolekule, kao što su proteini, nukleinske kiseline i lipidi, mogu formirati dobro definirane strukture koje prolaze termički inducirane konformacijske promjene. Ta strukturna preuređivanja rezultiraju apsorpcijom topline uzrokovane preraspodjelom nekovalentnih veza. Diferencijalna pretražna kalorimetrija mjeri tako nastalu toplinu.<sup>73</sup>

Termički dio DSC sustava sadrži dvije ćelije, referentnu ćeliju i ćeliju za uzorak. Uređaj je dizajniran na način da održava dvije ćelije na istoj temperaturi, budući da se zagrijevaju. Prije DSC mjerenja, obje se ćelije ispune puferom volumena otprilike 700  $\mu\text{L}$ . Nakon jednosatnog mjerenja odziva pufera radi snimanja bazne linije, iz ćelije za uzorak se izvadi pufer i stavi otopina uzorka volumena 700  $\mu\text{L}$ . Mjerenje se također provodi jedan sat.<sup>73</sup>

Temperatura ispitivanog uzorka i temperatura referentnog materijala održavaju se jednake u toku zagrijavanja variranjem snage u oba segmenta peći, preko koje se dobiva promjena entalpije u uzorku u odnosu na referentni materijal. Protein u uzorku uzima više topline kako bi se denaturirao, pa je potrebno odvesti tu toplinu kako bi se postigla ista temperatura kao referentnog uzorka. DSC mjeri tu toplinu.

DSC termogrami snimani su na instrumentu *TA Instruments NANO DSC*. Uzorci su snimani od 25 °C do 90 °C. Brzina zagrijavanja iznosila je 1,0 °C  $\text{min}^{-1}$  te tlaku od 3 atm. Uzorci su zagrijavani u jednom ciklusu.

### 3.2.17. CD (cirkularni dikroizam)

Cirkularni dikroizam je eksperimentalna metoda određivanja sekundarne strukture proteina. Dobivaju se informacije o udjelu sekundarnih struktura: alfa-uzvojnica, beta nabranih ploča i beta okreta u proteinu. Ovom tehnikom mogu se pratiti i kvantificirati procesi vezanja liganda, služi i za nadzor strukturnih promjena, npr. zbog mutacija pojedinih aminokiselina u proteinu, smatanja i odmatanja proteina te kako bi se pratila stabilnost strukture o temperaturi. Osim za određivanje sekundarne strukture proteina, koristi se za određivanje kiralnosti molekula pa je rasprostranjena u svim granama koje rabe optički aktivne spojeve.<sup>74</sup>

Tehnika se temelji na određivanju razlike u apsorpciji lijevo i desno polarizirane svjetlosti. Optički aktivne kromofore su kovalentno vezane nezasićene skupine koje apsorbiraju elektromagnetsko zračenje. U proteinima to su peptidne veze, bočni ogranci aromatskih aminokiselina te disulfidne veze. Peptidne veze apsorbiraju u području dalekog UV-a od 170-240 nm. U tom području valnih duljina, različiti tipovi sekundarnih struktura daju

karakteristične CD spektre koji se mogu uspoređivati i na temelju tih rezultata mogu se dati zaključci o sekundarnim strukturama nepoznatih proteina.<sup>74</sup>

Za snimanje CD spektara u dalekom UV području, koristi se mala količina uzorka od 20-200  $\mu\text{l}$ . S obzirom na izgled spektra, koncentracije proteina u uzorku mogu se i razrijediti kako bi se dobio bolji izgled spektra. CD uređaj sastoji se od: izvora monokromatskog linearno polariziranog svjetla, optičkog sustava koji ga prevodi u desno i lijevo cirkularno polariziranu svjetlost, Peltierovog držača za kivete za kontrolu temperature uzorka u području 5 – 90°C, s točnošću 0,50°C, kivete optičkog puta različite debljine, detektora te računala.<sup>74</sup>

CD spektri snimani su na JASCO J-815 spektropolarimetru u rasponu valnih duljina od 260 do 190 nm pri temperaturi od 20 °C. Brzina snimanja je iznosila 50 nm min<sup>-1</sup> s rezolucijom 0,2 nm, propusnosti 1 nm i odzivom od 1 sekunde. Duljina optičkog puta bila je 1 mm. Dobiveni rezultati su analizirani u programu *CDSSTR* na internetskoj stranici *Dichroweb*.

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Rezultati

#### 4.1.1. *Sravnjivanje sekvenci auksin-amidohidrolaza iz B.rapa i A. thaliana*

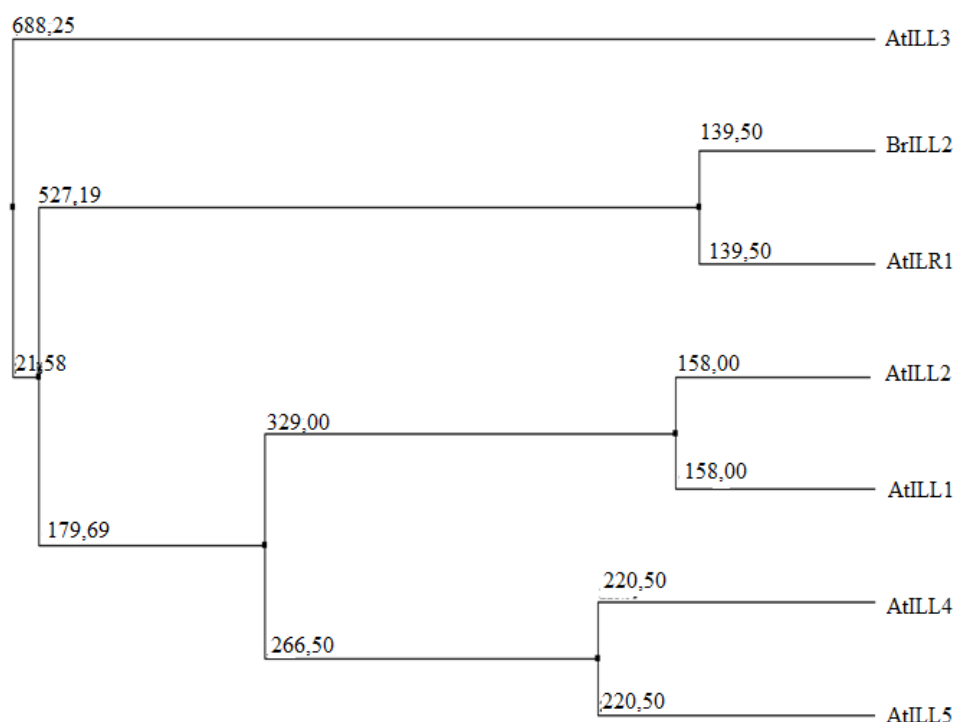
Aminokiselinski slijed proteina BrILL2 iz kineskog kupusa (*B. rapa*) sravljen je sa aminokiselinskim slijedovima AtILL2, AtILR1, AtILL4, AtILL1, AtILL3 i AtILL5 iz *Arabidopsis thaliana*. Sravnjivanje primarnih slijedova za spomenute auksin-amidohidrolaze napravljeno je u programu Jalview prema načinu opisanom pod poglavljem *Metode*, podpoglavlje 3.2.1. Prema sravnjenim sekvencama, sličnost primarnih sekvenci je od 40% (BrILL2 i AtILL5) do 85% (BrILL2 i AtILR1) (slika 10).

BrILL2	1	MNFSGVF--FLFFFFFLLSPALSYGSGSGIESLSRGM	LSAKEPEFFFEWMRG	51
AtILL2	1	MALNKLLSLTFQLLLFLLSVSSSESPW-IAEDTSQIQTKL	LEFAKSPEVFDWMVK	53
AtILR1	1	MDFSGSFFVIFVTFFFLPPLSSAGSYDSSGSGLESARGM	LHSAKDPEFFFEWMRG	54
AtILL4	1	MSFFKVV--SFVLIHLHLLN--PTLISCSNGLSQIPSKFL	TLAKRNDFFDWMVG	50
AtILL1	1	MALNNFL--TFQLLLLLLRVSSSESPWIVAGDVSRIPINFL	LELAKSPEVFDWMVR	52
AtILL3	1	MANSIV--ALLLLFVIAS--S--SVNGGDQEYPNQYL	TEALGDK--EWLVS	43
AtILL5	1	MSFCKLV--SFVLIHLHLLN--SCLISCSNGLSQIPKNFL	SLAKREDFDWMVG	50
BrILL2	52	IRRRIHENPETGFQEFKTSQLIRDEL D L L G V K Y K W P V A K T G V V A W I G S G S K P V F	105	
AtILL2	54	IRRKIHENPELGYEEL E T S K L I R S E L E L I G I K Y R Y P V A I T G V I G Y I G T G E P P F V	107	
AtILR1	55	IRRKIHENPETGFQEFKTSQLVRDEL D S L G V K Y K Y P V A K T G V V A W I G S C S K P V F	108	
AtILL4	51	IRRRIHENPELGYEEVETS K L V R A E L E K M G V S Y K Y P V A V T G V V G Y V G T G H A P F V	104	
AtILL1	53	IRRKIHENPELGYEEFETS K F I R S E L D L I G V K Y R F P V A I T G I I G Y I G T G E P P F V	106	
AtILL3	44	VRRQIHENPELLFELHKTSA L I R R E L D E L G V S Y S Y P V A K T G I V A G I G S G Y P P V F	97	
AtILL5	51	IRRRIHENPELGYEEVETS K L V K T E L D K M G V S Y K N P V A V T G V I G Y V G T G H A P F V	104	
BrILL2	106	GLRADMDALPLQELVEWESKSKVDGKMHACGHDT	HVAMLLGAAKLLQSRKHLIK	159
AtILL2	108	ALRADMDALPIQEGVEWEHKS K I A G K M H A C G H D G H V T M L L G A A K I L H E H R H H L Q	161	
AtILR1	109	GLRADMDALPLQELVEWESKSKVDGKMHACGHDT	HVAMLLGAAKLLQTTKHLIK	162
AtILL4	105	ALRADMDALAMQEMVEWEHKS K V P G K M H A C G H D A H T T M L L G A A K L L K E H E E L Q	158	
AtILL1	107	ALRADMDALPIQEAWEWEHKS K N P G K M H A C G H D G H V A M L L G A A K I L Q Q H R H L Q	160	
AtILL3	98	ALRADMDALPLQELVEWDHKS K I D G K M H A C G H D S H T T M L L G A A K L L S K R K R M L N	151	
AtILL5	105	ALRADMDALPIQEMVEWEHKS K I P G K M H A C G H D A H T T M L L G A A K L L K E H Q E E L Q	158	
BrILL2	160	GTVKLVFQPAEEGGYGGAIEMLKDDILDDLDGILSVHVFPTIPS	GGIGARPGTVL	213
AtILL2	162	GTVVLIFQPAEEGLSGAKMREEGALKNVEAIFG	IHLSPRTPF	215
AtILR1	163	GTVKLVFQPAEEGGYAGAYEMLKDEILDDLDGILSVHVFPSIPS	GGIGSRPGTVL	216
AtILL4	159	GTVVLVFPAAEEGGGAKKIVEAGVLENVSAIFGLHVTNQLALQVSSREG	PML	212
AtILL1	161	GTVVLIFQPAEEGLSGAKMREEGALKNVEAIFG	IHLSPRTPF	214
AtILL3	152	GTVRLVFPAAEEGGAGAFHMIKEGALGDSEAFGMHVHTGLPTGELATISGPAL	205	
AtILL5	159	GTVILVFPAAEEGGGAKKIVEAGVLENVGAIFGLHVSNNLLGLQLSSREG	LLM	212
BrILL2	214	AGAGLFTVTVHGQGGSHAATPHLSKDPVLAASSAVVALQQIVSREMDP	LEAGVVT	267
AtILL2	216	AGAGVFEAVITGKGGHAAIPQHTIDPVVAASSIVLSLQQLVSR	EDPLDSKVV	269
AtILR1	217	AGAGLFTVTVHGQGGSHAATPHFSKDPVLAASSAVVALQQIVSREL	DPLEAGVVT	270
AtILL4	213	AGSGFFKAKISGKGGHAALPQHTIDPILAASNVIIVSLQHLVSRE	ADPLDSQVVT	266
AtILL1	215	AGAGAFEAVITGKGGHAAIPQHTIDPVVAASSIVLSLQHLVSR	EDPLDSKVV	268
AtILL3	208	ASTSIFSVRMSGKSPASSETYSCVDPVLAASSTILALQLIISRE	VDPLLSHVLS	259
AtILL5	213	AGSGRFKATISGKGGHAALPQFAIDPVLAASNVIIVSLQHLVSR	EDPLDSQVVT	266
BrILL2	268	VGYIQ--GGHTQNVIPQSAKFGGTFRSLSNDGLLFIQRRRIKEISEA	QASVYQCKA	320
AtILL2	270	VSKVN--GGNAFNVIPDSITIGGTLRAFT--GFTQLQQRVKEVITKQA	AVHRCNA	320
AtILR1	271	VGYIE--GGHAQNVIPQSAKFGGTFRSLSNDGLLFIQRRRIKEISEA	QASVYRCKA	323
AtILL4	267	VAKFE--GGGAFNVIPDSVTIGGTFRAFSTKSFMQLKKRIEQVITR	QASVNMCNA	319
AtILL1	269	VTKVN--GGNAFNVIPDSITIGGTLRAFT--GFTQLQQRVKEVITKQA	AVHRCNA	319
AtILL3	260	VTFMKSGGSEFDVIPAYVEFGGTLRSLTTNGINWLIKRLKEVVEG	QAEVQRCKA	313
AtILL5	267	VATFE--GSDAFNVIPDSVTIGGTFRALLPKSFEQLKQRIVQVIT	TQASVNMCNA	319
BrILL2	321	EVDVGEKEPSLHPVVMKNDEGLYEHGKEVAEAMIGKNNFHDFPVT	MGAEDFSFFT	374
AtILL2	321	SVNLT PNGREPMPPTVNNKDL Y K Q F K K V V R D L L G Q E A F V E A P V M G S E D F S Y F A	374	
AtILR1	324	EVNFEKPKPSLHPVVMNDEGLYEHGKKEVAEAMIGKNNFHDFPVT	MGGEDFSFFT	377
AtILL4	320	TVDVIEEEKPFPPTVNDKALHQFFKKNVSGDMLG	IENYVEMQPLMGSEDFSYFQ	373
AtILL1	320	SVNLPNGNQPMPTVNNMDLYKFKKVVVRDLLGQEAFAVPEM	MGSEDFSYFA	373
AtILL3	314	DIDMHEDDHPMPATVNDHKLHEFTEKVLKLLGPEKVKPANKVM	AGEDFAFYQ	367
AtILL5	320	TVDVLEDETPFPPTVNNKTLHLFYKNVSVDMLG	IENYVETLPVMVSEDFAFYQ	373
BrILL2	375	QRTKAAIFVLG	IKNETL G A G K P L H S P Y F F V D E E A L P L G A A L H A M A V T Y L D K - -	426
AtILL2	375	ETIPGHFSLGMDQDETNG-YASSHSPLYRINEDVLPYGAAIHASMAVQYL	KE-K	426
AtILR1	378	QKTAAIFVLGVKNETL G A G K P L H S P Y F F V D E E A L P V G A A L H A M A V S Y L D E - -	429	
AtILL4	374	QAIPGHFSFVGMQNKARSPMASPHSPYFEVNEELLPYGASLHASMATRYLLEL	K	427
AtILL1	374	ETIPGHFSLGMDQDETNG-YASSHSPLYRINEDVLPYGAAIHATMAVQYL	K	425
AtILL3	368	QKIPGYIIGIIRNEEIGSVRSVHSPYFFLDENVLPIGSATFAALAEMYL	QE--	419
AtILL5	374	QAIPGHFSFVGMQNKSHSPMANPHSPYFEVNEELLPYGASLLASLATRYLLD	--	425
BrILL2	427	--HGNDHEVKTEL		437
AtILL2	427	ASKGSVSGFHEEL		439
AtILR1	430	HGHSHEEEVKSEL		442
AtILL4	428	ASTLNKSNKKDEL		440
AtILL1	426	ASKGSVSGFHDEL		438
AtILL3	420	--HQNQTKSGD--		428
AtILL5	426	--SSSPNKDEL		435

Slika 10. Srađnjene sekvence auksin- amidohidrolaze BrILL2 iz *Brassica rapa* i auksin-amidohidrolaza (AtILL2, AtILR1, AtILL4, AtILL1, AtILL3 i AtILL5) iz biljke *Arabidopsis thaliana*<sup>75</sup> Svijetlo plavom bojom označene su slične aminokiseline, a tamno plavom bojom identične aminokiseline u uspoređanim proteinskim sekvencama. Sasvim različite aminokiseline prikazane su bijelom bojom.

#### 4.1.2. Izrada filograma auksin-amidohidrolaza iz *Brassica rapa* i *Arabidopsis thaliana*

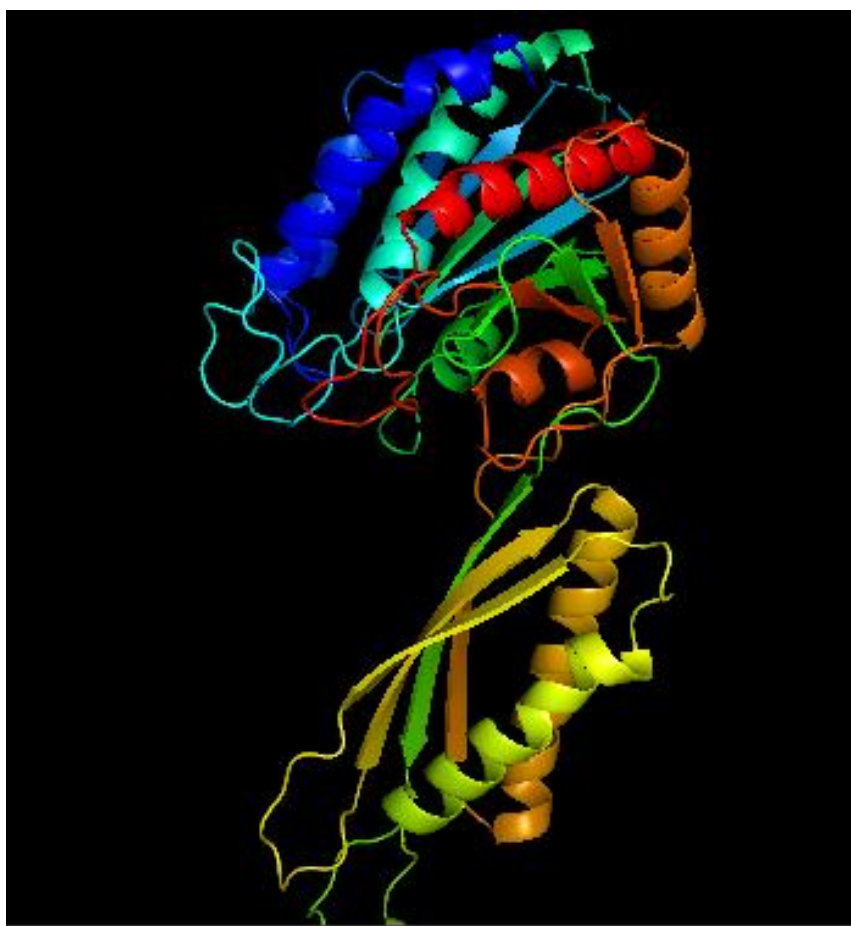
Filogram auksin-amidohidrolaza iz *Brassica rapa* i *Arabidopsis thaliana* izrađen je metodom *average distance* u programu Jalviewu<sup>54</sup>, a način je opisan pod poglavljem *Metode 3.2.2.* Slika 11. prikazuje izrađeni filogram auksin-amidohidrolaze BrILL2 iz *Brassica rapa* i auksin-amidohidrolaze iz *Arabidopsis thaliana*. Prema filogramu prikazanom na slici 11, auksin-amidohidrolaza iz *Brassica rapa* koja je predmet proučavanja ovog diplomskog, pokazuje prema proteinskim sekvencama najveću sličnost sa auksin-amidohidrolazom AtILR1. Čvorište od kojeg se grana BrILL2 i AtILR1 označava zajedničkog pretka. Iako auksin-amidohidrolaza ima najveću sličnost prema genima sa auksin-amidohidrolazom AtILR1, međusobno se razlikuju po svojoj specifičnosti prema supstratima. AtILR1 kao supstrat preferira IAA-Phe i IAA-Leu<sup>40</sup>, dok BrILL2 preferira IPA-Ala i IBA-Ala.<sup>3</sup> Najmanju sličnost ima sa auksin-amidohidrolazom AtILL5 jer je najveća udaljenost između njih na stablu.



Slika 11. Filogram proteina auksin amidohidrolaza iz biljnih vrsta *Arabidopsis thaliana* i *Brassica rapa*<sup>54</sup>

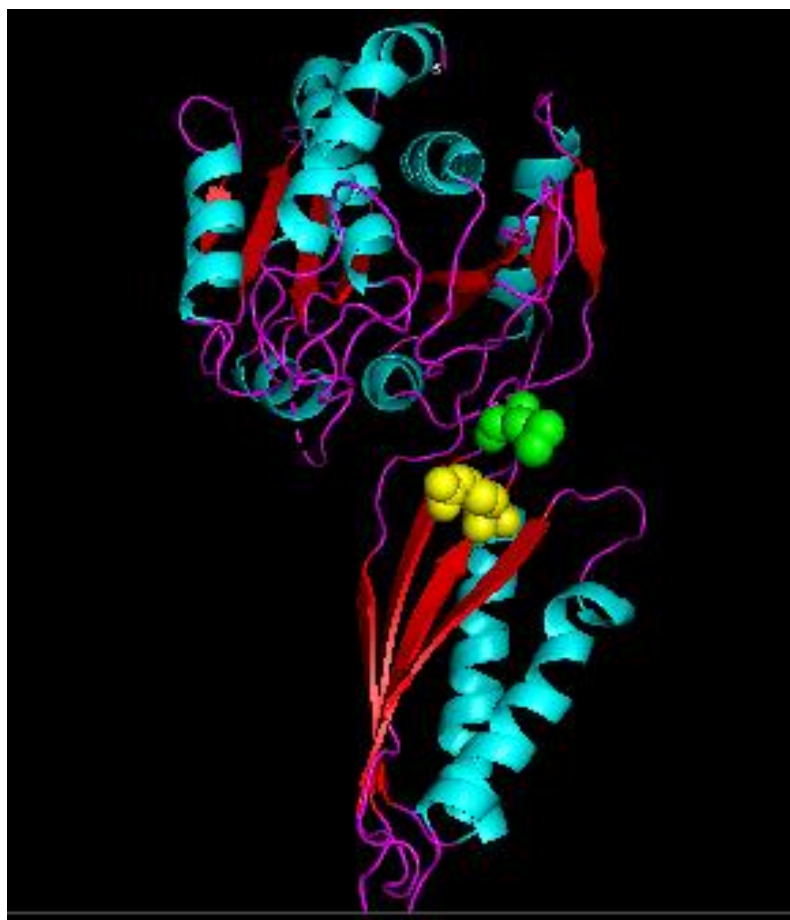
#### 4.1.3. Predviđanje tercijarne strukture auksin-amidohidrolaze BrILL2 iz kineskog kupusa (*Brassica rapa*)

Tercijarna struktura auksin-amidohidrolaze BrILL2 dobivena je homolognim modeliranjem putem online- alata Phyre, na osnovu strukture AtILL2 auksin-amidohidrolaze iz uročnjaka (pdb: 1XMB) s kojom dijeli 78% sličnosti. Struktura BrILL2 je određena modeliranjem u programu Phyre.<sup>58</sup> Struktura se sastoji od dvije domene, veće katalitičke domene, koja sadrži ostatke 1-199 i 317-425, i manje, satelitne domene koja sadrži ostatke 199-317. Katalitička domena se sastoji od osam  $\beta$ -ploha okruženih sa sedam  $\alpha$ -uzvojnica, a satelitna domena se sastoji od troslojnog  $\alpha\beta$  motiva (slika 12). Aminokiseline (R295 i M367) koje su mjesno-specifičnom mutagenezom promijenjene u Ala vizualizirane su u programu Pymol.<sup>59</sup> Slika 13 prikazuje 3D strukturu proteina BrILL2 iz kineskog kupusa sa aminokiselinama R295 i M367. Prema modelu, aminokiseline koje su se mjesno-specifičnom mutagenezom mijenjale u alanin, nalaze se izvan aktivnog mjesta.



Slika 12. Model tercijarne strukture proteina BrILL2 iz kineskog kupusa (*Brassica rapa*) dobiven u programu Phyre.<sup>58</sup>

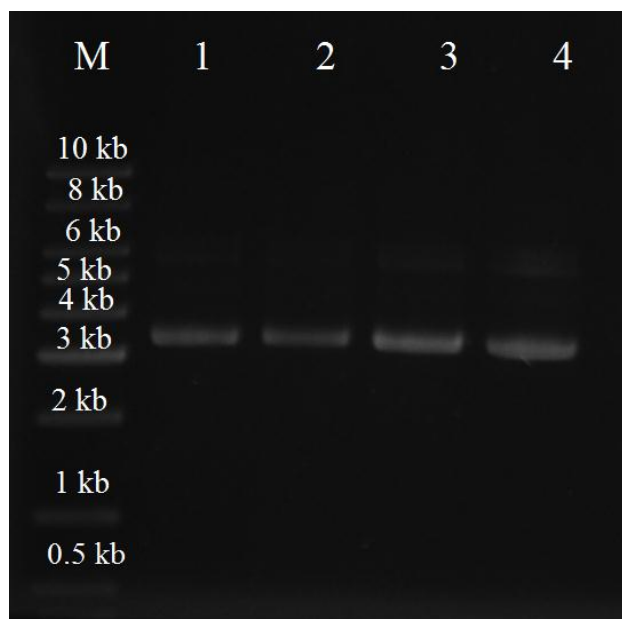




Slika 13. Model tercijarne strukture proteina BrILL2 iz kineskog kupusa (*Brassica rapa*) vizualiziran u programu Pymol.<sup>59</sup> Svijetlo plava boja prikazuje  $\alpha$ -zavojnice, crvena boja  $\beta$ -ukosnice ( $\beta$ -ploče), dok je ljubičastom bojom prikazana konformacija nasumičnog klupka. Zelenom bojom je prikazana aminokiselina M367, a žutom bojom R295.<sup>59</sup>

#### 4.1.4. Izolacija plazmida

Plazmidi pTrcHis2-TOPO+R295A i pTrcHis2-TOPO+M367A koji sadrže uklonirani gen za auksin-amidohidrolazu iz kineskog kupusa, BrILL2, umnoženi su i izolirani kako je opisano u poglavlju *Metode 3.2.6*. Kako bi se provjerila uspješnost izolacije provedena je agarozna elektroforeza (slika 14), plazmidi su vizualizirani bojanjem s etidij-bromidom.

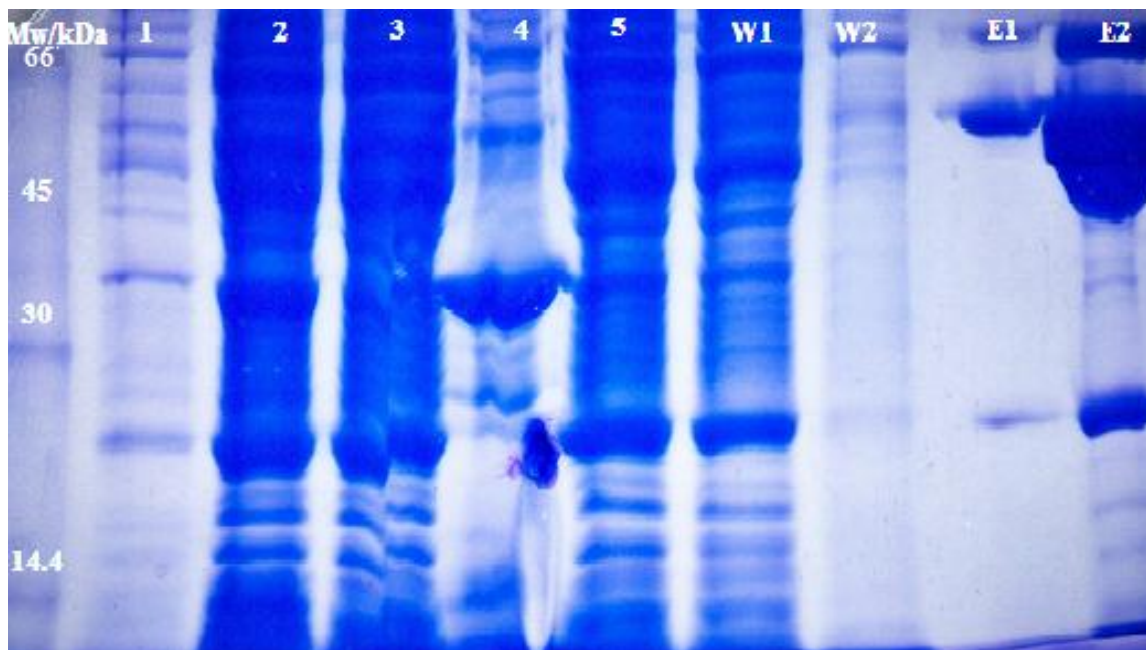


Slika 14. Elektroforetska slika izoliranih plazmida na agaroznom gelu. Marker molekulske mase (M), plazmidi R295A (pod 1. i 2.) te plazmidi M367A (pod 3. i 4.)

#### 4.1.5. Izolacija i pročišćavanje prekomjerno eksprimiranih rekombinantnih proteina (divljev tipa i mutiranih varijanti)

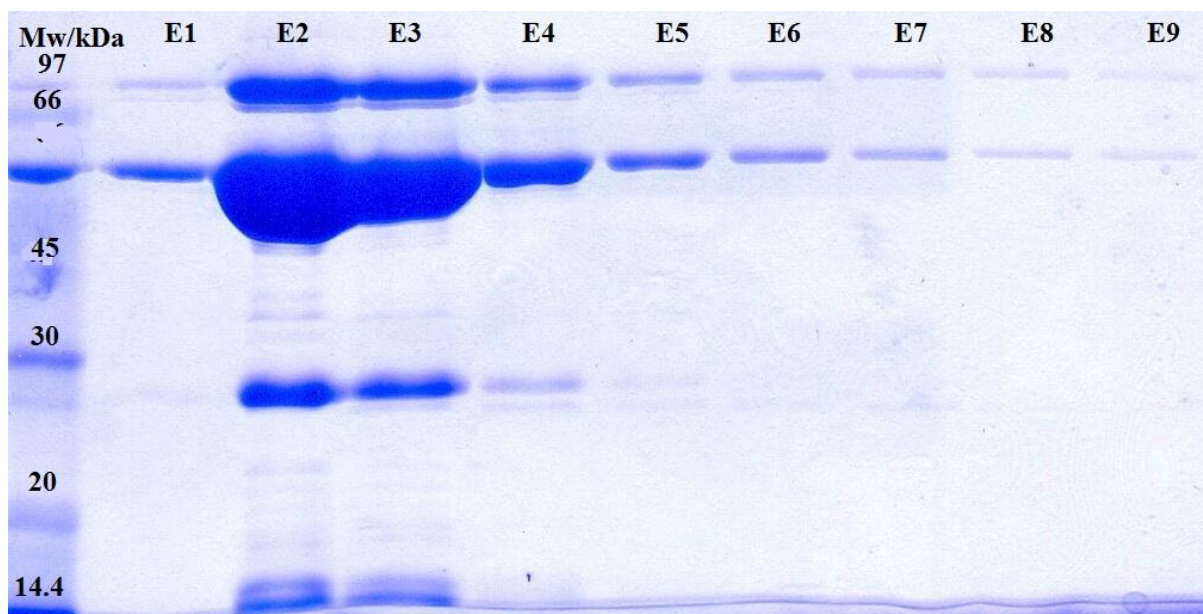
Prije izolacije i pročišćavanja proteina provedena je transformacija kompetentnih bakterijskih stanica *E.coli*, soj BL21((DE3)RIL)<sup>+</sup> prethodno pripremljenim plazmidima pTrcHis2-TOPO-BrILL2M367A (u daljnjem tekstu: mutirana varijanta M367A), pTrcHis2-TOPO-BrILL2R295A (u daljnjem tekstu: mutirana varijanta R295A) i pTrcHis2-TOPO-BrILL2 (u daljnjem tekstu: plazmid BrILL2) procesom elektroporacije. Cijeli postupak transformacije, heterologna ekspresija rekombinantnih proteina te postupak izolacije proteina opisano je u Metodama (odjeljak 3.2.8. i 3.2.9 i 3.2.11). Proteini su pročišćeni afinitetnom kromatografijom na koloni sa punilom Ni-NTA agaroze.

Rezultat tijekom izolacije i pročišćavanja proteina prikazan je na slici 15.



Slika 15. Elektroforetska slika tijekom pročišćavanja mutirane varijante R295A na koloni (MW= smjesa proteinskih standarda, 1= uzorak bakterijske stanice prije dodatka DNaze, 2= uzorak stanice nakon dodatka DNaze, 3=supernatant nakon centrifugiranja uzorka, 4= resuspendirani talog nakon centrifugiranja uzorka, 5=supernatant nakon inkubacije sa Ni-NTA agarozom, W1 I W2= uzorci sakupljeni nakon propuštanja pufera za ispiranje, E1 i E2=frakcije sakupljene nakon propuštanja pufera za eluciju)

Radi provjere jesu li uspješno proizvedeni proteini, provedena je elektroforeza u poliakrilamidnom gelu svih devet elucija dobivenih tijekom propuštanja supernatanta niz kolonu (slika 16). S obzirom na visoki prinos proteina i čistoću frakcije dobivene frakcije (E2, E3 i E4) su spojene, provedena je dijaliza, određena koncentracija te se taj uzorak koristio za daljnja mjerenja.



Slika 16. Elektroforetska slika sakupljenih frakcija mutirane varijante R295A nakon propuštanja pufera za eluciju provedenog pročišćavanja afinitetnom kromatografijom (MW=smjesa proteinskih standarda, E1-E9=uzorak proteina eluiran sa Ni-NTA agarozne kolone)

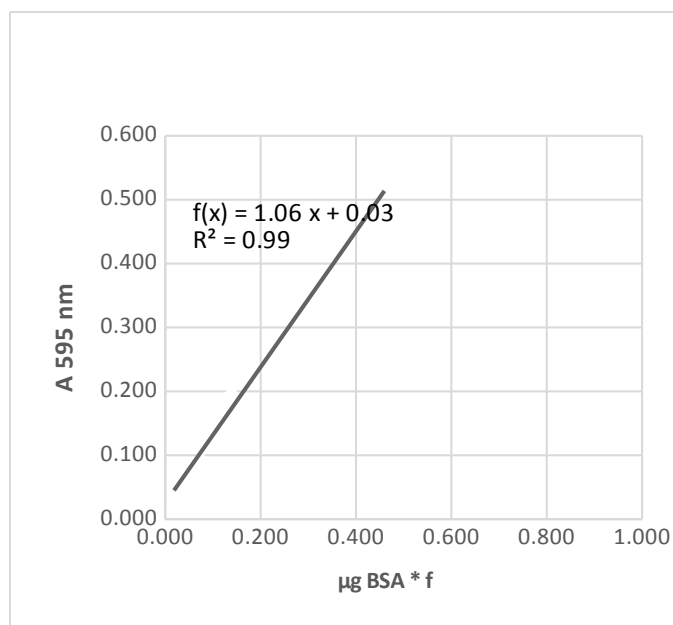
Na slici 16 u frakcijama E2, i E3 vidljive su vrpce željenog proteina mase oko 48 kDa u dostatnim količinama. U frakcijama E1, E4 i E5 ga ima znatno manje. U frakcijama E8 i E9 se već eluirala znatna količina proteina sa kolone.

Što se tiče proteina BrILL2 i mutirane varijante M367A, gelovi su slično izgledali u oba slučaja, te su ove dvije slike reprezentative i za preostala dva proteina.

#### 4.1.6. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

Koncentracija proteina određena je metodom po Bradfordu, a postupak je objašnjen u poglavlju 3.2.14. Metodom po Bradfordu dobivene su koncentracije proteina divljeg tipa te dvaju mutanata.

Prema Tablici 22. u poglavlju 3.2.14. nacrtana je baždarna krivulja prikazana na slici 17. Baždarna krivulja izrađena je u programu *Microsoft Office Excel 2013*.

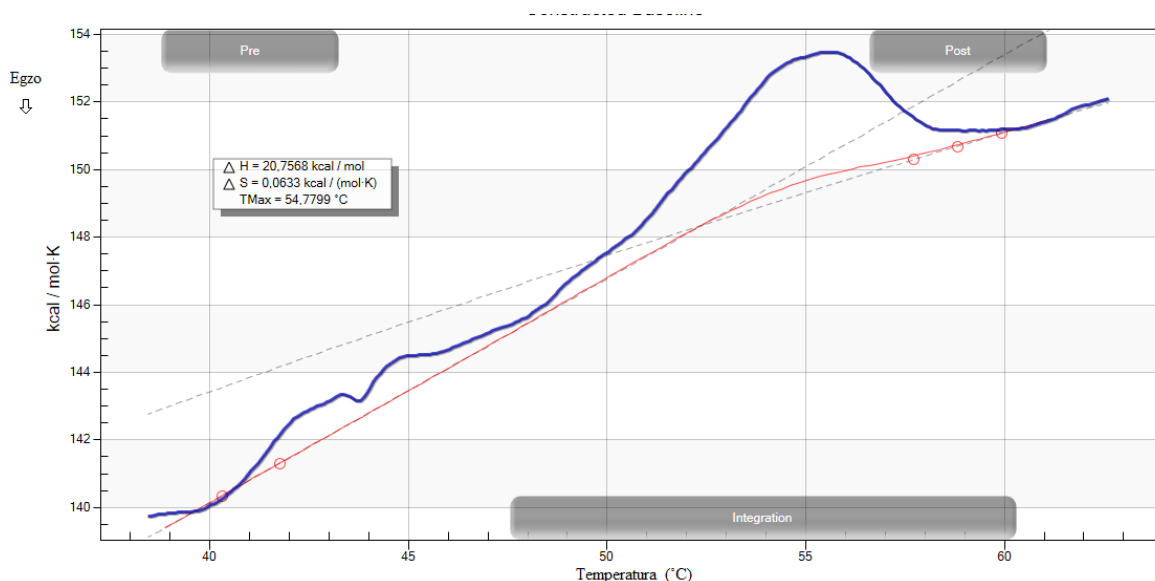


Slika 17. Prikaz baždarne krivulje za određivanje koncentracije proteina prema vrijednostima prikazanim u Tablici 22.

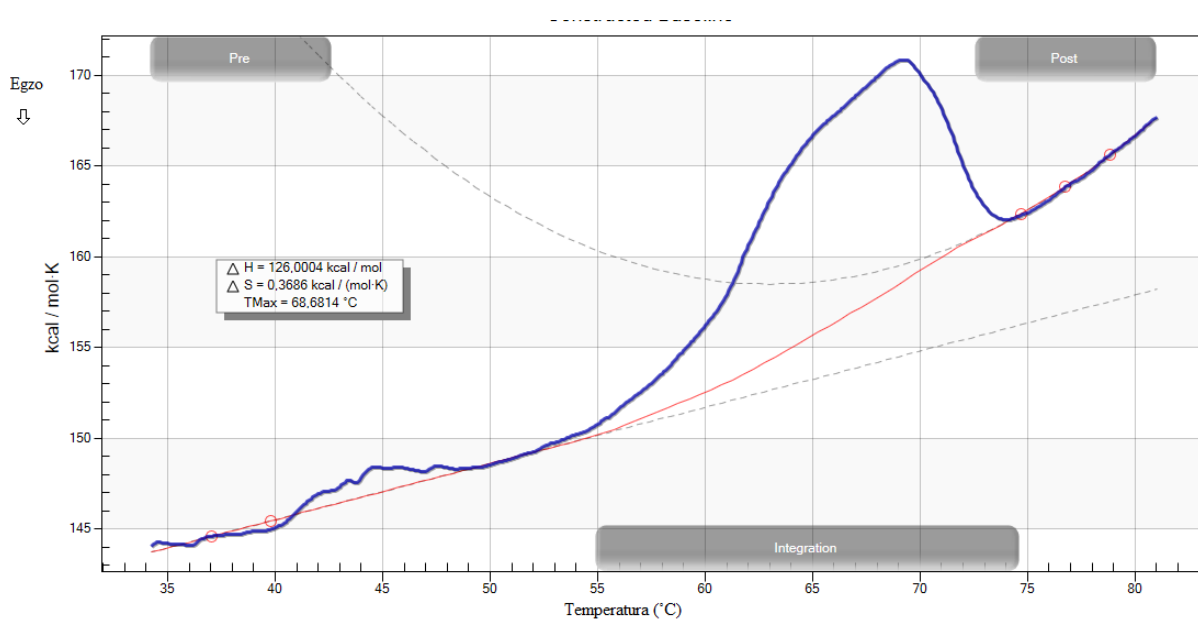
Pomoću jednadžbe pravca  $y = 1,0626x + 0,0254$ , dobivene preko baždarne krivulje, koncentracija proteina je izračunata prema formuli prikazanoj u poglavlju 3.2.14. Mjerenje je izvedeno po tri puta za svaki uzorak koji se nanosio na pločicu, te je konačna koncentracija proteina dobivena kao srednja vrijednost triju mjerenja. Za divlji tip iznosila je od 0,137 do 0,345  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ , za mutiranu varijantu R295A od 0,104 do 0,243  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ , dok je za mutiranu varijantu M367A konačna koncentracija iznosila 0,4  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  do 0,6  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ .

#### 4.1.7. Analiza termičke stabilnosti eksprimiranih rekombinantnih proteina (divljeg tipa i mutiranih varijanti)

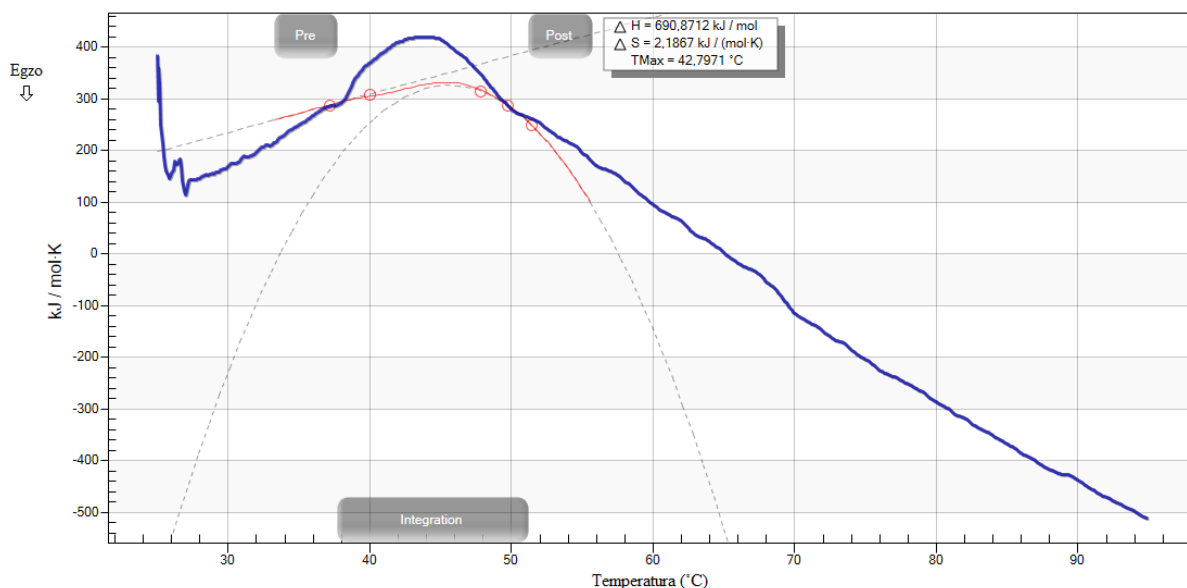
Termička stabilnosti proteina divljeg tipa i mutiranih varijanti ispitana je diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom (DSC). Programom *Nanoanalyze* vizualizirani su dobiveni termogrami uzorka divljeg tipa (slika 18), mutirane varijante R295A (slika 19) i mutirane varijante M367A (slika 20). Snimljen je i termogram kakodilatnog pufera, koncentracije 50  $\text{mmol dm}^{-3}$  koji je služio kao referentni uzorak. Iz dobivenih podataka za svaki uzorak izračunata je energija razmatanja ( $\Delta H$ ) te temperatura mekšanja ( $T_m$ ).



Slika 18. Odsječak termograma razmatanja proteina divljeg tipa (BrILL2). Plava linija odgovara termogramu proteina, crvena linija odgovara konačnoj baznoj liniji podešenoj na osnovu sigmoidalne krivulje koju predstavljaju iscrtkane sive linije. Iscrtkane sive linije označavaju baznu liniju prije i poslije mekšanja.



Slika 19. Odsječak termograma razmatanja mutirane varijante R295A dobivenog iz sigmoidne krivulje. Plava linija odgovara termogramu proteina, crvena linija odgovara konačnoj baznoj liniji podešenoj na osnovu sigmoidalne krivulje koju predstavljaju iscrtkane sive linije. Iscrtkane sive linije označavaju baznu liniju prije i poslije mekšanja.



Slika 20. Odsječak termograma razmatanja mutirane varijante M367A dobivenog iz sigmoidne krivulje. Plava linija odgovara termogramu proteina, crvena linija odgovara konačnoj baznoj liniji podešenoj na osnovu sigmoidalne krivulje koju predstavljaju iscrtkane sive linije. Iscrtkane sive linije označavaju baznu liniju prije i poslije mekšanja.

Iz termograma vidljivih na reprezentativnim slikama 18, 19, i 20 uočljivo je da se divlji tip i mutirane varijante razlikuju po stabilnosti, što se može iščitati iz vrijednosti temperature mekšanja ( $T_m$ ) koja predstavlja mjeru termostabilnosti enzima. Ovisno o konformaciji divljeg tipa i mutiranih varijanata, mijenja se raspon temperatura početka i završetka razmatanja. Nisu formirane razvučene krivulje, što znači da proces razmatanja ne traje dugo. Rezultati srednjih vrijednosti  $T_m$  dva do tri mjerenja prikazani su u tablici 23. Prema dobivenim rezultatima vidljivo je da je mutirana varijanta R295A termostabilnija u odnosu na divlji tip dok je mutirana varijanta M367A manje termostabilna.

Tablica 23.  $T_m$  vrijednosti za divlji tip BrILL2 i mutirane varijante R295A i M367A izračunate iz termograma diferencijalne pretražne kalorimetrije, te njihove srednje vrijednosti sa standardnim devijacijama.

	Izračunate $T_m$ vrijednosti / °C	Srednje vrijednosti $T_m$ / °C	standardna devijacija, $s$
Divlji tip BrILL2	54,963	54,871	0,129
	54,780		
Mutirana varijanta R295A	70,732	69,707	1,450
	68,681		
Mutirana varijanta M367A	45,247	44,491	1,470
	45,430		
	42,797		

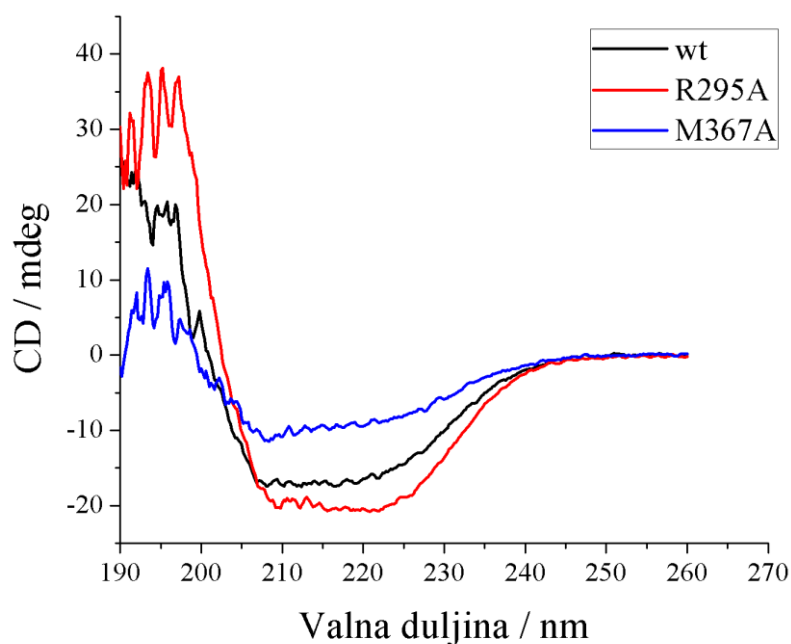
#### 4.1.8. Analiza očuvanosti sekundarne strukture divljeg tipa (BrILL2)

Za provjeru očuvanosti sekundarne strukture divljeg tipa BrILL2 i mutiranih varijanata R295A i M367A snimljeni su CD spektri spektroskopijom cirkularnog dikroizma (CD) (slika 21). Karakteristike ove metode kao i način snimanja opisano je pod poglavljem 3.2.16. Dobiveni rezultati analizirani su pomoću programa *Dichroweb* (tablica 24).

Tablica 24. Udio elemenata sekundarne strukture za divlji tip BrILL2, te mutirane varijante R295A i M367A

	$\alpha$ - uzvojnica	$\beta$ ploča	Okreti	Neuređeno	Ukupno
divlji tip	0,16	0,31	0,23	0,30	1
R295A	0,31	0,22	0,19	0,29	1,01
M367A	0,10	0,34	0,25	0,30	0,99





Slika 21. CD spektar otopina proteina divljeg tipa (crna krivulja), mutirane varijante R295A (crvena krivulja) i mutirane varijante M367A (plava krivulja)

Na slici 21 vidljivo je da struktura proteina BrILL2 nakon mutacije arginina i metionina u alanin nije u potpunosti očuvana. Mutacije ovih dviju aminokiselina mijenjaju sekundarnu strukturu proteina, a time i konformacije koje utječu na njegovu stabilnost. U slučaju mutirane varijante R295A došlo je do povećanja  $\alpha$  uzvojnice za 15 %, ali je došlo do smanjenja  $\beta$  niti za 9 % u odnosu na divlji tip. Nadalje, kod mutirane varijante M367A došlo je do smanjenja  $\alpha$  uzvojnice za 6 %, ali se povećala vrijednost  $\beta$  niti za 3 % u odnosu na divlji tip.

## 4.2. Rasprava

U ovom diplomskom radu predmet istraživanja bila je auksin-amidohidrolaza BrILL2 iz *B. rapa* koja hidrolizira amidnu vezu između aminokiseline i auksina u konjugatima te tako utječe na koncentraciju auksina u biljci. Kao supstrate preferira dugolančane auksine IPA-Ala i IBA-Ala, ali pokazuje i manju aktivnost prema IAA-Ala.<sup>3</sup> Najveću homologiju pokazuje prema ILR1 iz *A. thaliana* što potvrđuje filogram izrađen u programu Jalviewu. (slika 11). Iako ima najveću sličnost prema filogramu, jer su najbliže na stablu, sa ILR1, međusobno se

razlikuju u supstratnoj specifičnosti jer ILR1 preferira IAA-Phe i IAA-Leu kao supstrate.<sup>40</sup> Najmanju sličnost ima sa auksin-amidohidrolazom ILL5 iz *A. thaliana* jer je najveća udaljenost na stablu između njih. U svrhu usporedbe auksin-amidohidrolaze iz *B. rapa* sa sedam auksin-amidohidrolaza iz *A. thaliana*, srađnjene su aminokiselinske sekvence u programu Jalviewu. Sličnost primarnih sekvenci je od 40% do 85% (slika 10). Najveću sličnost BrILL2 ima sa AtILR1, a najmanju sa AtILL5.

Struktura BrILL2 je određena modeliranjem u programu *Phyre*.<sup>15</sup> Kao model prema kojem je modelirana ova struktura korištena je struktura auksin-amidohidrolaze iz *A. thaliana*.<sup>4</sup> Struktura se sastoji od dvije domene, veće katalitičke domene, koja sadrži ostatke 1-199 i 317-425, i manje, satelitne domene koja sadrži ostatke 199-317. Katalitička domena se sastoji od osam  $\beta$ -ploha okruženih sa sedam  $\alpha$ -uzvojnica, a satelitna domena se sastoji od troslojnog  $\alpha\beta\alpha$  motiva (slika 12). Dobivena struktura poklapa se sa već dobivenim modelima BrILL2.<sup>2,3,6</sup>

Prema MD simulacijama o kojima su izvijestili Šimunović i sur.<sup>6</sup> pretpostavljeno je da je aminokiselina R276 ključna za poticanje ili olakšavanje mehanizma zatvaranja te je otkriveno da mutacijom te aminokiseline enzim aminoacil-1 gubi svoju aktivnost.<sup>45</sup> R276 stvara interakciju sa ostacima petlje koja povezuje dvije uzvojnice, i to najčešće sa metioninom 348.<sup>6</sup> Kada se pravilno veže supstrat u ovakvu konstrukciju, enzim je zahvaljujući interakciji između R276 i M367 sklon promijeniti konformaciju do zatvorenog stanja. Pretpostavilo se da BrILL2 postoji u ravnoteži između otvorene i zatvorene konformacije<sup>46</sup>, te vezanjem supstrata u aktivno mjesto zatvorena konformacija postaje stabilnija.<sup>6</sup>

Cilj diplomskog rada bio je istražiti ulogu aminokiselina R295 i M367 na stabilnost enzima auksin-amidohidrolaze BrILL2 iz kineskog kupusa. U tu svrhu provedena je heterologna ekspresija rekombinantnih proteina divljeg tipa BrILL2 te mutiranih varijanti R295A i M367A u *E.coli*, soj BL21((DE3)RIL)<sup>+</sup>. Proteini su pročišćeni afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA koloni, te im je čistoća provjerena elektroforezom u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE). Elektroforetske slike pokazale su da se proteini uspješno ekspimiraju u *E.coli*, te su dobiveni u dostatnoj količini za daljnja mjerenja. Uz vrpce proteina od interesa, pojavile su se i vrpce neželjenih proteina koje predstavljaju ne toliko značajnu kontaminaciju koja bi smetala daljnjim analizama. Ponovljena afinitetna kromatografija na istim uzorcima proteina nije dala kao rezultat nestanak neželjenih vrpce

proteina u SDS-PAG elektroforezi što bi ukazivalo da i te skraćene verzije proteina imaju His privjesak na C-terminusu. Može se pretpostaviti da su neželjene proteinske vrpce rezultat proteolitičke razgradnje našeg proteina od interesa, a ne preuranjene terminacije translacije.

Kako bi se provjerilo mijenjaju li mutacije R295A i M367A, pripremljene mjesno-specifičnom mutagenezom, sekundarnu strukturu divljeg tipa BrILL2, provedena su mjerenja na JASCO J-815 spektropolarimetru. Dobiveni CD spektri (slika 22), i rezultati analizirani u programu *Dichroweb* (tablica 24) pokazali su da mutacija mijenja sekundarnu strukturu proteina BrILL2, a time i konformaciju koja je povezana sa stabilnošću.

Termostabilnost divljeg tipa BrILL2 enzima i mutiranih varijanata R295A i M367A je provjerena na uređaju *TA Instruments NANO DSC*. Temperatura mekšanja pokazatelj je stabilnosti proteina. Što je veća temperatura mekšanja, to je stabilniji protein.<sup>73</sup> Rezultati su pokazali da mutacija M367A uzrokuje smanjenje  $T_m$  za 10,380 °C s obzirom na divlji tip enzima. Nadalje mutacija R295A uzrokuje povećanje  $T_m$  za 14,836 °C u usporedbi s divljim tipom.

Rezultati sugeriraju da je mutirana varijanta R295A termostabilnija, dok je mutirana varijanta M367A manje termostabilna u odnosu na divlji tip enzima. Istraživanja uloge aminokiseline cisteina u BrILL2 enzimu pokazala su da C320S mutacija izaziva smanjenje  $T_m$  i posljedično uzrokuje manju termostabilnost enzima.<sup>2</sup> Razlog drugačije stabilnosti divljeg tipa u odnosu na mutirane varijante je u tome što divlji tip sadrži arginin i metionin koji međusobno stvaraju interakciju potrebnu da se ostvari zatvorena konformacija koja je odgovorna za optimalnu stabilnost i funkcioniranje enzima, a što je poremećeno uslijed istraženih mutacija.<sup>6,46</sup> Razlog što jedna mutacija povećava stabilnost, a druga smanjuje je vjerojatno u različitim kemijskim i fizičkim karakteristikama promjenjenih aminokiselina metionina i arginina u odnosu na alanin. U programu Pymol<sup>59</sup> vizualizirani su njihovi položaji (slika 13). Obje mutacije uzrokuju gubitak enzimske aktivnosti (neobjavljeni rezultati LKB-a) iako nisu dio aktivnog mjesta enzima i ne sudjeluju u ostvarivanju interakcija sa supstratom niti sa metalnim kofaktorom. Tako zaključujemo da su promjene termostabilnosti enzima uzrokovane mutacijama, bilo da se radi o smanjenoj ili povećanoj termostabilnosti, nepoželjne za funkcioniranje enzima.

## § 5. ZAKLJUČAK

- ✓ Uspješno su proizvedeni rekombinantni proteini BrILL2, te mutirane varijante R295A i M367A heterolognom ekspresijom gena od interesa u bakteriji *E.coli* korištenjem prethodno pripremljenih plazmidnih konstrukata
- ✓ Proteini su pročišćeni na Ni-NTA agaroznoj koloni metodom afinitetne kromatografije, a rezultati pročišćavanja kao i čistoća proteina provjereni su elektroforezom u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)
- ✓ Pomoću programa Phyre i Pymol predviđena je terciarna struktura auksin-amidohidrolaze BrILL2 iz *Brassica rapa* kao i položaj aminokiselina R295 i M367
- ✓ Izrađen je filogram auksin-amidohidrolaze BrILL2 iz *Brassica rapa* i auksin-amidohidrolaza iz *Arabidopsis thaliana* (AtILL1, AtILL2, AtILL3, AtILL4 i AtILL5, AtILR1). Najveću sličnost s obzirom na proteinske sekvence BrILL2 ima sa auksin-amidohidrolazom AtILR1, a najmanju sa AtILL5 iz *Arabidopsis*
- ✓ Srađene aminokiselinske sekvence auksin-amidohidrolaze BrILL2 iz *Brassica rapa* i auksin-amidohidrolaza iz *Arabidopsis thaliana* pokazale su međusobnu homologiju proteinskih sekvenci
- ✓ Metodom cirkularnog dikroizma dokazano je da mjesno-specifične mutacije R295A i M367A utječu na promjene sekundarne strukture enzima BrILL2
- ✓ Diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom ispitana je stabilnost divljeg tipa i mutiranih varijanata, koja je potvrdila rezultate CD analize da promjena sekundarne strukture mijenja stabilnost proteina. Rezultati sugeriraju da je mutirana varijanta R295A termostabilnija od divljeg tipa dok je M367A manje termostabilan.

## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

AAO - acetaldehid oksidaza

AMI1 - amidaza 1

APS - amonij-persulfat

BSA - albumin govedeg seruma, engl. bovine serum albumin

CD - cirkularni dikroizam

DSC - diferencijalna pretražna kalorimetrija, engl. differential scanning calorimetry

IAA - indol-3-octena kiselina

IAAId - indol-3-acetaldehid

IAM - indol-3-acetamid

IAN-indol-3-acetonitril

IAOx - indol-3-acetaldoksim

IBA - indol-3-maslačna kiselina

IPA - indol-3-piruvatna kiselina

IPTG - izopropil-tiogalaktopiranozid

LB - Luria Bertani

MD - molekularna dinamika

NAA - 1-naftalooctena kiselina

NIT - nitrilaza

PMSF - fenilmetilsulfonil fluorid

SDS - natrijev dodecilsulfat

TAA1 - triptofan aminotransferaza iz *Arabidopsis*

TAM - triptamin

TDC - triptofan dekarboksilaza

Tris - Trihidroksimetilaminometan

## § 7. LITERATURNI IZVORI

1. P. J. Davies u P. J. Davies (ur.) *Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development*, Springer, Nizozemska, 1987.
2. A. Smolko, F. Šupljika, J. Martinčić, Nina. Jajčanin- Jozić, M. Grabar- Branilović, S. Tomić, J. Ludwig-Müller, I. Piantanida, B. Salopek- Sondi, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18** (2016) 8890-8900.
3. B. Savić, S. Tomić, V. Magnus, K. Gruden, K. Barle, R. Grenković, J. Ludwig-Müller, B. Salopek-Sondi, *Plant Cell Physiol.* **50** (2009) 1587-1599.
4. E. Bitto, C. A. Bingam, L. Bittova, N. L. Houston, R. S. Boston, B. G. Fox, G. N. Phillips Jr., *Proteins* **74** (2009) 61-71.
5. B. Bartel, G. Fink, *Science* **268** (1995) 1745-1748.
6. M. Šimunović, B. Zagrović, S. Tomić, *J. Mol. Recognit.* **24** (2011) 854-861.
7. V. Vukadinovic, I. Jug, B. Đurđević, *Ekofiziologija bilja*, sveučilišni udžbenik, naklada NSS, Osijek, 2014, str. 132-139.
8. W. D. Teale, I. A. Paponov, K. Palme, *Nat. Rev. Mol. Cell. Bio.* **7** (2006) 847-859.
9. P. J. Davies, *The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions*, Springer, Dordrecht, 2010, str. 1.
10. J. Li, C. Li, S. M. Smith, *Hormone Metabolism and Singaling in Plants*, Elsevier, London, 2017, str 39.
11. A. W. Woodward, B. Bartel, *Ann. Bot-London.* **95** (2005) 707-735.
12. K. V. Thimann, *Hormone action in the whole life of plants.*, The University of Massachusetts Press, Amherst, 1977, str. 1.
13. J. Ludwig-Müller, *J. Exp. Bot.* **62** (2011) 1757-1773
14. M. R. Rosquete, E. Barbez, J. K. Vehn, *Mol. Plant.* **5** (2012) 772-786
15. L. Michalczuk, D. M. Ribnicky, T. J. Cooke, J. D. Cohen, *Plant Physiol.* **100** (1992) 1346–1353
16. J. Normanly, J. D. Cohen, G. R. Fink, *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* **90** (1993) 10355–10359
17. F. Rapparini, Y.Y. Tam, J.D. Cohen, J.P. Slovin, *Plant Physiol.* **128** (2002) 1410–1416
18. D. A. Korasick, T. A. Enders, L. C. Strader, *J. Exp. Bot.* **64** (2013) 2541-2555

19. B. Andersson, G. Sandber, *Journal of Chromatography* **238** (1982) 151–156
20. JM Sonner, WK Purves, *Plant Physiology* **77** (1985) 784–785.
21. A. Östin, T. Moritz, G. Sandberg, *Biological Mass Spectrometry* **21** (1992) 292–298.
22. M. Kowalczyk, G. Sandberg, *Plant Physiology* **127** (2001) 1845-1853.
23. A. Pencik, J. Rolcik, O. Novak, V. Magnus, P. Bartak, R. Buchtik, B. Salopek-Sondi, M. Strnad, *Talanta* **80** (2009) 651–655.
24. P. W. Zimmerman, F. Wilcoxon, *Contrib. Boyce Thompson Inst.* **7** (1935) 209–229.
25. K. Blommaert, *Nature.* **174** (1954) 970–972.
26. J. Ludwig-Müller, *Plant Growth Regul.* **32** (2000) 219–230.
27. S. Simon, M. Kubes, P. Baster, S. Robert, P.I. Dobrev, J. Friml, J. Petrasek, E. Zazimalova, *New Phytol.* **200** (2013) 1034–1048.
28. X. Liu, L. Barkawi, G. Gardner, J.D. Cohen, *Plant Physiol.* **158** (2012) 1988–2000.
29. O. Novák, E. Hényková, I. Sairanen, M. Kowalczyk, T. Pospíšil, K. Ljung, *Plant Journal* **72** (2012) 523–536.
30. L. C. Strader, B. Bartel, *Mol. Plant.* **4** (2011) 477-486.
31. Y. Gao, Y. Zhao u E. Zažimalova, J. Petrašek, E. Benkova (ur.), *Auxin and Its Role in Plant Development*, Springer, 2014, str. 1.
32. J. Normanly, *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **12** (2010) 1-17.
33. D. M. Reinecke, R. S. Bandurski, *Plant Physiol* **71** (1983) 211–213.
34. K. Kai, J. Horita, K. Wakasa, H. Miyagawa, *Phytochemistry* **68** (2007) 1651–1663.
35. A. Ostin, M. Kowalyczk, R. P. Bhalerao, G. Sandberg *Plant Physiol* **118** (1998) 285–296.
36. N. D. Rawlings, M. Waller, A. J. Barrett, A. Bateman, *Nucleic Acids Res.* **42** (2014) D503-D509.
37. A. Schuller, J. Ludwig-Müller, *New Phytol.* **171** (2006) 145-158.
38. G. Minasov, L. Shuvalova, J. S. Brunzelle, F. R. Collart, W. F. Anderson, 2005. Structure of Bacillus subtilis YXEP protein, a dinuclear metal binding peptidase from M20 family. Protein Data Bank (www. Rcsb.org/pdb/home) ID:1ysj, DOI: 10.2210/pdb2211ysj/pdb.
39. R. Davies, D. Goetz, J. Lasswell, M. Anderson, B. Bartel, *Plant Cell* **11** (1999) 365-476.
40. S. LeClere, R. Tellez, R.A. Rampey, S.P.T. Matsuda, B. Bartel., *J. Biol. Chem.* **277** (2002) 20446-20452.

41. B. Bartel, S. LeClere, M. Magidin, B. K. Zolman, *J. Plant Growth Regul.* **20** (2001) 198–216.
42. J. J. Campanella, A. F. Olajide, V. Magnus, J. Ludwig-Müller, *Plant Physiol.* **135** (2004) 2230-2240.
43. J. J. Campanella, S. Sigethy, J. Ludwig-Müller, *J. Plant Mol. Biol. Rep.* **29** (2011) 745-752.
44. R. A. Rampey, S. LeClere, M. Kowalczyk, K. Ljung, G. Sandberg, B. Bartel, *Plant Physiol.* **135** (2004) 978–988.
45. H. A. Lindner, A. Alary, L. I. Boju, T. Sulea, R. Menard, *Biochemistry* **44** (2005) 15645–15651.
46. C. J. Tsai, S. Kumar, B. Y. Ma, R. Nussinov, *Protein Sci.* **8** (1999) 1181–1190.
47. <https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/cloning/competent-cells-for-transformation/chemically-competent/dh10b-genotype.html> (13.5.2018)
48. <https://www.neb.com/faqs/2016/01/21/what-is-the-difference-between-bl21-and-bl21-de3-competent-e-coli-cells2>(13.5.2018)
49. <https://www.chem-agilent.com/pdf/strata/230240.pdf>(13.5.2018)
50. C. P. Carstens, J. Bonnardel, R. Allen, A. Waesche, *Stratagene* **14** (2001) 50-52.
51. Invitrogen™, *pTrcHis* and *pTrcHis2* TOPO<sup>R</sup> TA Expression Kits, **Version J** (2006) 1-44.
52. <https://www.biobasic.com/500-10000bp-dna-marker-ready-to-use-4331> (14.5.2018)
53. [https://www.carlroth.com/downloads/ba/en/T/BA\\_T851\\_EN.pdf](https://www.carlroth.com/downloads/ba/en/T/BA_T851_EN.pdf)(14.5.2018)
54. A. M. Waterhouse, J. B. Procter, D. M. A. Martin, M. Clamp, G. J. Barton, *Bioinformatics* **25** (2009) 1189-1191.
55. The UniProt Consortium, *Nucleic Acids Res.* **45** (2017) D158-D169.
56. R. C. Edgar, *Nucleic Acids Res.* **32** (2004) 1792-1797.
57. S. Henikoff, J. G. Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** (1992) 10915-10919.
58. L. A. Kelley, S. Mezulis, C. M. Yates, M. N. Wass, M. J. Sternberg, *Nat. Protoc.* **10** (2015) 845-858.
59. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.1.1 Schrödinger, LLC.
60. G. M. Cooper, R. E. Hausman, *Stanica- molekularni pristup*, 3. izdanje, Medicinska naklada, Zagreb, 2004, str. 16.
61. I. Chen, D. Dubnau, *Nat. Rev. Microbiol.* **2** (2004) 241-249.



62. Sigma-Aldrich, *GenElute™ Plasmid Miniprep Kit*, Catalog Numbers PLN10, PLN70, PLN350, 1-13.
63. H. C. Birnboim., J. Doly, *Nucleic Acids Res.* **7** (1979) 1513 -1522.
64. <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/nucleic-acid-gel-electrophoresis/dna-electrophoresis/agarose-gel-electrophoresis.html>(21. siječnja 2017.)
65. J. Sigmon, L. L. Larcom, *Electrophoresis.* **17** (1996) 1524–1527.
66. S. Primrose, R. Twyman, *Principles of Gene Manipulation and Genomics*, 7. izdanje, Blackwell Publishing, SAD, 2006, str. 25.
67. The QIA Expressionist: A handbook for high level expression and purification of 6xHis tagged proteins, 5. izdanje, QIAGEN (2003) 18-19.
68. I. Dodig, *Iščitavanje reverzne translacije sekvenciranjem peptida de novo tehnikama tandemne spektrometrije masa*, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2016, str. 9.
69. <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/dialysis-methods-protein-research.html> (22. siječnja 2017.)
70. Tube-O-DIALYZER™ No Loss Dialyzer for Small Samples, Manual, G-Biosciences, 2012
71. M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **72** (1976) 248-254.
72. P. Gill, T. T. Moghadam, B. Ranjbar, *J. Biomol. Tech.* **21** (2010) 167-193.
73. C. M. Johnson, *Arch. Biochem. Biophys.* **531** (2013) 100-109.
74. S. M. Kelly, T. J. Jess, N. C. Price, *Biochim. Biophys. Acta* **1751** (2005) 119-139.
75. P. V. Troshin, J. B. Procter, G. J. Barton, *Bioinformatics* **27** (2011) 2001-2002.

## § 8. ŽIVOTOPIS

Moje ime je Ivana Rubić. Rođena sam 09. ožujka 1994. godine u Vinkovcima gdje sam od 2000.-2008. godine pohađala osnovnu školu „A. G. Matoš“. Od 2008.-2012. pohađala sam srednju školu Gimnaziju „M. A. Reljkovića“ također u Vinkovcima. 2012. godine sam upisala preddiplomski studij kemije na Sveučilištu J. J. Strossmayera, na Odjelu za kemiju u Osijeku. Nakon završetka preddiplomskog studija 2015. odlučila sam se preseliti u Zagreb kako bi mogla pohađati istraživački smjer na diplomskog studiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta i to u području biokemije i analitičke kemije. Krajem 2017. godine volontirala sam na HPLC-uređaju u Laboratoriju za spektroskopiju NMR kod izv. prof. dr. sc. Predraga Novaka uz vodstvo asistentice Ive Habinovec, magistra kemije. Koautor sam postera pod nazivom: *IMPURITY PROFILING OF AZITHROMYCIN CONJUGATES BY LC-SPE/CRYO NMR METHODOLOGY* 2018. godine.