

# Priprema krnjih oblika izoleucil-tRNA-sintetaze 2 iz bakterije *Bacillus megaterium* i karakterizacija njihove funkcionalnosti

---

Škulac, Melody

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:217:338820>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-19**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijски odsjek

Melody Škulac

**PRIPREMA KRNJIH OBLIKA IZOLEUCIL-  
tRNA-SINTETAZE 2 IZ BAKTERIJE  
*BACILLUS MEGATERIUM* I  
KARAKTERIZACIJA NJIHOVE  
FUNKCIONALNOSTI**

**Diplomski rad**

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre kemije

Zagreb, 2022. godina.

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

## **Zahvale**

*Najiskrenije hvala mentorici prof. dr. sc. Iti Gruić Sovulj na pruženoj prilici za izradu ovog diplomskog rada pod Vašim mentorstvom, na razvoju zanimljive teme, Vašim savjetima i sugestijama. Hvala Vam na Vašoj predanosti i zanimljivim predavanjima kojima ste učvrstili moje zanimanje za biokemiju i područje enzimске katalize.*

*Neizmjerne hvala Igoru na uloženom trudu, vodstvu, prenesenom znanju, nesebičnoj pomoći i prijateljskoj atmosferi u kojoj je bio gušt raditi. Hvala ti na pomoći u izgradnji mojih znanstvenih i eksperimentalnih temelja.*

*Hvala svim članovima Zavoda za biokemiju na ugodnoj atmosferi i svojoj pruženoj pomoći.*

*Veliko hvala mojim roditeljima, bratu i sestrama na podršci i na mogućnosti da budem ovdje gdje jesam.*

*Neizmjerne hvala Bernardi i Marti na bezuvjetnom prijateljstvu, smijehu, podršci, razumijevanju i poticanju.*

*Hvala Anastaziji, Ivi, Katarini i Kristini na društvu i podršci tijekom studiranja.*

**SADRŽAJ**

<b>SAŽETAK.....</b>	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VIII</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Ribosomska biosinteza i smatanje proteina .....</b>	<b>4</b>
<b>2.2. Aminoacil-tRNA-sintetaze .....</b>	<b>9</b>
2.2.1. <i>Podjela aminoacil-tRNA-sintetaza .....</i>	9
2.2.2. <i>Mehanizam reakcije aminoaciliranja .....</i>	11
<b>2.3. Izoleucil-tRNA-sintetaza .....</b>	<b>13</b>
2.3.1. <i>Strukturne značajke.....</i>	13
2.3.2. <i>Reakcije izoleucil-tRNA-sintetaze i prepoznavanje supstrata .....</i>	17
2.3.3. <i>tRNA kao supstrat izoleucil-tRNA-sintetaza .....</i>	19
2.3.4. <i>Značajke izoleucil-tRNA-sintetaza iz bakterije Bacillus megaterium.....</i>	20
<b>2.4. Evolucija aminoacil-tRNA-sintetaza razreda I.....</b>	<b>21</b>
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1. Materijali.....</b>	<b>24</b>
3.1.1. <i>Standardne kemikalije.....</i>	24
3.1.2. <i>Aminokiseline i nukleotidi.....</i>	24
3.1.3. <i>Boje za elektroforetske metode .....</i>	25
3.1.4. <i>Markeri veličina DNA i proteina .....</i>	25
3.1.5. <i>Enzimi, proteini i nukleinske kiseline .....</i>	25
3.1.8. <i>Hranjive podloge i mediji za uzgoj bakterije E. coli .....</i>	25
3.1.9. <i>Sojevi bakterije E. coli.....</i>	26
3.1.10. <i>Plazmidi .....</i>	27
3.1.11. <i>Kromatografski materijali .....</i>	30
3.1.12. <i>Ostali materijali.....</i>	30
<b>3.2. Metode .....</b>	<b>31</b>
3.2.1. <i>Metode rada s bakterijama .....</i>	31
3.2.1.1. <i>Transformacija bakterijskih stanica elektroporacijom .....</i>	31
3.2.1.2. <i>Priprema elektrokompetetnih stanica bakterije E. coli .....</i>	31
3.2.1.3. <i>Priprema glicerolskih bakterijskih kultura.....</i>	32
3.2.1.4. <i>Praćenje rasta bakterijskih stanica .....</i>	32

3.2.1.5. <i>Test in vivo komplementacije</i> .....	33
3.2.2. <i>Metode rada s nukleinskim kiselinama</i> .....	34
3.2.2.1. <i>Izolacija plazmidne DNA</i> .....	34
3.2.2.2. <i>Agarozna gel-elektroforeza</i> .....	34
3.2.2.3. <i>Određivanje koncentracije nukleinskih kiselina</i> .....	35
3.2.2.4. <i>Lančana reakcija polimeraze</i> .....	35
3.2.2.5. <i>Lančana reakcija polimerazom na bakterijskim kolonijama</i> .....	37
3.2.2.6. <i>Pročišćavanje produkta lančane reakcije polimeraze</i> .....	38
3.2.2.7. <i>Razgradnja restrikcijskim endonukleazama i ligacija</i> .....	38
3.2.2.8. <i>Obilježavanje tRNA radioaktivnim izotopom [<sup>32</sup>P]</i> .....	40
3.2.3. <i>Metode rada s proteinima</i> .....	42
3.2.3.1. <i>Prekomjerna ekspresija rekombinantnih proteina</i> .....	42
3.2.3.2. <i>Priprema proteinskih ekstrakata</i> .....	44
3.2.3.3. <i>Afinitetna kromatografija na Ni-NTA agarozu</i> .....	45
3.2.3.4. <i>Afinitetna kromatografija na dekstrin agarozu</i> .....	46
3.2.3.5. <i>Pročišćavanje aminoacil-tRNA-sintetaza od supročišćenog aminoacil-adenilata</i> .....	48
3.2.3.6. <i>Gel-filtracijska kromatografija</i> .....	49
3.2.3.7. <i>Izmjena otopine gel-filtracijom</i> .....	50
3.2.3.8. <i>Denaturirajuća poliakrilamidna gel-elektroforeza uz dodatak natrijeva dodecil-sulfata</i> .....	50
3.2.3.9. <i>Ugušćivanje proteina ultrafiltracijom</i> .....	52
3.2.3.10. <i>Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije proteina</i> .....	52
3.2.4. <i>Kinetičke metode</i> .....	52
3.2.4.1. <i>Aktivacija aminokiselina praćena metodom izmjene pirofosfata</i> .....	52
3.2.4.2. <i>Aminoaciliranje uz [<sup>14</sup>C]-aminokiseline</i> .....	54
3.2.4.3. <i>Aminoaciliranje uz [<sup>32</sup>P]-tRNA</i> .....	55
<b>§ 4. REZULTATI</b> .....	<b>57</b>
<b>4.1. Konstrukcija rekombinantnih plazmida za ekspresiju krnjih oblika IleRS2 iz bakterije <i>B. megaterium</i></b> .....	<b>57</b>
4.1.1. <i>Rekombinantni plazmidi za ekspresiju krnjih oblika IleRS2</i> .....	57
4.1.2. <i>Rekombinantni plazmidi za ekspresiju krnjih oblika IleRS2 fuzioniranih s GST</i> .....	60
4.1.3. <i>Rekombinantni plazmidi za ekspresiju krnjih oblika IleRS2 fuzioniranih s MBP</i> .....	61
<b>4.2. Proizvodnja i pročišćavanje krnjih oblika IleRS2 iz bakterije <i>B. megaterium</i></b> .....	<b>65</b>
4.2.1. <i>Optimizacija prekomjerne ekspresije proteina</i> .....	65
4.2.2. <i>Pročišćavanje proteina</i> .....	71
4.2.3. <i>Optimizacija prekomjerne ekspresije fuzioniranih proteina i proteina koeksprimiranih sa šaperonima</i> .....	72
4.2.4. <i>Pročišćavanje fuzioniranih proteina i proteina koeksprimiranih sa šaperonima</i> .....	79
<b>4.3. Aktivacija aminokiselina</b> .....	<b>99</b>

---

4.4. Ukupna reakcija aminoaciliranja .....	102
4.5. <i>In vivo</i> komplementacija .....	105
<b>§ 5. RASPRAVA .....</b>	<b>110</b>
5.1. Konstrukcija rekombinantnih plazmida za ekspresiju krnjih oblika IleRS iz bakterije <i>B. megaterium</i> .....	110
5.2. Proizvodnja i pročišćavanje krnjih oblika IleRS2 iz bakterije <i>B. megaterium</i> .....	110
5.3. Aktivnost krnjih oblika IleRS2 iz bakterije <i>B. megaterium</i> .....	114
<b>§ 6. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>117</b>
<b>§ 7. POPIS OZNAKA KRATICA I SIMBOLA .....</b>	<b>118</b>
<b>§ 8. LITERATURNI IZVORI .....</b>	<b>121</b>
<b>§ 9. DODATAK .....</b>	<b>XV</b>
<b>§ 10. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>XXIV</b>



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

Diplomski rad

## SAŽETAK

### PRIPREMA KRNJIH OBLIKA IZOLEUCIL-tRNA-SINTETAZE 2 IZ BAKTERIJE *BACILLUS MEGATERIUM* I KARAKTERIZACIJA NJIHOVE FUNKCIONALNOSTI

Melody Škulac

Izoleucil-tRNA-sintetaza (IleRS) je enzim koji katalizira nastajanje izoleucil-tRNA<sup>Ile</sup> u dva koraka; izoleucin se prvo aktivira uz pomoć ATP-a pa prenosi na tRNA<sup>Ile</sup>. Enzim posjeduje modularnu građu s katalitičkom domenom koja je evolucijski najstarija. Izolacija samostojeće katalitičke domene zato predstavlja prvi korak u pripremi ancestralnih oblika. IleRS spada u skupinu drevnih i za život presudnih enzima što čini njegovu ancestralnu rekonstrukciju važnom za razumijevanje evolucije biosinteze proteina, ključnog staničnog procesa. U sklopu ovog diplomskog rada proizvedena su i kinetički okarakterizirana dva funkcionalno-minimalna (krnja) oblika IleRS2 iz bakterije *Bacillus megaterium* nastala uklanjanjem C-terminalne, korektivne i CP2 domene iz cjelovitog oblika. Topljivost krnjih oblika IleRS bila je niska što predstavlja veliki izazov za daljnja istraživanja. Kinetička karakterizacija pokazala je da oba krnja oblika posjeduju aminoacilacijsku aktivnost koja je 3-4 reda veličine manja nego kod cjelovite IleRS. Dobiveni rezultati ukazuju da su konstruirani krnji oblici IleRS2 dobri modeli za daljnje istraživanje ancestralnih oblika IleRS.

(131 stranica + XXIV, 52 slike, 32 tablice, 129 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: aminoaciliranje, *Bacillus megaterium*, evolucija, izoleucil-tRNA-sintetaza, krnji proteini, pročišćavanje proteina, šaperoni

Mentor: prof. dr. sc. Ita Gruić Sovulj  
Neposredni voditelj: dr. sc. Igor Živković  
Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Ita Gruić Sovulj
  2. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
  3. izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković
- Zamjena: doc. dr. sc. Marko Močibob

Datum diplomskog ispita: 14. prosinca 2022.





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

Diploma Thesis

## ABSTRACT

### PREPARATION AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF TRUNCATED FORMS OF ISOLEUCYL-tRNA SYNTHETASE 2 FROM *BACILLUS MEGATERIUM*

Melody Škulac

Isoleucyl-tRNA synthetase (IleRS) catalyzes the formation of isoleucyl-tRNA<sup>Ile</sup> in two steps; ATP-dependent isoleucine activation is followed by isoleucine transfer to the tRNA<sup>Ile</sup>. The enzyme is modular with the catalytic domain being the most ancient. Hence, the isolation of a freestanding catalytic domain represents the first step in the design of IleRS ancestral forms. IleRS belongs to a group of ancient and life-essential enzymes whose ancestral reconstruction is relevant for understanding the evolution of protein biosynthesis, a key cellular process. Within this thesis, we prepared and kinetically characterized two functionally minimal (truncated) forms of IleRS2 from the bacteria *Bacillus megaterium* designed by omitting the C-terminal, editing, and CP2 domains. The solubility of these forms was low, representing a challenge for further research. Kinetic characterization showed that both forms are active with 3-4 orders of magnitude lower aminoacylation rates compared to full-length IleRS. Our results suggest these truncated forms are suitable models for further research of IleRS ancestral forms.

(131 pages + XXIV, 52 figures, 32 tables, 129 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: aminoacylation, *Bacillus megaterium*, evolution, isoleucyl-tRNA synthetase, truncated proteins, protein purification, chaperons

Mentor: Dr. Ita Gruić Sovulj, Professor

Assistant mentor: Dr. Igor Živković

Reviewers:

1. Dr. Ita Gruić Sovulj, Professor
  2. Dr. Iva Juranović Cindrić, Professor
  3. Dr. Vesna Petrović Peroković, Professor
- Substitute: Dr. Marko Močibob, Assistant Professor

Date of exam: December, 14th, 2022

## § 1. UVOD

Prevođenje genetičke informacije u aminokiselinski slijed proteina predstavlja centralnu dogmu molekularne biologije.<sup>1</sup> Genetičke informacije zapisane u nukleotidnom slijedu DNA prepisuju se u molekulu glasničke RNA (engl. *messenger RNA*, mRNA) koja se zatim u procesu translacije prevodi u odgovarajući slijed aminokiselina, odnosno proteine. Translacija mRNA u stanici se odvija na ribosomu do kojeg se aminokiseline dopremaju u obliku aminoacil-tRNA<sup>aa</sup> (aa-tRNA<sup>aa</sup>). Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) kataliziraju reakciju aminoaciliranja molekule tRNA (engl. *transfer RNA*) koja se odvija u dva koraka: aktivacija aminokiseline i prijenos aminokiseline na tRNA<sup>aa</sup>.<sup>2</sup> Aktivacija aminokiseline podrazumijeva nukleofilni napad  $\alpha$ -karboksilnog kisika aminokiseline na  $\alpha$ -atom fosfora ATP-a koji rezultira nastajanjem aminoacil-adenilata (aa-AMP). U drugom koraku 2' ili 3'OH skupina terminalnog adenzina tRNA vrši nukleofilni napad na  $\alpha$ -karbonilni atom ugljika aa-AMP-a te nastaje aa-tRNA<sup>aa</sup>.<sup>3</sup> Vjernost biosinteze proteina oslanja se na ispravno prepoznavanje kodona u mRNA i antikodona pripadne aa-tRNA<sup>aa</sup> te na točnost sinteze aa-tRNA<sup>aa</sup> što čini aaRS ključnim enzimima u osiguravanju točnosti translacije mRNA.<sup>4</sup> Neke aaRS prepoznaju i nepripadne aminokiseline te misaminociliraju tRNA. One aaRS koje griješe iznad tolerabilne razine razvile su mehanizme popravka pogreške budući da ugradnja pogrešnih aminokiselina u proteine može biti toksična za stanicu.<sup>5</sup> AaRS dijele se na razred I i razred II prema mehanističkim, strukturnim i evolucijskim razlikama.<sup>6</sup>

Izoleucil-tRNA-sintetaza (IleRS) pripada razredu I aaRS i katalizira reakciju nastajanja kovalentne veze između izoleucina (Ile) i tRNA<sup>Ile</sup> u dva koraka. IleRS ponekad prilikom inicijalnog prepoznavanja može pogrešno prepoznati i nepripadne aminokiseline valin (Val) i norvalin (Nva) zbog njihove strukturne sličnosti izoleucinu. U tom slučaju može ih aktivirati i prenijeti na tRNA<sup>Ile</sup>. Zbog mogućnosti pogrešnog aminoaciliranja, IleRS je razvila mehanizme popravka pogreške koji se odvijaju prije ili poslije prijenosa aminokiseline na tRNA<sup>Ile</sup>. Kod IleRS prevladava popravak nakon prijenosa.<sup>7-9</sup> Popravak nakon prijenosa podrazumijeva hidrolizu misaminoacilirane tRNA<sup>Ile</sup> u zasebnoj korektivnoj domeni. Struktura IleRS se u svim organizmima sastoji od katalitičke domene iz superporodice HUP (engl. *HIGH-signature proteins*, *UspA*, and *PP-ATPases*), CP1 (engl. *connective peptide 1*), korektivne (engl. *editing*), CP2 (engl. *connective peptide 2*), tRNA-vezujuće, C-terminalne i N-terminalne domene.<sup>10-12</sup>

HUP domena karakteristična je za sve aaRS razreda I i pripada drevnoj superporodici koja izgrađuje katalitičke srži enzima (uglavnom ligaza) koji aktiviraju različite supstrate pomoću NTP-a formirajući adenilate kao aktivirane međuprodukte.<sup>13,14</sup>

Aminoacil-tRNA-sintetaze se zbog svoje esencijalne uloge u biosintezi proteina ubrajaju u biomakromolekule koje su evoluirale u današnji oblik vrlo rano u evolucijskoj povijesti života i to prije formiranja posljednjeg univerzalnog zajedničkog pretka (engl. *Last Universal Common Ancestor*, LUCA).<sup>15,16</sup> Istraživanje evolucije aaRS doprinosi razumijevanju drevne translacije, evolucije ribosoma i tRNA kao ključnih sudionika biosinteze proteina te razumijevanju uspostavljanja genetičkog koda. Dva razreda aaRS evoluirala su iz katalitičkih domena različitog evolucijskog porijekla, nemaju značajne sličnosti u strukturi i aminokiselinskim sljedovima što ukazuje na evolucijsku konvergenciju prema istoj biološkoj funkciji.<sup>6,17</sup> Model evolucije aaRS sugerira da su se razvile iz početnog oblika koji je obuhvaćao samo današnju katalitičku domenu aaRS, a provedena istraživanja koja su se fokusirala na rekonstrukciju evolucijske povijesti katalitičke domene još nisu razjasnila funkcionalna svojstva ancestralnih oblika.<sup>17-20</sup> Prema filogenetskim istraživanjima IleRS, kao i ostale aaRS razreda I, uklapa se u filogenetsko stablo HUP superporodice, a najbliži srodnik IleRS je valil-tRNA-sintetaza (ValRS) s kojom dijeli najbližeg posljednjeg pretka.<sup>15</sup> S obzirom na važnost aaRS bitno je razumjeti mehanizme njihovog djelovanja i razvoj specifičnosti prema supstratima. Proučavanje evolucije i rekonstrukcija predaka doprinosi razumijevanju razvoja specijaliziranih funkcija enzima i njihove strukture. Rekonstrukcija evolucijskog pretka proteina od interesa polazi od analiza višestrukog poravnavanja sekvenci (engl. *multiple sequence alignment*, MSA) i analiza poravnavanja na temelju strukture (engl. *structure-based alignment*) pomoću kojih se može generirati odgovarajuće filogenetsko stablo.<sup>21,22</sup> Filogenetsko stablo se izgrađuje iz nukleotidnih ili aminokiselinskih sljedova koji su evolucijski povezani s proteinom od interesa. Također, na temelju usporedbe poravnavanja struktura, poravnavanja aminokiselinskih sljedova i filogenetskih informacija moguće je pretpostaviti najočuvanije dijelove u strukturi proteina koji bi u najvećoj mjeri trebali biti zadržani u strukturama predaka. Na ovaj način moguće je prije detaljne ancestralne rekonstrukcije generirati krnje funkcionalne oblike enzima (kojima su uklonjene neke domene) koji bi mogli predstavljati polazne modele za daljnju evolucijsku analizu. Karakterizacija funkcionalnosti krnjeg oblika enzima daje uvid u funkciju i značaj uklonjenih domena te u katalitičku efikasnost enzima u odsutnosti tih domena.

Cilj ovog rada je istražiti funkcionalnost krnjih oblika IleRS, odnosno mogućnost njihove ekspresije, pročišćavanja i karakterizacije enzimske aktivnosti. Kao modelni enzim koristit će se izoleucil-tRNA-sintetaza tipa 2 (IleRS2, eukariotski tip) iz bakterije *Bacillus megaterium*. IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* pogodna je i za *in vivo* testiranje komplementacije jer ima rezistenciju na antibiotik mupirocin<sup>23,24</sup>, a dostupna je i riješena kristalna struktura (neobjavljeni rezultati grupe Gruić Sovulj). Bit će istražena dva konstrukta IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* koji bi predstavljali krnji oblik za koji pretpostavljamo da bi trebao biti katalitički aktivan. Konstrukti će biti konstruirani tako da će im biti uklonjene: 1) C-terminalna i korektivna domena, 2) C-terminalna, korektivna i CP2 domena. Proteini će biti eksprimirani uz standardne metode pomoću ekspresijskog sustava pET za prekomjernu ekspresiju proteina. Zbog nestabilnosti krnjih proteina uzrokovane narušavanjem interakcija s uklonjenim domenama, provest će se optimizacija uzgoja bakterijskih stanica i ekspresije variranjem uvjeta. Također, bit će priređeni fuzijski proteini s MBP (engl. *maltose-binding protein*) i GST (engl. *glutathione S-transferase*) privjescima te će ekspresija krnjih proteina ići uz koekspresiju šaperona.<sup>25</sup> Fuzijski proteini će biti konstruirani kloniranjem gena za krnje proteine u odgovarajuće plazmide s genima za fuzijske privjeske MBP i GST. Eksprimirani proteini bit će pročišćeni afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA i dekstrin agarozu te gel-filtracijskom kromatografijom. Kvalitativna analiza eksprimiranih i pročišćenih proteina obuhvaćat će denaturirajuću poliakrilamidnu gel-elektroforezu i gel-filtraciju dok će za kvantitativnu analizu biti korištena spektrofotometrija. Kinetička metoda izmjene pirofosfata uz radioaktivno obilježeni [<sup>32</sup>P]-pirofosfat bit će korištena za određivanje kinetičkih parametara u reakciji aktivacije aminokiselina konstruiranim varijantama IleRS. Ukupna reakcija aminoaciliranja bit će praćena uz radioaktivno obilježenu [<sup>14</sup>C]-aminokiselinu ili radioaktivno obilježenu [<sup>32</sup>P]-tRNA te će se odrediti opaženi koeficijent brzine reakcije  $k_{obs}$  za ukupnu reakciju aminoaciliranja. Rezultati ovog rada dat će uvid u mogućnosti ekspresije i pročišćavanja krnjih proteina, njihovu stabilnost i načine optimizacije postupaka proizvodnje krnjih proteina. Također, pokazat će utjecaj uklanjanja domena na aktivnost i funkciju krnjih oblika IleRS.

## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Ribosomska biosinteza i smatanje proteina

DNA je centralna molekula živog svijeta koja nosi nasljedne informacije zapisane u obliku nukleotidnog slijeda. Proces prijenosa genetičke informacije zapisane u DNA i njezino prevođenje u aminokiselinski slijed razlaže se na tri osnovna procesa: replikaciju, transkripciju i translaciju. Proces replikacije osigurava dupliciranje genetičkog zapisa kako bi nakon dijeljenja stanice svaka novonastala stanica imala jednu kopiju, a samu reakciju katalizira enzim DNA-polimeraza. Transkripcija je proces prepisivanja nukleotidnog slijeda lanca kalupa DNA u nukleotidni slijed glasničke RNA (engl. *messenger RNA*, mRNA) koji katalizira DNA-ovisna RNA-polimeraza. Sinteza mRNA odvija se u 5' → 3' smjeru, a RNA polimeraza „čita“ nukleotidni slijed DNA u smjeru 3' → 5'. Translacija podrazumijeva prevođenje kodona nukleotidnog slijeda mRNA u odgovarajući slijed aminokiselina (slika 2.1.). Kodoni su tripletne kombinacije nukleotida C, G, U i A sadržane u lancu mRNA koje kodiraju za neku od 20 proteinogenih aminokiselina. Broj mogućih kombinacija tripletnih kodona je  $4^3$ , odnosno 64, pri čemu tri kodona ne kodiraju za aminokiseline, nego predstavljaju terminacijske stop kodone UUA, UAG i UGA koji označavaju završetak sinteze polipeptida. Također, postoji i kodon koji označava početak translacije, a to je inicijacijski start kodon AUG koji istovremeno kodira za aminokiselinu metionin (Met), no postoje i alternativni početni kodoni koji se mogu pronaći kod prokariota i rjeđe kod eukariota.<sup>26,27</sup> U procesu translacije izravno sudjeluju ribosomi, mRNA, aa-tRNA<sup>aa</sup>, inicijacijski (IF), elongacijski (EF) i terminacijski faktori (faktori otpuštanja, RF). Kovalentno povezivanje aminokiselina s tRNA sintetiziraju aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) što je važno jer se aminokiseline samo u tom obliku mogu koristiti kao supstrati za biosintezu proteina. Ribosomska biosinteza proteina dijeli se u tri faze, a to su inicijacija, elongacija i terminacija.<sup>28</sup> U nastavku biti će opisane faze translacije na primjeru bakterije *Escherichia coli* kao predstavnika prokariota.

Inicijacija podrazumijeva sastavljanje inicijacijskog kompleksa od velike 50S i male 30S podjedinice ribosoma, mRNA, inicijacijske fMet-tRNA<sup>fMet</sup> (formilmetionil-tRNA<sup>fMet</sup>) uz pomoć IF1, IF2, IF3 i uz utrošak energije u obliku hidrolize GTP-a.<sup>29,30</sup> U oznakama podjedinica ribosoma S označava Svedberg - mjernu jedinicu brzine sedimentacije ( $1\text{ S} = 10^{-13}$

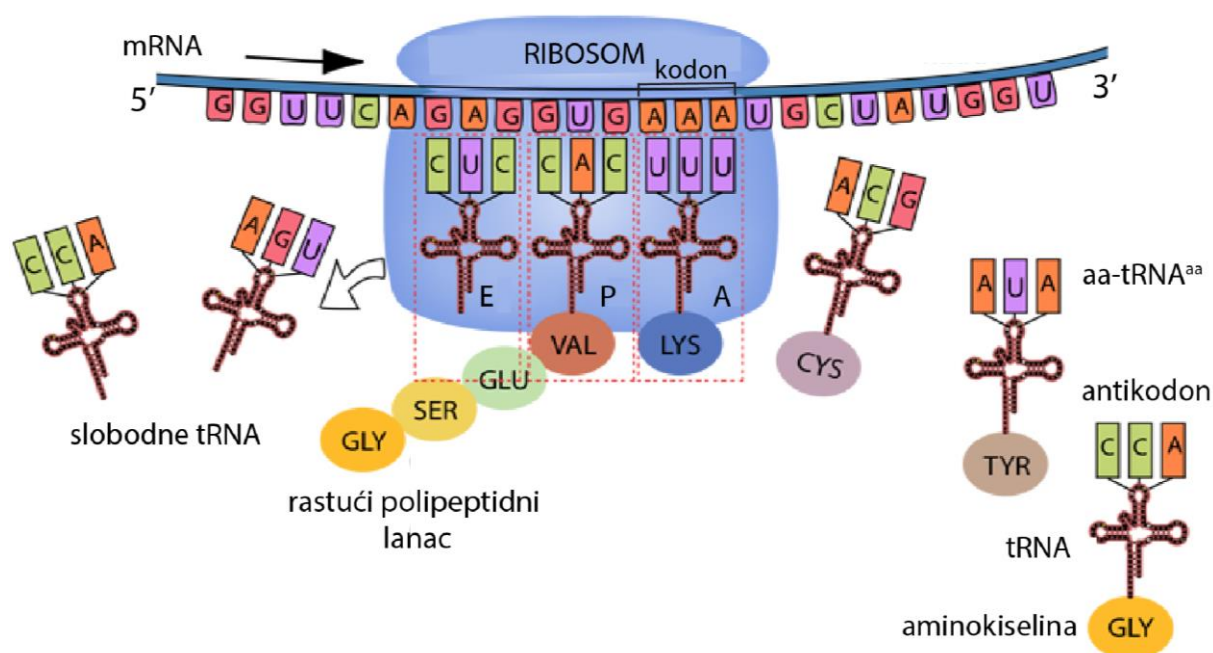
s). Ribosomi su ribonukleoproteinski kompleksi koji imaju peptidil-transferaznu aktivnost i kataliziraju nastajanje peptidne veze. Ribosomi su zapravo ribozimi jer je za njihovu katalitičku aktivnost odgovorna molekula ribosomske RNA (rRNA).<sup>31</sup> Velika podjedinica ribosoma iz bakterije *E. coli* sadrži dvije molekule rRNA (5S i 23S) i 36 proteina, a mala jednu molekulu rRNA (16S) i 21 protein.<sup>32,33</sup> Ribosom sadrži tri vezna mjesta za tRNA: A (engl. *aminoacyl*), P (engl. *peptidyl*) i E (engl. *exit*). Pravilno pozicioniranje ribosoma i mRNA ostvaruje se prepoznavanjem očuvanog Shine-Dalgarno (SD) slijeda u mRNA. SD slijed nalazi se oko osam nukleotida uzvodno od start kodona i interagira s komplementarnim bazama na 3' kraju 16S rRNA male podjedinice ribosoma.<sup>34,35</sup> Na ovaj način ribosom interakcijom sa SD slijedom pozicionira AUG u svoje P-mjesto. Kod prokariota se u prvom koraku na poziciju početne aminokiseline ugrađuje formilirani metionin (N-formilmetionin, fMet) pa se tako razlikuju unutarnji Met od inicijacijskih.<sup>36,37</sup> Inicijacija završava disocijacijom inicijacijskih faktora.

Elongacija je korak u kojemu dolazi do sinteze peptidne veze. Aminokiselina kodirana sljedećim kodonom doprema se kao aa-tRNA<sup>aa</sup> u mjesto A uz pomoć elongacijskog faktora EF-Tu.<sup>36</sup> Ukoliko dođe do komplementarnog prepoznavanja antikodona i kodona, dolazi do disocijacije EF-Tu uz hidrolizu GTP-a. Aminokiselina s 3' kraja aa-tRNA<sup>aa</sup> vezane u mjestu A,  $\alpha$ -amino dušikovim atomom vrši nukleofilni napad na karbonilni ugljik esterske veze između aminokiseline i tRNA u prethodno vezanoj aa-tRNA<sup>aa</sup> (u prvom krugu je to fMet-tRNA<sup>fMet</sup>) pri čemu puca esterska veza i nastaje peptidna veza.<sup>38</sup> Nastali dipeptid (polipeptid u daljnjim ciklusima elongacije) ostaje vezan na posljednje dopremljenoj tRNA u A mjestu koja se zatim translocira u mjesto P, a slobodna tRNA iz mjesta P u mjesto E. U sljedećim krugovima elongacije događa se i disocijacija slobodne tRNA iz mjesta E.

Translacija se obustavlja prepoznavanjem stop kodona u slijedu mRNA uz pomoć terminacijskih faktora RF1, RF2, RF3 koji doprinose hidrolizi peptidil-tRNA esterske veze, otpuštanju polipeptida i posljednje tRNA iz mjesta P te disocijaciji dvije podjedinice ribosoma.<sup>39</sup>

Proces translacije je ključan za život svih organizama. Pogrešno ugrađene aminokiseline u polipeptidnom lancu mogu biti toksične za stanicu zbog čega je točnost sinteze proteina izrazito bitna. Ključni događaji o kojima ovisi vjernost translacije su točna sinteza aa-tRNA<sup>aa</sup> i komplementarno prepoznavanje kodon:antikodon između mRNA:aa-tRNA<sup>aa</sup> na ribosomu.<sup>40</sup> S obzirom na prethodno navedeno, nameće se zaključak da je specifičnost i točnost aaRS važna za dobivanje funkcionalnih proteina ispravnog aminokiselinskog slijeda. Jednom kada aa-

tRNA<sup>aa</sup> stigne do ribosoma i ukoliko dođe do ispravnog prepoznavanja antikodon:kodon, aminokiselina vezana na tRNA može se ugraditi u polipeptidni lanac neovisno o tome je li ona pripadna ili nepripadna s obzirom na prepoznati kodon. Važno je napomenuti da postoje i mehanizmi kojima ribosom prepoznaje krivo ugrađenu aminokiselinu i zaustavlja translaciju, ali ne može „popraviti“ pogrešku.<sup>41</sup> Također, prilikom dopremanja aa-tRNA<sup>aa</sup> do ribosoma, EF-Tu pokazuje smanjeni afinitet prema nekim pogrešno sparenim aa-tRNA<sup>aa</sup> te se time dodatno povećava točnost biosinteze proteina.<sup>42,43</sup>

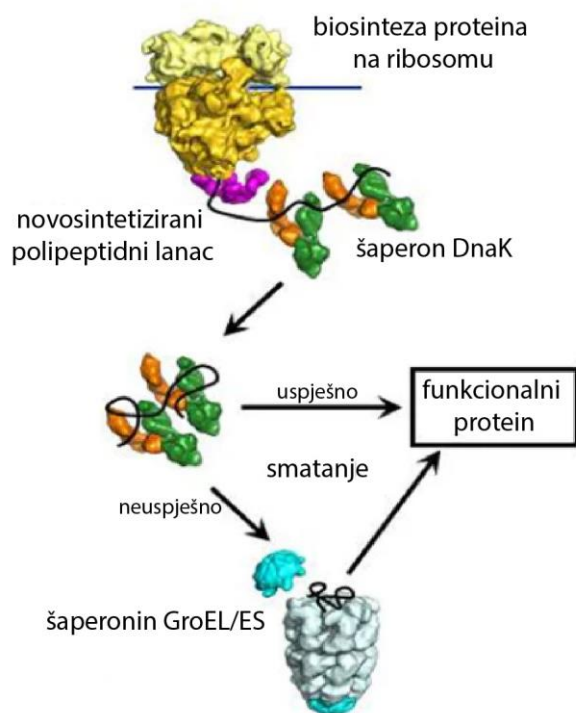


**Slika 2.1. Shematski prikaz ribosomske biosinteze proteina (translacije). Preuzeto i prilagođeno iz <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/Organic/translation.html> (datum pristupa 12.7.2022.).<sup>44</sup>**

Sinteza polipeptidnog lanca nije dovoljna za dobivanje funkcionalnog proteina, oni se moraju i pravilno smotati kako bi poprimili optimalnu nativnu strukturu. Smatanje proteina u stanici odvija se postupno na način da se prvo interakcijama bliskih aminokiselina u primarnom slijedu formiraju lokalne sekundarne strukture, a zatim interakcijama između udaljenijih elemenata sekundarnih struktura dolazi do oblikovanja stabilnih tercijskih struktura. Elektrostatske, van der Waalsove interakcije i vodikove veze doprinose procesu oblikovanju nativne strukture proteina. Tijekom smatanja, hidrofobne interakcije drže hidrofobne bočne ogranke zajedno i entropijski stabiliziraju međuprodukte smatanja dok se nativna struktura ne finalizira.<sup>36</sup> Iako se veliki broj proteina u normalnim uvjetima smata spontano, mnogi proteini se smataju uz pomoć

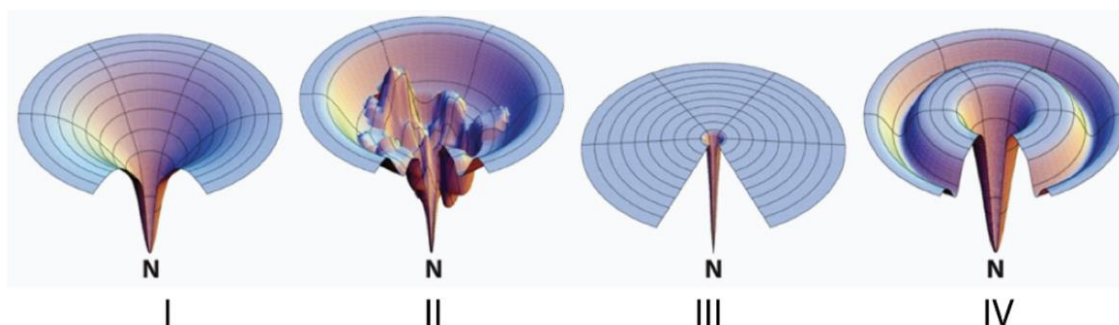
šaperona, a posebice u uvjetima stresa (najčešće toplinskog). Šaperoni su proteini koji ostvaruju interakcije s djelomično smotanim ili nepravilno smotanim proteinima i potpomažu pravilno smatanje. Dvije najveće porodice šaperona su Hsp70 (engl. *heat shock protein 70*, 70 označava molekulsku masu u kDa) i šaperonini.<sup>45</sup> Porodica proteina Hsp70 kod prokariota se naziva DnaK, dok se kod eukariota rabi naziv Hsp70.<sup>46</sup> Šaperoni iz porodice Hsp70 vežu hidrofobne dijelove novonastalih, nesmotanih polipeptida i time sprječavaju njihovu denaturaciju, agregiranje, mogu razbiti već nastale proteinske agregate ili proslijediti proteine do šaperonina (slika 2.2.).<sup>28,36,47</sup> Šaperonini su veliki proteinski kompleksi koji također pomažu smatanje proteina u normalnim uvjetima (10%-15% staničnih proteina u bakteriji *E. coli* se ne smata spontano i treba pomoć šaperonina) i u uvjetima stresa (do 30% staničnih proteina u bakteriji *E. coli*).<sup>36</sup> Djeluju kada se novosintetizirani proteini ne uspiju smotati u nativnu konformaciju, niti nakon interakcije s Hsp70 (slika 2.2.).<sup>45,47</sup> Sustav šaperonina u eukariotima naziva se Hsp60/Hsp10, a u prokariotima GroEL/GroES. Struktura je sastavljena od više podjedinica oblikovanih u prstene koji čine dvije komore (GroEL) i „poklopac“ (GroES).<sup>45</sup> Takva struktura sprječava agregiranje proteina i ograničava konformacijski prostor struktura koje protein može poprimiti. Smatanje započinje nakon vezanja ATP-a koji uzrokuje zatvaranje komore s GroES i konformacijske promjene u GroEL. Otpuštanje proteina iz komore šaperonina uvjetovano je konformacijskim promjenama potaknutim hidrolizom ATP-a pa se smatanje proteina odvija se u vremenskom razdoblju potrebnom za hidrolizu vezanih ATP molekula (oko 10 s kod bakterija, kod eukariota je hidroliza sporija pa je to vrijeme nešto duže).<sup>36,45</sup>





**Slika 2.2. Shema djelovanja Hsp70 šaperona DnaK i šaperonina GroES/EL u procesu smatanja neposredno nakon translacije u bakterijama. Preuzeto i prilagođeno iz Calloni et al. (2012)<sup>46</sup>.**

Zbog velike konformacijske slobode nesmotanog polipeptidnog lanca, protein ima gotovo beskonačan broj mogućih konformacija. Kada bi se proteini smatali uzorkovanjem svih mogućih konformacija, bilo bi potrebno vrijeme duže od starosti svemira da postignu nativnu konformaciju, ali se većina proteina spontano smata na skali od milisekunde do sekunde.<sup>48</sup> Ovo zapažanje naziva se Levinthalov paradoks, a upravo je Levinthal predložio da se pri smatanju proteina ne događa nasumično konformacijsko pretraživanje, već se protein smata kroz niz metastabilnih međustanja.<sup>48</sup> Termodinamički se proces smatanja proteina može promatrati u 3D konformacijskom prostoru kao lijevak koji predstavlja plohu slobodne energije u kojemu točka najniže energije predstavlja nativnu konformaciju. Lokalni minimumi predstavljaju strukture manje stabilne od nativne i kraćeg vijeka, ali dovoljno stabilne da čine međuprodukte (metastabilna stanja) u procesu smatanja (slika 2.3.).<sup>49</sup> Sama proizvodnja funkcionalnog proteina uključujući sintezu i smatanje prosječno traje vrlo kratko pa tako na primjer dobivanje funkcionalnog proteina od 100 aminokiselina u bakteriji *E. coli* traje 5 s pri 37 °C.<sup>36</sup>



Slika 2.3. Prikaz mogućih energetskih profila (ploha slobodne energije) za proces smatanja proteina. N označava točku najniže energije (nativnu strukturu), a lokalni minimumi (udubljenja plohe) predstavljaju metastabilna stanja. I – profil proteina koji ima više mogućih putanja smatanja, ali nema međuprodukte značajne stabilnosti. II – učestali profil proteina koji ima više metastabilnih stanja na više mogućih putanja smatanja. III - profil proteina koji ima jednu ili mali broj putanja smatanja koje rezultiraju nativnom konformacijom i nema metastabilna stanja. IV – profil proteina s metastabilnim stanjima značajne stabilnosti na svakoj putanji smatanja koja vodi do native konformacije, to su proteini s motivom ili domenom koja se brzo smata, ali se drugi dijelovi strukture smataju sporije i nasumično. Preuzeto i prilagođeno iz Dill et al. (2008)<sup>49</sup>.

## 2.2. Aminoacil-tRNA-sintetaze

### 2.2.1. Podjela aminoacil-tRNA-sintetaza

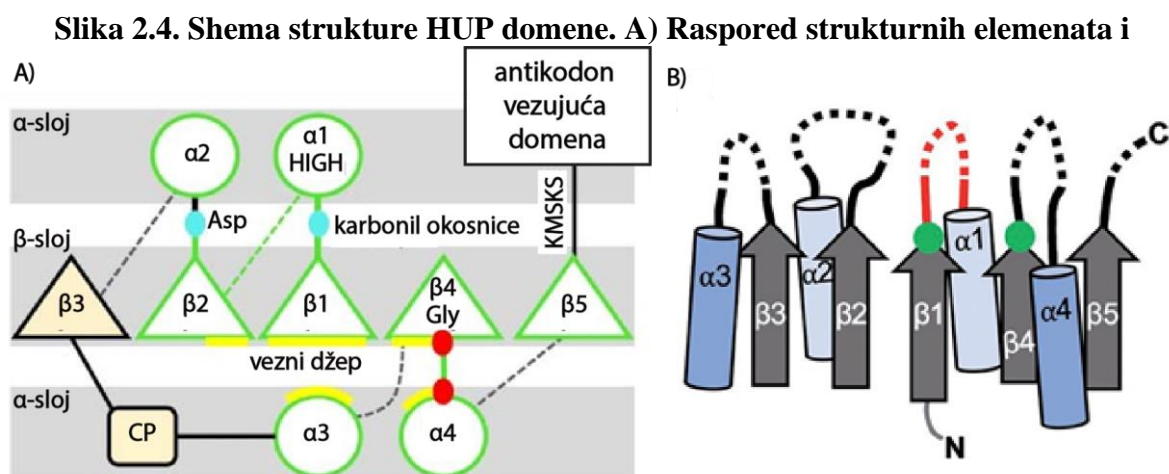
Aminoacil-tRNA-sintetaze su drevni enzimi prisutni u svim živim organizmima koji kataliziraju sintezu aminoacil-tRNA<sup>aa</sup> potrebnih za biosintezu proteina na ribosomu. Poznato je 20 različitih aaRS (za 20 različitih aminokiselina) koje se dijele u razred I i razred II prema strukturnim i mehanističkim razlikama unutar kojih postoje i podjele na podrazrede prema evolucijskoj bliskosti (tablica 2.1.).<sup>10,50-52</sup> Lizil-tRNA-sintetaza (LysRS) je iznimka kao aaRS koja se svrstava u oba razreda ovisno o varijanti, no većina LysRS pripada razredu II.<sup>53</sup>

Tablica 2.1. Podjela aminoacil-tRNA-sintetaza na razrede.

RAZRED I				RAZRED II			
Podrazred	aaRS	Kvaterna struktura	Vežanje aa na tRNA	Podrazred	aaRS	Kvaterna struktura	Vežanje aa na tRNA
<b>A</b>	IleRS	$\alpha$	2'OH A76	<b>a</b>	SerRS	$\alpha_2$	3'OH A76
	ValRS	$\alpha$			ProRS		
	LeuRS	$\alpha$			ThrRS		
	MetRS	$\alpha, \alpha_2$			HisRS		
<b>B</b>	CysRS	$\alpha, \alpha_2$		<b>b</b>	AspRS	$\alpha_2$	3'OH A76
	GlnRS	$\alpha$			AsnRS		
	GluRS	$\alpha$	LysRS				
<b>C</b>	TrpRS	$\alpha_2$	<b>c</b>	AlaRS	$\alpha_2, \alpha$ ( $\alpha\beta$ ) <sub>2</sub>	3'OH A76	
	TyrRS			PheRS		2'OH A76	
<b>D</b>	ArgRS	$\alpha$					
<b>E</b>	LysRS	$\alpha$	3'OH A76				

Razred I uključuje 10 aminoacil-tRNA-sintetaza i LysRS-I. Zajedničko svojstvo svih aaRS ovog razreda je očuvana struktura katalitičke domene koja pripada superporodici HUP (engl. *HIGH-signature proteins, UspA, and PP-ATPases*). HUP domene imaju specifičnu strukturu izgrađenu od pet paralelnih  $\beta$ -lanaca koji čine  $\beta$ -ploču i četiri  $\alpha$ -zavojnice (slika 2.4.). HUP je drevna domena koja izgrađuje katalitička mjesta enzima koji aktiviraju različite supstrate uglavnom pomoću ATP-a formirajući adenilate kao aktivirane međuproducte.<sup>13,54</sup> Katalitička domena aaRS ostvaruje interakcije s molekulom ATP-a i 3' krajem tRNA. Molekula tRNA<sup>aa</sup> biva aminoacilirana na 2' OH skupini kod aaRS razreda I (osim LysRS, tablica 2.1.). Za enzime ovog razreda karakteristična su dva očuvana motiva u sintetskom mjestu: HIGH i KMSKS.<sup>10</sup> HIGH sudjeluje u pozicioniranju fosfata ATP-a, stabiliziranju prijelaznog stanja u reakciji aktivacije i pozicioniranju adeninskog prstena.<sup>5,55</sup> Motiv KMSKS također interagira s adenilatnim dijelom Ile-AMP i stabilizira prijelazno stanje u reakciji aktivacije aminokiseline.<sup>5,10,55</sup> Unutar katalitičke domene umetnuta je dodatna domena CP1 (engl. *connective peptide I*) koja dijeli HUP na dva dijela. CP1 domena kod nekih aaRS razreda I (IleRS, ValRS, leucil-tRNA-sintetaze (LeuRS)) sadrži dodatnu inserciju - domenu za popravak pogreške (korektivnu domenu) koja će biti detaljnije opisana u poglavljima 2.3.1. i 2.3.2.<sup>4,56</sup>

Aminoacil-tRNA-sintetaze razreda I uglavnom su monomerni proteini (triptofanil-tRNA-sintetaza (TrpRS) i tirozil-tRNA-sintetaza su homodimeri (TyrRS)).



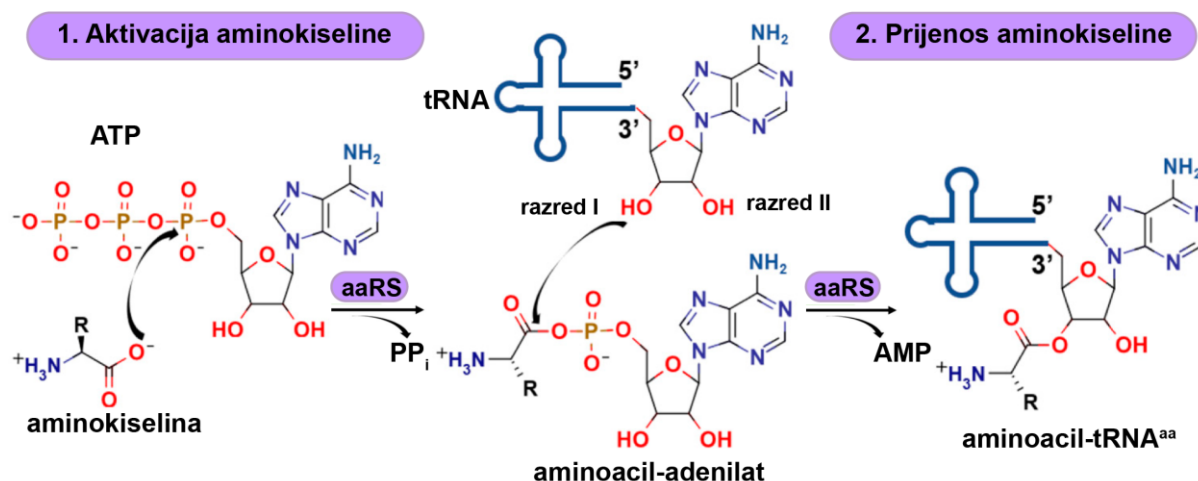
značajnih elemenata. Površinske petlje koje čine aktivno mjesto prikazane su punim linijama, dok su crtkanim linijama prikazane vezne petlje nepoznate uloge. Zelene pune linije označavaju srž koja se može poravnati u strukturalnom poravnavanju HUP domena različitih aaRS. CP (engl. *connective peptide*) označava inserciju u HUP domeni. Naznačeni su HIGH i KMSKS motivi, aspartat (Asp) i karbonyl oksidne (plave točke) koji vežu α-amino skupinu aminokiseline, elementi koji vežu ribozu (crvene točke) i vezni džep za aminokiselinski supstrat obojen žuto. B) Prikaz strukture iz bočne perspektive. Crvenom crtkanom linijom označena je petlja koja veže fosfat, zelenim točkama aminokiseline koje interagiraju s ribozom, crnim crtkanim linijama površinske petlje, a „unutarnje“ petlje nisu prikazane. Preuzeto i prilagođeno iz A) neobjavljeni rezultati grupe Gruić Sovulj, B) Gruić Sovulj et al. (2021)<sup>13</sup>.

Razred II sadrži 10 aminoacil-tRNA-sintetaza koje dijele istu strukturu katalitičke srži sastavljenu od 7 β-niti koji čine antiparalelnu β-ploču okruženu α-zavojnica. Očuvana su tri motiva u aminokiselinskom slijedu: motiv 1, motiv 2 i motiv 3. Motivi 2 i 3 sudjeluju u vezanju supstrata pri tome motiv 2 ostvaruje interakcije s ATP-om, aminokiselinom i 3' krajem tRNA dok motiv 3 najznačajnije veže ATP i može se povezati sa funkcijom HIGH i KMSKS motiva aaRS razreda I.<sup>10</sup> Molekula tRNA<sup>aa</sup> se aminoacilira na 3' kraju kod svih aaRS razreda II osim fenilalanil-tRNA-sintetaza (PheRS). Aminoacil-tRNA-sintetaze razreda II uglavnom su dimeri te su interakcije između dvije podjedinice stabilizirane motivom I koji ima strukturu α-zavojnice i ne sudjeluje u katalizi.<sup>57</sup>

### 2.2.2. Mehanizam reakcije aminoaciliranja

Reakcija aminoaciliranja tRNA<sup>aa</sup> provodi se u dva koraka kod svih aaRS (slika 2.5.). Prvi korak je aktivacija aminokiseline koja se odvija mehanizmom bimolekularne nukleofilne supstitucije

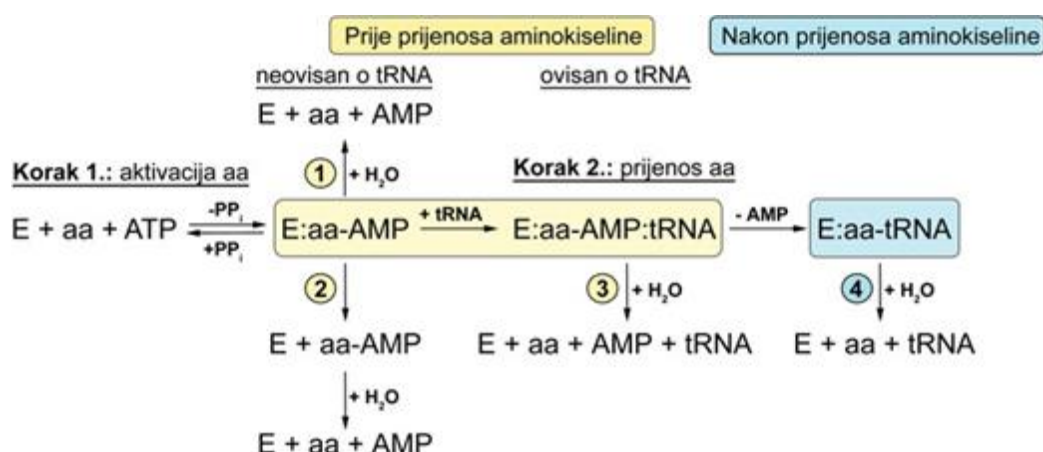
(S<sub>N</sub>2) što podrazumijeva usklađenu reakciju u kojoj koncentracija supstrata i nukleofila utječu na brzinu reakcije. Nukleofilni napad vrši  $\alpha$ -karboksilni kisik aminokiseline na  $\alpha$ -atom fosfora ATP-a što rezultira nastajanjem aminoacil-adenilata (aa-AMP) i pirofosfata (PP<sub>i</sub>) kao izlazne skupine. U sljedećoj reakciji koja se također odvija S<sub>N</sub>2 mehanizmom 2' ili 3'OH skupina terminalnog adenzina tRNA vrši nukleofilni napad na  $\alpha$ -karbonilni ugljikov atom aa-AMP-a koji je bolji elektrofil za nukleofilni napad u reakciji S<sub>N</sub>2 od same aminokiseline jer je AMP bolja izlazna skupina od hidroksilne. Ovom reakcijom formira se esterska veza između aminokiseline i 3' kraja tRNA. Anorganski pirofosfat koji nastaje u reakciji aktivacije biva hidroliziran anorganskom pirofosfatazom u egzotermnoj reakciji što čini cjelokupni proces aminoaciliranja termodinamički povoljnim. Položaj na koji će aminokiselina biti prenesena na tRNA (2' ili 3' OH skupina) ovisi o aktivnom mjestu enzima, no u otopini dolazi do transaminoacilacije između dva oblika i u proces translacije ulaze samo 3'-aa-tRNA<sup>aa</sup> jer EF-Tu veže samo taj oblik.<sup>58,59</sup> Brzinu ukupne reakcije aminoaciliranja određuju različiti koraci kod dva razreda aaRS. Za enzime razreda I korak koji određuje brzinu reakcije je otpuštanje konačnog produkta aa-tRNA<sup>aa</sup>, a karakteristična je bifazna ovisnost promjene koncentracije produkta u vremenu koja ukazuje na brzo nastajanje produkta u kratkom vremenu što se naziva *burst* kinetika.<sup>51</sup> Korak koji određuje brzinu reakcije kod aaRS razreda II je korak aktivacije aminokiseline u prisutnosti tRNA ili neki od događaja koji prethode reakciji prijenosa aminokiseline na tRNA<sup>aa</sup> (npr. konformacijska promjena nakon aktivacije).<sup>51</sup>



Slika 2.5. Shematski prikaz reakcije aminoaciliranja u dva koraka. Preuzeto i prilagođeno iz Pang et al. (2021)<sup>60</sup>.

Poznato je da 10 od 20 aaRS ponekad može pogrešno prepoznati nepripadne aminokiseline u sintetskom mjestu. Točna sinteza proteina izrazito je bitna jer ugradnja pogrešne aminokiseline

u polipeptidni lanac može biti toksična za stanicu, a sinteza aa-tRNA<sup>aa</sup> je jedan od dva ključna događaja o kojima ovisi vjernost translacije (kao što je pojašnjeno u poglavlju 2.1.). Stoga su aaRS koje prepoznaju nepripadne aminokiseline evoluirale dodatne katalitičke aktivnosti kojima hidroliziraju pogrešno aktivirane aminokiseline ili misaminoacilirane aa-tRNA<sup>aa</sup>.<sup>5</sup> Putevi popravka i sprječavanja nastanka misaminoacilirane tRNA prikazani su na slici 2.6.<sup>61</sup> Nakon aktivacije nepripadne aminokiseline moguća su tri načina popravka pogreške pri čemu su dva tRNA-neovisna i jedan tRNA-ovisan. tRNA-neovisni podrazumijevaju hidrolizu aa-AMP u aktivnom mjestu prije vezanja tRNA ili disocijaciju aa-AMP iz aktivnog mjesta i potom hidrolizu u otopini. tRNA-ovisan popravak podrazumijeva hidrolizu aa-AMP koja je potpomognuta s tRNA. Dosada navedeni popravci odvijaju se u sintetskom mjestu. Popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline događa se u korektivnom mjestu aaRS koje katalizira hidrolizu misaminoacilirane-tRNA<sup>aa</sup>. Sedam aaRS posjeduje posebnu domenu za popravak pogreške nakon prijenosa: IleRS, ValRS, LeuRS, PheRS, alanil-tRNA-sintetaza (AlaRS), prolil-tRNA-sintetaza (ProRS) i treonil-tRNA-sintetaza (ThrRS).<sup>5</sup>



**Slika 2.6. Shema mehanizama popravka pogreške aminoacil-tRNA-sintetaza. 1. tRNA-neovisna hidroliza aa-AMP, 2. disocijacija aa-AMP i hidroliza u otopini, 3. tRNA-ovisna hidroliza aa-AMP, 4. hidroliza aa-tRNA<sup>aa</sup> u korektivnom mjestu. Preuzeto iz Cvetešić (2015)<sup>62</sup>.**

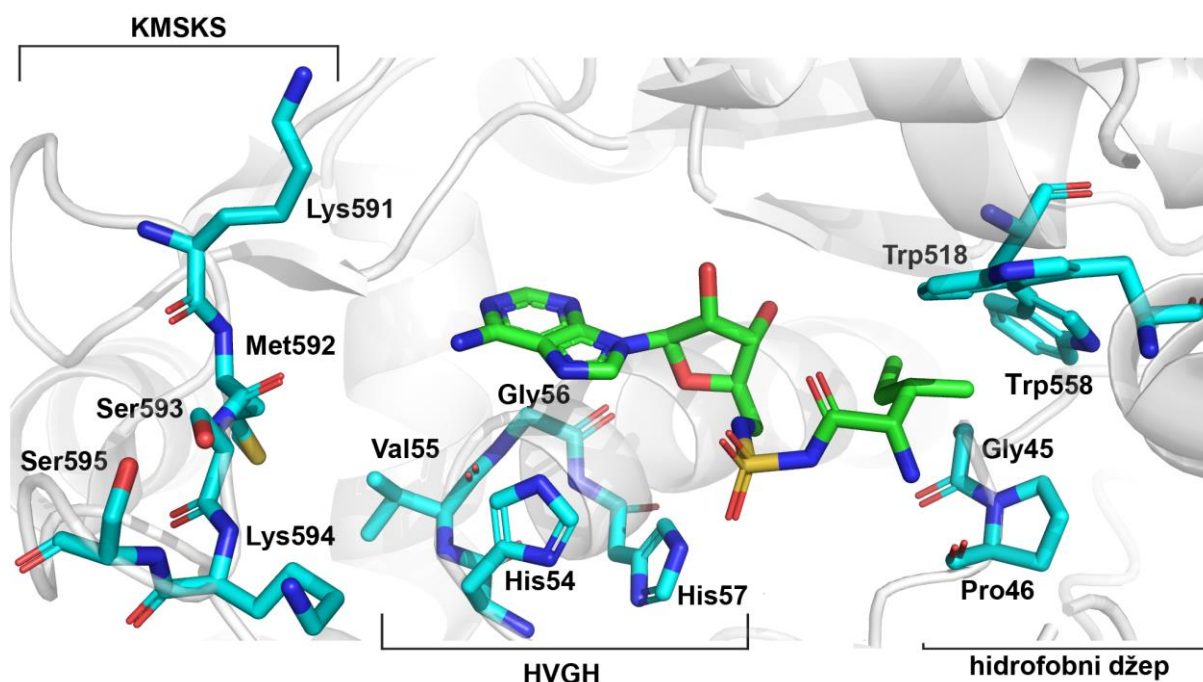
## 2.3. Izoleucil-tRNA-sintetaza

### 2.3.1. Strukturne značajke

Izoleucil-tRNA-sintetaza (IleRS) pripada razredu Ia, stoga ima njemu karakteristične strukturne značajke. Općenito se struktura svih IleRS dijeli na sljedeće domene: N-terminalna, katalitička HUP, CP1, CP2, korektivna domena (domena za popravak pogreške), tRNA-vezujuća i C-terminalna domena (slika 2.8.). IleRS je monomerni protein sastavljen od 800-1300

aminokiselina molekulske mase od 100-150 kDa. Struktura IleRS sadrži dva cinkova kationa  $Zn^{2+}$  koji su tetraedarski koordinirani s cisteinskim bočnim ograncima i nemaju katalitičku ulogu, ali su neophodni za aktivnost enzima.

Katalitičko mjesto čini HUP domena karakteristična za aaRS razreda I koja je opisana i u potpoglavlju 2.2.1., a njezin shematski prikaz se nalazi na slici 2.4. Općenito HUP domena sadrži očuvane motive HIGH i KMSKS. HIGH se nalazi na N-terminalnom kraju prve  $\alpha$ -zavojnice HUP domene i ostvaruje interakcije s ATP-om te adenilatnim dijelom izoleucil-adenilata (Ile-AMP). Prvi histidin iz HIGH ostvaruje interakcije s  $\gamma$ -fosfatom, a posljednji s  $\alpha$ -fosfatom ATP-a.<sup>13</sup> Glicin je najočuvanija aminokiselina u ovom motivu jer okosnica na tom položaju poprima konformaciju koja omogućuje ostvarivanje interakcija s adeninskim prstenom iz molekule ATP-a.<sup>5</sup> Razlog zašto je na ovom mjestu očuvan glicin može biti taj što bi prisutnost bilo kakvog bočnog ogranka vjerojatno narušila opisne interakcije.<sup>5</sup> Vodikove veze koje aktivno mjesto ostvaruje s adeninskim prstenom osiguravaju specifičnost za ATP i onemogućuju vezanje sličnih molekula kao što je to na primjer GTP. KMSKS se nalazi u petlji koja slijedi nakon  $\beta$ 5-lanca  $\beta$ -ploče na C-terminalnom kraju sintetskog mjesta. KMSKS također interagira s ATP-om i adenilatnim dijelom Ile-AMP, no ostvaruje i interakcije s 3' krajem tRNA. Oba lizina ostvaruju elektrostatske interakcije s fosfatnim skupinama ATP-a i Ile-AMP-a.<sup>5</sup> U riješenoj kristalnoj strukturi IleRS iz bakterije *Thermus thermophilus* određene su aminokiseline koje ostvaruju glavne interakcije u aktivnom mjestu (slika 2.7.).<sup>11</sup> Kod ove IleRS u HIGH motivu aminokiselina izoleucin zamijenjena je valinom (isto je i kod IleRS iz bakterije *B. megaterium* koja se istražuje u ovom radu). HVGH motiv čine His54, Val55, Gly56, His57, a KMSKS Lys591, Met592, Ser593, Lys594 i Ser595. Aminokiseline Gly45, Pro46, Trp518 i Trp558 oblikuju hidrofobni džep u katalitičkom mjestu i van der Waalsovima interakcijama smještaju bočni ogranak izoleucina u džep.<sup>11</sup>



**Slika 2.7. Prikaz sintetskog mjesta IleRS iz *T. thermophilus* s analogom izoleucil-adenilata (5'-N-[N-(L-izoleucil)sulfamoil]adenozin) (PDB: 1JZQ).**

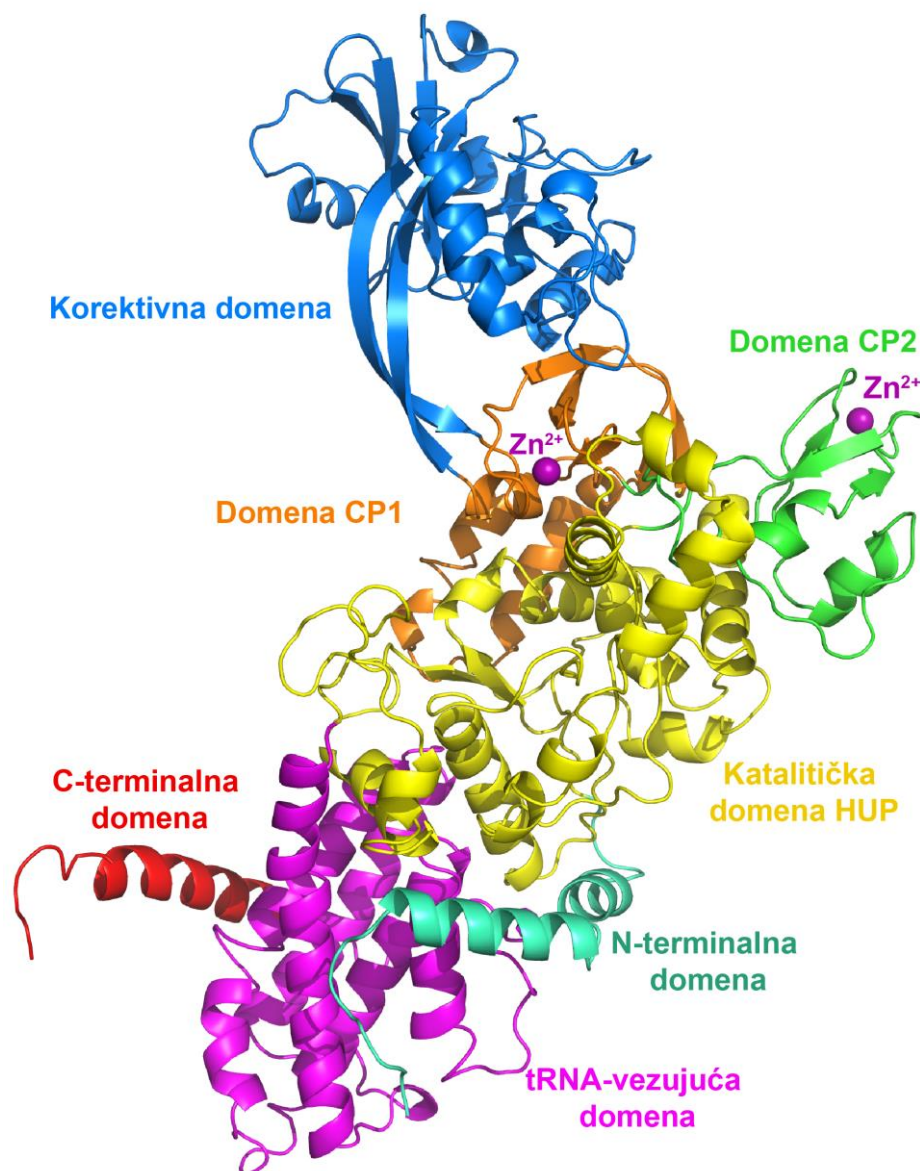
U primarnom slijedu na HUP domenu nastavlja se CP1 domena koja u IleRS ima umetnutu dodatnu korektivnu domenu (domenu za popravak pogreške). Korektivna domena posjeduje katalitičku aktivnost za hidrolizu pogrešno aminoacilirane tRNA, odnosno njezina je funkcija povećavanje točnosti enzima u cjelokupnoj reakciji. Njezina evolucija potaknuta je toksičnim utjecajem mistranslacije na stanicu. Korektivna domena evolucijski je mlađa značajka aaRS razreda I, a očuvanost korektivne domene ukazuje na evolucijski ranu značajku IleRS, LeuRS i ValRS kladija, odnosno njihovog zajedničkog pretka.<sup>63-65</sup> Aktivno mjesto korektivne domene IleRS jednako dobro hidrolizira misaminoacilirane tRNA<sup>Ile</sup> neovisno o tome jesu li diskriminirane u sintetskom mjestu, ali zato specifično diskriminira Ile-tRNA<sup>Ile</sup>.<sup>66</sup> Ovo svojstvo ukazuje na to da je evolucija specifičnosti korektivnog mjesta gonjena ciljem da se spriječi hidroliza pripadnog produkta Ile-tRNA<sup>Ile</sup> kako bi se omogućila široka supstratna specifičnost. Položaji bočnih ogranaka korektivnog mjesta koji mispozicioniraju pripadni supstrat identificirani su simulacijama molekulske dinamike IleRS iz bakterije *E. coli* u kompleksu s analogom produkta 2'-L-izoleuciladenozinom i potvrđeni kinetičkim testovima nakon uvođenja mutacija na mjesta identificiranih bočnih ogranaka.<sup>66,67</sup>

Uloga CP2 domene nije u potpunosti poznata, no pretpostavlja se da doprinosi katalitičkoj aktivnosti enzima u reakciji aktivacije aminokiseline i popravka pogreške u korektivnoj domeni.<sup>68</sup> Bitno je napomenuti da CP2 domena veže kation Zn<sup>2+</sup> što također



ukazuje na njezin značaj u strukturi.<sup>11</sup> Ova domena prisutna je kod IleRS, ValRS, LeuRS, cisteinil-tRNA-sintetaze (CysRS), triptofanil-tRNA-sintetaze (TrpRS) i metionil-tRNA-sintetaze (MetRS).<sup>69,70</sup> Iako funkcija CP2 domene nije razjašnjena, valja naglasiti da je istraživanje kod LeuRS pokazalo da određene mutacije u CP2 domeni rezultiraju potpunim gubitkom aktivnosti u reakcijama aktivacije i aminoaciliranja te da ostvaruje interakcije s tRNA.<sup>71</sup> S druge strane, u slučaju TrpRS iz *Acidithiobacillus ferrooxidans* potpuna delecija CP2 domene nije utjecala na aktivnost enzima u aktivaciji aminokiseline, ali je  $K_m$  za tRNA 7 puta veći u odnosu na divlji tip što također ukazuje na interakcije između tRNA i CP2 domene ili utjecaj CP2 domene na konformaciju koja mijenja afinitet prema tRNA.<sup>72</sup>

C-terminalna domena ostvaruje interakcije s antikodonskom peteljkom tRNA<sup>Ile</sup>.<sup>12</sup> Prema filogenetskim istraživanjima C-terminalna domena evolucijski je još mlađa od korektivne domene kod IleRS, LeuRS i ValRS.<sup>64,65,73</sup> Istraživanja ukazuju na to da je za postojanje minimalne aktivnosti aminoaciliranja većini aaRS, pa tako i IleRS, dovoljna interakcija katalitičke domene s nekoliko nukleotida akceptorske peteljke što se naziva operacijskim RNA kodom (engl. *operational RNA code*).<sup>20</sup> Prethodno navedeno sugerira da interakcije koje C-terminalna domena ostvaruje s tRNA nisu nužne za postojanje minimalne katalitičke aktivnosti IleRS u reakciji aminoaciliranja. S druge strane, pokazano je da C-terminalna domena prokariotske IleRS sadrži klaster Cys<sub>4</sub> koji koordinira ion Zn<sup>2+</sup> i nužan je za aminoacilacijsku aktivnost IleRS.<sup>74</sup> Uklanjanje ovog klastera ne utječe na katalizu reakcije aktivacije Ile, ali u potpunosti gasi aminoacilacijsku aktivnost IleRS te nema detektibilnog vezanja tRNA.<sup>74</sup> Pretpostavljeno je da se C-terminalna domena translocira prema aktivnom mjestu što omogućuje interakciju Cys<sub>4</sub> klastera i akceptorske peteljke tRNA.<sup>74</sup>



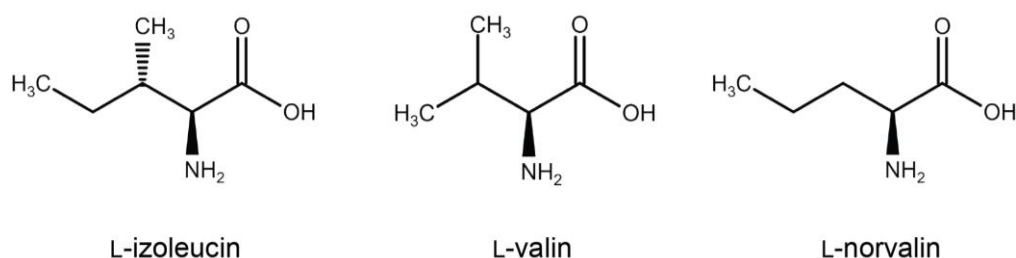
**Slika 2.8. Struktura izoleucil-tRNA-sintetaze iz bakterije *Thermus thermophilus*. (PDB ID: 1ILE).**

### 2.3.2. Reakcije izoleucil-tRNA-sintetaze i prepoznavanje supstrata

Izoleucil-tRNA-sintetaza katalizira reakciju pripajanja izoleucina pripadnoj tRNA<sup>Ile</sup>. Reakcija aminoaciliranja dijeli se na aktivaciju izoleucina do izoleucil-AMP i prijenos izoleucina na pripadnu tRNA<sup>Ile</sup>. Reakcije se odvijaju opisanim mehanizmima u potpoglavlju 2.2.2. Kinetički parametri za navedene reakcije određuju se Michaelis-Mentenim modelom kojim se dobivaju  $K_M$  i  $k_{cat}$ .  $K_M$  se definira kao koncentracija supstrata potrebna za postizanje polovine maksimalne brzine dok se  $k_{cat}$  definira kao maksimalni broj molekula supstrata koje se prevedu u produkt po aktivnom mjestu enzima u jedinici vremena u uvjetima zasićenja enzima supstratom i

predstavlja donju granicu koeficijenta brzine prvog reda svih koraka reakcije nakon nastajanja enzim-supstrat kompleksa. Kinetički parametri za reakcije IleRS izmjereni su za enzime iz različitih organizama. Na primjer, Michaelisova konstanta  $K_M$  za Ile u reakciji aktivacije IleRS iz bakterije *E. coli* iznosi  $3,4 \mu\text{mol dm}^{-3}$ , a vrijednost obrtnog broja  $k_{\text{cat}}$   $56,7 \text{ s}^{-1}$ <sup>75</sup>, iako ovisno o organizmu i eksperimentu vrijednosti  $K_M$  variraju u rasponu  $3\text{-}10 \mu\text{mol dm}^{-3}$ , a vrijednosti  $k_{\text{cat}}$  u rasponu  $18\text{-}82 \text{ s}^{-1}$ .<sup>76,77</sup> Izolirani korak neke enzimski katalizirane reakcije može se pratiti u uvjetima kinetike jednog kruga dodavanjem enzima u znatno većoj količini nego supstrata. U ovim uvjetima brzina reakcije ne ovisi o regeneraciji enzima (disocijaciji produkta) što omogućuje praćenje isključivo reakcije nastajanja produkta u aktivnom mjestu enzima. Kinetički parametar  $k_{\text{trans}}$  za izolirani korak prijenosa aminokiseline određen je u uvjetima kinetike jednog kruga. Opaženi koeficijent brzine ukupne reakcije aminoaciliranja  $k_{\text{obs}}$  određuje se u uvjetima više obrtaja, kao i prethodno opisani  $k_{\text{cat}}$  i  $K_M$ . Vrijednost koeficijenta brzine prijenosa aminokiseline  $k_{\text{trans}}$  iznosi  $9,4 \text{ s}^{-1}$ , a  $k_{\text{obs}}$  za ukupnu reakciju aminoaciliranja iznosi  $1,1 \text{ s}^{-1}$ , no vrijednosti također blago variraju ovisno o organizmu i eksperimentu.<sup>9,77</sup>

IleRS je jedna od aaRS koje ponekad griješe i može pogrešno prepoznati nepripadne aminokiseline Val i neproteinogenu Nva što je posljedica njihove velike strukturne sličnosti s Ile jer se razlikuju samo u jednoj metilnoj skupini (slika 2.9).



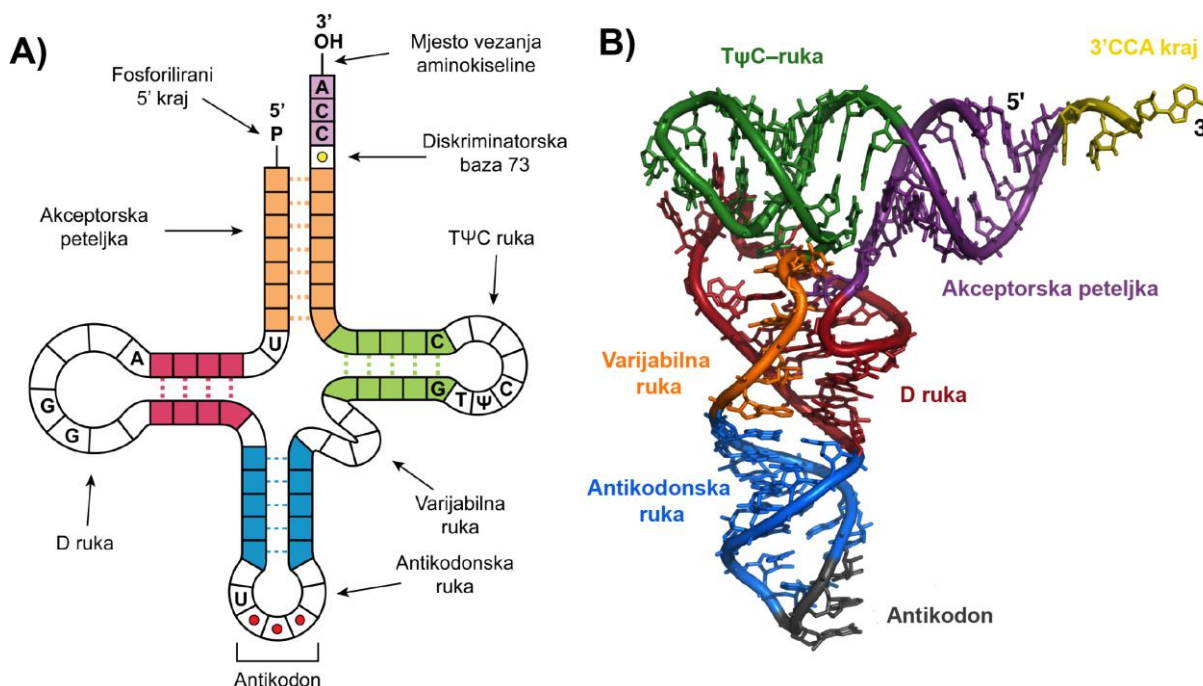
**Slika 2.9. Strukture izoleucina, valina i norvalina.**

Vežanju u aktivno mjesto doprinosi i to što su Nva i Val manji od Ile tako da je njihovo smještanje u aktivno mjesto manje sterički ometeno. Mjera kojom se opisuje koliko je neki nepripadni supstrat lošiji od pripadnog, odnosno koliko dobro enzim diskriminira nepripadni supstrat je diskriminacijski faktor koji se matematički definira kao  $D = \left(\frac{k_{\text{cat}}}{K_M}\right)_{\text{pripadni}} / \left(\frac{k_{\text{cat}}}{K_M}\right)_{\text{nepripadni}}$ . Nva je u sintetskom mjestu IleRS u reakciji aktivacije diskriminiran faktorom 160, a Val 240.<sup>8</sup> Razlike u vrijednostima između  $k_{\text{cat}}$  Ile ( $55 \text{ s}^{-1}$ ) i Nva ( $41 \text{ s}^{-1}$ ), odnosno Val ( $35 \text{ s}^{-1}$ ) su male dok se vrijednosti  $K_M$  za Ile ( $0,0046 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) i Nva ( $0,82 \text{ mmol dm}^{-3}$ ), odnosno Val

(0,47 mmol dm<sup>-3</sup>) značajno razlikuju što ukazuje na smanjeni afinitet prema neprikladnom supstratu. Uvriježeno je stajalište da ukoliko diskriminacijski faktor iznosi manje od 3300, aminokiselina stvara prijetnju točnosti ukupnom procesu translacije.<sup>78</sup> U reakciji prijenosa na tRNA<sup>Ile</sup> Nva i Val su gotovo jednako dobri supstrati kao Ile, pa ovaj korak ne doprinosi značajno njihovoj diskriminaciji.<sup>8,79</sup> S obzirom na važnost reakcije koju katalizira, IleRS je razvila mehanizme popravka pogreške prije (hidroliza aminoacil-AMP) i nakon prijenosa (hidroliza aa-tRNA<sup>Ile</sup>) aminokiseline.<sup>11,67,80</sup> Popravak prije prijenosa ima doprinos od 30% na ukupnu razinu popravka pogreške što je visok u usporedbi s drugim aaRS<sup>79</sup>, no glavni doprinos ima popravak nakon prijenosa aminokiseline koji se odvija u korektivnom mjestu kod IleRS iz bakterije *E. coli*. Koeficijenti brzine hidrolize Nva-tRNA<sup>Ile</sup> i Val-tRNA<sup>Ile</sup> iznose 85 s<sup>-1</sup> i 49 s<sup>-1</sup>.<sup>8</sup>

### 2.3.3. tRNA kao supstrat izoleucil-tRNA-sintetaza

Molekula tRNA<sup>Ile</sup> jedan je od supstrata izoleucil-tRNA-sintetaze na koji se prenosi aktivirana. Općenito se sekundarna struktura molekula tRNA, pa tako i tRNA<sup>Ile</sup>, shematski prikazuje modelom djeteline, a čine ju sljedeći glavni elementi: akceptorska peteljka, D-ruka, antikodonska ruka, varijabilna ruka i T $\Psi$ C-ruka (slika 2.10. A) Tercijarna struktura tRNA je oblika slova L (slika 2.10. B), a stabiliziraju je vodikove veze i  $\pi$ - $\pi$  interakcije. Na 3'CCA kraj akceptorske peteljke veže se aminokiselina na terminalni adenozin.



**Slika 2.10.** Shematski prikaz sekundarne A) i tercijarne B) strukture tRNA. A) Preuzeto iz Živković (2021)<sup>81</sup>, B) PDB ID: 1EHZ.

Što se tiče tRNA<sup>Ile</sup>, u stanici postoje dvije izoakceptorske tRNA<sup>Ile</sup> (tRNA<sup>Ile</sup><sub>GAU</sub> i tRNA<sup>Ile</sup><sub>UAU</sub>) koje dekodiraju kodone AUU, AUC i AUA za aminokiselinu Ile. tRNA<sup>Ile</sup><sub>GAU</sub> je glavni izoakceptor i dekodira AUU i AUC. Najznačajniji elementi identiteta tRNA koji ostvaruju interakcije s IleRS nalaze se u antikodonskoj ruci i akceptorskoj peteljci. Glavni elementi identiteta tRNA<sup>Ile</sup><sub>GAU</sub> su nukleotidi antikodonske ruke koji uključuju sam antikodon G34, A35, U36 te t<sup>6</sup>A37 i A38.<sup>82</sup> U akceptorskoj peteljci to su diskriminatorska baza A73 i parovi baza C29-G41, U12-A23 i C4-G69.<sup>82</sup> C-terminalna domena IleRS ostvaruje interakcije s antikodonskom rukom, dok katalitička HUP domena ostvaruje interakcije s 3' krajem akceptorske peteljke.

#### 2.3.4. Značajke izoleucil-tRNA-sintetaza iz bakterije *Bacillus megaterium*

U okviru ovog rada istraživana je IleRS2 iz bakterije *Bacillus (Priestia) megaterium* koja pripada porodici bakterija *Bacillaceae* i skupini Gram-pozitivnih bakterija. Ova bakterija je zanimljiva jer u svom genomu sadrži dva gena za IleRS *ileS1* i *ileS2*. Dvije IleRS kodirane ovim genima imaju različita svojstva koja će biti opisana u nastavku.<sup>83</sup> Općenito se izoleucil-tRNA-sintetaze evolucijski dijele u dva kladija IleRS1 (izoleucil-tRNA-sintetaza tipa 1) i IleRS2 (izoleucil-tRNA-sintetaza tipa 2) koji se razlikuju u strukturama C-terminalne antikodon-vezujuće domene, u određenim elementima u sintetskom mjestu i najvažnije u otpornosti na antibiotik mupirocin koji je kompetitivni inhibitor mnogih bakterijskih IleRS.<sup>9,24</sup> Strukturna razlika u C-terminalnoj domeni je klaster Cys<sub>4</sub> koji koordinira ion Zn<sup>2+</sup> kod IleRS1 i neophodan je za aktivnost enzima dok ga IleRS2 u strukturi nema.<sup>74</sup> Većina bakterijskih IleRS pripada tipu 1, iako bakterije mogu imati i IleRS tipa 2 te oba tipa istovremeno (kao bakterija *B. megaterium*). Sve citosolne eukariotske IleRS su tipa 2 (pa se taj tip naziva još i eukariotski tip), dok su sve mitohondrijske eukariotske IleRS tipa 1. Za bakterije iz porodice *Bacillaceae* karakteristična je prisutnost oba tipa.<sup>84</sup> Glavna razlika na funkcionalnoj razini između dva tipa je u brzini reakcije aminoaciliranja i otpornosti na mupirocin. IleRS1 ima veći obrtni broj u reakciji aminoaciliranja i omogućuje bržu translaciju u stanici, dok IleRS2 ima manji obrtni broj, ali je otporna na inhibiciju mupirocinom.<sup>23</sup> IleRS2 odabrana je za istraživanje u sklopu ovog rada, između ostalog, upravo zbog prethodno navedene otpornosti na mupirocin. Koristeći ovo svojstvo moguće je, osim *in vitro* karakterizacije, provesti *in vivo* komplementaciju kojom se ispituje funkcionalnost proteina u stanici kao što je opisano u poglavlju 4.5. Prednost rada s IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* je i to što je dostupna riješena kristalna struktura

(neobjavljeni rezultati grupe Gruić Sovulj). Iako tip 2 IleRS ima prednost nad IleRS1 u smislu otpornosti na mupirocin, sve istražene bakterijske vrste iz porodice *Bacillaceae* sadrže gen *ileS1*. Prethodno navedeno sugerira da je gen *ileS1* evolucijski očuvan i važan za preživljavanje bakterijskih vrsta ove porodice neovisno o prisutnosti *ileS2*. Prisutnost oba oblika može se objasniti činjenicom da su bakterije iz ove porodice brzo rastući organizmi pa im je IleRS1 potreban kako bi se brzina translacije održavala na visokoj razini, dok IleRS2 daje mogućnost rasta u prisutnosti mupirocina.

Prethodno opisane razlike između dva tipa IleRS iz bakterije *B. megaterium* u nastavku će biti potkrijepljene usporedbom vrijednosti kinetičkih parametara za reakcije aktivacije i ukupnog aminoaciliranja. Obrtni broj za reakciju aktivacije kataliziranu enzimom IleRS1 iz bakterije *B. megaterium* iznosi  $30 \text{ s}^{-1}$ , dok je vrijednost za IleRS2  $66 \text{ s}^{-1}$ .  $K_M$  (Ile) vrijednosti iznose  $2,1 \mu\text{mol dm}^{-3}$  za IleRS1 i  $48,6 \mu\text{mol dm}^{-3}$  za IleRS2.<sup>84</sup> No, kinetički parametri za ukupnu reakciju aminoaciliranja suprotni su aktivacijskim parametrima. Obrtni broj za reakciju aminoaciliranja s IleRS1 iznosi  $1,75 \text{ s}^{-1}$ , dok je ta vrijednost za IleRS2  $0,96 \text{ s}^{-1}$  što je dva puta manje.  $K_M$  (Ile) vrijednosti iznose  $43,2 \mu\text{mol dm}^{-3}$  za IleRS1 i  $6,2 \mu\text{mol dm}^{-3}$  za IleRS2.<sup>84</sup> Kada se za reakciju aminoaciliranja izračuna omjer  $k_{\text{cat}}/K_M$  koji se koristi za opisivanje specifičnosti enzima, dobiju se vrijednosti  $14,3 \text{ s}^{-1} \mu\text{mol}^{-1} \text{ dm}^3$  za IleRS1 i  $1,4 \text{ s}^{-1} \mu\text{mol}^{-1} \text{ dm}^3$  za IleRS2 koje ukazuju na veću efikasnost IleRS1. Konstanta inhibicije mupirocinom za tip 2 iznosi  $1,08 \mu\text{mol dm}^{-3}$ , a za tip 1 iznosi  $285 \mu\text{mol dm}^{-3}$  što je velika, ali i očekivana razlika.<sup>84</sup> Vjernost aminoaciliranja između dva tipa ne razlikuje se značajno. Oba tipa IleRS iz bakterije *B. megaterium* posjeduju popravak pogreške nakon prijenosa i, neobično za IleRS, nemaju popravak prije prijenosa.<sup>84</sup>

## 2.4. Evolucija aminoacil-tRNA-sintetaza razreda I

Aminoacil-tRNA-sintetaze sudjeluju u procesu translacije koja čini biološku srž živog svijeta. Evolucija aaRS je vezana za evoluciju cijele translacijske mašinerije koja koristi produkte aaRS kao glavne supstrate pa je neizravno bilo potrebno uskladiti djelovanje aaRS s potrebama biosinteze proteina. Razvoj IleRS izravno je vezan za svojstva i interakcije sa supstratima koje vežu pa se evolucija aktivnog mjesta, korektivnog mjesta i ukupne strukture može korelirati sa evolucijom tRNA i pojavom različitih proteinogenih i neproteinogenih aminokiselina. Stoga istraživanje evolucijske prošlosti ovih enzima doprinosi razumijevanju drevne translacije, evolucije ključnih sudionika (ribosoma, tRNA, aminokiselina, EF-Tu itd.) i

razumijevanju uspostavljanja genetičkog koda. S obzirom na to da se potreba za aaRS pojavila vrlo rano, one su evoluirale u bliski oblik današnjem prije formiranja posljednjeg univerzalnog zajedničkog pretka (LUCA).<sup>15</sup>

Uzimajući u obzir njihovu funkciju, moglo bi se pretpostaviti da dva razreda aaRS imaju zajedničkog pretka, no oni su ipak konvergentno evoluirali u enzime s istom biološkom funkcijom iz različitih ancestralnih proteina. Osim biološke funkcije i biokemije reakcija koje kataliziraju, dva razreda nemaju zajedničke karakteristike. Evoluirali su iz katalitičkih domena različitog evolucijskog porijekla, nemaju sličnosti u strukturi niti u aminokiselinskim sljedovima.<sup>17</sup> Zanimljiva hipoteza koja objašnjava evoluciju dva razreda aaRS je Rodin-Ohno hipoteza koja pretpostavlja da su dva razreda potekla iz komplementarnih lanca jedne dvolančane DNA od kojih je svaki kodirao za aktivno mjesto jednog razreda.<sup>53</sup> Neki od argumenata koji potkrepljuju ovu hipotezu su: simetričnost raspodjele aaRS u dva razreda budući da se u svaki smješta 10 aaRS, zrcalni odnosi struktura nekih aaRS u kompleksu s tRNA (npr. glutaminil-tRNA-sintetaza iz razreda I i aspartil-tRNA-sintetaza iz razreda II), vezanje tRNA sa suprotnih strana, položaj antikodon-vezujuće domene (kod razreda I na C-terminalnom, a kod razreda II na N-terminalnom kraju) te raspodjela i uloge očuvanih katalitičkih motiva aaRS razreda I HIGH i KMSKS te aaRS II motiva 1, 2 i 3.<sup>53,86,87</sup> Daljnja istraživanja pokazala su da dva polipeptidna lanca dizajnirana prema skraćenom obliku aaRS, kodirana dvama komplementarnim lancima DNA mogu aktivirati aminokiseline uz utrošak ATP.<sup>88,89</sup> Ono što ova hipoteza ne objašnjava je kako je ovakav par komplementarnih gena transliran inicijalno. Također, ono što ne ide u prilog hipotezi je da se u obzir uzima samo aktivno mjesto, a činjenica je da su sve insercije u strukturi tijekom daljnje evolucije (npr. korektivna domena u katalitičkom mjestu razreda I) morale narušiti komplementarnost te bi se morali uključiti drugi utjecaji koji bi mogli objasniti daljnju simultanu evoluciju dva razreda aaRS.<sup>16</sup>

Model evolucije aaRS pretpostavlja da su minimalni prekursori aaRS obuhvaćali samo današnju katalitičku domenu.<sup>20,90</sup> Provedena su istraživanja koja podupiru navedenu pretpostavku. Kao što je već prethodno spomenuto, pokazano je da je za postojanje minimalne aktivnosti aminoaciliranja većini aaRS dovoljna interakcija katalitičke domene s operacijskim RNA kodom.<sup>20</sup> Nadalje, u istraživanjima ancestralnih aaRS konstruirani su katalitički aktivni minimalni oblici LeuRS, TrpRS i HisRS koji sadrže katalitičku domenu, dok su im manje očuvane domene uklonjene.<sup>88,90-92</sup> Sve aaRS razreda I uklapaju se u filogenetsko stablo

superporodice HUP zbog svoje katalitičke domene pa tako i IleRS.<sup>13</sup> Prema filogenetskim istraživanjima najbliži srodnik IleRS je ValRS s kojim dijeli najbližeg posljednjeg pretka, odmah potom su im najbliži LeuRS pa MetRS.<sup>15</sup> Evolucijska grupacija i grananje ovih aaRS, osim s njihovim sličnostima u sljedovima i strukturama, slaže se i sa sličnostima u strukturama njihovih aminokiselinskih supstrata, ali i s obrascima u genetičkom kodu. Sve četiri pripadne aminokiseline su hidrofobne i alifatske strukture, a kodoni koji kodiraju za ove aminokiseline imaju sastav nukleotida NUN.<sup>15</sup> IleRS, ValRS i LeuRS imaju CP1 inserciju u katalitičkoj domeni na istoj poziciji što ukazuje na postojanje zajedničkog pretka s ovakvom strukturom.<sup>16</sup> Nadalje, sve tri aaRS imaju i korektivnu domenu kao inserciju u CP1 domeni koja je evolucijski mlađa značajka aaRS razreda I, ali njezina očuvanost ukazuje na evolucijski ranu značajku IleRS, LeuRS i ValRS kladija.<sup>63-65</sup>

Istraživanje evolucijskih predaka doprinosi razumijevanju razvoja specijaliziranih funkcija enzima i specifičnosti prema supstratima. Prilikom istraživanja evolucije proteina polazi se od višestrukog poravnavanja sljedova (engl. *multiple sequence alignment*, MSA) i poravnavanja na temelju strukture (engl. *structure-based alignment*) na temelju kojih se može generirati odgovarajuće filogenetsko stablo.<sup>21,22</sup> Za izgradnju filogenetskog stabla koristi se relevantni uzorak OTUs-a (engl. *operational taxonomic units*), odnosno aminokiselinskih sljedova bliskih istraživanom proteinu. Za izgradnju stabla potrebno je koristiti i sljedove koji su evolucijski udaljeniji (engl. *outlier sequences*), a služe za „ukorjenjivanje“ stabla. Usporedbom poravnavanja struktura i aminokiselinskih sljedova detektiraju se najočuvaniji dijelovi u primarnom slijedu i strukturi proteina koji bi trebali biti u određenom udjelu zadržani u strukturama predaka. Na temelju ovakvih analiza moguće je generirati krnje funkcionalne oblike enzima koji predstavljaju polazne modele za daljnju evolucijsku analizu. Ovakav dizajn daje uvid u funkciju i značaj uklonjenih domena te u katalitičku efikasnost enzima u odsutnosti tih domena pri čemu se istovremeno očituje i mogućnost postojanja pretka sličnog krnjem modelu.



## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Standardne kemikalije

Agar (*Liofilchem*), agarozna (*Sigma*), akrilamid/bisakrilamid (*Sigma*), amonijev acetat (*Kemika*), amonijev klorid (*GramMol*), amonijev peroksodisulfat (APS) (*Serva*), ampicilin (*Sigma*), L-arabinoza (*Sigma*), 1,4-bis(2-(4-metil-5-fenil)oksazolil)benzen (POPOP) (*Beckmann*), cinkov (II) klorid (*Sigma*), 2,5-difeniloksazol (PPO) (*Serva*), ditiotretitol (DTT) (*Sigma*), ekstrakt kvasca (*Liofilchem*), etanol (*GramMol*), etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) (*Sigma*), fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF) (*Sigma*), fenol (*Acros Organics*), glicerol (*Kemika*), D-glukoza (*Merck*), N-(2-hidroksietil)piperazin-N'-2-etansulfonska kiselina (Hepes) (*Fischer Bioreagents*), imidazol (*Sigma*), izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktopiranozid (IPTG) (*CarlRoth*), kalijev hidroksid (*Kemika*), kalijev klorid (*Kemika*), kanamicin (*Gibco BRL*), kloramfenikol (*Sigma*), kloroform (*Carlo Erba*), klorovodična kiselina (*Kemika*), Luria-bertani agar (LB agar) (*Liofilchem*), magnezijev klorid heksahidrat (*Kemika*), magnezijev sulfat (*Kemika*), maltoza (*Torlak*),  $\beta$ -merkaptotanol (*Sigma*), N,N'-metilenbisakrilamid (*Sigma*), natrijev acetat (*GramMol*), natrijev azid (*Sigma*), natrijev dodecilsulfat (SDS) (*CarlRoth*), natrijev hidroksid (*Kemika*), natrijev hipoklorit (*Labud*), natrijev klorid (*GramMol*), natrijev pirofosfat (*Sigma*), octena kiselina (*Kefo*), tetraciklin (*Sigma*), N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED) (*Sigma*), toluen (T. T. T.) (*GramMol*), trikloroctena kiselina (TCA) (*Kemika*), tripton (*Liofilchem*), tris(hidroksimetil)-aminometan (Tris) (*Chemsolute*), polioksietilen sorbitan monolaurat 20 (Tween20) (*Sigma*), polioksietilen sorbitan monolaurat 80 (Tween80) (*Sigma*), urea (*GramMol*).

#### 3.1.2. Aminokiseline i nukleotidi

L-Arginin (*Sigma*), ATP (*Sigma*), dNTP smjesa (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (*Sigma*), glicin (*Sigma*), L-glutaminska kiselina (*Sigma*), L-izoleucin (*Sigma*), L-leucin (*Sigma*), L-norvalin (*Sigma*), L-valin (*Sigma*).

### 3.1.3. Boje za elektroforetske metode

Bromfenol plavo (*Serva*), Coomassie Brilliant Blue G-250 (*Merck*), GelRed (*Sigma*), ksilencijan-ol-fluorofosfat (XCFF) (*Serva*).

### 3.1.4. Markeri veličina DNA i proteina

Marker za agaroznu gel-elektroforezu 1 kb DNA Ladder (*NEB*), marker za poliakrilamidnu gel-elektroforezu Precision Plus Protein Standards Unstained (*Bio-Rad*), marker za poliakrilamidnu gel-elektroforezu Precision Plus Protein Standards Prestained (*Bio-Rad*).

### 3.1.5. Enzimi, proteini i nukleinske kiseline

Albumin iz goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumin*, BSA) (*NEB*), alkalna fosfataza iz škampa (rSAP) (*NEB*), DNaza I (*NEB*), P1 ribonukleaza (*Sigma*), restrikcijske endonukleaze: *Bam*HI, *Eco*RI, *Nhe*I, *Not*I, *Sac*I, *Sal*II, *Xho*I, *Pst*I s pripadajućim puferima (*NEB*), T4-DNA-ligaza (*Takara*), Taq-DNA-polimeraza (*Thermo Scientific*), Q5-DNA-polimeraza (*NEB*), lizozim (*Merck*), termostabilna anorganska pirofosfataza (TIPP) (*NEB*).

Oligonukleotidi (*Macrogen*) korišteni kao početnice u lančanoj reakciji polimeraze i sintetski geni sintetizirani su prema potrebi (*Twist Bioscience*).

### 3.1.6. Radioaktivno obilježeni spojevi

$\alpha$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-ATP (*Perkin Elmer*), [ $^{32}\text{P}$ ]-pirofosfat (*Perkin Elmer*), [ $^{14}\text{C}$ ]-izoleucin (*Perkin Elmer*).

### 3.1.7. Komercijalni kompleti za pročišćavanje DNA

QIAprep Spin Miniprep Kit (*Qiagen*) za izolaciju plazmidne DNA, QIAquick PCR Purification Kit (*Qiagen*) za izolaciju produkata lančane reakcije polimeraze.

### 3.1.8. Hranjive podloge i mediji za uzgoj bakterije *E. coli*

- Tekuća hranjiva podloga Luria-Bertani (LB): kvaščev ekstrakt ( $\gamma = 5 \text{ g dm}^{-3}$ ), tripton ( $\gamma = 10 \text{ g dm}^{-3}$ ), NaCl ( $\gamma = 10 \text{ g dm}^{-3}$ ).
- Kruta hranjiva podloga Luria-Bertani (LB): kvaščev ekstrakt ( $\gamma = 5 \text{ g dm}^{-3}$ ), tripton ( $\gamma = 10 \text{ g dm}^{-3}$ ), NaCl ( $\gamma = 10 \text{ g dm}^{-3}$ ), agar ( $\gamma = 15 \text{ g dm}^{-3}$ ).

### 3.1.9. Sojevi bakterije *E. coli*

**BL21 (DE3)** ( $F^- ompT hsdS_B (r_B^- m_B^-) ga dcm$  (DE3), Novagen): soj korišten za prekomjernu ekspresiju gena ukloniranih u vektore iz serije pET. Soj nema gene *ompT* i *lon* zbog čega nema ekspresije Lon i OmpT proteaza. Soj sadrži gen za T7-RNA-polimerazu koji je pod kontrolom inducibilnog promotora *lacUV5* koji se inducira izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktopiranozidom (IPTG).

**Rosetta (DE3)** ( $F^- ompT hsdS_B (r_B^- m_B^-) gal dcm$  (DE3) *pRARE* ( $Cm^R$ ), Novagen): soj koji je varijanta BL21 soja i koristi se za prekomjernu ekspresiju eukariotskih proteina. Soj je optimiran za ekspresiju eukariotskih proteina jer sadrži plazmid  $Cm^R$  koji nosi gen za rezistenciju na kloramfenikol i kodira molekule tRNA s kodonima koji su slabo zastupljeni u bakteriji *E. coli*, a to su: AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA.

**DH5 $\alpha$**  (*supE44  $\Delta lacU169$  ( $\Phi 80 lacZ$ )  $\Delta M15$  hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi1 relA1, Thermo Scientific*): soj korišten za umnažanje plazmidne DNA i za kloniranje. Soj nema gen *endA1* (kodira za endonukleazu I) što sprječava nespecifičnu razgradnju DNA.

**NovaBlue** (*endA1 hsdR17 ( $r_{K12}^- m_{K12}^+$ ) supE44 thi1 recA1 gyrA96 relA1 lac F' [*proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> Z $\Delta$ M15 ::Tn10*] ( $Tet^R$ ), Novagen*): soj korišten za umnažanje plazmidne DNA i za kloniranje. Soj sadrži mutacije u genu *recA* kojom je smanjena rekombinacija plazmidne DNA i *endA* kojom je eliminirana aktivnost nespecifične endonukleaze. Soj se može koristiti i za plavo-bijelu selekciju ukoliko se koristi odgovarajući plazmid.

**XL10-Gold** ( $Tet^R \Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte$  [*F' proAB lacI<sup>q</sup> Z $\Delta$ M15 Tn10 (*Tet'*) Amy Cam*], Agilent): soj pogodan za umnažanje plazmidne DNA, transformaciju velikih molekula DNA visokom efikasnošću i za kloniranje. Soj sadrži mutacije u genu *recA* kojom je smanjena rekombinacija plazmidne DNA i *endA* kojom je eliminirana aktivnost nespecifične endonukleaze. Soj se može koristiti i za plavo-bijelu selekciju ukoliko se koristi odgovarajući plazmid.

**MachI-T1** ( $F^- \phi 80(lacZ)\Delta M15 \Delta lacX74 hsdR(r_K^- m_K^+) \Delta recA1398 endA1 tonA$ , Thermo Scientific): soj pogodan za umnažanje plazmidne DNA, transformaciju visokom efikasnošću i za kloniranje, a karakterizira ga izrazito brzi rast. Soj sadrži mutacije u genu *recA* čime je smanjena rekombinacija plazmidne DNA, *endA* čime je eliminirana aktivnost nespecifične

endonukleaze i sadrži gen *tonA* koji omogućava rezistenciju na T1 i T5 fagove. Soj se može koristiti i za plavo-bijelu selekciju ukoliko se koristi odgovarajući plazmid.

#### 3.1.10. Plazmidi

**pET28b** - plazmid iz serije vektora pET koji se koristi za prekomjernu ekspresiju proteina pod kontrolom inducibilnog promotora *T7lac*. Višestruko mjesto za kloniranje (engl. *multiple cloning site*, MCS) u pET28b je pod kontrolom T7-promotora koji prepoznaje T7-RNA-polimerazu. Gen za T7-RNA-polimerazu dio je bakterijskog kromosoma bakterije *E. coli* soja BL21(DE3) (koji se najčešće koristi za ekspresiju gena iz plazmida pET) i pod kontrolom je *lacUV5* promotora. Ekspresija T7-DNA-polimeraze inducira se dodatkom IPTG-a koji uzrokuje disocijaciju *lac*-represora s *lac*-operatora i omogućuje vezanje bakterijske RNA-polimeraze. Ekspimirana T7-RNA-polimeraza prepoznaje T7-promotor na plazmidu pET28b i započinje transkripciju gena ukloniranog u MCS. Ovaj plazmid omogućava ekspresiju proteina s histidinskim privjeskom na N- ili C-kraju koji se mogu pročistiti afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozima. Plazmid je niskokopijski i ima gen za otpornost na kanamicin. U ovom radu korišten je za ekspresiju divljeg tipa IleRS2 iz bakterije *B. megaterium*, divljeg tipa IleRS iz bakterije *E. coli* i krnjih oblika IleRS2 iz bakterije *B. megaterium*.

**pET24d** - plazmid iz serije vektora pET koji se koristi za prekomjernu ekspresiju proteina pod kontrolom inducibilnog promotora *T7lac* (princip opisan kod plazmida pET28b). Omogućava ekspresiju proteina s histidinskim privjeskom na C-kraju koji se mogu pročistiti afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozima. Plazmid ima gen za otpornost na kanamicin. Razlika između pET28 i pET24 je ta što pET24 omogućuje ekspresiju s histidinski privjeskom samo na C-kraju i što pET28 ima mjesto za cijepanje privjeska trombinom dok pET24 nema. U ovom radu korišten je za ekspresiju TEV-proteaze.

**ΔpET3a** - derivat plazmida pET3a iz serije vektora pET za prekomjernu ekspresiju pod kontrolom inducibilnog promotora *T7lac* (princip opisan kod plazmida pET28b). Plazmid je niskokopijski, ima gen za otpornost na ampicilin i omogućava prekomjernu ekspresiju proteina s T7-privjeskom na N-kraju koji se mogu pročistiti uz smolu sa specifičnim antitijelima. U ovom radu korišten je za prekomjernu ekspresiju tRNA<sup>Ile</sup>.

**pGEX-6P-3** - koristi se za prekomjernu ekspresiju proteina pod kontrolom inducibilnog promotora *tac*. *tac* je hibridni sintetski promotor sastavljen od dijelova *trp* promotora i *lacUV5* operatora. Ova kombinacija omogućuje visoku razinu ekspresije jer je *trp* tri puta jači promotor od *lac*, a pritom se koristi isti princip indukcije kao kod *lac* promotora (indukcija IPTG-om). Omogućava ekspresiju rekombinantnih proteina s GST-privjeskom na N-kraju proteina koji se mogu pročitati afinitetnom kromatografijom na glutation agarozu, a GST-privjesak se uklanja cijepanjem proteazom PreScission. Plazmid je niskokopijski i ima gen za otpornost na ampicilin. U ovom radu korišten je za ekspresiju krnjih oblika IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* s GST-privjeskom.

**pMAL-c2x** - koristi se za prekomjernu ekspresiju proteina pod kontrolom inducibilnog promotora *tac*, a ekspresija se inducira IPTG-om. Omogućava ekspresiju rekombinantnih proteina s MBP-privjeskom na N-kraju proteina koji se mogu pročitati afinitetnom kromatografijom na dekstrin agarozu, a MBP-privjesak se uklanja cijepanjem s proteazom *Factor Xa*. Plazmid je niskokopijski i ima gen za otpornost na ampicilin. U ovom radu plazmid je modificiran tako da mu je mjesto prepoznavanja za *Factor Xa* zamijenjeno mjestom prepoznavanja za TEV-proteazu (modificirani plazmid nazvan je pMAL-c2x-TEV). Nakon modifikacije korišten je za ekspresiju krnjih oblika IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* s MBP-privjeskom.

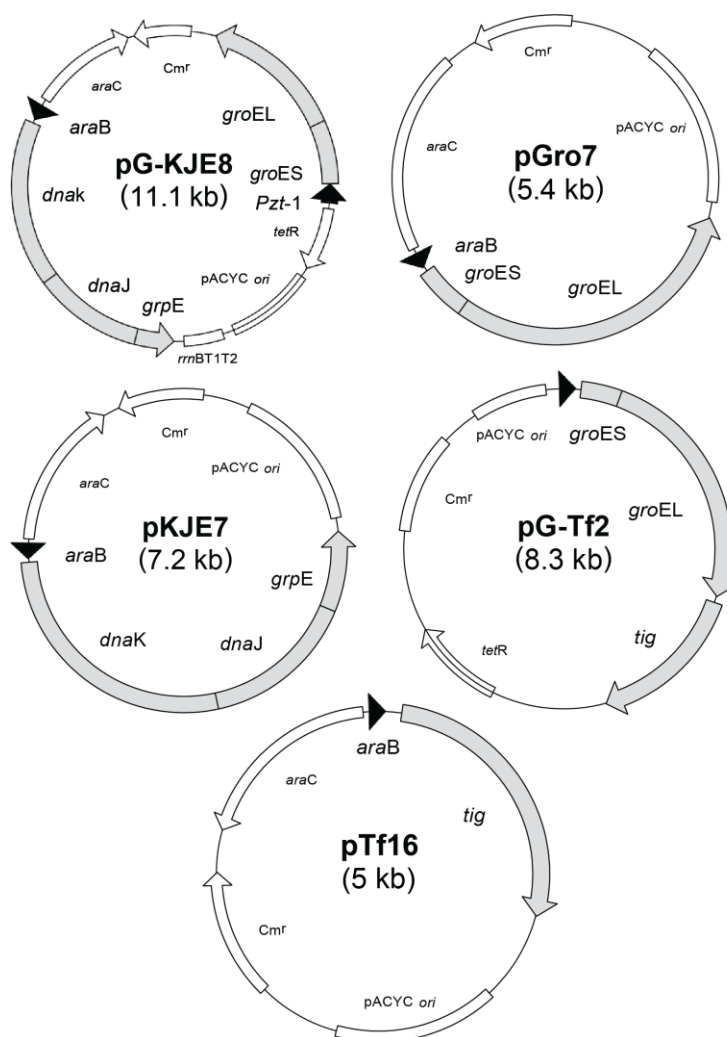
**pG-KJE8** (*Takara*) - koristi se za prekomjernu ekspresiju šaperona DnaK, DnaJ, GrpE, GroES i GroEL pod kontrolom inducibilnog promotora *araB* (*dnaK*, *dnaJ*, *grpE*) i *Pzt-1* (*groES*, *groEL*). Plazmid ima gene za otpornost na kloramfenikol i tetraciklin. Ekspresija se inducira dodatkom arabinoze (*araB*) i tetraciklina (*Pzt-1*). Mapa plazmida nalazi se na slici 3.1. U ovom radu korišten je za koekspresiju navedenih šaperona s krnjim oblicima IleRS2 iz bakterije *B. megaterium*.

**pGro7** (*Takara*) - koristi se za prekomjernu ekspresiju šaperona GroES i GroEL pod kontrolom inducibilnog promotora *araB* (*groES*, *groEL*). Plazmid ima gen za otpornost na kloramfenikol. Ekspresija se inducira dodatkom arabinoze. Mapa plazmida nalazi se na slici 3.1. U ovom radu korišten je za koekspresiju navedenih šaperona s krnjim oblicima IleRS2 iz bakterija *B. megaterium*.

**pKJE7** (*Takara*) - koristi se za prekomjernu ekspresiju šaperona DnaK, DnaJ i GrpE pod kontrolom inducibilnog promotora *araB* (*dnaK*, *dnaJ*, *grpE*). Plazmid ima gen za otpornost na kloramfenikol. Ekspresija se inducira dodatkom arabinoze. Mapa plazmida nalazi se na slici 3.1. U ovom radu korišten je za koekspresiju navedenih šaperona s krnjim oblicima IleRS2 iz bakterije *B. megaterium*.

**pG-Tf2** (*Takara*) - koristi se za prekomjernu ekspresiju šaperona GroES, GroEL i Tig (engl. *trigger factor*) pod kontrolom inducibilnog promotora *Pzt-1* (*groES*, *groEL*, *tig*). Plazmid ima gen za otpornost na kloramfenikol i tetraciklin. Ekspresija se inducira dodatkom tetraciklina. Mapa plazmida nalazi se na slici 3.1. U ovom radu korišten je za koekspresiju navedenih šaperona s krnjim oblicima IleRS2 iz bakterije *B. megaterium*.

**pG-Tf16** (*Takara*) - koristi se za prekomjernu ekspresiju šaperona Tig pod kontrolom inducibilnog promotora *araB*. Plazmid ima gen za otpornost na kloramfenikol. Ekspresija se inducira dodatkom arabinoze. Mapa plazmida nalazi se na slici 3.1. U ovom radu korišten je za koekspresiju navedenog šaperona s krnjim oblicima IleRS2 iz bakterije *B. megaterium*.



Slika 3.1. Mapa plazmida pG-KJE8, pGro7, pKJE7, pG-Tf2 i pG-Tf16.

### 3.1.11. Kromatografski materijali

Bio-Rad standard za gel-filtraciju na kolonama Superdex200 (Bio-Rad), HP HisTrap (Cytiva), Ni-NTA agaroz (Qiagen), kromatografska kolona Superdex Increase 75 10/300 GL (GE Healthcare), kromatografska kolona Superdex Increase 200 5/150 GL (GE Healthcare), kromatografska kolona Superdex Increase 200 10/300 GL (GE Healthcare), MBPTrap (Cytiva), PD-10 gel-filtracijska kolona (GE Healthcare), pločice za tankoslojnu kromatografiju od polietilenimin-celuloze (Macherey Nagel).

### 3.1.12. Ostali materijali

BugBuster (Millipore), Centrikoni Amicon® Ultra centrifugal filters (Millipore), filter papir (Whatman 3MM), filteri s promjerom pora 0,2  $\mu\text{m}$  (Whatman), mikrotitarske pločice (Kisker),

set za agaroznu, odnosno poliakrilamidnu elektroforezu (*Bio-Rad*), zaslon s uskladištenim fosforom (*GE Healthcare*).

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Metode rada s bakterijama

U sljedećim poglavljima opisane su metode rada s bakterijama koji podrazumijeva sterilne uvjete. Kako bi se osigurali sterilni uvjeti eksperimenti su izvođeni u laminaru, uz plamen te korištenje sterilnih kemikalija, laboratorijskog posuđa i pribora. Kemikalije se steriliziraju autoklaviranjem ili filtriranjem kroz sterilne filtere s porama veličine 0,22  $\mu\text{m}$ , a posuđe autoklaviranjem.

#### 3.2.1.1. Transformacija bakterijskih stanica elektroporacijom

Elektroporacija je metoda transformacije bakterijskih stanica. Metoda se temelji na primjeni kratkog električnog pulsa koji povećava propusnost bakterijske stijenke stvarajući pore. Uslijed povećane propusnosti strana DNA može ući u stanicu. Za izvođenje elektroporacije korišten je uređaj MicroPulser (*Bio-Rad*). U alikvot od 50  $\mu\text{L}$  elektrokompetentnih bakterija *E. coli* dodan je plazmid mase 1-100 ng ovisno o plazmidu i soju bakterija. Suspenzija je prebačena u ohlađenu elektrokivetu, postavljena je u pripadni držač za kivete koji je također ohlađen na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  i primijenjen je električni puls od 2,5 kV/cm u trajanju od 4-6 ms. Stanice su resuspendirane u 950  $\mu\text{L}$  tekućeg LB medija zagrijanog na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  te su inkubirane 1 h pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  i 300 okretaja u minuti (engl. *revolutions per minute*, rpm). Zatim je 50 do 1000  $\mu\text{L}$  bakterijske suspenzije razmazano na krutu hranjivu podlogu s antibiotikom. Plazmidi kojima se vrši transformacija sadrže gene za otpornost na određeni antibiotik pa se u sastav krute podloge dodaje plazmidu pripadni antibiotik. Na krutim podlogama rasti će samo one bakterije koje su transformirane. Bakterijske stanice na krutim podlogama inkubiraju se preko noći na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Provedena je i uspješna kotransformacija uz dva plazmida.

#### 3.2.1.2. Priprema elektrokompetentnih stanica bakterije *E. coli*

Elektrokompetentne stanice su stanice pogodne za unos strane DNA metodom elektroporacije. Kako bi proces elektroporacije koji uključuje primjenu električnih impulsa bio uspješan, suspenzije stanica moraju biti optimalno pripravljene. Priprema stanica započeta je uzgojem prekonocne kulture bakterije *E. coli* soj BL21(DE3) u 5 mL LB medija bez antibiotika na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



Prekonoćna kultura razrijeđena je u 500 mL LB medija bez antibiotika i uzgajana na 37 °C i 250 rpm do vrijednosti optičke gustoće  $OD_{600}$  0,4-0,6. Kulture su ohlađene 10 min na ledu i istaložene centrifugiranjem 15 min pri 4 °C i  $5000 \times g$ . Supernatant je odličen, a talog bakterijskih kultura resuspendiran u 500 mL glicerola ( $\varphi = 10 \%$ ) ohlađenog na 4 °C. Resuspendiranje, odnosno ispiranje glicerolom provedeno je kako bi se uklonio hranjivi medij i soli te spriječilo iskretnje tijekom procesa elektroporacije. Postupak taloženja i ispiranje su ponovljeni još jednom, a talog stanica posljednji put resuspendiran u 3 mL glicerola ( $\varphi = 10 \%$ ) i podijeljen u alikvote od 50  $\mu$ L koji su spremljeni na -80 °C. Pripremljene stanice su testirane elektroporacijom uz testni plazmid (postupak elektroporacije opisan u poglavlju 3.2.1.1.).

#### 3.2.1.3. Priprema glicerolskih bakterijskih kultura

Kako bi se sačuvale bakterijske kolonije sa željenim plazmidom bakterije su pohranjene u obliku glicerolskih kultura. Uzgojeno je 5 mL prekonoćne kulture uz antibiotik za koji plazmid nosi gen za otpornost. Nakon cca 15 h uzgoja u posebne plastične tubice za pohranu glicerolskih kultura odvojeno je 1 mL bakterijske kulture i dodano 200  $\mu$ L glicerola ( $\varphi = 70 \%$ ), odnosno tako da konačni udio glicerola bude  $\varphi \approx 10$ -15 %. Glicerolske kulture spremljene su na -80 °C.

#### 3.2.1.4. Praćenje rasta bakterijskih stanica

Rast bakterijskih stanica tijekom uzgoja praćen je spektrofotometrijskim mjerenjem turbiditeta pri 600 nm, odnosno optičke gustoće (engl. *optical density*,  $OD_{600}$ ). Turbiditet je mjera za zamućenje otopine koje je u ovom slučaju posljedica raspršenja upadne svjetlosti na bakterijskim stanicama. Detektor uređaja mjeri smanjenje intenziteta zračenja (s obzirom na upadno zračenje) uzrokovano raspršenjem svjetlosti na uzorku. Važno je naglasiti da uređaj ne raspoznaje dolazi li do smanjenja intenziteta zbog raspršenja ili apsorbcije zračenja. Budući da bakterijske stanice (ukoliko nisu pigmentirane) i uobičajeno korišteni hranjivi mediji ne apsorbiraju značajno svjetlost pri valnoj duljini od 600 nm, smanjenje intenziteta uglavnom je posljedica je raspršenja svjetlosti. Zbog prethodno navedenog koristi se valna duljina upadnog zračenja od 600 nm, ali i zbog toga što ne oštećuje bakterijske stanice. Uređaj se nulira mjerenjem apsorbcije „slijepe probe“, odnosno matrice željenog uzorka bez analita, u ovom slučaju korišten je LB medij u kojemu su uzgajane bakterije. Korišten je spektrofotometar Ultrospec 10 Cell Density Meter (*Amersham Biosciences*).

3.2.1.5. *Test in vivo komplementacije*

Test *in vivo* komplementacije je metoda testiranja funkcionalnosti nekog proteina u stanicama praćenjem preživljenja ili mogućnosti obavljanja funkcije u stanicama. U ovom radu korištena je za testiranje preživljenja bakterije *E. coli* soja BL21(DE3) na krutoj LB agar hranjivoj podlozi uz mupirocin i ekspresiju krnjih varijanti IleRS2 iz bakterije *B. megaterium*. Mupirocin inhibira IleRS iz bakterije *E. coli*, a divlji tip IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* ima otpornost na mupirocin. Budući da je IleRS bakterije *E. coli* neophodan za život na ovaj način prati se funkcionalnost krnjih varijanti IleRS2 praćenjem preživljenja bakterija u prisutnosti mupirocina. Prvo su uzgojene prekonoćne kulture u 5 mL LB medija uz dodatak odgovarajućeg antibiotika. Izmjerene su vrijednosti OD<sub>600</sub> i usklađene razrjeđivanjem na OD<sub>600</sub> = 3-5. Zatim su pripremljeni alikvoti kultura razrijeđeni 10 ×, 100 ×, 1000 ×, 10000 × u MiliQ sterilnoj vodi. Naneseno je 10 µL početne kulture usklađenog OD<sub>600</sub> i svakog razrjeđenja na LB-agar krute hranjive podloge s odgovarajućim antibioticima, aditivima potrebnim za rast i indukciju ekspresije te mupirocinom (tablica 3.1.). Stanice su inkubirane na 20 °C i 30 °C, 2-7 dana ovisno o brzini rasta.

**Tablica 3.1. Antibiotici i aditivi u sastavu krutih hranjivih podloge za *in vivo* komplementaciju. Oznaka + 1 u nazivu eksprimiranih proteina označava set šaperona 1 (DnaK, DnaJ, GroEL, GroES i GrpE), odnosno da su proteini koeksprimirani s ovim setom šaperona.**

Eksprimirani proteini	Antibiotik	Ostali aditivi
A_ BmIleRS2 C_ BmIleRS2 WT BmIleRS2 EcBmIleRS pET28	kanamicin 30 µg/mL mupirocin Ø, 50-200 µM	ZnCl <sub>2</sub> 1 mM IPTG 50-100 µM
A_ BmIleRS2 + 1 C_ BmIleRS2 + 1 WT BmIleRS2 + 1 EcBmIleRS + 1 pET28 + 1	kanamicin 30 µg/mL kloramfenikol 34 µg/mL mupirocin Ø, 10 - 200 µM tetraciklin 5 ng/mL	ZnCl <sub>2</sub> 1 mM MgCl <sub>2</sub> 1mM IPTG 50 µM L-arabinoza 0,5 mg/mL
A_ BmIleRS2 + ΔpET3a C_ BmIleRS2 + ΔpET3a WT BmIleRS2 + ΔpET3a EcBmIleRS + ΔpET3a pET28 + ΔpET3a	kanamicin 30 µg/mL ampicilin 100 µg/mL mupirocin Ø, 150 µM	ZnCl <sub>2</sub> 1 mM IPTG 100 µM

### 3.2.2. Metode rada s nukleinskim kiselinama

#### 3.2.2.1. Izolacija plazmidne DNA

Plazmidna DNA izolirana je i pročišćena komercijalnim kompletom QIAprep Spin Miniprep Kit (*Qiagen*) prema uputama proizvođača. Tijekom postupaka pročišćavanja istaložene stanice iz prekonoćne kulture razbijene su alkalnom lizom uz SDS i NaOH, a pritom su denaturirani proteini i molekule DNA. Neutralizacijom uz otopinu kalijeva acetata i gvanidin hidroklorida istaloženi su kompleksi proteina, SDS-a i genomske DNA, dok je plazmidna DNA renaturirana. Nakon taloženja netopljivih komponenti centrifugiranjem, supernatant s plazmidnom DNA nanesen je na kolone ispunjene silika-gelom koji veže DNA u prisutnosti kaotropne soli. Kolona je isprana puferom s etanolom da bi se isprale soli iz neutralizacijske otopine, a zatim je DNA vezana na koloni eluirana otopinom pufera niske ionske jakosti.

#### 3.2.2.2. Agarozna gel-elektroforeza

Agarozna gel-elektroforeza je metoda odvajanja molekula DNA na temelju njihove veličine. Kretanje DNA u agaroznom gelu temelji se na principu putovanja nabijene molekule u električnom polju. Kako svaka molekula DNA ima jednak naboj (fosfatne skupine) po nukleotidu, omjer mase i naboja biti će jednak za sve DNA, a razlike u brzini kretanja na gelu ovisit će samo o veličini i obliku molekule. DNA molekule su negativno nabijene pa se kreću od negativno nabijene katode prema pozitivno nabijenoj anodi.

Agarozni gelovi s 1 % (w/V) agaroze pripremljeni su otapanjem 3 g agaroze u 300 mL otopine  $1 \times \text{TAE}$  ( $c(\text{Tris}) = 40 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{EDTA}) = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$  titrirana octenom kiselinom do  $\text{pH} = 8,0$ ). Agarozu je otopljena grijanjem u mikrovalnoj pećnici nekoliko minuta, ohlađena pod mlazom vode kako ne bi došlo do značajnog isparavanja, a zatim izlivena u odgovarajuće kalupe. Prije elektroforeze uzorci su pripremljeni miješanjem s otopinom za nanošenje ( $\gamma$  (ksilencijanolfosforat) =  $2 \text{ g dm}^{-3}$ ,  $\gamma$  (bromfenolno plavilo) =  $2,5 \text{ g dm}^{-3}$ ,  $c(\text{EDTA}) = 0,07 \text{ mol dm}^{-3}$   $\text{pH} = 8,0$ ,  $\varphi$  (glicerol) = 30 %, GelRed (*Sigma*) razrijeđen  $10\,000 \times$ ) u omjeru 1:10 (otopina za nanošenje:uzorak). GelRed je dimer etidijevog bromida premošten dugom razmaknicom, a vizualizacija DNA uz GelRed temelji se na interkalaciji boje između parova baza DNA. Nastali kompleks ekscitiran je pri  $\lambda = 300 \text{ nm}$ , a do emisije dolazi pri  $\lambda = 590 \text{ nm}$ . Elektroforeza je provedena u otopini  $1 \times \text{TAE}$  pri 120 V u trajanju 40 min. Korištena je aparatura za horizontalnu elektroforezu EPS 600 (*Pharmacia Biotech*). Nakon elektroforeze

gelovi su snimljeni pomoću kamere MiniBIS Pro (*Bio-Imaging Systems*). Kao marker veličina korišten je 1 kb DNA Ladder (*NEB*).

#### 3.2.2.3. Određivanje koncentracije nukleinskih kiselina

Koncentracije nukleinskih kiselina određene su spektrofotometrijski na uređaju *NanoDrop One* (*Thermo Scientific*). Spektrofotometar je jednosnopen pa ga je potrebno nulirati otopinom određenog sastava ili MiliQ vodom ovisno u čemu je otopljena nukleinska kiselina. Naneseno je 2  $\mu$ L uzorka i izmjerena je apsorbancija pri  $\lambda = 260$  nm. Koncentracija DNA određena je na temelju podatka da 50  $\mu$ g čiste DNA ima vrijednost  $A_{260} = 1$ . Omjeri  $A_{260}/A_{280}$  i  $A_{260}/A_{230}$  daju informaciju o onečišćenju uzorka proteinima, odnosno organskim tvarima (tim redom). Prihvaćene vrijednosti za čistu DNA su oko 1,8 za omjer  $A_{260}/A_{280}$  i 2,0-2,2 za  $A_{260}/A_{230}$ .<sup>93</sup>

#### 3.2.2.4. Lančana reakcija polimeraze

Lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) je rutinska metoda za *in vitro* selektivno umnažanje fragmenata DNA. Reakcija se sastoji od tri koraka koji se ponavljaju u određenom broju ciklusa (najčešće oko 30). Prvi korak je termička denaturacija u kojoj se dva lanca DNA odvajaju, drugi korak je komplementarno sparivanje DNA i oligonukleotidnih početnica koje omeđuju dio koji se želi umnožiti, a posljednji korak je produljivanje oligonukleotidnih početnica DNA-polimerazom. Na kraju n ciklusa u reakcijskoj smjesi bi trebalo biti  $2^n$  kopija fragmenta DNA. Sastav PCR smjese i uvjeti pri kojima je proveden PCR navedeni su u tablicama 3.2. i 3.3. Korištena je Q5-DNA-polimeraza visoke vjernosti s 3'→5' egzonukleaznom aktivnošću. Uspješnost PCR-a provjerena je elektroforezom na agaroznom gelu. U ovom radu PCR je korišten za:

- umnažanje krnjih varijanti IleRS2 iz *B. megaterium* ukloniranih u pET28b uz početnice s odgovarajućim restrikcijskim mjestima za kloniranje u plazmid pMAL-c2x\_TEV,
- umnažanje krnjih varijanti IleRS2 iz *B. megaterium* ukloniranih u pET28b uz početnice s odgovarajućim restrikcijskim mjestima za kloniranje u plazmid pGEX-6P-3.

Početnice korištene u ovim PCR reakcijama navedene su u tablici 3.4., a naručene su od tvrtke *Macrogen*.

Tablica 3.2. Sastav smjesa za PCR.

	Početne koncentracije	Konačne koncentracije
Q5 pufer	5×	1×
dNTP	10 mmol dm <sup>-3</sup>	200 μmol dm <sup>-3</sup>
uzvodna početnica	10 μmol dm <sup>-3</sup>	0,5 μmol dm <sup>-3</sup>
nizvodna početnica	10 μmol dm <sup>-3</sup>	0,5 μmol dm <sup>-3</sup>
DNA kalup	10-220 ng μL <sup>-1</sup>	2 ng μL <sup>-1</sup>
Q5-DNA-polimeraza	2000 U mL <sup>-1</sup>	0,02 U mL <sup>-1</sup>

Tablica 3.3. Uvjeti pri kojima je proveden PCR. Inicijalna denaturacija provodi se samo u prvom ciklusu, a završno produljenje samo u posljednjem ciklusu.

Broj ciklusa	32	
Korak	$T_{\text{ekspresije}} / ^\circ\text{C}$	$t / \text{s}$
Inicijalna denaturacija	98	30
Denaturacija	98	10
Sparivanjem početnica	62	20
Produljenje	72	60
Završno produljenje	72	120

Tablica 3.4. Početnice korištene u PCR reakcijama. Oznake A, B, C u nazivima početnica odnose se na različite konstrukte IleRS iz bakterije *B. megaterium* koji su opisani u poglavlju 4.1. Podcrtani nukleotidi u sljedovima označavaju restrikcijska mjesta koja prepoznaju restrikcijske endonukleaze navedene u nazivu početnica.

Naziv početnice	Nukleotidni slijed 5'→3'	Ciljni plazmid za ugradnju
A_IleRS_BamHI_F	5' GAGAG <u>GGATCC</u> ATGAAAGAAGTGAATGTCCGAGA 3'	pGEX-6P-3 i pMAL-c2x
A_IleRS_XhoI_R	5' TGGT <u>GCTCGAG</u> TTAATTAACCTTTAGTCTGGTCGC 3'	pGEX-6P-3
B_IleRS_SalI_F	5' GAGAG <u>GTCGAC</u> ATGAAGGAAGTCAATGTTTCGCGA 3'	pGEX-6P-3
B_IleRS_NotI_R	5' GAGAG <u>GCGCCGC</u> TTAGTTCACTTTAGTTTGATCGC 3'	pGEX-6P-3
C_IleRS_BamHI_F	5' GAGAG <u>GGATCC</u> ATGAAAGAAGTGAATGTAAGGGA 3'	pGEX-6P-3 i pMAL-c2x
C_IleRS_XhoI_R	5' TGGT <u>GCTCGAG</u> TCAGTTCACTTTTCGTTTGATCAC 3'	pGEX-6P-3
A_IleRS_PstI_R	5' GAGAG <u>CTGCAG</u> TTAATTAACCTTTAGTCTGGTCGC 3'	pMAL-c2x
B_IleRS_EcoRI_F	5' GAGAG <u>GAATTC</u> ATGAAGGAAGTCAATGTTTCGCGA 3'	pMAL-c2x
B_IleRS_SalI_R	5' GAGAG <u>GTCGAC</u> TTAGTTCACTTTAGTTTGATCGC 3'	pMAL-c2x
C_IleRS_PstI_R	5' GAGAG <u>CTGCAG</u> TCAGTTCACTTTTCGTTTGATCAC 3'	pMAL-c2x

## 3.2.2.5. Lančana reakcija polimerazom na bakterijskim kolonijama

Lančana reakcija polimerazom na bakterijskim kolonijama (engl. *colony PCR*) je metoda koja se najčešće koristi za utvrđivanje prisutnosti određenog fragmenta DNA, odnosno plazmida s ugrađenim fragmentom DNA u bakterijskim kolonijama. Metoda se razlikuje od klasičnog PCR-a opisanog u prethodnom poglavlju po duljini trajanja početne denaturacije koja se produljuje radi razbijanja stanica (uvjeti u tablici 3.6.), sastavu reakcijske smjese (prikazan u tablici 3.5.) i korištenoj DNA-polimerazi. Bakterijske kolonije su u reakcijsku smjesu dodane na način da je vrhom nastavka pipete dotaknuta kolonija na krutoj hranjivoj podlozi, a zatim je vrh uronjen u reakcijsku smjesu i smjesa resuspendirana. Korištena je Taq-DNA-polimeraza koja nema 3'→5' egzonukleaznu aktivnost pa nema svojstvo visoke vjernosti koje nije bitno u ovom slučaju jer se PCR radi samo radi provjere prisutnosti rekombinantnog plazmida. PCR na bakterijskim stanicama u ovom radu korišten je za:

- provjeru prisutnosti rekombinantnog plazmida pMAL-c2x\_TEV (s ugrađenim mjestom prepoznavanja za TEV-proteazu) u bakterijskim kolonijama,
- provjeru prisutnosti rekombinantnog plazmida pGEX-6P-3 s ugrađenim genima za krnje varijante IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* u bakterijskim kolonijama,
- provjeru prisutnosti rekombinantnog plazmida pMAL-c2x\_TEV s ugrađenim genima za krnje varijante IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* u bakterijskim kolonijama.

**Tablica 3.5. Sastav PCR smjese za PCR na bakterijskim kolonijama.**

	Početne koncentracije	Konačne koncentracije
Q5 pufer	5 ×	1 ×
dNTP	1 mmol dm <sup>-3</sup>	200 μmol dm <sup>-3</sup>
uzvodna početnica	10 μmol dm <sup>-3</sup>	0,5 μmol dm <sup>-3</sup>
nizvodna početnica	10 μmol dm <sup>-3</sup>	0,5 μmol dm <sup>-3</sup>
MgCl <sub>2</sub>	25 mmol dm <sup>-3</sup>	1,5 mmol dm <sup>-3</sup>
Q5-DNA-polimeraza	1000 U mL <sup>-1</sup>	0,025 U μL <sup>-1</sup>
+ uzorak bakterijske kolonije		

**Tablica 3.6. Uvjeti pri kojima je proveden PCR na bakterijskim kolonijama. Inicijalna denaturacija provodi se samo u prvom, a završno produljenje samo u posljednjem ciklusu.**

Broj ciklusa	32	
Korak	$T_{\text{ekspresije}} / ^\circ\text{C}$	$t / \text{s}$
Inicijalna denaturacija	95	300
Denaturacija	95	30
Sparivanjem početnica	62	30
Produljenje	72	60
Završno produljenje	72	300

#### 3.2.2.6. Pročišćavanje produkta lančane reakcije polimeraze

Fragmenti DNA umnoženi PCR-om izolirani su i pročišćeni komercijalnim kompletom QIAquick PCR Purification Kit (*Qiagen*) prema uputama proizvođača. Ovim kompletom pročišćeni su i produkti restrikcijske razgradnje i ligacije uz T4-DNA-ligazu u postupku kloniranja opisanom u poglavlju 3.2.2.7. Postupak i sastav korištenih otopina je gotovo identičan izolaciji plazmidne DNA opisane u poglavlju 3.2.2.1. nakon koraka lize stanica i denaturacije.

#### 3.2.2.7. Razgradnja restrikcijskim endonukleazama i ligacija

Restrikcijske endonukleaze su enzimi prisutni u prokariotima koji razgrađuju stranu DNA hidrolizirajući fosfodietersku vezu. Restrikcijske endonukleaze tipa II prepoznaju palindromske sljedove veličine 4-8 nukleotida unutar molekule DNA, a cijepanjem nastaju stršeci ili tupi krajevi. Cijepanjem palindromskih sljedova istom restrikcijskom endonukleazom nastaju komplementarni krajevi.

T4-DNA-ligaza je enzim koji katalizira nastajanje fosfodieterske veze između dva polinukleotidna lanca uz utrošak jedne molekule ATP-a. Jedan lanac mora imati fosfatnu skupinu na 5' kraju, a drugi hidroksilnu na 3' kraju zbog mehanizma katalize reakcije. Amino skupina lizina iz ligaze nukleofilno napada  $\alpha$ -atom fosfora ATP-a pri čemu izlazi PPi, a nastaje ligaza-Lys-AMP. Kisik 5' fosfatne skupine jednog lanca molekule DNA nukleofilno napada  $\alpha$ -atom fosfora ligaza-Lys-AMP-a te nastaje DNA-AMP. U posljednjem koraku 3' OH skupina

drugog polinukleotidnog lanca nukleofilno napada aktiviranu 5' fosfatnu skupinu drugog lanca te nastaje fosfodieterska veza.

Restriksijske endonukleaze i T4-DNA-ligaze koriste se za konstrukciju rekombinantnih plazmida, odnosno kloniranje gena u plazmidne vektore. Restriksijskim endonukleazama generiraju se stršeći komplementarni krajevi u DNA fragmentu i ciljnom plazmidu koji se potom kovalentno povezuju T4-DNA-ligazom. Budući da restriksijske endonukleaze na 5' krajevima ostavljaju fosfatnu skupinu, a na 3' krajevima hidroksilnu, može doći do ponovne ligacije plazmida sa samim sobom pa se koristi alkalna fosfataza kako bi se defosforilirali krajevi. Restriksijske endonukleaze koriste se i za restriksijsku analizu rekombinantnih plazmida kako bi se provjerilo je li ugrađen željeni DNA fragment (insert). Nakon cijepanja nastali fragmenti se analiziraju elektroforezom na agaroznom gelu. U ovom radu restriksijske endonukleaze i T4-DNA-ligaze korištene su za generiranje rekombinantnih plazmida, ali i za restriksijsku analizu istih:

- pMAL-c2x\_TEV s ugrađenim TEV-mjestom koje prepoznaje TEV-proteaza,
- pMAL-c2x\_TEV s ugrađenim krnjim varijantama IleRS2 iz bakterije *B. megaterium*,
- pGEX-6P-3 s ugrađenim krnjim varijantama IleRS2 iz bakterije *B. megaterium*.

Pripremljene su restriksijske smjese od 50 µL zasebno za plazmid i insert, a sastav reakcijskih smjesa naveden je u tablici 3.7. Pufferi su prilagođeni pojedinim restriksijskim endonukleazama. Smjese su inkubirane 4 sata na 37 °C, a 30 min prije kraja dodana je alkalna fosfataza iz škampa (rSAP) konačne koncentracije 0,02 U/µl reakcijskoj smjesi s plazmidom. Restriksijske endonukleaze inaktivirane su zagrijavanjem 5 min na 65 °C. DNA iz obje reakcijske smjese pročišćene su uz QIAquick PCR Purification Kit (*Qiagen*) te im je određena koncentracija. Pripremljene su ligacijske smjese od 20 µL, a njihov sastav naveden je u tablici 3.8. Plazmid i insert dodani su u omjeru otprilike 1:5 (uspješno je testirano i s 1:2). Ligacijska smjesa inkubira se 1 h na 25 °C. Rekombinantna DNA pročišćena je QIAquick PCR Purification Kit (*Qiagen*) te joj je izmjerena koncentracija na spektrofotometru *NanoDrop One*. Za transformaciju elektrokompetentnih stanica prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.1.2. korišteno je 2,5 µL ligacijske smjese i 50 µL stanica. Korištene restriksijske endonukleaze navedene su u tablici 3.9. Rekombinantni plazmidi sekvencirani su kako bi se provjerila uspješnost ugradnje. Sekvenciranje je provela tvrtka *Macrogen*.



**Tablica 3.7. Sastav restriksijske reakcijske smjese. Početne koncentracije DNA variraju ovisno o plazmidu i insertu, a puferi ovisno o restriksijskim endonukleazama.**

	Početne koncentracije	Konačne koncentracije
Pufer (rCutSmart, NEB 3.1, NEB, 2.1)	10 ×	1 ×
DNA	0,1 – 1,5 µg/µL	0,04 µg/µL
restriksijska endonukleaza 1	20 U/µL	0,4 U/µL
restriksijska endonukleaza 2	20 U/µL	0,4 U/µL

**Tablica 3.8. Sastav ligacijske reakcijske smjese. Početne koncentracije DNA variraju ovisno o plazmidu i insertu.**

	Početne koncentracije	Konačne koncentracije
T4 pufer	10 ×	1 ×
DNA	30 – 80 ng/µL	5 ng/µL (plazmid), 25 ng/µL (insert)
T4-DNA-ligaza	350 U/µL	17,5 U/µL

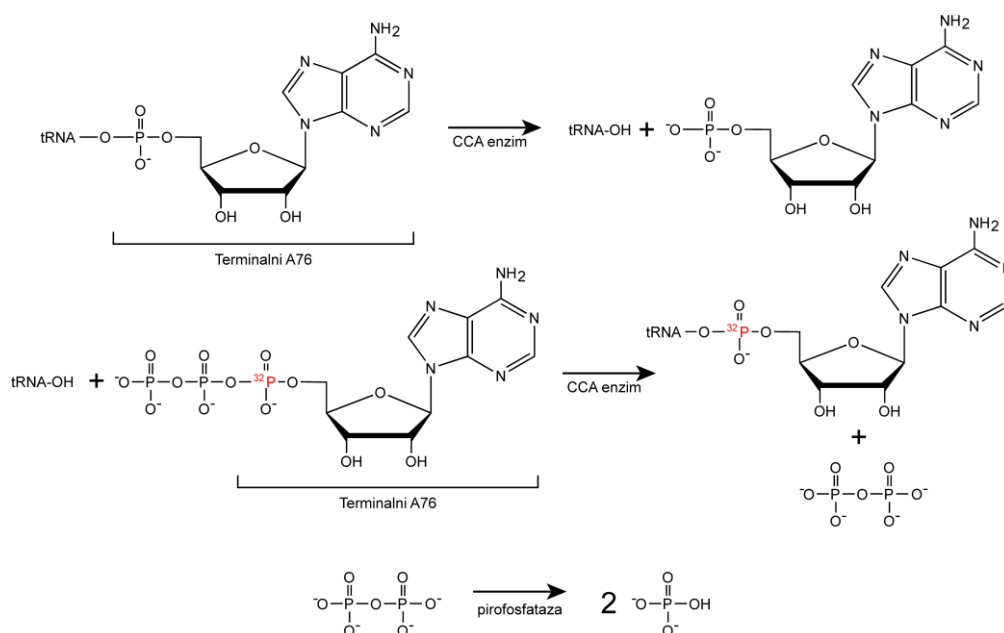
**Tablica 3.9. Restriksijske endonukleaze korištene za kloniranje i restriksijske analize. Oznake A, B, C u nazivima rekombinantnih plazmida odnose se na različite konstrukte IleRS iz bakterije *B. megaterium* koji su opisani u poglavlju 4.1.**

Konačni plazmid	Restriksijska endonukleaza I	Restriksijska endonukleaza II
pMAL-c2x_TEV	<i>SacI</i>	<i>EcoRI</i>
A_pGEX-6P-3	<i>XhoI</i>	<i>BamHI</i>
B_pGEX-6P-3	<i>SalI</i>	<i>NotI</i>
C_pGEX-6P-3	<i>XhoI</i>	<i>BamHI</i>
A_pMAL-c2x_TEV	<i>BamHI</i>	<i>PstI</i>
B_pMAL-c2x_TEV	<i>EcoRI</i>	<i>SalI</i>
C_pMAL-c2x_TEV	<i>BamHI</i>	<i>PstI</i>

#### 3.2.2.8. Obilježavanje tRNA radioaktivnim izotopom [<sup>32</sup>P]

Kako bi se mogla pratiti reakcija aminoaciliranja uz radioaktivno obilježenu [<sup>32</sup>P]-tRNA kao što je kasnije opisano u poglavlju 3.2.4.3., potrebno je prvo obilježiti tRNA s [<sup>32</sup>P] prema standardiziranom postupku. jskih privjes<sup>94,95</sup> Obilježavanje tRNA, kao i sva kinetička mjerenja u radu koja uključuju korištenje radioaktivnih kemikalija, izveo je dr. sc. Igor Živković. Kao

izvor radioaktivnog  $[^{32}\text{P}]$  korišten je  $\alpha$ - $[^{32}\text{P}]$ -ATP, a enzim tRNA-nukleotidil-transferaza (CCA enzim) korišten je za katalizu reakcije obilježavanja. CCA prvo katalizira odgradnju terminalnog A76 iz tRNA, a zatim se dodatkom pirofosfataze potiče ligacija obilježenog  $[^{32}\text{P}]$ -ATP pri čemu izlazi pirofosfat kao izlazna skupina (slika 3.2.). Rezultat ove reakcije je tRNA s  $[^{32}\text{P}]$ -obilježenim fosfatom u fosfodieterskoj vezi između A76 i C75. Reakcijska smjesa za obilježavanje sadrži Tris ( $c = 200 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 8,0$ ),  $\text{MgCl}_2$  ( $c = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$ ),  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  ( $c = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$ ), DTT ( $c = 0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ ), tRNA<sup>Ile</sup> ( $c = 5 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ ),  $\alpha$ - $[^{32}\text{P}]$ -ATP ( $c = 1 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ , specifične aktivnosti  $3000 \text{ Ci mmol}^{-1}$ ) i enzim CCA ( $c = 10 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ ). Reakcija odgradnje terminalnog A76 započeta je dodatkom enzima CCA te je inkubirana 1 min na  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Reakcija ligacije započeta je dodatkom anorganske pirofosfataze konačne koncentracije  $0,1 \text{ U}/\mu\text{L}$  koja hidrolizira pirofosfat (uklanja produkt) što pomiče ravnotežu prema prijenosu  $[^{32}\text{P}]$ -adenozina na tRNA uz CCA, a reakcija je inkubirana još 2 minute na sobnoj temperaturi. Reakcija je zaustavljena dodatkom fenola i tRNA izdvojena ekstrakcijom uz fenol-kloroform. Neizreagirani  $\alpha$ - $[^{32}\text{P}]$ -ATP uklonjen je s dva uzastopna pročišćavanja gel-filtracijom na kolonama Micro Bio-Spin 30 (*Bio-Rad*). Obilježena  $[^{32}\text{P}]$ -tRNA prevedena je dijalizom u otopinu Hepes ( $c = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7,5$ ) i pohranjena na  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ .



**Slika 3.2. Shema radioaktivnog obilježavanja tRNA zamjenom terminalnog A76 s  $[^{32}\text{P}]$ -ATP uz enzim tRNA-nukleotidil-transferazu (CCA). Preuzeto iz Živković (2021)<sup>81</sup>.**

### 3.2.3. Metode rada s proteinima

#### 3.2.3.1. Prekomjerna ekspresija rekombinantnih proteina

Za prekomjernu ekspresiju rekombinantnih proteina korištena je bakterija *E. coli* sojevi BL21(DE3) i Rosetta (DE3). U soju Rosetta (DE3) prekomjerno je eksprimirana proteaza TEV, a u soju BL21(DE3) sljedeći proteini:

- divlji tip (WT) IleRS2 iz bakterije *B. megaterium*,
- proteaza PreScission,
- krnje varijante IleRS2 iz bakterije *B. megaterium*,
- krnje varijante IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* s GST-privjeskom,
- krnje varijante IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* s MBP-privjeskom,
- krnje varijante IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* uz koekspresiju šaperona,
- krnje varijante IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* s MBP-privjeskom uz koekspresiju šaperona,
- krnje varijante IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* s GST-privjeskom uz koekspresiju šaperona.

Opis krnjih konstrukata nalazi se u poglavlju 4.1., a opis plazmida s genima za šaperone, njihovi prikladni induktori te antibiotske rezistencije nalaze se u tablici 3.10.

Uzgojene su prekonodne kulture u 5 mL tekućeg medija LB uz odgovarajući antibiotik(e) (tablica 3.10.) na 250 rpm i 37 °C. Prekonodna kultura razrijeđena je 100 puta u LB mediju te je dodan antibiotik(ci) i potrebni aditivi za uzgoj pojedinih proteina (tablica 3.11.). Tijekom uzgoja i ekspresije svih IleRS dodan je ZnCl<sub>2</sub> jer je Zn<sup>2+</sup> kofaktor nužan za aktivnost ovih enzima. Kulture su zatim uzgajane na 250 rpm i 37 °C do OD<sub>600</sub> 0,5-0,8, a potom je inducirana ekspresija dodatkom IPTG-a do nekoliko konačnih koncentracija u rasponu od 0,05 do 0,5 mmol dm<sup>-3</sup> (tablica 3.12.). Proteini su eksprimirani na nekoliko temperatura u rasponu od 15 °C do 37 °C u trajanju od 2 h do 24 h (preko noći, engl. *overnight*, ON) (tablica 3.12.). Nakon ekspresije stanice su istaložene centrifugiranjem 15-30 min pri 4 °C i 5000 × g, supernatant je odliven, a stanice iskorištene za daljnje eksperimente ili pohranjene na -20 °C. Detaljnije o uvjetima uzgoja i varijacijama u poglavlju 4.2.

Tablica 3.10. Korišteni plazmidi za koekspresiju šaperona.

#	plazmid	šaperoni	induktor	rezistencija
1.	pG-KJE8	DnaK-DnaJ-GrpE GroES-GroEL	L-arabinoza tetraciklin	Cm
2.	pGro7	GroES-GroEL	L-arabinoza	Cm
3.	pKJE7	DnaK-DnaJ-GrpE	L-arabinoza	Cm
4.	pG-Tf2	GroES-GroEL-Tig	tetraciklin	Cm
5.	pTf16	Tig	L-arabinoza	Cm

Tablica 3.11. Antibiotici i aditivi korišteni tijekom uzgoja i prekomjerne ekspresije rekombinantnih proteina.

Proteini	Antibiotik	Aditivi
WT BmIleRS2	kanamicin 30 µg/mL	ZnCl <sub>2</sub> 1mM
proteaza PreScission	ampicilin 100 µg/mL	-
proteaza TEV	kanamicin 30 µg/mL kloramfenikol 34 µg/mL	-
A/B/C_BmIleRS2	kanamicin 30 µg/mL	ZnCl <sub>2</sub> 1mM
A/B/C_BmIleRS2_GST	ampicilin 100 µg/mL	ZnCl <sub>2</sub> 1mM
A/B/C_BmIleRS2_MBP	ampicilin 100 µg/mL	ZnCl <sub>2</sub> 1mM
A/B/C_BmIleRS2 + šaperoni	kanamicin 30 µg/mL kloramfenikol 34 µg/mL tetraciklin <sup>1</sup> 5 ng/mL	ZnCl <sub>2</sub> 1mM MgCl <sub>2</sub> 1mM L-arabinoza <sup>2</sup> 0,5 mg/mL
A/B/C_BmIleRS2_GST + šaperoni	ampicilin 100 µg/mL kloramfenikol 34 µg/mL tetraciklin <sup>1</sup> 5 ng/mL	ZnCl <sub>2</sub> 1mM MgCl <sub>2</sub> 1mM L-arabinoza <sup>2</sup> 0,5 mg/mL
A/B/C_BmIleRS2_MBP + šaperoni	ampicilin 100 µg/mL kloramfenikol 34 µg/mL tetraciklin <sup>1</sup> 5 ng/mL	ZnCl <sub>2</sub> 1mM MgCl <sub>2</sub> 1mM L-arabinoza <sup>2</sup> 0,5 mg/mL

<sup>1</sup> Tetraciklin je dodan za setove šaperona 1 i 4 kao induktor ekspresije prema tablici 3.10.<sup>2</sup> Arabinoza je dodana za setove šaperona 1, 2, 3 i 5 kao induktor ekspresije prema tablici 3.10.

Tablica 3.12. Različiti uvjeti ekspresije rekombinantnih proteina.

Proteini	$T_{\text{ekspresije}} / ^\circ\text{C}$	$t_{\text{ekspresije}} / \text{h}$	$c \text{ (IPTG)} / \text{mmol dm}^{-3}$
WT BmIleRS2	15	ON*	0,25
proteaza PreScission	37	3	0,25
proteaza TEV	16	ON	0,5
A/B/C_BmIleRS2	10; 16; 30; 37	2; 3; 4; ON	0,05; 0,1; 0,25
A/B/C_BmIleRS2_GST	16; 25; 37	3; 5; ON	0,25
A/B/C_BmIleRS2_MBP	16; 25; 37	2; 4; ON	0,25
A/B/C BmIleRS2 + šaperoni	16; 30	2; ON	0,25
A/B/C BmIleRS2 GST + šaperoni	16	ON	0,25
A/B/C BmIleRS2 MBP + šaperoni	16	ON	0,25

\*ON označava ekspresiju preko noći.

### 3.2.3.2. Priprema proteinskih ekstrakata

Talozi uzgojenih bakterijskih stanica resuspendirani su u otopini odgovarajućeg sastava, a to su: otopina A iz tablice 3.13. ukoliko će proteini biti pročišćeni afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu ili MBP otopina za vezanje iz tablice 3.15. ukoliko će biti pročišćeni na dekstrin agarozu). Talog uzgoja resuspendiran je u omjeru 1:100 =  $V$  (otopina) :  $V$  (uzgoj) i dodan je PMSF ( $c = 0,1 \text{ mmol/dm}^3$ ), lizozim ( $\gamma = 50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ) te Dnaza I ( $\gamma = 3 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ). PMSF je inhibitor serinskih proteaza koji sprječava razgradnju proteina u staničnom ekstraktu, lizozim je hidrolitički enzim koji razgrađuje glikozidne veze u staničnoj stijenci, a Dnaza I razgrađuje genomsku DNA što značajno smanjuje viskoznost uzroka i olakšava baratanja s istim. Stanice u suspenziji razbijene su soniciranjem na ledu šest puta po 1 min s razmacima od 1 min između svakog soniciranja (vrijeme soniciranja za manje uzgoje prilagođeno je po potrebi). Stanice je potrebno držati na ledu jer tijekom soniciranja dolazi do zagrijavanja koje može uzrokovati denaturaciju proteina. Razbijene stanice centrifugirane su 30-60 min pri  $20\,000 \times g$  i  $4^\circ\text{C}$ . Supernatant (proteinski ekstrakt) je profiltriran kroz sterilni filter ( $0,22 \mu\text{m}$ ) i dalje analiziran denaturirajućom poliakrilamidnom gel-elektroforezom ili u slučaju većih uzgoja pročišćen odgovarajućom afinitetnom kromatografijom.

Za razbijanje stanica korištena je i *BugBuster* otopina uz *Lysonase* smjesu za manje probne uzgoje (20 mL). Ova metoda pripada metodama enzimske lize stanica u kombinaciji s detergentima koja je pogodna za manje uzorke, blaga je i omogućuje izolaciju labilnih makromolekula. Nedostatak može biti nepotpuna liza ili neželjenih učinak sastojaka otopina na proteine. *BugBuster* je reagens za lizu koji sadrži blage neionske i zwitterionske detergente za razaranje stanične stijenke uz koji se koristi *Lysonase* smjesa rekombinantnog lizozima koji

pomaže u razgradnji stanične stijenke i nukleaze *Benzonase* koja razgrađuje nukleinske kiseline. U smjesu se dodaje i 1 mmol/dm<sup>3</sup> PMSF kako bi se inhibirale proteaze. Uzorci bakterijskih stanica za lizu pripremljeni su tako da je iz 20 mL uzgojenih stanica nakon ekspresije odvojen alikvot od 1,5 mL i istaložen centrifugiranjem pri 4 °C i 20 000 × g. Talog je otopljen u 100 µL smjese otopine *BugBuster* (otprilike 1:15 =  $V(\text{BugBuster}):V(\text{uzgoj})$ ), 0,1 µL *Lysonase* (1000 × manje od otopine *BugBuster*) i PMSF ( $c_f = 1 \text{ mmol/dm}^3$ ). Količine su skalirane s obzirom na veličinu uzgoja. Smjesa je miješana 15 minuta pri 10-20 rpm, a zatim je stanični ekstrakt istaložen centrifugiranjem 10 min pri 20 000 × g na 4 °C. Supernatant (proteinski ekstrakt) odvojen je od taloga i dalje analiziran denaturirajućom poliakrilamidnom gel-elektroforezom (SDS-PAGE).

### 3.2.3.3. Afinitetna kromatografija na Ni-NTA agarozima

Afinitetna kromatografija na Ni-NTA agarozima korištena je za pročišćavanje rekombinantnih proteina s histidinskim privjeskom (His-privjesak). Ni-NTA agarozima ima kovalentno vezanu nitrilotriocetenu kiselinu čije su karboksilne skupine deprotonirane pri pH = 7 i koordiniraju ion Ni<sup>2+</sup> zauzimajući četiri koordinacijska mjesta. Na dva koordinacijska mjesta Ni<sup>2+</sup> mogu se vezati dva histidina iz histidinskog privjeska i na taj način se proteini s His-privjeskom specifično vežu za kolonu. Za ispiranje specifično vezanih proteina koristi se otopina s visokom koncentracijom imidazola koji kompeticijom za koordinacijska mjesta Ni<sup>2+</sup> narušava interakcije između histidina i Ni<sup>2+</sup>. Korišten je kromatografski sustav Äkta Pure 25 (*GE Healthcare*) i kolone HisTrap HP 1 mL i 5 mL (*Cytiva*) za manje i veće uzgoje. Sastav mobilnih faza korištenih za pročišćavanje naveden je u tablici 3.13. gdje se nalaze i aditivi za optimiranje pročišćavanja. Kromatografska metoda opisana je u tablici 3.14. Mobilna faza A služi za nanošenje uzorka na kolonu i ispiranje nevezanih proteina, mobilna faza B služi ispiranju proteina koji su slabo vezani za kolonu ili ostvaruju slabe nespecifične interakcije, a mobilna faza C služi za eluciju vezanog proteina. Pročišćavanje je provedeno na 4 °C, uz protok od 1 mL/min, sakupljanje frakcija od 1,5 mL tijekom nanošenja uzorka i 0,5 mL tijekom elucije. Frakcije su analizirane ili dalje pročišćene gel-filtracijom. Uspješnost pročišćavanja analizirana je denaturirajućom poliakrilamidnom gel-elektroforezom ili gel-filtracijom. Afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozima pročišćeni su: divlji tip IleRS2 iz bakterije *B. megaterium*, proteaza PreScission, proteaza TEV i krnje varijante IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* koeksprimirane sa šaperonima.

**Tablica 3.13.** Sastav mobilnih faza za afinitetnu kromatografiju na Ni-NTA. Vrijednosti u zagradi odnose se na modifikacije primijenjene tijekom optimiranja pročišćavanja krnjih varijanti IleRS2 iz bakterije *B. megaterium*, a na dnu tablice nalaze se ostali aditivi korišteni tijekom optimiranja pročišćavanja.

	Otopina A	Otopina B	Otopina C
	$c / \text{mmol dm}^{-3}$	$c / \text{mmol dm}^{-3}$	$c / \text{mmol dm}^{-3}$
Hepes pH = 7,5 ili Tris pH = 8,0	20 – 30	20 – 30	20 – 30
NaCl	500	500	500
MgCl <sub>2</sub>	20	20	20
imidazol	10	30	200
β-merkaptioetanol	5 – 10	5 – 10	5 – 10
Glu + Arg	50 mM + 50 mM		
Urea	0,5 M		
Tween80	1 %		
Tween20	1 %		

**Tablica 3.14.** Metoda afinitetne kromatografije na Ni-NTA agarozu za pročišćavanje proteina s histidinskim privjeskom.

Faza	Trajanje faze / CV <sup>1</sup>	Mobilna faza
Uravnoteženje	10	Otopina A
Nanošenje uzorka	Volumen uzorka	Otopina A
Ispiranje 1	10	Otopina A
Ispiranje 2	2 – 10	Otopina B
Elucija	5	Otopina C

<sup>1</sup>CV (engl. *column volume*) je oznaka za volumen kolone.

#### 3.2.3.4. Afinitetna kromatografija na dekstrin agarozu

Afinitetna kromatografija na dekstrin agarozu korištena je za pročišćavanje rekombinantnih proteina s MBP-privjeskom. Dekstrin agarozu ima kovalentno vezan polisaharid dekstrin koji je miješani polimer D-glukoze povezane α(1→4) ili α(1→6) glikozidnim vezama što znači da u strukturi sadrži i jedinice maltoze (dimer glukoze povezan α(1→4) glikozidnom vezom). MBP-privjesak je zapravo protein koji veže maltozu (engl. *maltose-binding protein*) te se veže na

jedinice maltoze u dekstrinu primarno ostvarivanjem vodikovih veza. Za ispiranje specifično vezanih proteina s MBP-privjeskom koristi se puferirana otopina s maltozom koja kompetira za vodikove veze s MBP-privjeskom pa dolazi do narušavanja interakcija sa stacionarnom fazom. Korišten je kromatografski sustav Äkta Pure 25 (*GE Healthcare*) i kolona MBPTrap HP 1 mL (*Cytiva*). Sastav mobilnih faza korištenih za pročišćavanje naveden je u tablici 3.15., a navedeni su i aditivi za optimiranje pročišćavanja. Faze kromatografske metode opisane su u tablici 3.16. Mobilna faza za vezanje služi za nanošenje uzorka na kolonu i ispiranje nevezanih proteina, a mobilna faza za eluciju služi za ispiranje vezanih proteina. Pročišćavanje se provodilo na 4 °C, uz protok od 1 mL/min, sakupljanje frakcija od 1,5 mL tijekom nanošenja uzorka i 0,5 mL tijekom elucije. Frakcije su analizirane ili dalje pročišćene gel-filtracijom. Uspješnost pročišćavanja analizirana je denaturirajućom poliakrilamidnom gel-elektroforezom ili gel-filtracijom. Afinitetnom kromatografijom na dekstrin agarozu pročišćene su krnje varijante IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* s MBP-privjeskom.

**Tablica 3.15. Sastav mobilnih faza za afinitetnu kromatografiju na dekstrin agarozu. Vrijednosti u zagradi odnose se na modifikacije testirane tijekom optimiranja pročišćavanja krnjih varijanti IleRS2 iz bakterije *B. megaterium*, a na dnu tablice nalaze se ostali aditivi korišteni tijekom optimiranja pročišćavanja.**

	MBP otopina za vezanje	MBP elucijska otopina
	$c / \text{mmol dm}^{-3}$	$c / \text{mmol dm}^{-3}$
Hepes pH = 7,5 ili Tris pH = 8,0	20 – 30	20 – 30
NaCl	200	200
maltoza	0	10
$\beta$ -merkaptioetanol	1 – 5	1 – 5
Glu + Arg	50 mM + 50 mM	
Urea	0,5 M	
Tween20	1 % ili 0,1 %	



**Tablica 3.16. Metoda afinitetne kromatografije na dekstrin agarozi za pročišćavanje proteina s MBP-privjeskom.**

Faza	Trajanje faze / CV <sup>1</sup>	Mobilna faza
Uravnoteženje	10	MBP otopina za vezanje
Nanošenje uzorka	Volumen uzorka	MBP otopina za vezanje
Ispiranje	5 – 10	MBP otopina za vezanje
Elucija	5	MBP elucijska otopina

<sup>1</sup>CV (engl. *column volume*) je oznaka za volumen kolone.

### 3.2.3.5. Pročišćavanje aminoacil-tRNA-sintetaza od supročišćenog aminoacil-adenilata

Tijekom pročišćavanja nekih aaRS može doći do supročišćavanja aminoacil-adenilata (aa-AMP) koji nastaje u reakciji aktivacije aminokiseline koju kataliziraju aaRS. Ukoliko će enzim biti korišten u kinetičkim istraživanjima potrebno ga je pročistiti od aa-AMP-a kako isti ne bi utjecao na rezultate. Pročišćavanje je provedeno reakcijom pirofosforolize u kojoj aa-AMP, nastao u reakciji aktivacije kataliziranoj s aaRS, reagira s dodanim pirofosfatom dajući ATP koji potom disocira u otopinu. Na ovaj način uklanja se aa-AMP iz aktivnog mjesta aaRS u obliku ATP-a. Protein ( $\gamma = 1 \text{ mg/mL}$ ) se inkubirao 30 min u otopini A+PP<sub>i</sub> koji sadrži Hepes ( $c = 20 \text{ mmol/dm}^3$ ) pH = 7,5, NaCl ( $c = 500 \text{ mmol/dm}^3$ ), MgCl<sub>2</sub> ( $c = 4 \text{ mmol/dm}^3$ ) i Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> ( $c = 2 \text{ mmol/dm}^3$ ). Pročišćavanje proteina od pirofosfata, ATP-a i aminokiseline provedeno je afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozi na kromatografskom sustavu Äkta Pure 25 (GE Healthcare), na 4 °C uz protok od 1 mL/min i sakupljanje frakcija od 1,5 mL tijekom nanošenja uzorka te 0,5 mL tijekom elucije. Protokol metode afinitetne kromatografije na Ni-NTA za pročišćavanje aaRS uz pirofosforolizu nalazi se u tablici 3.17. Tijekom prvog ispiranja uz mobilnu fazu A+PP<sub>i</sub> odvija se dodatna pirofosforoliza i otpuštanje ATP-a i aminokiseline, zatim se produkti i neizreagirani PP<sub>i</sub> ispiru mobilnom fazom A, a pročišćeni aaRS eluira mobilnom fazom C.

**Tablica 3.17. Protokol metode afinitetne kromatografije na Ni-NTA agarozi za pročišćavanje aaRS uz pirofosforolizu.**

Faza	Trajanje faze / CV <sup>1</sup>	Mobilna faza
Uravnoteženje	10	Otopina A+PP <sub>i</sub>
Nanošenje uzorka	Volumen uzorka	Otopina A+PP <sub>i</sub>
Ispiranje 1	10	Otopina A+PP <sub>i</sub>
Ispiranje 2	10	Otopina A
Elucija	5	Otopina C

<sup>1</sup>CV (engl. *column volume*) je oznaka za volumen kolone.

### 3.2.3.6. Gel-filtracijska kromatografija

Gel-filtracijska kromatografija je metoda odvajanja proteina na temelju veličine koje ovisi o veličini pora punila kromatografske kolone. Manje molekule se duže zadržavaju na koloni jer ulaze u pore punila dok veće molekule prolaze brže i eluiraju se prve. Veličina pora punila definira koja veličina molekula se može odvojiti. Korištene su kolone Superdex Increase 75 10/300 GL (*GE Healthcare*, raspon odvajanja: 3-70 kDa), Superdex Increase 200 5/150 GL (*GE Healthcare*, raspon odvajanja: 10-600 kDa) i Superdex Increase 200 10/300 GL (*GE Healthcare*, raspon odvajanja: 10-600 kDa) uz kromatografski sustav Äkta Pure 25 (*GE Healthcare*). Sastav korištene mobilne faze (otopina za pohranu proteina) nalazi se u tablici 3.18. gdje su navedeni i aditivi korišteni prilikom optimiranja pročišćavanja. Protokol kromatografske metode nalazi se u tablici 3.19. Pročišćavanje proteina provedeno je pri 4 °C, protok je ovisio o koloni (0,8 mL/min za Superdex Increase 75 10/300, 0,4 mL/min za Superdex Increase 200 5/150 GL (*GE Healthcare*) i 0,7 mL/min za Superdex Increase 200 10/300 GL), a volumen skupljenih frakcija bio je 250 µL. Korištena mobilna faza je pogodna za pohranu proteina pa se sakupljene frakcije mogu spremati bez izmjene otopine. Uspješnost pročišćavanja preparativnom gel-filtracijom analizirana je denaturirajućom poliakrilamidnom gel-elektroforezom ili analitičkom gel-filtracijom. Analitičkom gel-filtracijom analizirani su: divlji tip IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* i krnje varijante IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* bez i sa MBP-privjeskom. Preparativnom gel-filtracijom pročišćene su krnje varijante IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* bez i sa MBP-privjeskom.

Tablica 3.18. Sastav mobilne faze za gel-filtracijsku kromatografiju.

	Otopina za pohranu proteina
	$c / \text{mmol dm}^{-3}$
Hepes pH = 7,5 ili Tris pH = 8,0	20 – 30
NaCl	50
glicerol	10%
$\beta$ -merkaptoetanol	10
Glu + Arg	50 mM + 50 mM
Urea	0,5 M
Tween80	1 %
Tween20	1 % ili 0,1 %

Tablica 3.19. Metoda gel-filtracijske kromatografije. Mobilna faza u svim koracima je otopina za pohranu proteina sastava navedenog u tablici 3.18.

Faza	Trajanje faze / CV <sup>1</sup>
Uravnoteženje	3 – 5
Nanošenje uzorka	Volumen uzorka
Elucija	2

<sup>1</sup>CV (engl. *column volume*) je oznaka za volumen kolone.

### 3.2.3.7. Izmjena otopine gel-filtracijom

Ukoliko se proteini nakon afinitetne kromatografije ne odvajaju na gel-filtracijskoj koloni, odnosno ako se ne nalaze u adekvatnoj otopini potrebno je izmijeniti otopinu kako bi se proteini mogli pohraniti. Sastav otopine za pohranu proteina nalazi se u tablici 3.18. Korištena je kolona HiTrap Desalting 5 mL (*Cytiva*) na kromatografskom sustavu Äkta Pure 25 (*GE Healthcare*).

### 3.2.3.8. Denaturirajuća poliakrilamidna gel-elektroforeza uz dodatak natrijeva dodecil-sulfata

Denaturirajuća poliakrilamidna gel-elektroforeza (SDS-PAGE) je metoda odvajanja denaturiranih proteina na temelju njihove veličine. Natrijev dodecil-sulfat (SDS) je anionski

detergent koji stvara kompleks s proteinima i denaturira ih. Za sve komplekse SDS-protein omjer mase i naboja je jednak zbog negativnog naboja ravnomjerno vezanog SDS-a koji čini intrinzični naboj proteina zanemarivim. Denaturirani proteini se u gelu kreću pod utjecajem električnog polja od katode prema anodi budući da su kompleksi negativno nabijeni. Brzina kretanja ovisi samo o njihovoj masi, a poliakrilamidni gel služi kao molekulsko sito. SDS-PAGE korišten je za provjeru uspješnosti ekspresije i pročišćavanja proteina.

SDS-poliakrilamidni gelovi se sastoje od dva dijela: gel za sabijanje i gel za razdvajanje (sastav u tablici 3.20.) Za izradu gelova i elektroforezu korištena je aparatura Mini Protean Tetra (*Bio-Rad*). Sastav otopine u kojemu se provodi elektroforeza uključuje:  $\gamma$  (glicin) = 14,4 mg/mL,  $\gamma$  (Tris) = 3,03 mg/mL pH = 8,3 i  $\gamma$  (SDS) = 1 mg/mL. Uzorcima proteina prije nanošenja na gel dodana je puferirana otopina SDS-a sastava:  $c$  (Tris) = 62,5 mmol/dm<sup>3</sup> pH = 6,8,  $\varphi$  (glicerol) = 6,25 %,  $\gamma$  (SDS) = 1,25 mg/mL,  $c$  ( $\beta$ -merkaptetanol) = 12,5 mmol/dm<sup>3</sup> i  $\gamma$  (bromfenolplavo) = 0,02 mg/mL te voda po potrebi. Ukupni volumen pripremljenih uzoraka bio je 20  $\mu$ L. Uzorci su zagrijavani 5 min na 95 °C kako bi se proteini u potpunosti denaturirali nakon čega je u jažice nanoseno 15  $\mu$ L uzorka i 3-5  $\mu$ L markera Precision Plus Protein Standards Unstained ili Prestained (*Bio-Rad*). Elektroforeza je provedena na sobnoj temperaturi 15 min uz napon od 120 V, a zatim još 40 min pri 180 V. Gel je obojen miješanjem u otopini sastava ( $\varphi$  (CH<sub>3</sub>COOH) = 10 %,  $\varphi$  (etanol) = 45 %,  $\gamma$  (Coomassie Brilliant Blue R-250) = 2,5 g dm<sup>-3</sup>), a zatim je kuhanjem gela u vodi uklonjena nespecifično vezana boja.

**Tablica 3.20. Sastav gelova za sabijanje i razdvajanje.**

	Gel za razdvajanje	Gel za sabijanje
Komponenta	Koncentracija ili udio	Koncentracija ili udio
Akrilamid:bisakrilamid (29:1)	4 % (w/V)	9 % (w/V)
Tris-HCl	125 mmol dm <sup>-3</sup> pH = 6,8	375 mmol dm <sup>-3</sup> pH = 8,8
SDS	1 g dm <sup>-3</sup>	1 g dm <sup>-3</sup>
APS (inicijator)	0,7 $\mu$ g mL <sup>-1</sup>	0,7 $\mu$ g mL <sup>-1</sup>
TEMED (katalizator)	0,05 % (V/V)	0,05 % (V/V)

### 3.2.3.9. Ugušćivanje proteina ultrafiltracijom

Za ugušćivanje proteina koristi se metoda ultrafiltracije. Korišteni su Amicon Ultra Centrifugal Filters (*Milipore*) – „centrikoni“ s porama kroz koje mogu proći proteini manji od 30 kDa. Centrikoni su prvo uravnoteženi na način da je kroz njih propuštena otopina u kojoj su pohranjeni proteini, a zatim su u centrikone dodani uzorci proteina koji su centrifugirani na  $5000 \times g$  i  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  do željene koncentracije. Ukoncentrirani proteini pohranjeni su na  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ .

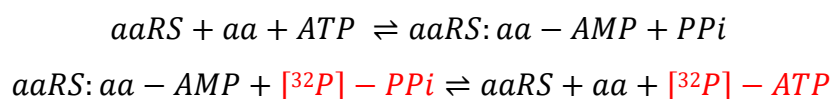
### 3.2.3.10. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije proteina

Koncentracije proteina određene su spektrofotometrijski na uređaju NanoDrop One (*Thermo Scientific*). Spektrofotometar je jednosnopan pa ga je potrebno nulirati otopinom u kojoj je otopljen protein. Naneseno je  $2 \text{ } \mu\text{L}$  uzorka i određena je koncentracija proteina mjerenjem apsorbancije pri  $\lambda = 280 \text{ nm}$  na temelju izmjerene apsorbancije (najveći udio apsorbancije pri  $280 \text{ nm}$  dolazi od triptofana), molarog ekstincijskog koeficijenta i molarne mase proteina. Omjeri izmjerenih apsorbancija pri  $260$  i  $280 \text{ nm}$   $A_{260}/A_{280}$  daju informaciju o čistoći uzorka, a prihvaćene vrijednosti za čiste proteine su oko  $0,6$  za omjer  $A_{260}/A_{280}$ .

## 3.2.4. Kinetičke metode

### 3.2.4.1. Aktivacija aminokiselina praćena metodom izmjene pirofosfata

Prva reakcija u ukupnom aminoaciliranju koju kataliziraju aaRS je aktivacija aminokiseline. Metoda izmjene pirofosfata omogućuje praćenje aktivacije aminokiseline jer se uz dodatak radioaktivno obilježenog  $[^{32}\text{P}]$ -pirofosfata može pratiti nastajanje radioaktivno obilježenog  $[^{32}\text{P}]$ -ATP-a čija je količina ekvivalentna količini prethodno nastalog aa-AMP.<sup>95</sup>



Naime, u ovako postavljenoj reakciji dodaje se suvišak pirofosfata (obilježeni i neobilježeni pirofosfat) koji potiče povratnu reakciju pirofosforolize u kojoj iz aa-AMP i  $PP_i$  nastaje ATP. Budući da je  $PP_i$  radioaktivno obilježen, bit će obilježen i nastali ATP. Ovom metodom prati se izmjena radiokativiteta između  $PP_i$ -a i ATP-a u ravnotežnim uvjetima što opisuje reakciju aktivacije aminokiseline. Mjerenjem brzine nastanka ATP-a mjeri se i brzina nastanka aa-

AMP-a. Ovakvim mjerenjem mogu se odrediti početne brzine reakcije  $v_0$ , opažena konstanta brzine reakcije  $k_{\text{obs}}$  te kinetički parametri  $k_{\text{cat}}$  i  $K_M$ . U ovom radu metoda je korištena samo za određivanje početne brzine reakcije i  $k_{\text{obs}}$ , odnosno testiranje aktivnosti krnjih varijanti IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* u reakciji aktivacije aminokiseline izoleucina jer kod niskih aktivnosti nije moguće opisati cjelovite Michaelis-Menten krivulje.

Reakcijske smjese sadržavale su  $c(\text{Hepes}) = 50 \text{ mmol/dm}^3$ ,  $c(\text{MgCl}_2) = 40 \text{ mmol/dm}^3$ ,  $c(\text{DTT}) = 5 \text{ mmol/dm}^3$ ,  $c(\text{ATP}) = 25 \text{ mmol/dm}^3$ ,  $\varphi(\text{Tween20}) = 1 \%$ ,  $c(\text{PPi}) = 1 \text{ mmol/dm}^3$  i  $\gamma(\text{BSA}) = 0,1 \text{ mg/mL}$ . Koncentracija enzima iznosila je  $3,26 \text{ } \mu\text{mol/dm}^3$ . Reakcije su započete dodatkom aminokiselina, a konačne koncentracije izoleucina bile su 20 mM i 30 mM te 60 mM Val. Sve reakcije aktivacije provedene su na  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , a alikvoti reakcija uzimani su za vremenske točke: 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30, 60 min. Alikvoti reakcijske smjese od  $2 \text{ } \mu\text{L}$  za svaku vremensku točku pomiješani su s  $3 \text{ } \mu\text{L}$  smjese za zaustavljanje reakcije sastava:  $c(\text{CH}_3\text{COONa}) = 600 \text{ mmol dm}^{-3}$  (pH = 4,5) i  $\gamma(\text{SDS}) = 1,5 \text{ mg/mL}$ . Komponente reakcijske smjese razdvojene su tankoslojnom kromatografijom. Prije nanošenja reakcijskih smjesa na polietileniminsku pločicu za tankoslojnu kromatografiju, pločice su razvijene u vodi i osušene. Nakon pripreme pločica alikvoti od 1-2  $\mu\text{L}$  nanoseni su na pločice s određenim razmakom. Otopina za tankoslojnu kromatografiju sadržavala je:  $c(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 750 \text{ mmol dm}^{-3}$  (pH = 3,5) i  $c(\text{urea}) = 4 \text{ mol dm}^{-3}$ . Pločice su osušene i izložene preko noći na zaslonu za detekciju radioaktivnosti (*GE Healthcare*). Na zaslonu za detekciju radioaktivnosti nalaze se molekule sa svojstvom fotostimulirane luminescencije. Molekule na zaslonu pobuđuju se zračenjem  $\beta$ -raspada izotopa  $^{32}\text{P}$  s polietileniminskih pločica, a zatim se zaslon izlaže laserskom skeneru Typhoon (*GE Healthcare*) koji emisijom elektromagnetskog zračenja uzrokuje luminescenciju pobuđenih molekula zaslona. Dobiveni signali su kvantificirani programom ImageQuant 8.1 (*GE Healthcare*), a rezultati su obrađeni pomoću programa Excel (*Microsoft*) i GraphPad Prism (*GraphPad Software*). Koncentracija nastalog produkta  $^{32}\text{P}$ -ATP određena je računanjem omjera intenziteta signala radioaktivnog  $^{32}\text{P}$ -ATP i zbroja intenziteta signala  $^{32}\text{P}$ -ATP i  $^{32}\text{P}$ -PPi te množenjem dobivenog rezultata ( $x$  ( $^{32}\text{P}$ -ATP)) s početnom koncentracijom PPi ( $c = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$ ). Iz dobivenih vrijednosti određene su početne brzine reakcija  $v_0$  primjenom linearne regresije ( $x = \text{vrijeme}$ ,  $y = \text{koncentracija } ^{32}\text{P}\text{-ATP}$ ). Opažena konstanta brzine reakcije ( $k_{\text{obs}}$ ) računa se kao omjer početne brzine reakcije i početne koncentracije enzima.

3.2.4.2. Aminoaciliranje uz [ $^{14}\text{C}$ ]-aminokiseline

Ukupna reakcija aminoaciliranja katalizirana uz aaRS može se pratiti korištenjem radioaktivno obilježene [ $^{14}\text{C}$ ]-aminokiseline pri čemu nastaje radioaktivno obilježena [ $^{14}\text{C}$ ]-aa-tRNA<sup>aa</sup>. Metoda s [ $^{14}\text{C}$ ]-aminokiselinama češće se koristi za određivanje udjela aktivnih molekula tRNA<sup>aa</sup> koje mogu biti aminoacilirane u pročišćenoj smjesi tRNA (akceptorska aktivnost). U svrhu praćenja aminoaciliranja može se odrediti početna brzina reakcije  $v_0$  i opažena konstanta brzina reakcije  $k_{\text{obs}}$ . U ovom radu metoda je korištena za praćenje aminoaciliranja tRNA<sup>Ile</sup> izoleucinom uz divlji tip IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* te su određene  $v_0$  i  $k_{\text{obs}}$ .



Reakcijske smjese ukupnog volumena 40  $\mu\text{L}$  sadržavale su:  $c$  (Hepes) = 20 mmol/dm<sup>3</sup>,  $c$  (MgCl<sub>2</sub>) = 10 mmol/dm<sup>3</sup>,  $c$  (NH<sub>4</sub>Cl) = 150 mmol/dm<sup>3</sup>,  $c$  (ATP) = 2 mmol/dm<sup>3</sup>,  $\gamma$  (BSA) = 0,1 mg/mL, anorgansku pirofosfatazu TIPP 0,008 U/ $\mu\text{L}$ ,  $c$  (tRNA<sup>Ile</sup>) = 15  $\mu\text{mol/dm}^3$  i  $c$  (IleRS) = 10 nmol/dm<sup>3</sup>. Korištena je smjesa radioaktivne i neradioaktivne aminokiseline čija je specifična aktivnost u reakcijskoj smjesi iznosila 50-100 mCi/mmol. Anorganska pirofosfataza je korištena jer razgrađuje pirofosfat koji nastaje kao produkt reakcije aminoaciliranja i time pomiče ravnotežu prema nastajanju produkta. Aminoaciliranje je praćeno pri 30 °C, a reakcije su započete dodatkom enzima u ostatak reakcijske smjese. U vremenskim točkama 30, 60, 90, 120, 150, 180 s uzimani su alikvoti od 5  $\mu\text{L}$  koji su nanoseni na kromatografske papiriće Whatman 3MM Chr (GE Healthcare) dimenzija 2  $\times$  1 cm. Kako bi se zaustavila reakcija papirići su uronjeni u otopinu hladne trikloroctene kiseline ( $w = 10\%$ ). Zatim su papirići isprani 10 min u hladnoj trikloroctenoj kiselini ( $w = 10\%$ ) i dodatno 2 puta po 5 min u hladnoj trikloroctenoj kiselini ( $w = 5\%$ ) te ohlađenom etanolu ( $\varphi = 96\%$ ). Papirići su osušeni u sušioniku 30 min na 70-80 °C. Radioaktivnost [ $^{14}\text{C}$ ]-Ile-tRNA<sup>Ile</sup> je određena scintilacijskim brojanjem. Papirići su uronjeni u scintilacijsku otopinu (toluenska otopina  $\gamma$  (PPO) = 5 g/dm<sup>3</sup> i  $\gamma$  (POPOP) = 0,3 g/dm<sup>3</sup>), a radioaktivnost je mjerena na scintilacijskom brojaču Tri-Carb 2900 TR (*Perkin Elmer*). Papirići su uronjeni u 2,5 mL scintilacijske otopine zasebno svaki u posebnoj staklenoj bočici. Pripremljene su i otopine s [ $^{14}\text{C}$ ]-Ile točno poznate množine i specifične radioaktivnosti za izradu baždarnog pravca. Početna brzina reakcije izračunata je linearnom regresijom iz vremenske ovisnosti  $c$  ([ $^{14}\text{C}$ ]-Ile-tRNA<sup>Ile</sup>), a  $k_{\text{obs}}$  iz omjera početne brzine reakcije i početne koncentracije enzima.

3.2.4.3. Aminoaciliranje uz [<sup>32</sup>P]-tRNA

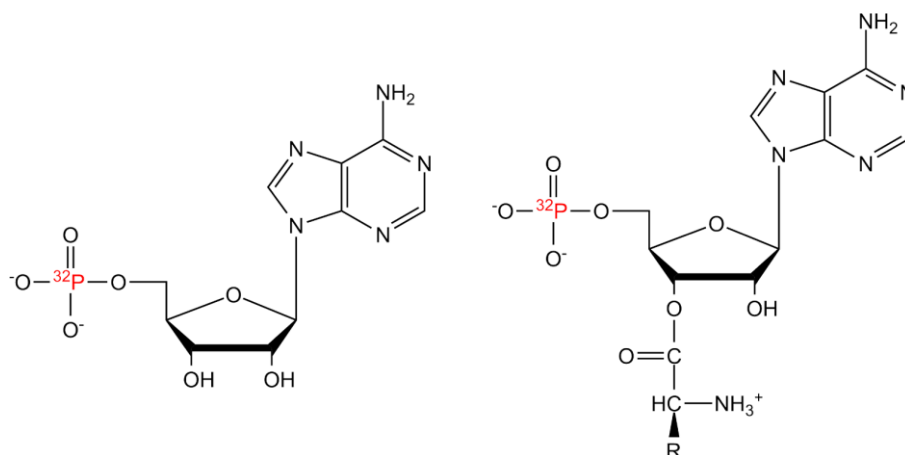
Ukupna reakcija aminoaciliranja može se pratiti i korištenjem radioaktivno obilježene [<sup>32</sup>P]-tRNA<sup>aa</sup> što rezultira nastankom aa-[<sup>32</sup>P]-tRNA<sup>aa</sup>. Prednost ove metode je mogućnost korištenja većih koncentracija aminokiselina jer maksimalna koncentracija aminokiselina nije ograničena njenom specifičnom aktivnošću što je slučaj kod metode s [<sup>14</sup>C]-aminokiseline. Nedostatak metode je što [<sup>32</sup>P]-tRNA<sup>aa</sup> nisu komercijalno dostupne već se moraju radioaktivno obilježiti kao što je opisano u poglavlju 3.2.2.9. U ovom radu aminoaciliranje uz [<sup>32</sup>P]-tRNA<sup>Ile</sup> korišteno je za praćenje reakcije aminoaciliranja s krnjim varijantama IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* i određivanje  $v_0$  i  $k_{obs}$ .



Reakcijske smjese ukupnog volumena 20  $\mu$ L sadržavale su:  $c$  (Hepes) = 20 mmol/dm<sup>3</sup>,  $c$  (MgCl<sub>2</sub>) = 10 mmol/dm<sup>3</sup>,  $c$  (NH<sub>4</sub>Cl) = 150 mmol/dm<sup>3</sup>,  $c$  (ATP) = 2 mmol/dm<sup>3</sup>, anorgansku pirofosfatazu TIPP 0,008 U/ $\mu$ L,  $\gamma$  (BSA) = 0,1 mg/mL,  $c$  (tRNA<sup>Ile</sup> suplementirana s [<sup>32</sup>P]-tRNA<sup>Ile</sup>) = 50  $\mu$ mol/dm<sup>3</sup>,  $c$  (krnje varijante BmIleRS) = 2  $\mu$ mol/dm<sup>3</sup> i  $c$  (Ile) = 20 mmol/dm<sup>3</sup>. Aminoaciliranje je praćeno pri 30 °C, a reakcije su započete dodatkom aminokiseline u ostatak reakcijske smjese. U vremenskim točkama 2, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 min uzimani su alikvoti od 1  $\mu$ L i pomiješani s 3  $\mu$ L otopine za zaustavljanje reakcije ( $c$  (CH<sub>3</sub>COONa) = 600 mmol dm<sup>-3</sup> (pH = 4,5) i  $\gamma$  (SDS) = 1,5 mg/mL). Za detekciju aa-tRNA<sup>Ile</sup> potrebno je tretirati alikvote reakcijskih smjesa s P1 nukleazom koja cijepa aa-tRNA<sup>aa</sup> na 5'-mononukleotide. Naime, aa-tRNA<sup>Ile</sup> i tRNA<sup>Ile</sup> ne mogu se odvojiti tankoslojnom kromatografijom pa se zato cijepanjem s P1 nukleazom generiraju terminalni [<sup>32</sup>P]-AMP (predstavlja neaminoaciliranu tRNA) i aa-[<sup>32</sup>P]-AMP (predstavlja aminoaciliranu tRNA) koji se mogu odvojiti tankoslojnom kromatografijom (slika 3.3.). Alikvoti 1,5  $\mu$ L zaustavljenih reakcijskih smjesa pomiješani su s 3  $\mu$ L otopine P1 nukleaze (P1 nukleaza > 0,01 U/ $\mu$ L,  $c$  (CH<sub>3</sub>COONa) = 300 mmol/dm<sup>3</sup> pH = 5,0 i  $c$  (ZnCl<sub>2</sub>) = 0,15 mmol/dm<sup>3</sup>) i inkubirani 30-60 min na 25 °C. Alikvoti od 1-2  $\mu$ L nanoseni su na prethodno razvijene polietileniminske pločice s određenim razmakom. Otopina za tankoslojnu kromatografiju sadržavala je:  $c$  (CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>) = 100 mmol/dm<sup>3</sup> i  $\varphi$  (CH<sub>3</sub>COOH) = 5 %. Pločice su osušene i izložene preko noći na zaslonu za detekciju radioaktivnosti (*GE Healthcare*). Detekcija radioaktivnosti i kvantifikacija signala temelji se na istim principima kao i u metodi izmjene pirofosfata u poglavlju 3.2.4.1. Iz



dobivenih vrijednosti određene su početne brzine reakcija i opažene konstante brzine reakcije kao omjer početne brzine reakcije i početne koncentracije enzima.



**Slika 3.3. Prikaz radioaktivno obilježenog terminalnog adenilata (lijevo) i radioaktivno obilježenog aminoacil-adenilata (desno). Preuzeto iz Živković (2021).<sup>81</sup>**

## § 4. REZULTATI

### 4.1. Konstrukcija rekombinantnih plazmida za ekspresiju krnjih oblika IleRS2 iz bakterije *B. megaterium*

#### 4.1.1. Rekombinantni plazmidi za ekspresiju krnjih oblika IleRS2

Radi istraživanja proizvodnje i funkcionalnosti krnjih oblika IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* dizajnirani su geni IleRS iste. Krnje varijante ovog proteina predstavljaju modele za detaljniju rekonstrukciju ancestralnog enzima. Koje domene će biti uklonjene/zadržane odabrano je prema njihovoj ulozi u aktivnosti enzima i prema evolucijskom značaju. Odabrane su domene čije uklanjanje ne bi trebalo u potpunosti ugasiti aminoacilacijsku aktivnost enzima i/ili za koje se pretpostavlja da su evolucijski mlađe. Uklonjene su domene u kombinacijama C-terminalna i korektivna domena, odnosno C-terminalna, korektivna i CP2 domena. Kao što je prethodno opisano u poglavlju 2 uloga korektivne domene je popravak misaminoacilirane tRNA<sup>lle</sup>, uloga C-terminalne domene je interakcija s antikodonskom peteljkom tRNA, a funkcija CP2 domene nije u potpunosti razjašnjena. Kako evolucijska istraživanja pretpostavljaju da su ove domene naknadno evoluirale radi poboljšanja specifičnosti i efikasnosti katalize već funkcionalnog oblika enzima, ovakvi krnji enzimi trebali bi posjedovati određenu katalitičku aktivnost.

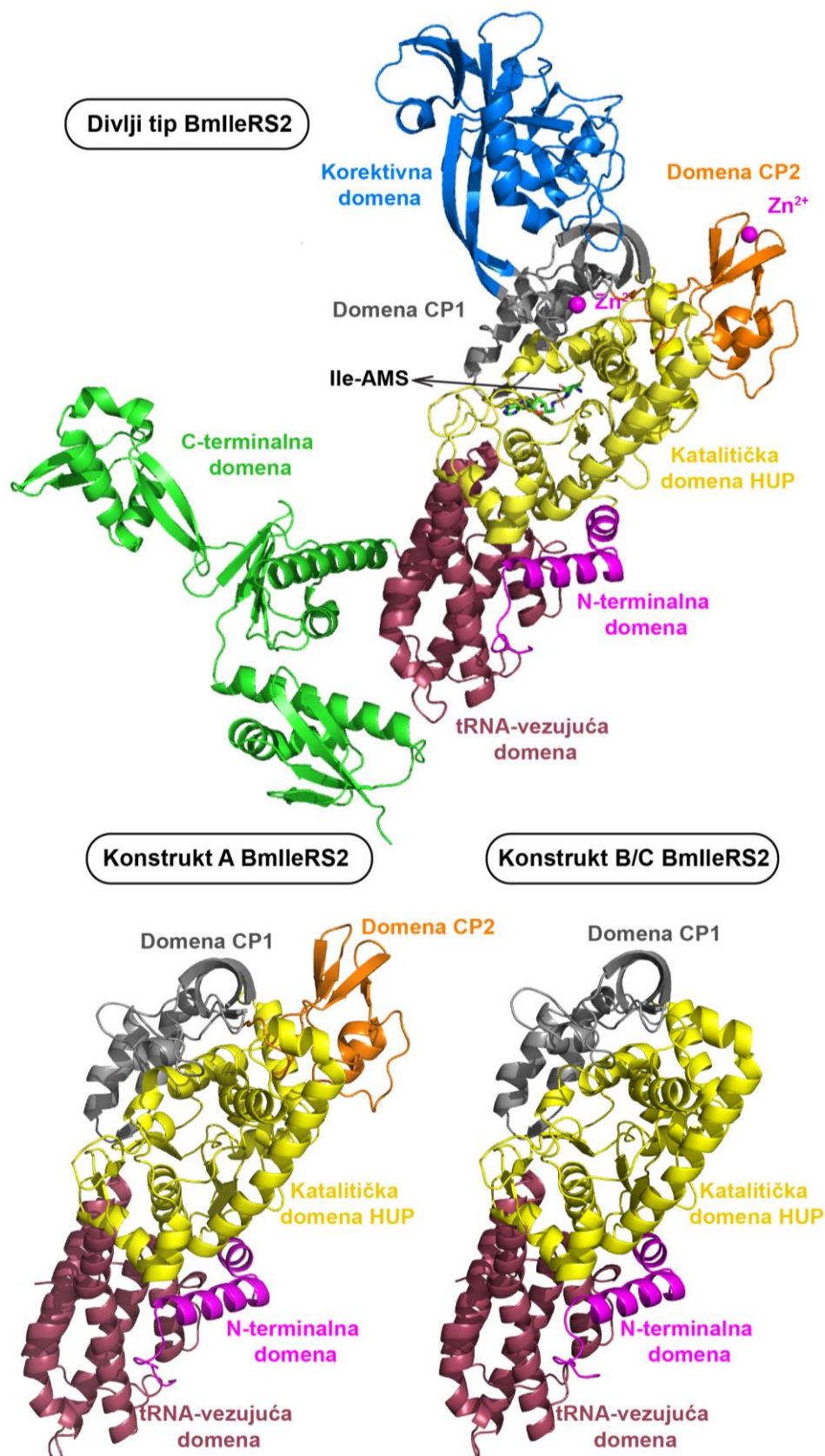
Dizajnirana su tri gena za krnje oblike IleRS2. Prvi krnji oblik (dalje u tekstu konstrukt A) konstruiran je uklanjanjem C-terminalne i korektivne domena iz gena za IleRS2 iz bakterije *B. megaterium*. Nukleotidni slijed optimiran je prema korištenju kodona (engl. *codon usage*) u bakteriji *E. coli* koja će koristiti kao ekspresijski organizam. Optimizacija kodona prema uporabi kodona u organizmu u kojemu se eksprimira ciljani protein pospješuje ekspresiju i smatanje proteina.<sup>96-98</sup> Drugi krnji oblik (dalje u tekstu konstrukt B) konstruiran je uklanjanjem C-terminalne, korektivne i CP2 domene te je nukleotidni slijed optimiran prema korištenju kodona u bakteriji *E. coli*. Treći konstrukt (dalje u tekstu konstrukt C) konstruiran je uklanjanjem C-terminalne, korektivne i CP2 domene kao i konstrukt B, ali je nukleotidni slijed zadržan kao u izvornom genu iz bakterije *B. megaterium*. Krnji oblik C nije optimiran prema korištenju kodona u bakteriji *E. coli* radi usporedbe kako bi se istražilo utječe li optimizacija kodona na uspješno smatanje proteina i u ovom slučaju. Prekidi nastali delecijama unutarnjih domena (korektivna i CP2) spojeni su poveznicama glicin-serin (GS). Svojstva i opis krnjih oblika nalaze se u tablici 4.1., strukture na slici 4.1., a nukleotidni i aminokiselinski sljedovi na

slikama D1-D3 u Dodatku. Na slici 4.1. za usporedbu prikazana je i riješena kristalna struktura cjelovitog IleRS2 iz bakterije *B. megaterium*. Konstruirani geni ugrađeni su u ekspresijski plazmid pET28b tako da se eksprimiraju s His-privjeskom na N-kraju. Sintezu i ugradnju krnjih gena u ekspresijski plazmid pET28b provela je tvrtka *Twist Bioscience*.

**Tablica 4.1. Svojstva i opis konstruiranih krnjih oblika IleRS2 iz bakterije *B. megaterium*.**

	A_IleRS2	B_IleRS2	C_IleRS2
<b>Uklonjene domene</b>	C-terminalna Korektivna	C-terminalna Korektivna CP2	C-terminalna Korektivna CP2
<b>Optimirano prema korištenju kodona u <i>E. coli</i></b>	DA	DA	NE
<b>Broj nukleotida</b>	1809	1608	1608
<b>Broj aminokiselina</b>	602	535	535
<b>Molarna masa proteina</b>	69,3 kDa	61,5 kDa	61,5 kDa

Kako bi se provjerile konformacijske promjene u strukturi kao posljedice uklanjanja domena, strukture konstruiranih krnjih oblika IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* modelirane su na serveru za predviđanje struktura proteina Robetta (*Baker Lab*).<sup>99</sup> Nakon preklapanja struktura dobivenih modela s riješenom kristalnom strukturom divljeg tipa IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* (neobjavljeni rezultati grupe Gruić Sovulj) opažene su vrlo male promjene u konformaciji. Prilikom uporabe modeliranih struktura potrebno je uzeti u obzir da se ne radi o riješenim kristalnim već računalno predviđenim strukturama koje se ponekad ne poklapaju u potpunosti s realnim strukturama. Ovo posebno vrijedi kada se struktura narušava velikim delecijama, a nema dobrog reprezentativnog uzorka u bazama podataka koje bi mogle omogućiti vjerno modeliranje.



Slika 4.1. Struktura divljeg tipa IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* (neobjavljeni rezultati grupe Gruić Sovulj) i strukture konstruiranih krnjih oblika A i B/C IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* modelirane Robettom.

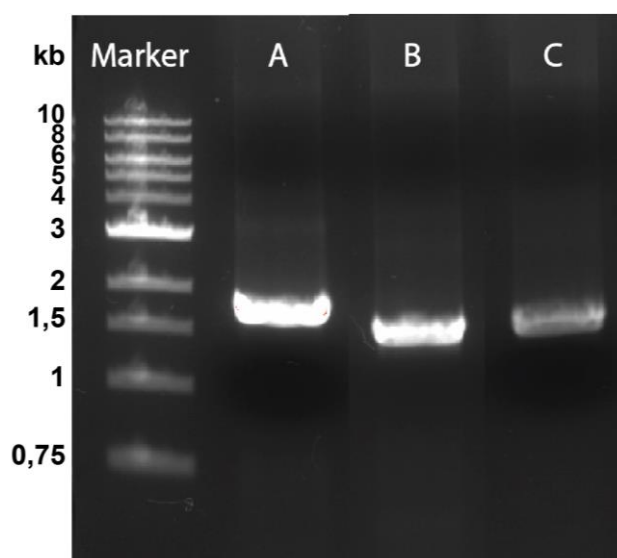
#### 4.1.2. Rekombinantni plazmidi za ekspresiju krnjih oblika IleRS2 fuzioniranih s GST

Za ekspresiju krnjih konstrukata IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* fuzioniranih s GST-privjeskom na N-kraju korišten je ekspresijski plazmid pGEX-6P-3 opisan u poglavlju 3.1.10. Nukleotidni i aminokiselinski slijed GST-privjeska prikazan je na slici D4. u Dodatku, a veličina rekombinantnih plazmida i proteina nalazi se u tablici 4.2.

**Tablica 4.2. Svojstva rekombinantnog pGEX-6P-3 plazmida s genima za krnje IleRS2 iz bakterije *B. megaterium*, krnjih proteina s GST-privjeskom i korištene restriksijske endonukleaze za ugradnju.**

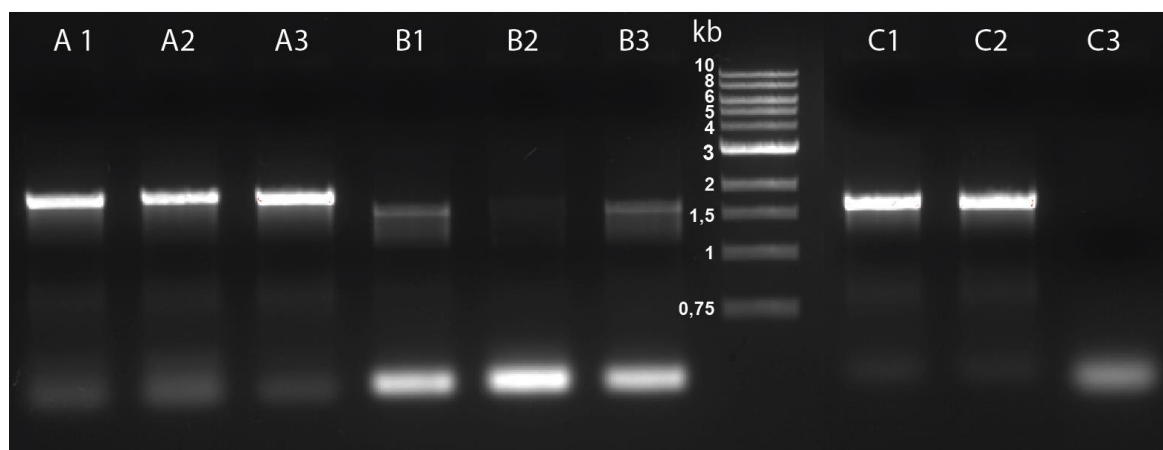
	A_GST	B_GST	C_GST
Broj nukleotida rekombinantnog plazmida	6775 bp	6587 bp	6574 bp
Broj aminokiselina	833	772	766
Molarna masa	96,1 kDa	89,0 kDa	88,3 kDa
Korištene restriksijske endonukleaze	<i>Bam</i> HI i <i>Xho</i> I	<i>Sal</i> I i <i>Not</i> I	<i>Bam</i> HI i <i>Xho</i> I

Geni za krnje oblike IleRS2 umnoženi su lančanom reakcijom polimeraze iz plazmida pET28b uz početnice (tablica 3.3.) koje sadrže restriksijska mjesta za ugradnju u pGEX-6P-3 prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.2.4. Uspješnost PCR-a provjerena je elektroforezom na agaroznom gelu te se na slici 4.2. vide očekivane vrpce na 1800 kb za konstrukt A i vrpce na oko 1500 kb za konstrukte B i C.



**Slika 4.2. Analiza PCR produkata elektroforezom na agaroznom gelu krnjih konstrukata A, B i C. Umnažanje gena krnjih konstrukata A, B i C s restriksijskim mjestima za kloniranje u pGEX-6P-3. Korišten je marker 1 kb DNA Ladder (NEB).**

Umnoženi geni i plazmid pGEX-6P-3 su razgrađeni odgovarajućim restriksijskim enzimima iz tablice 4.2 te ligirani T4-DNA-ligazom prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.2.7. Nakon pročišćavanja ligacijskih smjesa s QIAquick PCR Purification Kitom (*Qiagen*), plazmidi su elektroporirani u bakterijske stanice *E. coli* soj XL10-Gold i potom uzgojene preko noći na krutoj hranjivoj podlozi s ampicilinom. Uspješnost transformacije provjerena je PCR-om na bakterijskim kolonijama (postupak opisan u poglavlju 3.2.2.5.) i elektroforezom na agaroznom gelu. Rezultati su prikazani na slici 4.3. gdje se na agaroznom gelu nalaze uzorci za tri različite kolonije za A, B i C konstrukt. Transformacija je uspješna u slučaju sva tri krnja oblika u barem dvije kolonije što potvrđuju vrpce pri oko 2000 kb za konstrukt A, i 1500 kb za konstrukte B i C. U svim jažicama, a posebno kod uzoraka konstrukta B, vide se linije na dnu gela koje odgovaraju malim oligonukleotidima, odnosno početnicama.



**Slika 4.3. Analiza produkata PCR-a na bakterijskim kolonijama elektroforezom na agaroznom gelu. Uspješnost ugradnje gena za krnje konstrukte IleRS2 A, B, C u pGEX-6P-3 i transformacije bakterije *E. coli* soja XL10-Gold rekombinantnim plazmidima. Analizirane su 3 kolonije za A, B i C. Korišten je marker 1 kb DNA Ladder (*NEB*).**

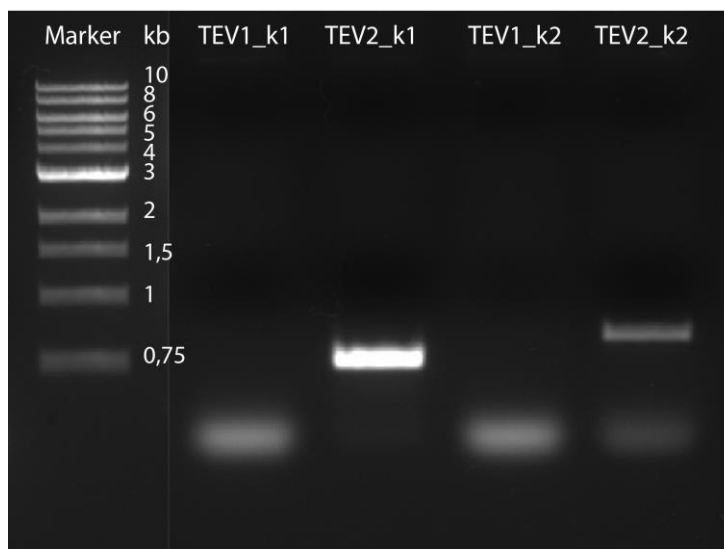
#### 4.1.3. Rekombinantni plazmidi za ekspresiju krnjih oblika IleRS2 fuzioniranih s MBP

Za ekspresiju krnjih konstrukata IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* fuzioniranih s MBP-privjeskom korišten je ekspresijski plazmid pMAL-c2x opisan u poglavlju 3.1.10. Budući da je komercijalni plazmid pMAL-c2x dizajniran tako da se MBP-privjesak uklanja proteazom *Factor Xa* koja nije bila dostupna, ukloniran je nukleotidni slijed za mjesto prepoznavanja proteaze virusa pjegavosti duhana (engl. *Tobacco Etch Virus*, TEV). Nukleotidni slijed TEV-mjesta sintetiziran je kao dvolančani oligonukleotid s restriksijskim mjestima na krajevima koja odgovaraju onima na ciljnom položaju u vektoru pMAL-c2x (tablica 4.3.). Otopine s početnicama pomiješane su i podvrgnute restrikciji endonukleazama *EcoRI* i *SacI* kao i plazmid

pMAL-c2x. Razgrađene DNA pomiješane su i ligirane T4-DNA-ligazom prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.2.7. Nakon pročišćavanja ligacijskih smjesa, plazmidi su elektroporirani u bakterijske stanice *E. coli* soja XL10-Gold i potom uzgojene preko noći na krutoj hranjivoj podlozi s ampicilinom. Uspješnost transformacije provjerena je PCR-om na bakterijskim kolonijama (postupak opisan u poglavlju 3.2.2.5., a početnice u tablici 4.3.) i elektroforezom na agaroznom gelu. Korištena su dva seta početnica za provjeru uspješnosti ugradnje TEV-mjesta, a konstruirane su tako da se umnaža fragment veličine 500 pb kako bi se mogao detektirati elektroforezom na 1 % agaroznom gelu. U prvom setu početnice su komplementarne početku TEV-mjesta i slijedu nakon TEV-mjesta, dok su u drugom setu komplementarne slijedu prije TEV mjesta i kraju TEV mjesta. Rezultati ugradnje TEV-mjesta prikazani su na slici 4.4. Na gelu se vide vrpce oko 0,5 kb u jažicama s uzorcima PCR smjesa u kojima je korišten prvi set početnica koje odgovaraju fragmentu DNA s TEV-mjestom. Objašnjenje zašto s drugim setom početnica PCR nije uspješan vjerojatno leži u tehničkoj pogrešci.

**Tablica 4.3. Početnice korištene za ugradnju TEV-mjesta u pMAL-c2x, provjeru uspješnosti transformacije i ugradnje PCR-om na kolonijama.**

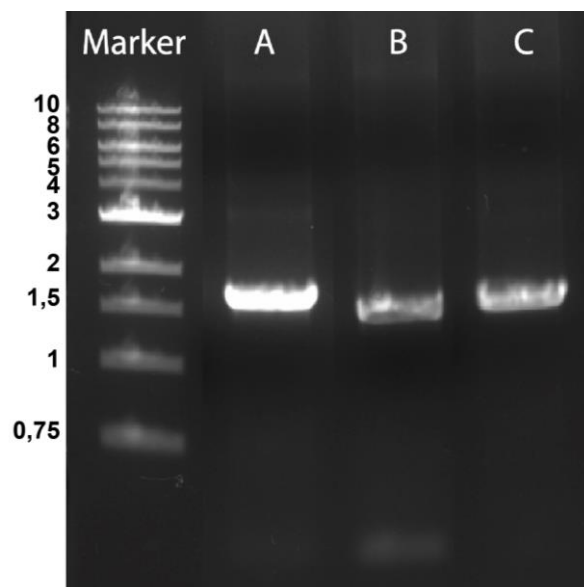
Naziv početnice	Nukleotidni slijed 5'→3'
TEV_site_F	5' CTAATTCGAGCTCCGAGGATCTGTACTTTCAGAGCGAATTCGGATCC 3'
TEV_site_R	5' GGATCCGAATTCGCTCTGAAAGTACAGATCCTCGGAGCTCGAATTAG 3'
TEV_prim1_F	5' CCGAGGATCTGTACTTTCAGAGCG 3'
TEV_prim1_R	5' CCGTTGCTTCGCAACGTTCAA 3'
TEV_prim2_F	5' GACACCGATTACTCCATCGCAG 3'
TEV_prim2_R	5' CGCTCTGAAAGTACAGATCCTCGG 3'



**Slika 4.4.** Analiza uspješnosti ugradnje TEV-mjesta u pMAL-c2x i transformacije bakterije *E. coli* soja XL10-Gold rekombinantnim plazmidom elektroforezom na agaroznom gelu nakon PCR-a na bakterijskim kolonijama. Korištena su 2 seta početnica TEV1 i TEV2, a PCR je napravljen na 2 kolonije (k1, k2) za svaki set početnica. Korišten je marker 1 kb DNA Ladder (*NEB*).

Geni za krnje oblike IleRS2 umnoženi su lančanom reakcijom polimeraze iz plazmida pET28b uz početnice (tablica 3.3.) koje sadrže restrikcijska mjesta za ugradnju u pMAL-c2x\_TEV prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.2.4. Uspješnost PCR-a provjerena je elektroforezom na agaroznom gelu te se na slici 4.5. vide očekivane vrpce na 1800 kb za konstrukt A i vrpce na 1500 kb za konstrukte B i C. Nukleotidni i aminokiselinski slijed MBP-privjeska prikazan je u Dodatku na na slici D5, a veličine rekombinantnih plazmida i proteina nalaze se u tablici 4.4.





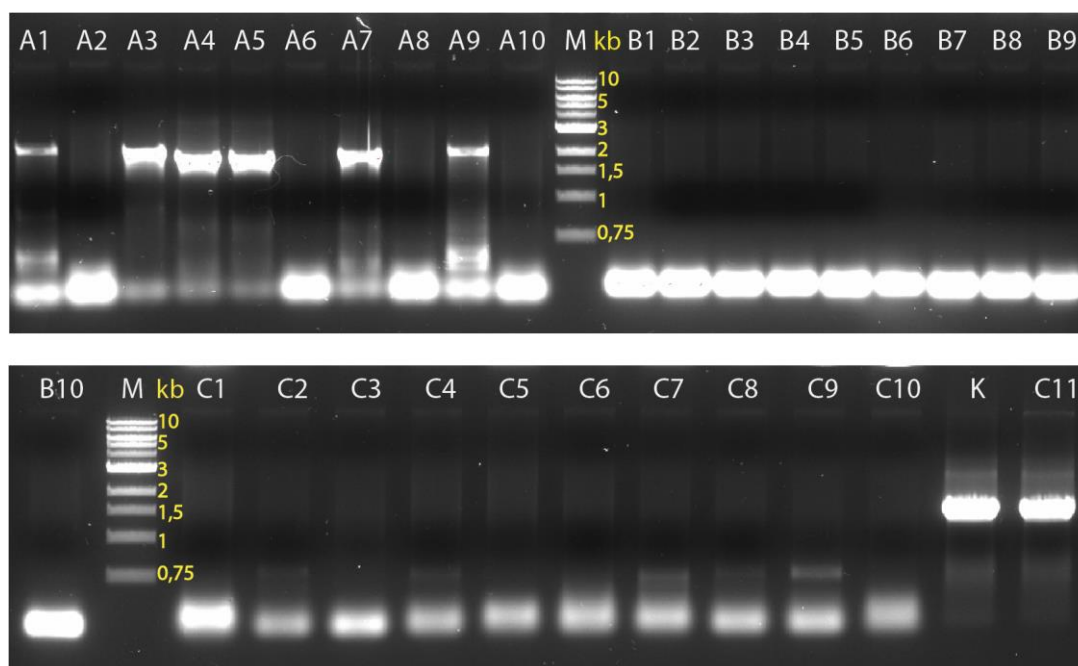
**Slika 4.5.** Analiza PCR produkata elektroforezom na agaroznom gelu krnjih konstrukata A, B, C. Umnažanje gena krnjih konstrukata A, B i C s restriksijskim mjestima za kloniranje u pMAL-c2x\_TEV. Korišten je marker 1 kb DNA Ladder (NEB).

**Tablica 4.4.** Svojstva rekombinantnog pMAL-c2x\_TEV plazmida s genima za krnje IleRS2 iz bakterije *B. megaterium*, krnjih proteina s MBP-privjeskom i korištene restriksijske endonukleaze za ugradnju.

	A_MBP	B_MBP	C_MBP
Broj nukleotida rekombinantnog plazmida	8409 bp	8208 bp	8208 bp
Broj aminokiselina	984	915	917
Molarna masa	111,3 kDa	103,3 kDa	103,5 kDa
Korištene restriksijske endonukleaze	<i>Bam</i> HI i <i>Pst</i> I	<i>Eco</i> RI i <i>Sal</i> I	<i>Bam</i> HI i <i>Pst</i> I

Umnoženi geni za krnje oblike IleRS2 i plazmid pMAL-c2x\_TEV su razgrađeni odgovarajućim restriksijskim enzimima iz tablice 4.4. te ligirani T4-DNA-ligazom prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.2.7.. Nakon pročišćavanja ligacijskih smjesa, plazmidi su elektroporirani u bakterijske stanice *E. coli* soj Mach I i potom uzgojene preko noći na krutoj hranjivoj podlozi. Napravljena je i pozitivna kontrola s kolonijom koja sadrži plazmid pET28b s ugrađenim genom za krnji konstrukt C. Uspješnost transformacije provjerena je PCR-om na bakterijskim kolonijama (postupak opisan u poglavlju 3.2.2.5.) i elektroforezom na agaroznom gelu. Rezultati su prikazani na slici 4.6. gdje se na agaroznom gelu nakon elektroforeze vide vrpce pri oko 1800 bp kod šest uzoraka kolonija s konstruktom A. Svi uzorci kolonija s konstruktom B su negativni te ovaj konstrukt krnjeg IleRS2 s fuzioniranim MBP-privjeskom nije uspješno

proizveden, a razlog tome može biti neuspješna restrikcija, ligacija ili transformacija. Deset uzoraka s kolonijama koje bi trebale sadržavati konstrukt C su negativni, ali je jedan uzorak pozitivan s vrpcom oko 1600 kb te je ova bakterijska kolonija korištena za daljnju proizvodnju krnjeg konstrukta C s MBP-privjeskom. Kontrolni uzorak kolonija s ugrađenim genom za konstrukt C u plazmidu pET28b je pozitivan. Ugradnja gena za krnje konstrukte A i C u pMAL-c2x\_TEV te transformacija u bakterijske stanice je uspješno provedena.



**Slika 4.6.** Analiza produkata PCR-a na bakterijskim kolonijama elektroforezom na agaroznom gelu. Uspješnost ugradnje gena za krnje konstrukte IleRS2 A, B, C u pMAL-c2x\_TEV i transformacije bakterije *E. coli* soja Mach I rekombinantnim plazmidima. Analizirano je 10 kolonija za A i B, 11 kolonija za C te kontrola K (kolonija s genom za konstrukt C ugrađenim u pET28b). Korišten je marker 1 kb DNA Ladder (*NEB*), a veličine markera u kb istaknute su žutom bojom.

## 4.2. Proizvodnja i pročišćavanje krnjih oblika IleRS2 iz bakterije *B. megaterium*

### 4.2.1. Optimizacija prekomjerne ekspresije proteina

Divlji tip IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* (pozitivna kontrola) prekomjerno je eksprimiran prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.3.1. Korištena je glicerolska kultura bakterija *E. coli* soja BL21(DE3) transformirana ekspresijskim plazmidom pET28b s ugrađenim genom za divlji tip IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* dostupna u laboratoriju. Prekomjerna ekspresija inducirana je pri  $OD_{600} \approx 0,6$  s  $0,25 \text{ mmol dm}^{-3}$  IPTG-om i provedena na  $16 \text{ }^\circ\text{C}$  preko noći.

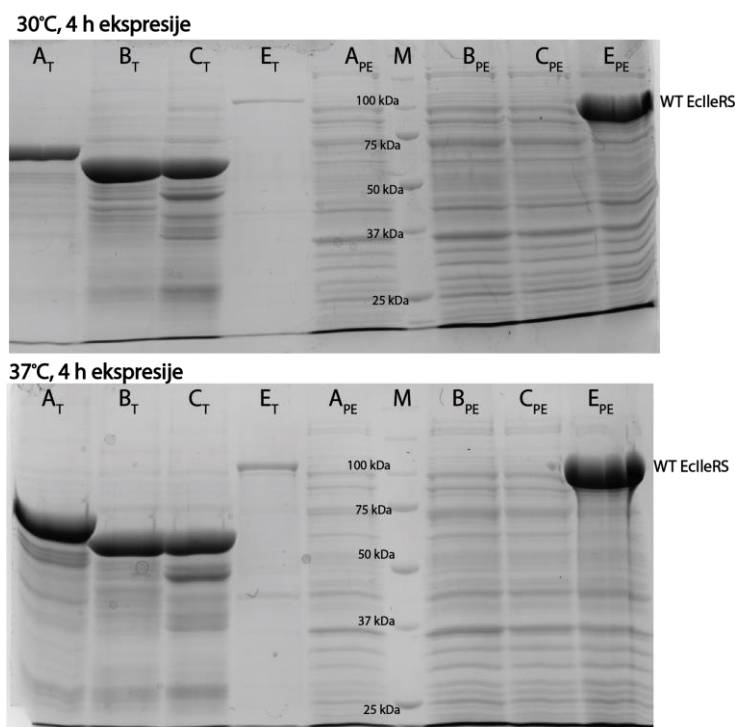
Priprema proteinskog ekstrakta provedena je prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.3.2. uz sonikaciju.

Gen za PreScission proteazu (potrebnu za uklanjanje GST-privjeska) bio je dostupan u laboratoriju ugrađen u pET plazmid s rezistencijom na ampicilin, His-privjeskom i ekspresijskim sustavom koji se inducira IPTG-om. *E. coli* soj BL21(DE3) transformiran je elektroporacijom plazmidom pET s ugrađenim genom za PreScission proteazu. Prekomjerna ekspresija provedena je prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.3.1., inducirana je s 0,25 mmol dm<sup>-3</sup> IPTG-om i odvijala se 3 h na 37 °C. Priprema proteinskog ekstrakta provedena je prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.3.2. uz sonikaciju.

Gen za proteazu TEV (potrebnu za uklanjanje MBP-privjeska) bio je dostupan u laboratoriju ugrađen u plazmid pET24d koji je opisan u poglavlju 3.1.10. Budući da je proteaza TEV eukariotski protein, plazmid pET24d\_TEV transformiran je elektroporacijom u bakterijske stanice *E. coli* soja Rosetta (DE3) opisanom u poglavlju 3.1.9. Uvjeti uzgoja i prekomjerne ekspresije opisani su u poglavlju 3.2.3.1., prekomjerna ekspresija inducirana je s 0,5 mmol dm<sup>-3</sup> IPTG-om i provedena na 16 °C preko noći (prije indukcije stanice inkubirane 15 min na ledu kako bi se smanjio toplinski šok). Priprema proteinskog ekstrakta provedena je prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.3.2. uz sonikaciju.

Geni za krnje oblike koji ne sadrže dodatni privjesak BmIleRS2 A, B i C ugrađeni su u ekspresijski vektor pET28b te su dobivenim rekombinantnim plazmidom transformirane bakterijske stanice *E. coli* soja BL21(DE3). Uzgoj bakterijskih stanica i ekspresija provedeni su u manjim volumenima i u nekoliko uvjeta jer za ove krnje proteine nisu poznati optimalni uvjeti. Svi testirani uvjeti (bez fuzijskih oblika i šaperona) nalaze se u tablici 4.5.

Provedena je ekspresija pri 30 °C (4 h) i 37 °C (4 h) oboje uz 0,25 mmol dm<sup>-3</sup> IPTG, a razbijanje stanica provedeno je uz *BugBuster*. Paralelno je eksprimiran i divlji tip IleRS iz bakterije *E. coli* kao kontrola jer se WT IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* ne eksprimira pri 30 °C i 37 °C u topljivom obliku. Proteinski ekstrakti i talozi nakon razbijanja stanica analizirani su SDS-PAGE-om (metoda opisana u poglavlju 3.2.3.8.), a rezultati nakon 4 h ekspresije prikazani su na slici 4.7. (rezultati nakon 2 h su bili jednaki, prikazani su u Dodatku na slici D6.).

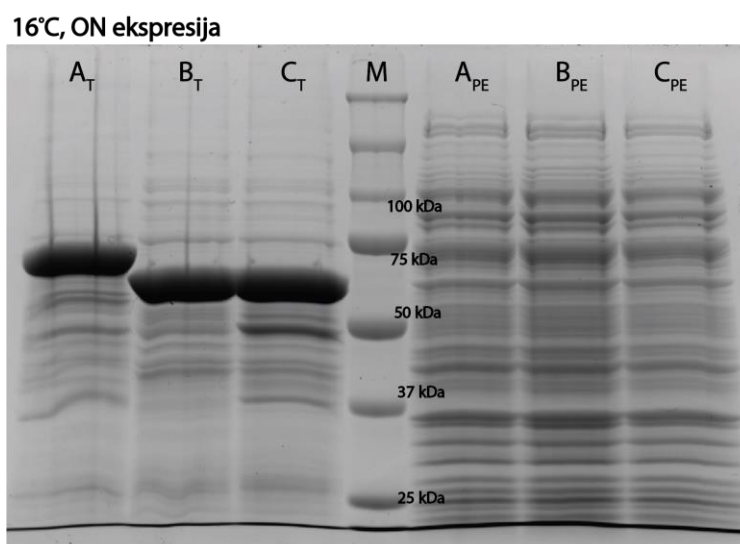


**Slika 4.7. SDS-PAGE analiza ekspresije krnjih oblika BmIleRS2 i WT EcIleRS na 30 °C i 37 °C uz 0,25 mmol dm<sup>-3</sup> IPTG te razbijanje stanica uz *BugBuster*. A, B, C označavaju krnje IleRS2, E označava EcIleRS, M marker, T u indeksu talog, a PE proteinski ekstrakt. Korišten je marker Precision Plus Protein Standards Unstained (*Bio-Rad*).**

Na oba gela, u jažicama gdje su nanoseni talozi uzoraka krnjih konstrukata, vide se intenzivne vrpce koje odgovaraju krnjim proteinima na oko 69 kDa (A) i 61 kDa (B i C). U jažici s talozima uzoraka WT EcIleRS na položaju oko 100 kDa vidi se vrpca koja odgovara WT EC IleRS (104 kDa) puno manjeg intenziteta. U jažicama s uzorcima proteinskih ekstrakata u slučaju uzoraka krnjih proteina A, B i C nema jasno izraženih linija na očekivanom položaju dok je u slučaju WT EcIleRS linija oko 100 kDa intenzivna. Za linije slabog intenziteta u jažicama s uzorcima proteinskih ekstrakata krnjih IleRS A, B, C pri očekivanih 69 kDa i 61 kDa malo je vjerojatno da dolaze od krnjih proteina jer se linije pojavljuju u sve tri jažice na oba položaja, a konstrukt A se razlikuje za 8 kDa od B i C. Također, u talozima se jasno vidi prethodno navedena razlika u veličinama konstrukata, stoga spomenute linije vjerojatno pripadaju drugim eksprimiranim proteinima u stanici iste molekulske mase. Opažena prisutnost krnjih konstrukata u talogu sugerira da, iako pri obje temperature dolazi do ekspresije, proteini agregiraju i odlaze u inkluzijska tijela što nije neočekivano s obzirom na narušenu nativnu strukturu. Budući da se divlji tip IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* prema uhodanom postupku<sup>84</sup> najbolje ekspimirira pri 16 °C, vjerojatnije je da će se i krnje varijante bolje ekspimirati na nižim temperaturama.

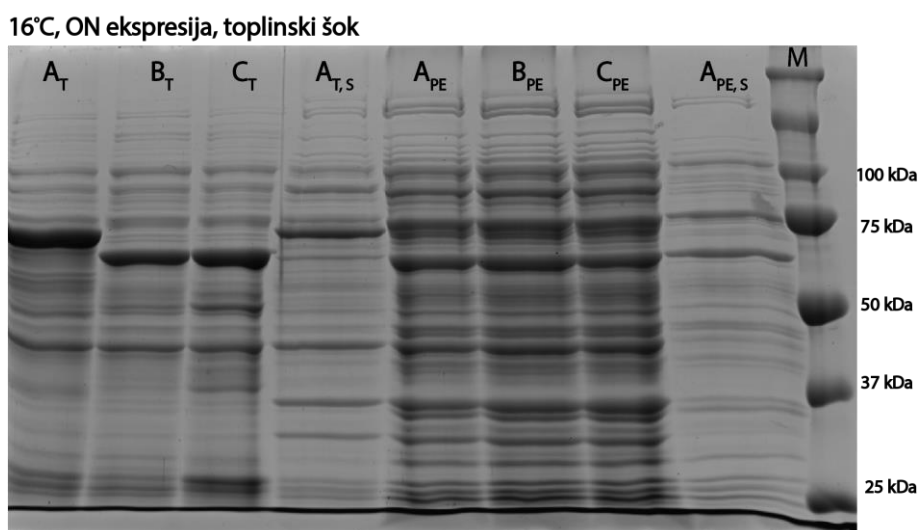
Kako bi proteini bili eksprimirani u topljivom obliku provedena je daljnja optimizacija modificiranjem uvjeta uzgoja i ekspresije.

Sljedeće probne ekspresije krnjih konstrukata inducirane su s  $0,25 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$  IPTG-om (prije indukcije stanice su inkubirane na ledu 15 min) i provedene na  $16 \text{ }^\circ\text{C}$  preko noći, a uzorci bakterijskih stanica uzeti su nakon 3 h i nakon cca 20 h ekspresije. Niža temperatura i manja koncentracija IPTG-a kao induktora usporavaju brzinu ekspresije i tako mogu doprinjeti povećanju topljivosti proteina.<sup>100,101,102</sup> Priprema proteinskih ekstrakata provedena je uz *BugBuster*. Rezultati su prikazani samo za ekspresiju induciranu s  $0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$  IPTG-om nakon prekononočne ekspresije (slika 4.13.) jer indukcija s  $0,25 \text{ mmol dm}^{-3}$  IPTG-om daje isti rezultat (dodatak slika D7). Na gelovima s uzorcima nakon 3 h ekspresije, s obje koncentracije IPTG-a, ekspresije gotovo niti nema (rezultati su prikazani u Dodatku na slici D7). Na slici 4.8. vide se isti rezultati kao i u prethodnoj ekspresiji, proteini su eksprimirani, ali prisutnost u talogu sugerira nastajanje agregata. Kao što je već rečeno rezultat je isti za indukciju s  $0,25 \text{ mmol dm}^{-3}$  IPTG što ukazuje da smanjenje koncentracije induktora za 2,5 puta ne utječe vidljivo na nastajanje taloga. Valja naglasiti da osjetljivost stanice na promjenu koncentracije IPTG-a u otopini ovisi o prijenosu IPTG-a u stanicu i količini *lac*-represora u stanici.<sup>103</sup>



**Slika 4.8.** SDS-PAGE analiza ekspresije krnjih oblika BmIleRS2 na  $16 \text{ }^\circ\text{C}$  uz  $0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$  IPTG i razbijanje stanica uz *BugBuster*. ON označava ekspresiju preko noći, A, B, C krnje IleRS2, M marker, T u indeksu talog, a PE proteinski ekstrakt. Korišten je marker Precision Plus Protein Standards Unstained (*Bio-Rad*).

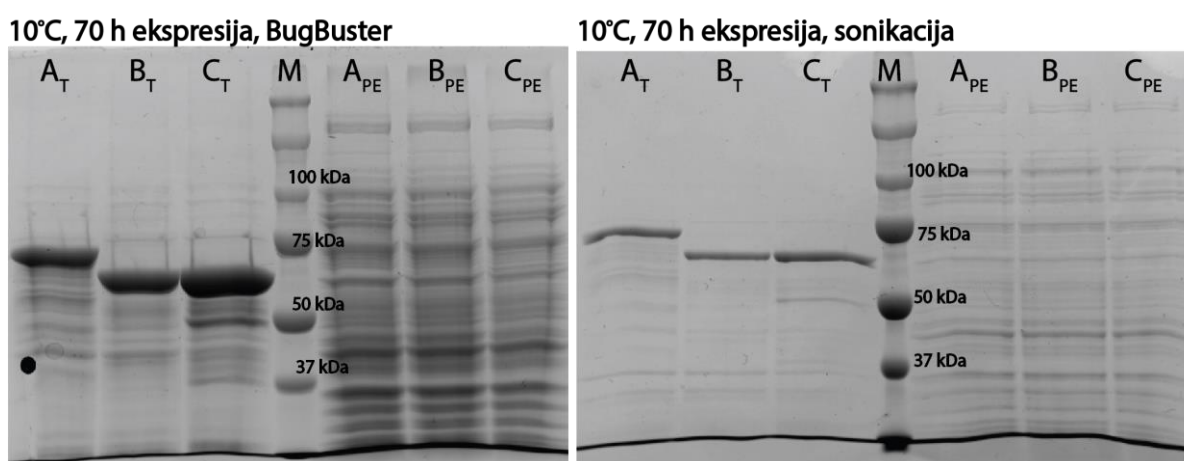
S obzirom na to da klasični pristupi sprječavanja agregiranja rekombinantnih proteina smanjivanjem temperature i koncentracije induktora nisu rezultirali topljivim proteinima, isprobane su druge metode. Primjenom hladnog šoka 1 h na 4 °C prije ekspresije (dodatka IPTG-a) inducira se ekspresija šaperona koji se eksprimiraju pri niskim temperaturama.<sup>104</sup> Primjenom toplinskog šoka na 5 min prije i tijekom 30 min nakon dodatka IPTG-a na 47 °C inducira se ekspresija šaperona toplinskog šoka (engl. *heat shock proteins*, Hsp).<sup>102,105,106</sup> Dodatak 3% EtOH neposredno prije ekspresije će izazvati odgovor stanice kao na toplinski šok (ekspresija šaperona toplinskog šoka). Dodatak 0,1 mmol dm<sup>-3</sup> MgCl<sub>2</sub> prije uzgoja može također pomoći u stabilizaciji strukture tijekom smatanja proteina i smanjiti agregaciju. Iako mehanizam djelovanja nije razjašnjen, učinak se može objasniti time da kaotropne soli nasumično mijenjaju raspored molekula vode u otapalu i smanjuju jačinu hidrofobnih interakcija što smanjuje agregiranje.<sup>107</sup> Sve četiri probne ekspresije provedene su na 16 °C preko noći uz 0,05 mmol dm<sup>-3</sup> IPTG, priprema proteinskog ekstrakta provedena je uz razbijanje stanica *BugBusterom* za sva tri konstrukta, a za konstrukt A dodatno je testirano i razbijanje stanica soniciranjem u 0,5 mL otopine A (tablica 3.1.). Metoda razbijanja stanica soniciranjem testirana je kako bi se isključila mogućnost da do taloženja dolazi zbog sastava *BugBuster* smjese za lizu. Rezultati ekspresije uz toplinski šok prikazani su kao reprezentativni za sve probne ekspresije (slika 4.9.) jer su rezultati svih uzgoja jednaki s vrlo malim razlikama (ostali rezultati nalaze se u Dodatku na slici D8).



**Slika 4.9.** SDS-PAGE analiza ekspresije krnjih oblika BmIleRS2 na 16 °C uz 0,05 mmol dm<sup>-3</sup> IPTG, toplinski šok na 5 min prije i tijekom 30 min nakon dodatka IPTG-a na 47 °C i razbijanje stanica uz *BugBuster*. ON označava ekspresiju preko noći, A, B, C krnje IleRS2, M marker, T u indeksu talog, a PE proteinski ekstrakt, S označava lizu stanica sonikacijom. Korišten je marker Precision Plus Protein Standards Unstained (*Bio-Rad*).

Na gelu s uzorcima iz uzgoja bakterijskih stanica koje su izložene toplinskom šoku prije i na početku ekspresije, ekspresija je gotovo jednaka kao i u svim prethodnim uvjetima - proteini su ekspimirani, ali nastaju agregati.. Razlika koja se može primijetiti na slici 4.14 je da se soniciranjem u ekstraktu nalazi manji broj proteina što ukazuje na manju efikasnost razbijanja stanica. Također, kada je primijenjen hladan šok i dodan  $\text{MgCl}_2$  ekspresija konstrukta B bila je nešto manja prema intenzitetu vrpce u talogu (rezultati u Dodatku). Može se zaključiti da hladni ili toplinski šok, dodatak 3% EtOH,  $0,1 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ MgCl}_2$ , razbijanje stanica sonikacijom ili smanjivanje koncentracije IPTG-a na  $0,05 \text{ mmol dm}^{-3}$  u ovakvoj postavi eksperimenta ne pomažu u sprječavanju agregiranja krnjih konstrukata BmIleRS2.

Isprobana je i ekspresija krnjih konstrukata pri  $10^\circ\text{C}$  kako bi se daljnjim snižavanjem temperature pokušalo pospješiti smatanje proteina na temelju već prethodno opisanog principa. Ekspresija je provedena 70 h uz  $0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$  IPTG i razbijanje stanica uz *BugBuster* i sonikaciju. Rezultati su prikazani na slici 4.10. te su jednaki kao i za sve ekspresije opisane do sada. Sumirani testirani uvjeti i rezultati nalaze se u tablici 4.5. S obzirom na to da sama varijacija uvjeta uzgoja i ekspresije u smislu temperature ekspresije, koncentracije IPTG-a, indukcije odgovora stanice na toplinski ili hladni šok nije bila uspješna strategija za prevenciju nastanka agregata i poticanje pravilnog smatanja proteina, u poglavlju 4.2.3. opisana je daljnja optimizacija uz koekspresiju šaperona i ekspresiju s fuzioniranim proteinskim privjescima MBP i GST.



**Slika 4.10.** SDS-PAGE analiza ekspresije krnjih oblika BmIleRS2 na  $10^\circ\text{C}$  uz  $0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$  IPTG, razbijanje stanica uz *BugBuster* i sonikaciju. ON označava ekspresiju preko noći, A, B, C krnje IleRS2, M marker, T u indeksu talog, a PE proteinski ekstrakt, S označava lizu stanica sonikacijom. Korišten je marker Precision Plus Protein Standards Unstained (*Bio-Rad*).

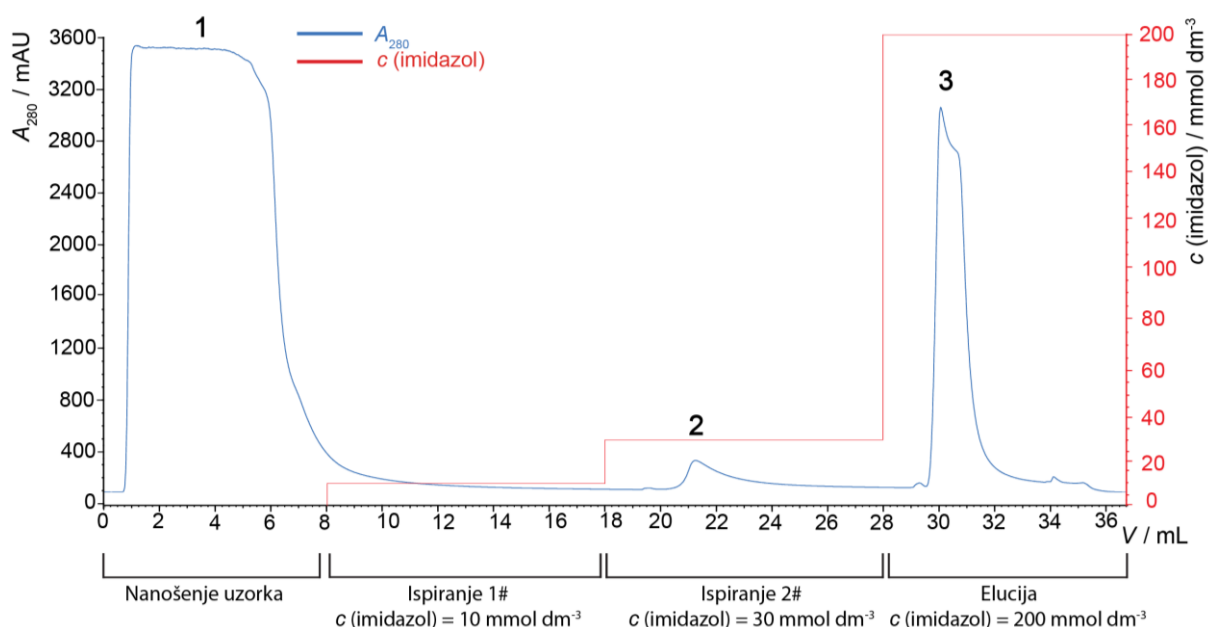
Tablica 4.5. Testirani uvjeti ekspresije krnjih oblika IleRS2 iz bakterije *B. megaterium*.

Krnji BmIleRS	$\theta_{\text{ekspresije}} / ^\circ\text{C}$	$t_{\text{ekspresije}}$	$c(\text{IPTG}) / \text{mmol dm}^{-3}$	Liza	Dodatni uvjeti	Rezultati
A,B,C	37 30 16	4h 4h ON*	0,25	<i>BugBuster</i>	-	A,B,C u talogu
A,B,C	16	ON	0,1	<i>BugBuster</i>	-	A,B,C u talogu
A,B,C	16	ON	0,05	<i>BugBuster</i> , sonikacija za A	hladan šok toplinski šok 3% EtOH $\text{Mg}^{2+}$ 0,1 Mm	A,B,C u talogu
A,B,C	10	70 h	0,1	<i>BugBuster</i> , sonikacija	-	A,B,C u talogu

\*ON označava ekspresiju preko noći

#### 4.2.2. Pročišćavanje proteina

Uspješno eksprimirani proteini (divlji tip BmIleRS2, PreScission proteaza i proteaza TEV) pročišćeni su afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.3.2. uz HEPES i bez aditiva navedenih u tablici 3.13. Kromatogram dobiven tijekom pročišćavanja divljeg tipa BmIleRS2 prikazan je na slici 4.11. Kromatogrami za pročišćavanje proteaza TEV i PreScission bili su analogni pa nisu zasebno prikazani.



Slika 4.11. Kromatogram pročišćavanja divljeg tipa IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu prema metodi opisanom u tablici 3.14.



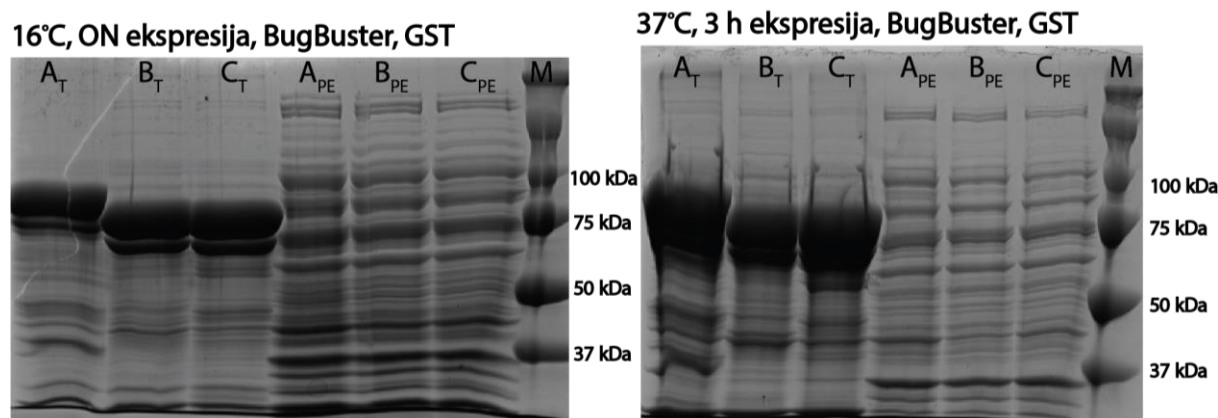
Na kromatogramu uočava se široka vrpca (1) koja odgovara nevezanim proteinima koji prolaze tijekom nanošenja. Sljedeća manja vrpca (2) uočava se u fazi ispiranja 2# uz  $c$  (imidazol) = 30 mmol dm<sup>-3</sup> i pripada proteinima koji se nespecifično vežu na kolonu. Treća vrpca odgovara fazi elucije uz  $c$  (imidazol) = 200 mmol dm<sup>-3</sup> u kojoj izlaze proteini specifično vezani na kolonu jer imaju His-privjesak. Divlji tip BmIleRS2, PreScission proteaza i TEV proteaza imaju His-privjesak i eluiraju se u frakcijama treće vrpce. Uspješnost pročišćavanja provjerena je metodom SDS-PAGE, proteini su ukoncentrirani prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.3.9., a koncentracije izmjerene spektrofotometrom NanoDrop. Za divlji tip BmIleRS2 izmjereni omjer  $A_{260}/A_{280}$  iznosio je 1,7 što upućuje na onečišćenje nukleinskim kiselinama, nukleotidima ili spojevima s purinskim i pirimidinskim bazama koje apsorbiraju pri 260 nm. Budući da su tRNA i aminoacil-adenilati supstrati aaRS, nerijetko se mogu supročistiti s aaRS vezani u aktivnom mjestu. Proveden je postupak pročišćavanja aaRS od adenilata prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.3.5. Postupak se temelji na reakciji pirofosforolize u kojoj aminoacil-adenilat nastao u reakciji aktivacije koju katalizira aaRS reagira s dodanim pirofosfatom pri čemu nastaje ATP i disocira u otopinu. Nakon pirofosforolize enzim je ponovno pročišćen afinitetnom kromatografijom uz dodatno ispiranje mobilnom fazom s pirofosfatom. Ovim postupkom omjer  $A_{260}/A_{280}$  smanjen je na 0,6 koji je karakterističan za čiste proteine što ukazuje na to da je BmIleRS2 doista bio onečišćen aminoacil-adenilatom.

#### 4.2.3. Optimizacija prekomjerne ekspresije fuzioniranih proteina i proteina koekspimiranih sa šaperonima

Najčešće strategije za povećanje topljivosti proteina nakon optimizacije uvjeta uključuju fuzioniranje proteinskih privjesaka za koje je poznato da povećavaju topljivost proteina i sprječavaju agregiranje.<sup>26,100,107</sup> Primjeri takvih fuzijskih privjesaka su MBP<sup>108</sup>, GST<sup>109</sup>, SUMO<sup>110</sup> (engl. *small ubiquitin modifying protein*), NusA<sup>111</sup> (engl. *N-utilizing substance*) i ubikvitin<sup>112</sup>. Odabrani su MBP i GST na temelju njihove efikasnosti u poboljšanju topljivosti i njihovoj dostupnosti.

Geni za krnje oblike BmIleRS2 A, B i C ugrađeni su u ekspresijski vektor pGEX-6P-3 kao što je opisano u poglavlju 4.1.2. Dobivenim rekombinantnim plazmidom transformirane bakterijske stanice *E. coli* soja BL21(DE3). Uzgoj bakterijskih stanica i ekspresija krnjih oblika s GST-privjeskom provedeni su u manjim volumenima, a općeniti protokol opisan je u poglavlju 3.2.3.1. Provedena je ekspresija pri 37 °C (3 h), 25 °C (5 h) i 16 °C (preko noći) uz

0,25 mmol dm<sup>-3</sup> IPTG, a priprema proteinskog ekstrakta provedena je prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.3.2. uz *BugBuster* i sonikaciju. Proteinski ekstrakti i talozi nakon razbijanja stanica analizirani su SDS-PAGE-om. Rezultati ekspresije pri 25 °C i 37 °C uz razbijanje stanica *BugBusterom* su prikazani na slici 4.12., a rezultati ekspresije uz pripremu proteinskih ekstrakata sonikacijom su analogni prikazanim rezultatima i nalaze se u Dodatku na slici D9.

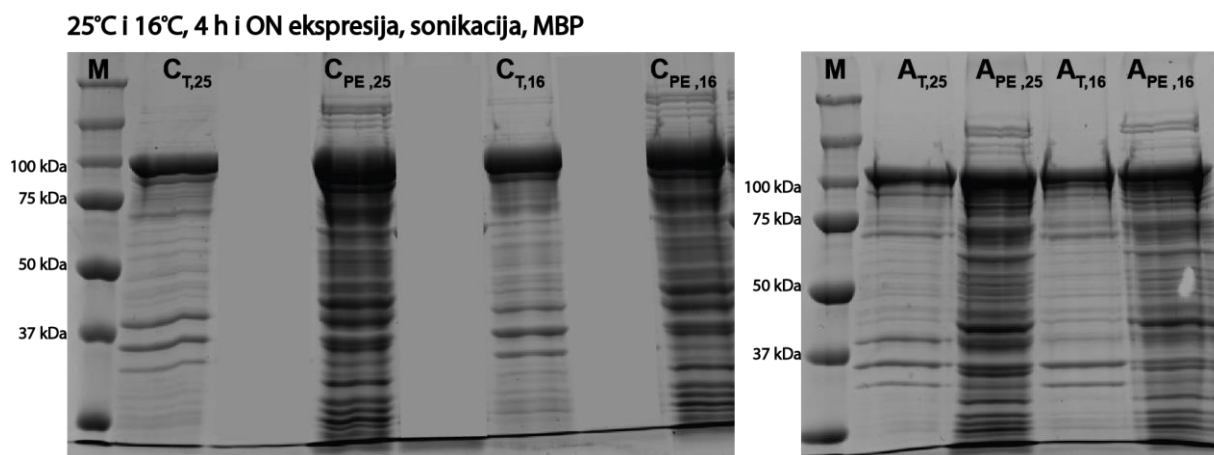


**Slika 4.12. SDS-PAGE analiza ekspresije krnjih oblika BmIleRS2 fuzioniranih s GST-privjeskom na 16 °C i 37 °C uz 0,25 mmol dm<sup>-3</sup> IPTG, razbijanje stanica uz *BugBuster*. ON označava ekspresiju preko noći, A, B, C krnje IleRS2 fuzionirane s GST, M marker, T u indeksu talog, a PE proteinski ekstrakt. Korišten je marker Precision Plus Protein Standards Unstained (*Bio-Rad*).**

Kao i u svim prethodnim ekspresijama, u jažicama u kojima su nanoseni talozi uzoraka krnjih konstrukata s GST-privjeskom, vide se intenzivne vrpce koje odgovaraju krnjim proteinima na oko 96 kDa (A) i 88 kDa (B i C). U jažicama s uzorcima proteinskih ekstrakata u slučaju uzoraka krnjih proteina A, B i C nema izraženih linija na očekivanom položaju kao kod taloga. Za linije pri oko 80 kDa u jažicama s uzorcima proteinskih ekstrakata krnjih IleRS A, B, C malo je vjerojatno da dolaze od krnjih proteina jer se linije pojavljuju u sve tri jažice, a konstrukt A se razlikuje za 8 kDa od B i C. Također, u talozima se jasno vidi prethodno navedena razlika u veličinama krnjih konstrukata, stoga spomenute linije vjerojatno pripadaju drugim eksprimiranim proteinima iste molekulske mase (kao što se to moglo uočiti i u prethodnim ekspresijama). Ono što se razlikuje od prethodnih ekspresija je pojava dodatnih vrpca u jažicama s talozima za uzorke sva tri krnja oblika BmIleRS2\_GST. Dodatna vrpca može biti posljedica cijepanja krnjih proteina u stanicama, a s obzirom na to da je razmak između dvije vrpce u sva tri uzorka jednak i odgovara oko 10-20 kDa može se pretpostaviti da dolazi do cijepanja između sljedova krnjih proteina i slijeda GST-privjeska uslijed djelovanja endogenih proteaza

u bakteriji *E. coli*. U tom slučaju očekivana je još jedna dodatna vrpca jer se fuzija cijepa na dva dijela, ali ona nije prisutna na gelovima. Razlog tome je činjenica da je sada samostalni GST topljiv i odlazi u proteinski ekstrakt. Nadalje, neovisno o tome je li GST nakon lize stanica u talogu ili ekstraktu, zbog njegove male molekulska masa (oko 25 kDa) on se zapravo nalazi na fronti gela i nije odvojen što onemogućuje vizualizaciju njegove vrpce.

Geni za krnje oblike BmIleRS2 A i C ugrađeni su u ekspresijski vektor pMAL-c2x kao što je opisano u poglavlju 4.1.3. te su dobivenim rekombinantnim plazmidima i kontrolnim praznim pMAL-c2x transformirane bakterijske stanice *E. coli* soja BL21(DE3). Uzgoj bakterijskih stanica i ekspresija krnjih oblika s MBP-privjeskom provedeni su u manjim volumenima, a općeniti protokol opisan je u poglavlju 3.2.3.1. Provedena je ekspresija pri 37 °C (3 h), 25 °C (5 h) i 16 °C (ON) uz 0,25 mmol dm<sup>-3</sup> IPTG, a priprema proteinskog ekstrakta provedena je prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.3.2. uz sonikaciju i *BugBuster*. Proteinski ekstrakti i talozi nakon razbijanja stanica analizirani su SDS-PAGE-om. Rezultati ekspresije pri 25 °C (5 h) i 16 °C (ON) uz pripremu proteinskog ekstrakta sonikacijom prikazani su na slici 4.13. Rezultati ekspresije pri 37 °C (3 h) i 25 °C (5 h) uz pripremu proteinskog ekstrakta *BugBusterom* nalaze se u Dodatku na slici D10.



**Slika 4.13. SDS-PAGE analiza ekspresije krnjih oblika BmIleRS2 fuzioniranih s MBP-privjeskom na 16 °C i 25 °C uz 0,25 mmol dm<sup>-3</sup> IPTG i razbijanje stanica sonikacijom. ON označava ekspresiju preko noći, A i C krnje IleRS2 fuzionirane s MBP, M marker, T u indeksu talog, a PE proteinski ekstrakt. Korišten je marker Precision Plus Protein Standards Unstained (*Bio-Rad*).**

Pri obje temperature ekspresije za A\_MBP i C\_MBP prisutne su vrpce na odgovarajućih 111 kDa (A\_MBP) i 103 kDa (C\_MBP) u jažicama s uzorcima taloga i ekstrakata. Uspješno su eksprimirani krnji konstrukti BmIleRS2 A i C u fuziji s MBP-privjeskom pri 16 °C i 25 °C i uz 0,25 mmol dm<sup>-3</sup> IPTG te uz pripremu proteinskog ekstrakta uz razbijanje stanica sonikacijom.

Krnji proteini nakon razbijanja stanica bili su prisutni u proteinskom ekstraktu što sugerira mogućnost da su topljivi. Iako su prisutni u ekstraktu, potrebno je naglasiti da dio proteina ipak taloži i zaostaje u talogu nakon sonikacije. Fuzijski oblici krnjih oblika pročišćeni su i detaljnije analizirani afinitetnom kromatografijom i gel-filtracijom što je opisano u poglavlju 4.2.4. U slučaju ekspresije pri 37 °C i 25 °C te pripremu staničnog ekstrakta uz *BugBuster*, A\_MBP pri obje temperature nije eksprimiran (dodatak slika D10), a dodatni eksperimenti su pokazali da je korištena kolonija bez plazmida A\_pMAL-c2x\_TEV. Nakon ponovljene transformacije A\_MBP je eksprimiran, ali je bio prisutan samo u talogu (rezultati nisu prikazani) što ukazuje na utjecaj *BugBustera* na topljivost, budući da je nakon lize stanica sonikacijom A\_MBP bio prisutan u staničnom ekstraktu (slika 4.13). Krnja varijanta C\_MBP u slučaju ekspresije na 37 °C taloži, dok je nakon ekspresije pri 25 °C prisutna u ekstraktu i nakon pripreme staničnom ekstraktu uz *BugBuster*.

Kako bi se dalje istražila mogućnost proizvodnje topljivih krnjih konstrukata Bm1leRS2 eksprimirani su i uz koekspresiju s šaperonima. Korišteno je pet plazmida s različitim kombinacijama ugrađenih gena za šaperone. Opis plazmida nalazi se u tablici 3.10. prikazanoj u poglavlju 3.2.3.1.

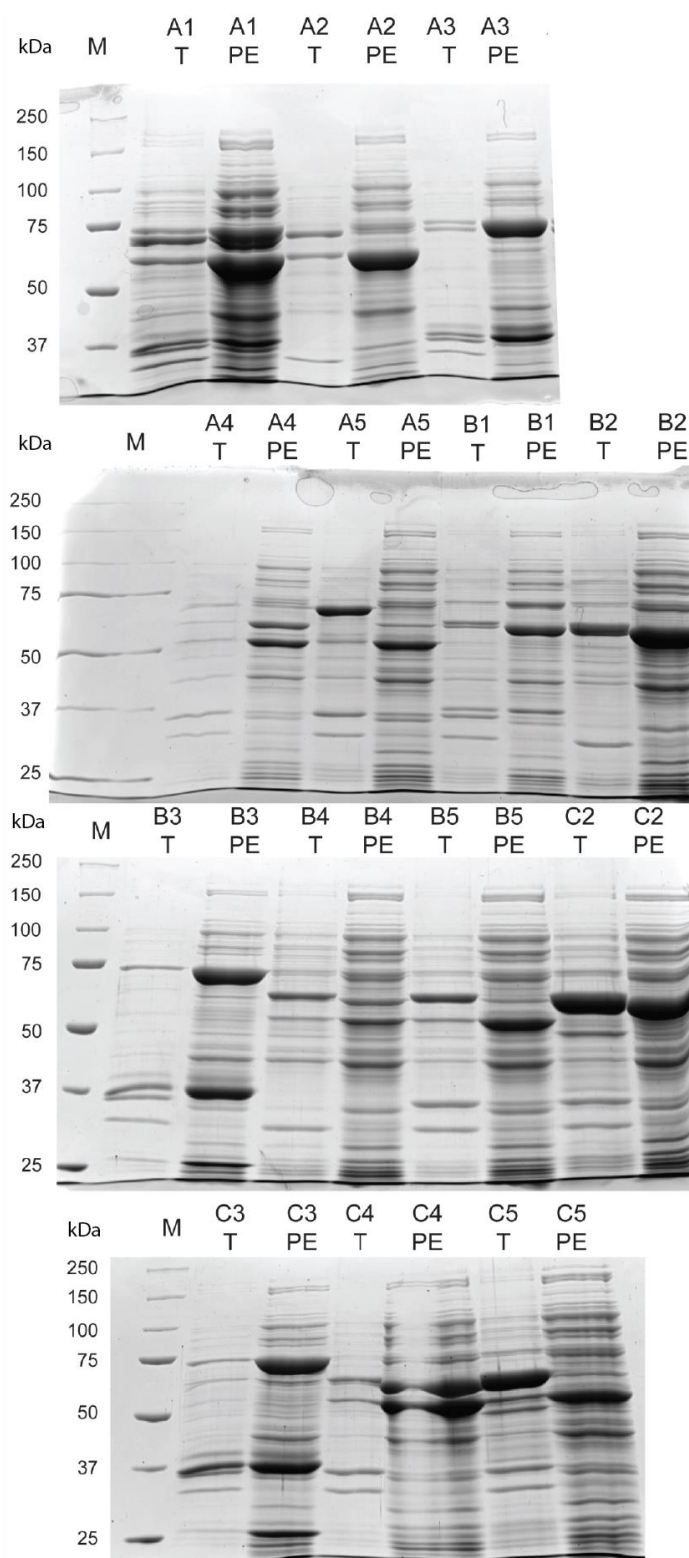
**Tablica 3.10. Korišteni plazmidi za koekspresiju šaperona.**

#	plazmid	šaperoni	induktor	rezistencija
1.	pG-KJE8	DnaK-DnaJ-GrpE GroES-GroEL	L-arabinoza tetraciklin	Cm
2.	pGro7	GroES-GroEL	L-arabinoza	Cm
3.	pKJE7	DnaK-DnaJ-GrpE	L-arabinoza	Cm
4.	pG-Tf2	GroES-GroEL-Tig	tetraciklin	Cm
5.	pTf16	Tig	L-arabinoza	Cm

**Tablica 4.6. Molarne mase šaperona korištenih u koekspresiji krnjih varijanti BmIleRS2 A, B i C.**

Šaperon	Molarna masa/ kDa
DnaK	70
DnaJ	40
GrpE	22
GroES	60
GroEL	10
Tig	56

Proveden je uzgoj i koekspresija krnjih varijanti BmIleRS2 A, B i C uz ekspresijske plazmide navedene u tablici 3.8. za koje će se u daljnjem tekstu koristiti brojčane oznake navedene u tablici. Kako bi koekspresija bila moguća napravljena je kotransformacija plazmida pET28b s genima za krnje konstrukte i plazmida s genima za šaperone u bakterijske stanice *E. coli* soja BL21(DE3) postupkom opisanim u poglavlju 3.2.1.2. Šaperoni su eksprimirani od početka uzgoja, a ekspresija krnjih proteina je provedena klasično pri 16 °C (preko noći) i 30 °C (3 h) uz indukciju s 0,25 mmol dm<sup>-3</sup> IPTG-om, a proteinski ekstrakti su pripremljeni uz sonikaciju. Proteinski ekstrakti i talozi nakon razbijanja stanica analizirani su SDS-PAGE-om. Rezultati su prikazani na slici 4.14. za ekspresiju pri 16 °C jer su rezultati za ekspresiju pri 30 °C jednaki (prikazani u Dodatku na slici D11). Nedostaju uzorci za varijantu krnjeg konstrukta C i seta šaperona 1 jer bakterijske stanice nisu uspješno transformirane.



**Slika 4.14. SDS-PAGE analiza koekspresije krnjih oblika BmIleRS2 i različitih kombinacija šaperona na 16 °C uz 0,25 mmol dm<sup>-3</sup> IPTG i razbijanje stanica sonikacijom. A, B i C označavaju krnje IleRS2, 1-5 setove šaperona navedene u tablici 3.8., M marker, T u indeksu talog, a PE proteinski ekstrakt. Korišten je marker Precision Plus Protein Standards Unstained (Bio-Rad).**

Na gelovima je teško protumačiti i povezati vrpce s pojedinim proteinima jer se dio šaperona veličinom poklapa s krnjim konstruktima BmIleRS2. Na primjer, DnaK ima molarnu masu 70 kDa što je gotovo jednako kao konstrukt A (69 kDa), dok GroES ima molarnu masu 60 kDa što je blisko konstruktima B i C (61 kDa). Za uzorak A1 ne može se jednoznačno reći ima li ekspresije i topljivog konstrukta A zbog koeksprimiranih DnaK (70 kDa), kod uzorka A2, koji ne sadrži šaperone veličine 70 kDa, mogu se razlučiti dvije linije u ekstraktu oko 60 kDa (GroES) i 70 kDa (konstrukt A). Za uzorak A3 je jednako kao i za A1, kod uzorka A4 vide se vrpce malog intenziteta pri oko 70 kDa koje bi mogle pripadati konstrukt A, kod uzorka A5 vrpca u talogu oko 70 kDa je jasna i može se jasno dodijeliti konstrukt A, dok je u ekstraktu vrpca na tom položaju slabijeg intenziteta, a vrpca pri 56 kDa koja pripada Tig (engl. *trigger factor*) intenzivna. Na isti način mogu se analizirati uzorci za konstrukte B i C te se za uzorak B5 u talogu i C5 u talogu mogu razlučiti vrpce konstrukata dok su u ekstraktima one vrlo slabe. Budući da se analizom ekspresija metodom SDS-PAGE za većinu provedenih koekspressija ne može zaključiti jesu li eksprimirani i topljivi krnji konstrukti BmIleRS2 zbog prisutnosti šaperona, eksprimirani proteini su pročišćeni i analizirani afinitetnom kromatografijom, gel-filtracijom i SDS-poliakrilamidnom elektroforezom što je opisano u poglavlju 4.2.4.

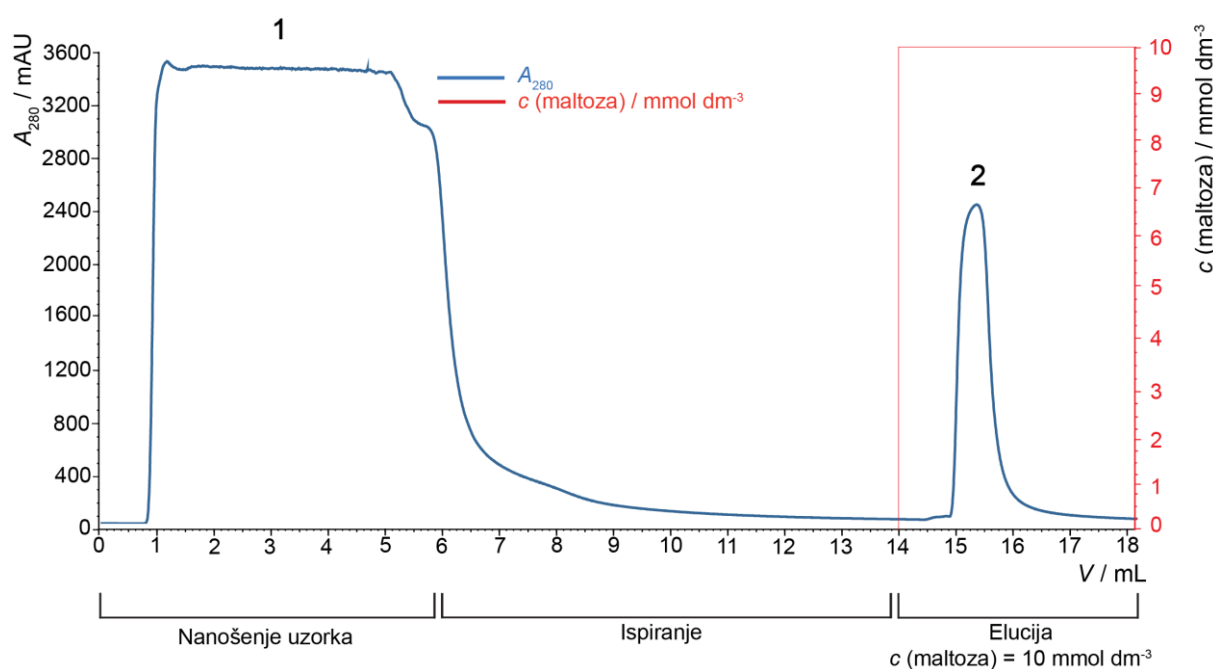
Posljednje su eksprimirane proteinske fuzije krnjih oblika i MBP-privjeska uz koekspressiju šaperona. Napravljen je uzgoj i ekspresija A i C krnjih varijanti uz šaperone seta 1 jer on sadrži sve šaperone koji postoje u drugim setovima osim Tiga. Ekspresija se odvijala na 16 °C, inducirana je s 0,25 mmol dm<sup>-3</sup> IPTG-om i proteinski ekstrakti su pripremljeni uz sonikaciju. Proteini su pročišćeni i analizirani afinitetnom kromatografijom, gel-filtracijom i SDS-poliakrilamidnom elektroforezom što je opisano u poglavlju 4.2.4.

Osim prethodno navedenih testirane su i ekspresije fuzija krnjih proteina s GST-privjeskom uz koekspressiju šaperona u istim uvjetima kao i s MBP-privjeskom, ali u svim kombinacijama krnji IleRS2 bili su prisutni samo u talogu. Također osim krnjih oblika IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* dizajnirana je i krnja IleRS2 iz bakterije *Thermus thermophilus* analogna krnjoj varijanti C\_BmIleRS2 koja je isto sintetizirana i ugrađena u plazmid pET28b od strane tvrtke *Twist Bioscience*. Varijanta iz *T. thermophilus* odabrana je jer ova bakterija živi na područjima visokih temperatura te su proteini iz takvih bakterija općenito stabilniji<sup>119-121</sup> što bi moglo doprinijeti ekspresiji topljive, pravilno smotane krnje varijante IleRS2. Testiran je uzgoj s i bez koekspressije šaperona, no ekspresija nije bila uspješnija od varijanti iz bakterije

*B. megaterium*. S obzirom na prethodno navedeno i opseg eksperimentalnog rada koji zahtjeva daljnje istraživanje, rad s krnjim oblikom iz *T. thermophilus* nije nastavljen.

#### 4.2.4. Pročišćavanje fuzioniranih proteina i proteina koekspimiranih sa šaperonima

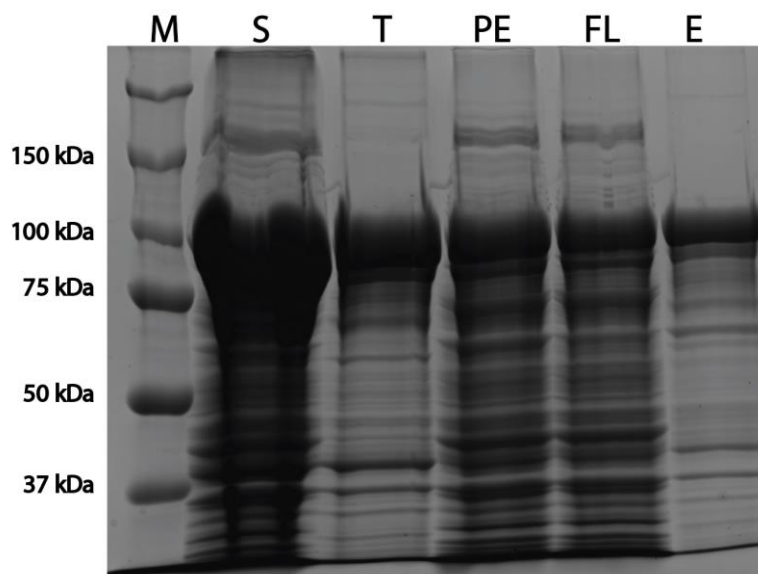
Eksprimirani fuzionirani krnji oblici BmIleRS2 A i C s MBP-privjeskom pročišćeni su afinitetnom kromatografijom na dekstrin agarozu prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.3.3. uz HEPES i bez aditiva. Prvo je pročišćen C\_MBP, a kromatogram dobiven tijekom pročišćavanja prikazan je na slici 4.15.



**Slika 4.15. Kromatogram pročišćavanja krnjeg oblika C IleRS2 s MBP-privjeskom iz bakterije *B. megaterium* afinitetnom kromatografijom na dekstrin agarozu prema metodi opisanoj u tablici 3.16.**

Tijekom nanošenja uzorka vidi se široka vrhova visoke apsorbanije koja odgovara nevezanim proteinima koji prolaze kroz kolonu. Druga, uža vrhova koja se javlja u fazi elucije odgovara proteinima s MBP-privjeskom koji su se vezali za kolonu što upućuje na krnji protein C fuzioniran s MBP-privjeskom. Kako bi se utvrdio sastav eluiranih frakcija napravljena je SDS-poliakrilamidna elektroforeza, a rezultati su prikazani na slici 4.16.



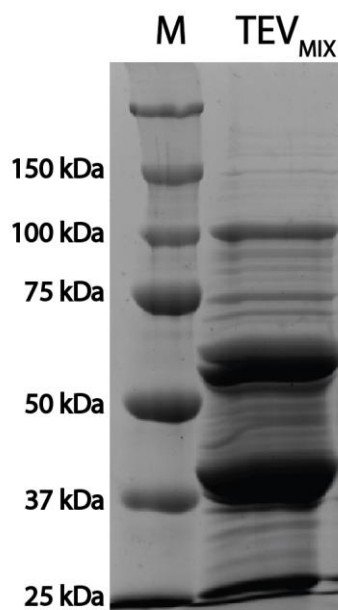


**Slika 4.16. SDS-PAGE analiza pročišćavanja C krnjeg oblika BmIleRS2 fuzioniranog s MBP-privjeskom afinitetnom kromatografijom na dekstrin-agarozu. M označava jažicu s markerom, S sonikat, T talog sonikata, PE proteinski ekstrakt, FL nevezanu frakciju, E eluiranu vezanu frakciju. Korišten je marker Precision Plus Protein Standards Unstained (*Bio-Rad*).**

Na gelu u jažici s nevezanom frakcijom (FL) se može vidjeti vrpca na oko 100 kDa koja odgovara C\_MBP što znači da veliki dio C\_MBP prolazi kao nevezana frakcija što je primijećeno i u daljnjim pročišćavanjima te sugerira mogućnost da količina nanesenog proteina prelazi kapacitet vezanja MBPTrap kolone od 1 mL. Zbog prethodno navedenog pokazalo se da je optimalno pročišćavati proteinske uzorke dobivene iz 500 mL medija u tri navrata. U jažici s frakcijom eluiranog proteina vidi se očekivana intenzivna vrpca koja odgovara C\_MBP-u na oko 100 kDa što potvrđuje da se fuzijski protein specifično veže na kolonu. Prisutna je i blijeda vrpca pri oko 60 kDa koja može pripadati krnjem obliku C jer u stanici postoji mogućnost nespecifičnog cijepanja proteina.<sup>122</sup>

Eluiranim frakcijama fuzijskih proteina bilo je potrebno izmijeniti otopinu u kojoj su eluirani s otopinom koja osigurava optimalne uvjete za aktivnost TEV-proteaze u reakciji uklanjanja MBP-privjeska. Sastav otopine optimalne za aktivnost TEV-proteaze je:  $c(\text{Tris-HCl}) = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$  pH 8,0,  $c(\beta\text{-merkaptanol}) = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Krnji protein s MBP-privjeskom i TEV-proteaza dodani su u masenom omjeru fuzija:TEV = 10:1, a reakcija uklanjanja MBP privjeska TEV-proteazom je provedena na 4 °C preko noći uz miješanje. Uspješnost uklanjanja MBP-privjeska provjerena je SDS-PAGE analizom, a gel je prikazan na slici 4.17. Tijekom cijepanja i pri visokim koncentracijama tijekom ukoncentriravanja

ultrafiltracijom dolazi do taloženja pa je nastali talog iz reakcijske smjese istaložen centrifugiranjem prije daljnjeg pročišćavanja.

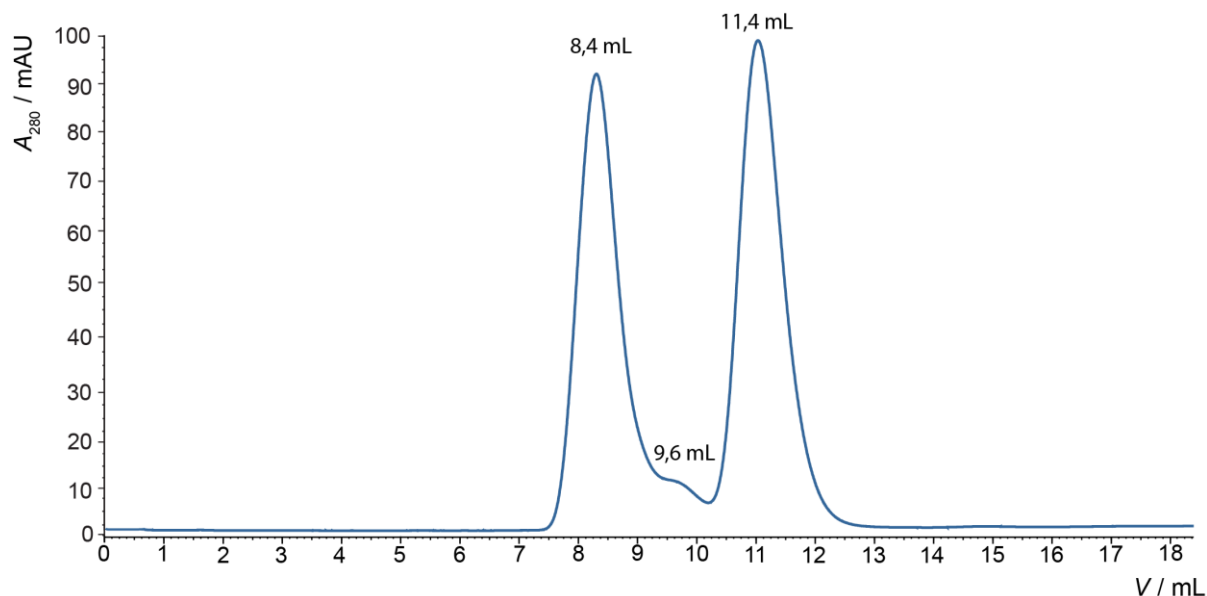


**Slika 4.17. SDS-PAGE analiza uklanjanja MBP-privjeska TEV-proteazom. Jažice: M-marker, TEV<sub>MIX</sub>-reakcijska smjesa C\_MBP i TEV proteaze,. Korišten je marker Precision Plus Protein Standards Unstained (Bio-Rad).**

Na gelu u jažici s reakcijskom smjesom TEV vide se sve očekivane vrpce pri 60 kDa (C\_IleRS2) i 40 kDa (TEV-proteaza), ali prisutna je i vrpca manjeg intenziteta oko 100 kDa (C\_MBP) što znači da dio proteina nije pocijepan, ali većina jest. Nakon uklanjanja MBP-privjeska reakcijska smjesa pročišćena je afinitetnom kromatografijom na dekstrin-agarozu. U nevezanim frakcijama izlazi krnji protein, TEV-proteaza i dio MBP-privjeska, a najveći dio uklonjenog MBP-privjeska i nerazgrađeni krnji protein u fuziji s MBP se eluiraju kao vezana frakcija. Sakupljenim frakcijama s krnjim proteinima izmijenjena je mobilna faza otopinom za pohranu proteina čiji sastav se nalazi u tablici 3.16. Proteini su ukoncentrirani prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.3.9., a koncentracije izmjerene spektrofotometrom NanoDrop.

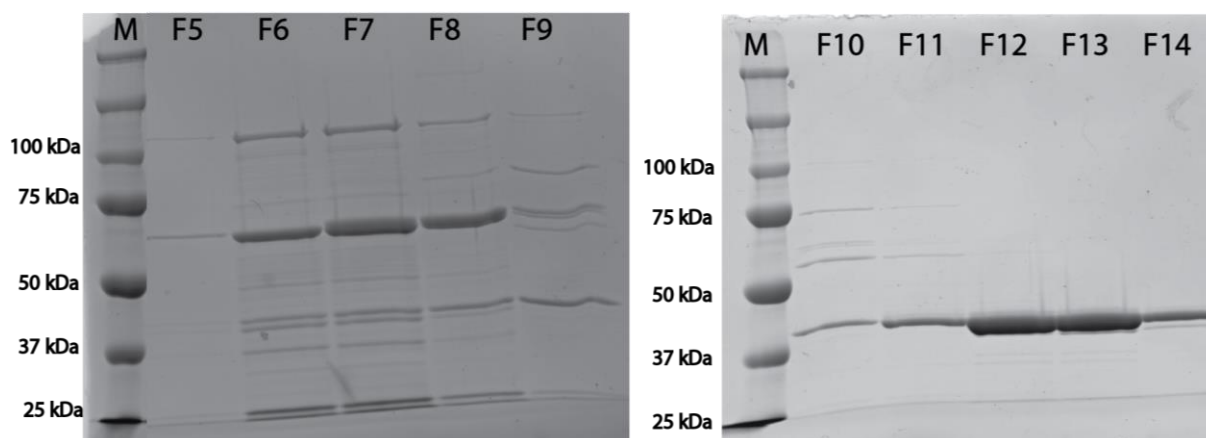
Kako bi se spriječilo taloženje tijekom uklanjanja MBP-privjeska TEV-proteazom i ultrafiltracije modificiran je postupak pročišćavanja. Prvo je smanjeno vrijeme cijepanja TEV-proteazom na 1 h i 30 °C te je isprobano pročišćavanje krnjeg proteina gel-filtracijom na koloni Superdex 75 Increase 10/300 GL kako bi se uklonila TEV-proteaza i MBP. Kao mobilna faza korištena je otopina sastava navedenog u tablici 3.18 uz Hepes. Ovom kolonom uspješno se odvajaju proteini veličine 3-70 kDa. Budući da je krnji protein C veličine 60 kDa on bi trebao izaći prije MBP-a (40 kDa) i TEV-proteaze (20 kDa). U smjesi je prisutan i nerazgrađeni

C\_MBP (cca 100 kDa) pa se vrpce krnjeg proteina C i C\_MBP mogu poklapati. Protein je opet taložio tijekom cijepanja i ukoncentriravanja, ali u naizgled manjoj količini nego u prethodnom postupku. Rezultati ovog pročišćavanja prikazani su na slici 4.18.



**Slika 4.18. Kromatogram pročišćavanja krnjeg oblika C\_IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* nakon uklanjanja MBP-privjeska TEV-proteazom gel-filtracijom na koloni Superdex 75 Increase 10/300 GL prema metodi opisanoj u tablici 3.19.**

Prisutne su dvije jasno razlučene vrpce na kromatogramu na 8,4 mL i 11,4 mL bliske površine i apsorbancije, ali i manja vrpca između njih pri 9,6 mL. Prema rezultatima priloženim u priručniku proizvođača kolone Superdex Increase 75 10/300 GL proteini eluirani ispod 9 mL izlaze u mrtvom volumenu te je njihova masa veća od 75 kDa. Položaj prve vrpce na 8,4 mL nalazi se u području mrtvog volumena te su proteini koji izlaze u ovim frakcijama zasigurno veći od 75 kDa. Sastav eluiranih frakcija u dvije vrpce analiziran je SDS-PAGE metodom, a rezultati su prikazani na slici 4.19.



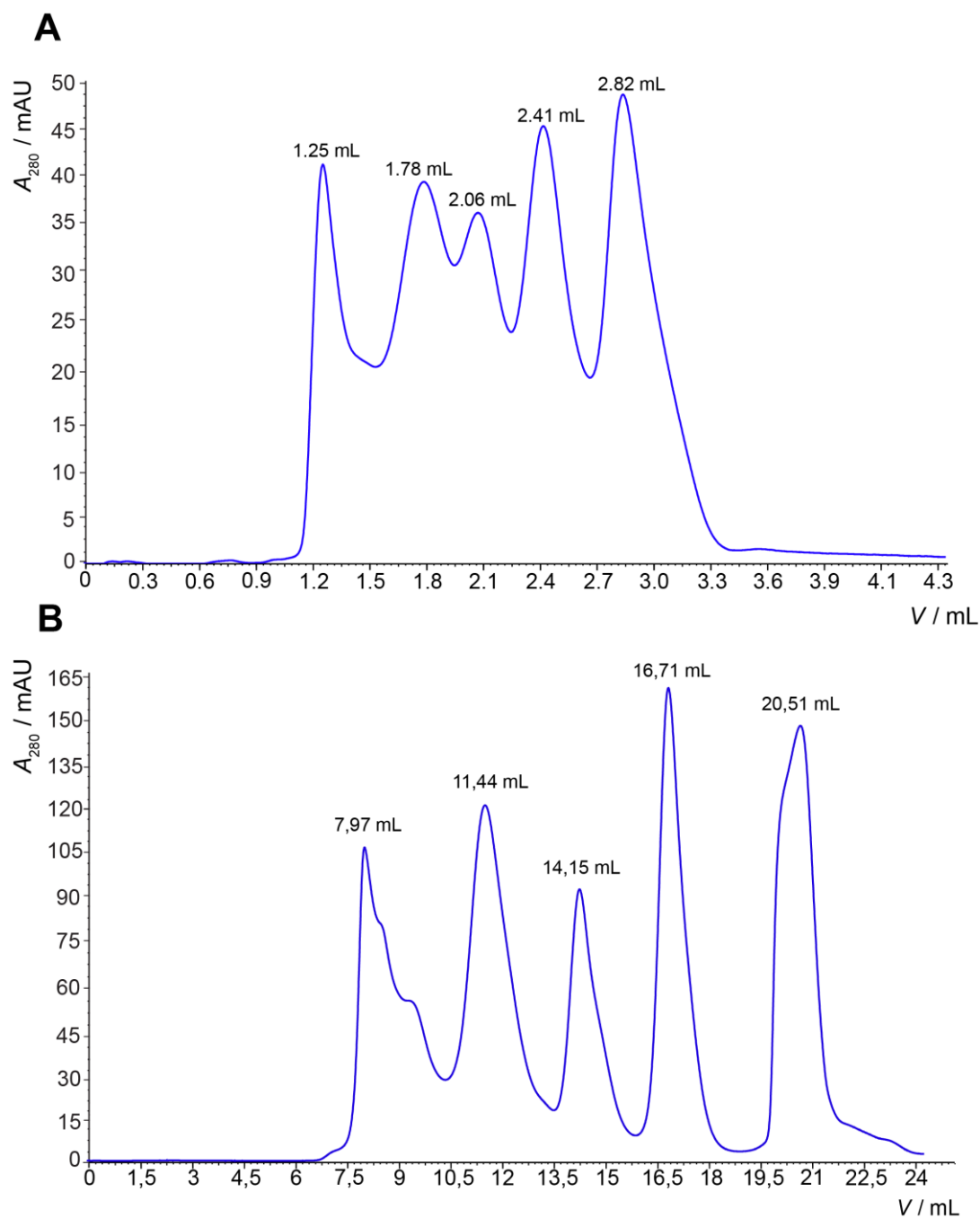
**Slika 4.19. SDS-PAGE analiza pročišćavanja krnjeg oblika C\_IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* nakon uklanjanja MBP-privjeska TEV-proteazom gel-filtracijom na koloni Superdex 75 Increase 10/300 GL. Označene frakcije F5-F8 pripadaju prvoj vrpci na 8,4 mL, frakcije F9-F10 drugoj vrpci na 9,6 mL, a frakcije F11-F14 trećoj vrpci pri 11,4 mL s kromatograma na slici 4.18. Korišten je marker Precision Plus Protein Standards Unstained (*Bio-Rad*).**

Frakcije iz prve vrpce (F5-F8) na 8,4 mL najvećim dijelom sadrže proteine veličine oko 60 kDa što odgovara C\_IleRS2 krnjem proteinu, ali vide se i linije pri 100 kDa (C\_MBP), 40 kDa (MBP) i 25 kDa (TEV-proteaza). Za krnji protein, TEV-proteazu i MBP nije očekivano da izlaze u mrtvom volumenu jer su manji od 75 kDa što je granica isključenja ove kolone. Prethodno navedeno sugerira da su ovi proteini prisutni u obliku topljivih agregata. Druga vrpca koja se nalazi na 9,6 mL mogla bi pripadati neagregiranom C\_IleRS2 s obzirom na to da se i na gelu kod uzoraka frakcija ove vrpce (F9-F10) vide očekivane linije pri 60 kDa koje odgovaraju krnjem proteinu. Frakcije treće vrpce (F11-F14) na 11,4 mL gotovo isključivo sadrže MBP s linijama na gelu pri 40 kDa. Rezultati na gelovima pokazuju da se TEV-proteaza eluira s C\_IleRS2 i objašnjavaju odsutnost dodatne vrpce na kromatogramu koja bi trebala pripadati eluciji TEV-proteaze. Prema sastavu frakcija i položaju vrpca na kromatogramu može se zaključiti da većina C\_IleRS2 krnjeg proteina nakon uklanjanja MBP-privjeska izlazi u mrtvom volumenu, odnosno prisutan je u obliku topljivih agregata zajedno s TEV-proteazom i dijelom pocijepanog MBP-privjeska.

Testirana je aktivnost TEV-proteaze u otopinama različitih sastava i njihov utjecaj na taloženje proteina (tablica 4.7.). Isprobani su Hepes (pH = 7,5) i Tris (pH = 8,0 i 8,8) puferi radi testiranja utjecaja pH na taloženje. Kao alternativa za NaCl korišten je MgCl<sub>2</sub> kako bi se isključila mogućnost utjecaja standardno korištenog NaCl na topljivost proteina tijekom reakcije cijepanja, ali i mogućnost pozitivnog djelovanja MgCl<sub>2</sub> na stabilizaciju i topljivost proteina. Glicerol je dodan jer stabilizira proteine i sprječava njihovo agregiranje.<sup>123</sup> Kao

dodatak korištena je i glukoza koja je osmolit te kao i neki drugi jednostavni šećeri stabilizira proteine u otopini.<sup>124</sup> Optimizacijom cijepanja odabrani su uvjeti provođenja reakcije oko 1 h pri 25 °C u otopini za pohranu sastava:  $c$  (Tris) = 20 mmol dm<sup>-3</sup> pH = 8,0,  $c$  (NaCl) = 25 mmol dm<sup>-3</sup>,  $\varphi$  (glicerol) = 10 %,  $c$  ( $\beta$ -merkaptotanol) = 5 mmol dm<sup>-3</sup>. Kako bi se maksimalno optimizirali uvjeti u otopinama tijekom pročišćavanja, otopini za vezanje, eluciju i otopini za pohranu proteina sastav je prilagođen tako da sadrže Tris (pH = 8,0) umjesto Hepesa (pH = 7,5).

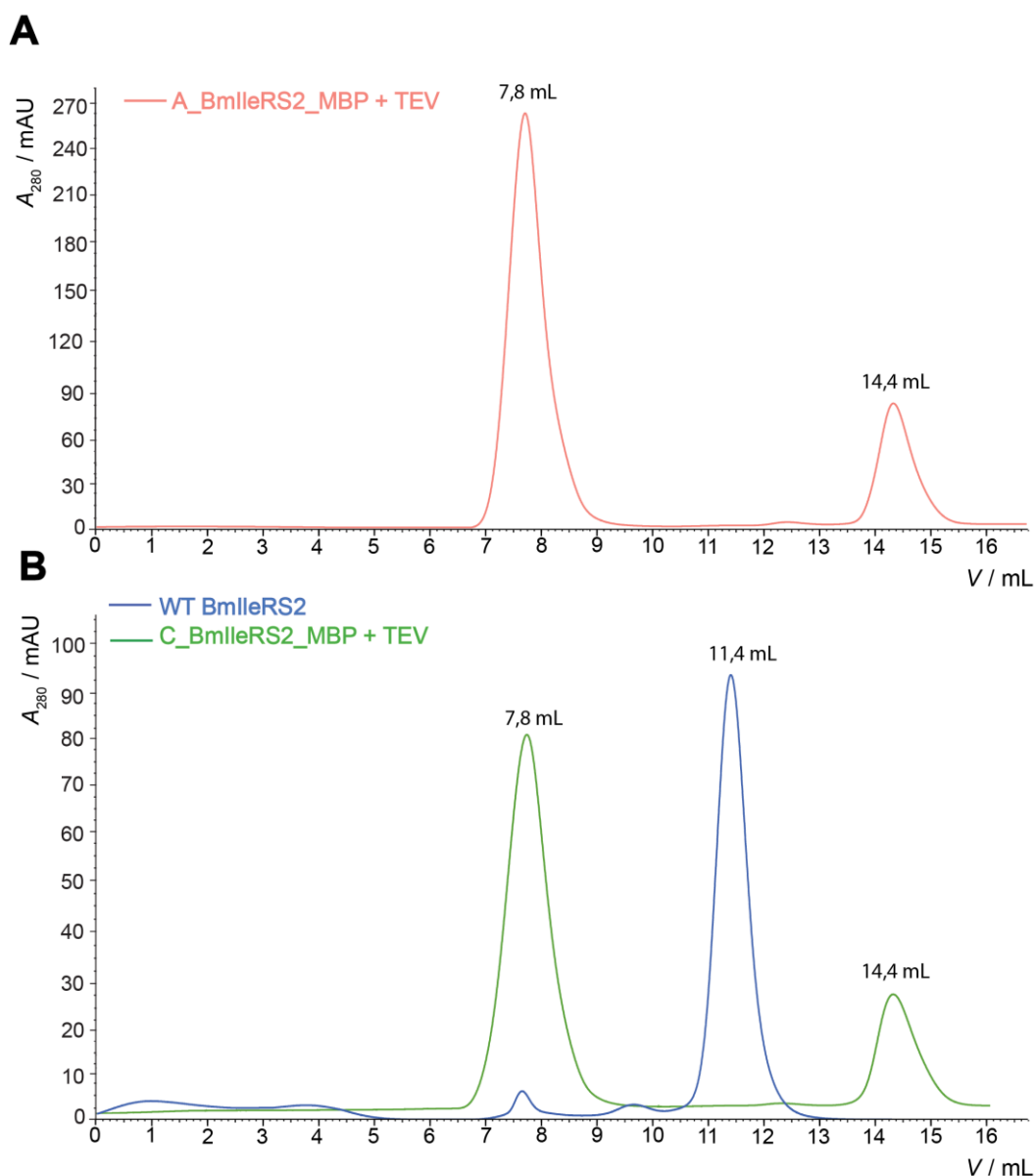
Kako bi se eksprimirani i pročišćeni krnji proteini detaljnije analizirali, u nastavku istraživanja provedene su gel-filtracije na Superdex Increase 200 5/150 GL i Superdex Increase 200 10/300 GL koloni. Superdex Increase 200 5/150 GL je kolona manjeg volumena punjenja (CV = 3 mL) i pogodna za brzu analizu manjih količina uzoraka 4-50  $\mu$ L dok je Superdex Increase 200 10/300 GL kolona većeg volumena punjenja (CV = 24 mL) i pogodna za preparativne svrhe uzoraka volumena 25-500  $\mu$ L. Korištenjem ovih kolona moguće je odvojiti proteine u rasponu molekulskih masa od 10 kDa do 600 kDa. Gel-filtracijom na ovim kolonama provjerena je prisutnost topljivih agregata u otopini krnjih konstrukata IleRS2 koji su prethodno uočeni nakon uklanjanja MBP-privjeska analizom gel-filtracijom na Superdex Increase 75 10/300 GL (slika 4.18.). Za kolone Superdex Increase 200 5/150 GL i Superdex Increase 200 10/300 GL provedena je kalibracija sa standardom proizvođača (*Bio-Rad*) kako bi se u kromatografijama s uzorcima od interesa mogle preciznije dodijeliti pojedine vrpce veličinama proteina. Uzorak standarda sadrži tiroglobulin goveda (670 kDa),  $\gamma$ -globulin goveda (158 kDa), ovalbumin kokoši (44 kDa), mioglobin konja (17 kDa) i vitamin B12 (1,35 kDa). Dobiveni kromatogrami nalaze se na slici 4.20.



**Slika 4.20. Kromatogrami gel-filtracije na koloni Superdex 200 Increase 5/150 GL (A) i Superdex 200 Increase 10/300 GL (B) uzorka *Bio-Rad* standarda za gel-filtraciju koji sadrži tiroglobulin goveda (670 kDa),  $\gamma$ -globulin goveda (158 kDa), ovalbumin kokoši (44 kDa), mioglobin konja (17 kDa) i vitamin B12 (1,35 kDa).**

Na kromatogramu A standarda vidi se vrpca pri 1,25 mL koja odgovara tiroglobulinu goveda (670 kDa) koji izlazi u mrtvom volumenu jer je granica isključenja 600 kDa. Vrpca pri 1,78 mL odgovara  $\gamma$ -globulinu goveda (158 kDa), sljedeća na 2,06 mL ovalbumina kokoši (44 kDa), vrpca na 2,41 mL mioglobinu konja (17 kDa) i posljednja na 2,82 vitaminu B12 (1,35 kDa). Na

kromatogramu B vrpca pri 7,97 mL odgovara tiroglobulinu goveda (670 kDa) koji izlazi u mrtvom volumenu jer je granica isključenja 600 kDa. Vrpca pri 11,44 mL odgovara  $\gamma$ -globulinu goveda (158 kDa), sljedeća na 14,15 mL ovalbumina kokoši (44 kDa), vrpca na 16,71 mL mioglobinu konja (17 kDa) i posljednja na 20,51 mL vitaminu B12 (1,35 kDa). Uzorci krnjih proteina A\_IleRS2\_MBP i C\_IleRS2\_MBP nakon uklanjanja MBP-privjeska TEV-proteazom analizirani su gel-filtracijom na koloni Superdex Increase 200 5/150 GL. Na istoj koloni analiziran je i uzorak divljeg tipa BmIleRS2 radi usporedbe, a rezultati se nalaze na slici 4.21.



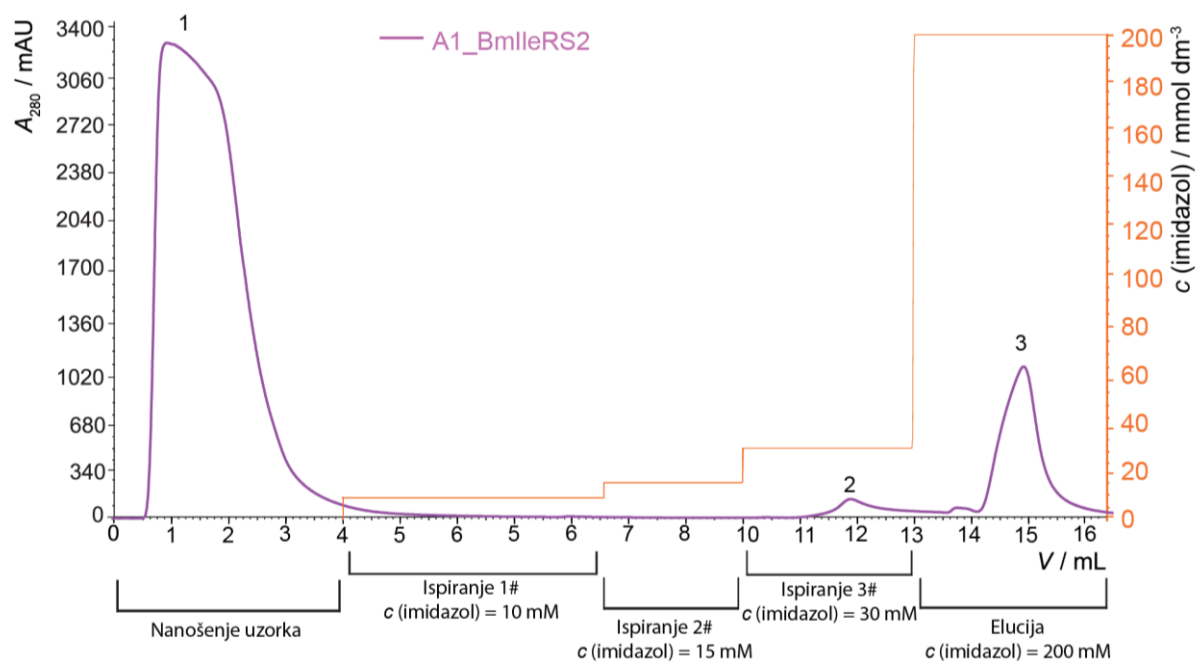
**Slika 4.21. Kromatogrami gel-filtracije na koloni Superdex 200 Increase 10/300 GL uzoraka WT BmIleRS2 i krnjih konstrukata A i C nakon uklanjanja MBP prema metodi opisanoj u tablici 3.19.**

Kromatogrami dobiveni gel-filtracijom na većoj koloni Superdex 200 Increase 10/300 GL potvrđuju da krnji konstrukti A i C agregiraju i pročišćavaju se kao topljivi agregati. Prema kromatogramu B standarda na slici 4.20. proteini eluirani ispod 9 mL izlaze u mrtvom volumenu te je njihova masa veća od 600 kDa. Vrpca WT BmIleRS2 nalazi se na oko 11,4 mL, a vrpce A\_IleRS2 i C\_IleRS2 na oko 7,8 mL što ukazuje na agregate. Na kromatogramu B sa slike 4.21. preklapljeni su dvije vrpce različitih pročišćavanja. Intenzitet signala različit je zbog varijacije u koncentracijama uzoraka koji su nanošeni jer one nisu standardizirane. Vrijednosti molarnih apsorpcijskih koeficijenta analiziranih proteina su slične tako da oni nemaju značajan utjecaj na intenzitet. Prethodno navedeno vrijedi za sve preklapljene kromatograme u nastavku.

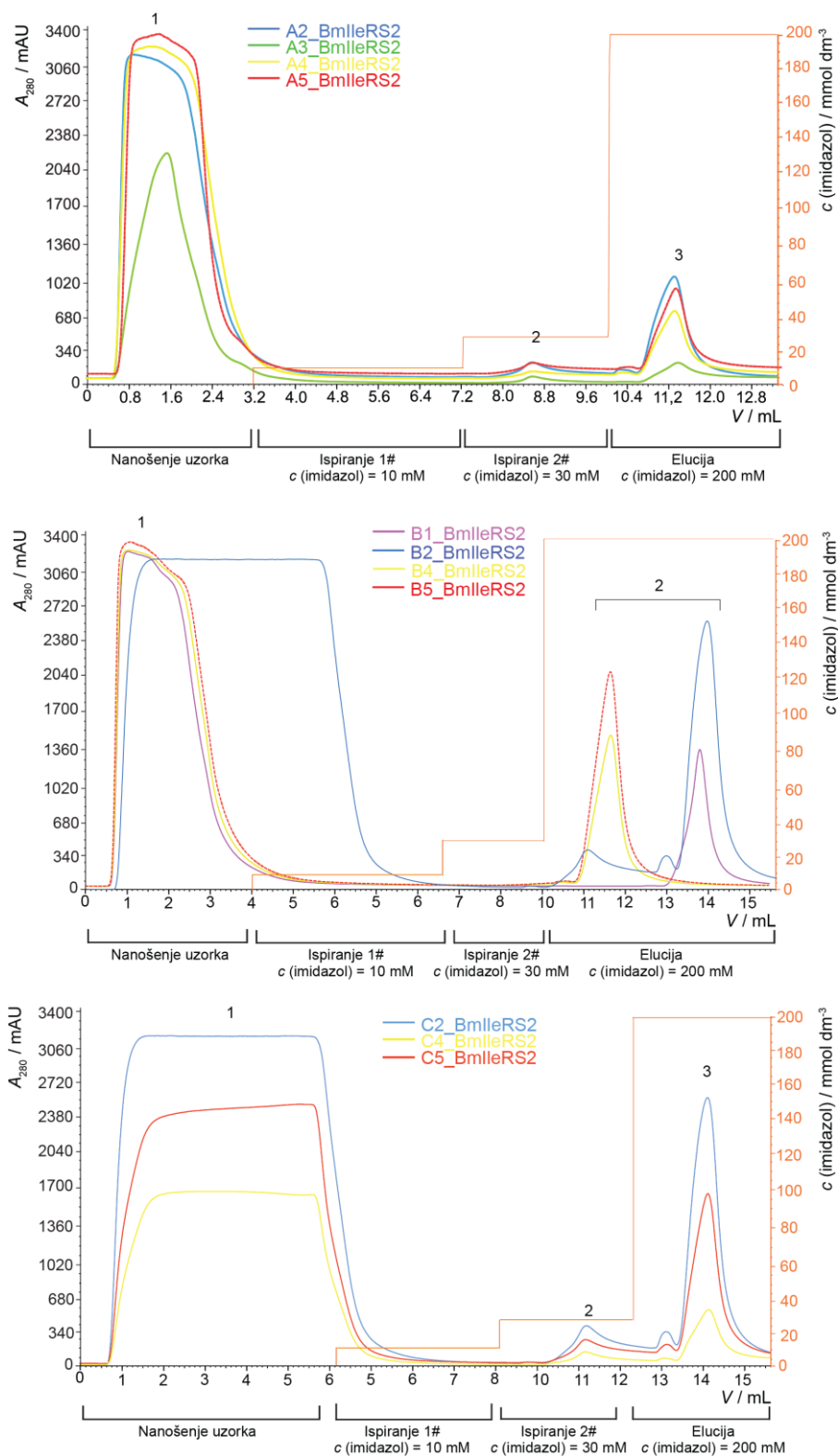
Postoji mogućnost da je i fuzija prisutna u obliku topljivih agregata, stoga je napravljena gel-filtracija C\_MBP fuzije na Superdex Increase 200 5/150 GL koloni. C\_MBP fuzija je također prisutna u obliku topljivih agregata (rezultati nisu prikazani). Razlog zašto topljivi agregati nisu mogli biti uočeni prije gel-filtracije je taj što je metoda SDS-PAGE denaturirajuća pa agregati prije nanošenja na gel bivaju razbijeni te se na gelu vide vrpce veličine monomernih proteina. MBP-privjesak pomaže u povećanju topljivosti agregata krnjih konstrukata, ali na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da ne doprinosi dobivanju pravilno smotanih, topljivih, samostojećih proteina već opet nastaju topljivi agregati. MBP-privjesci vjerojatno prekrivaju hidrofobne dijelove strukture agregata i na taj način omogućuju njihovu topljivost.<sup>108,118</sup> Na ovaj način analiziran je i A\_MBP te je rezultat bio isti – ekspresija i smatanje u obliku topljivih agregata. S obzirom na ove rezultate, daljnje istraživanje fokusiralo se na proteine eksprimirane uz šaperone sa i bez MBP-privjeska.

Krnje varijante BmIleRS2 dobivene uz koekspresiju šaperona pročišćene su afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu i analizirane gel-filtracijom. Pročišćeni su eksprimirani krnji konstrukti BmIleRS2 A, B i C uz sve setove šaperona. Afinitetna kromatografija provedena je prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.3.3. uz navedene mobilne faze. Dobiveni kromatogrami prikazani su na slici 4.23. Kromatogram kombinacije konstrukta A sa setom šaperona 1 prikazan je zasebno na slici 4.22. jer je posebno zanimljiva zbog prisutnosti najviše različitih šaperona. Kombinacije krnjeg konstrukta B sa setovima šaperona 2 i 3 nisu uspješno eksprimirane, kao ni kombinacije krnjeg konstrukta C sa setovima šaperona 1 i 3.



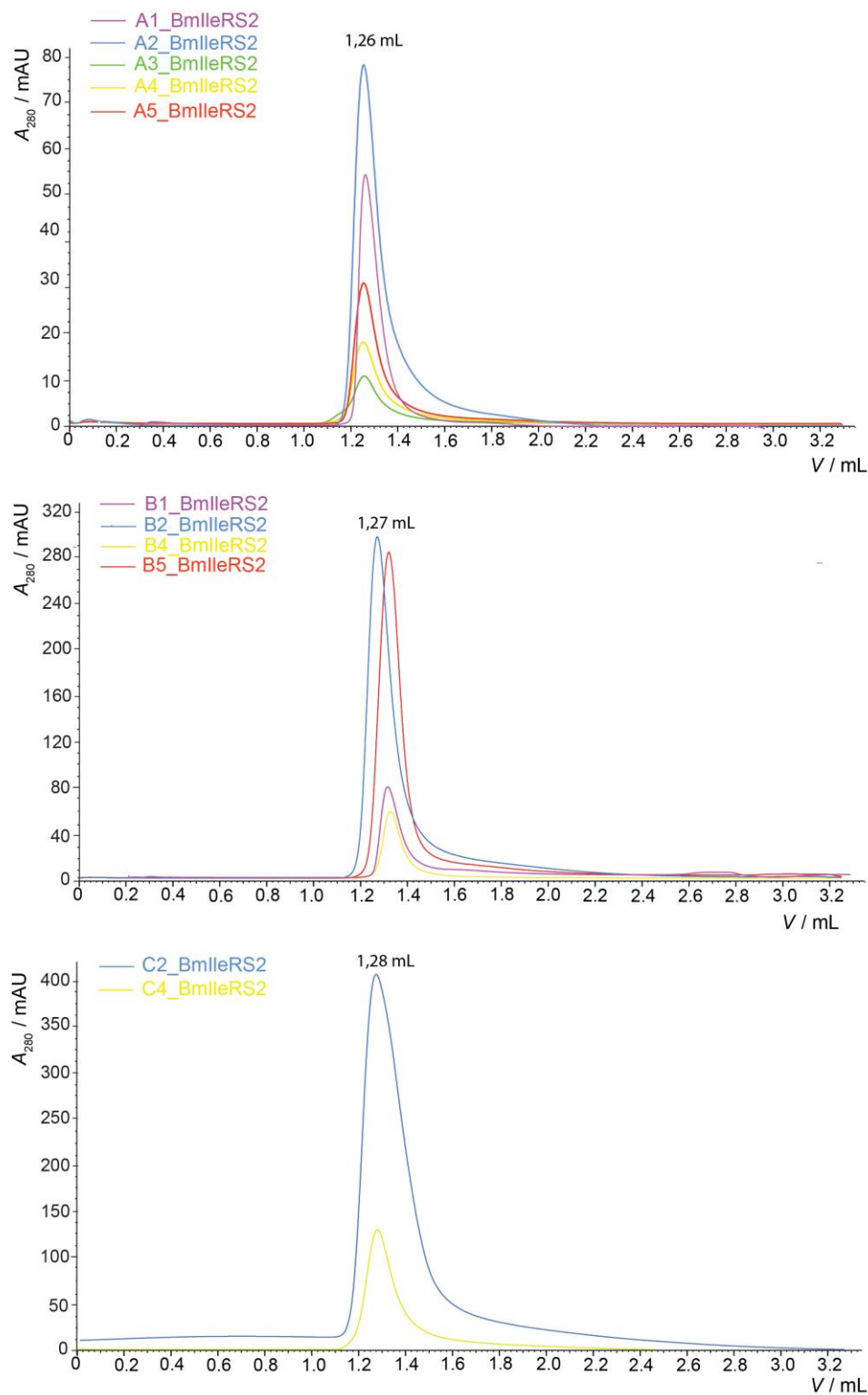


**Slika 4.22. Kromatogram pročišćavanja eksprimiranog krnjeg konstrukta BmIleRS2 A uz set šaperona 1 (tablica 3.10.) afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu prema metodi opisanoj u tablici 3.14.**



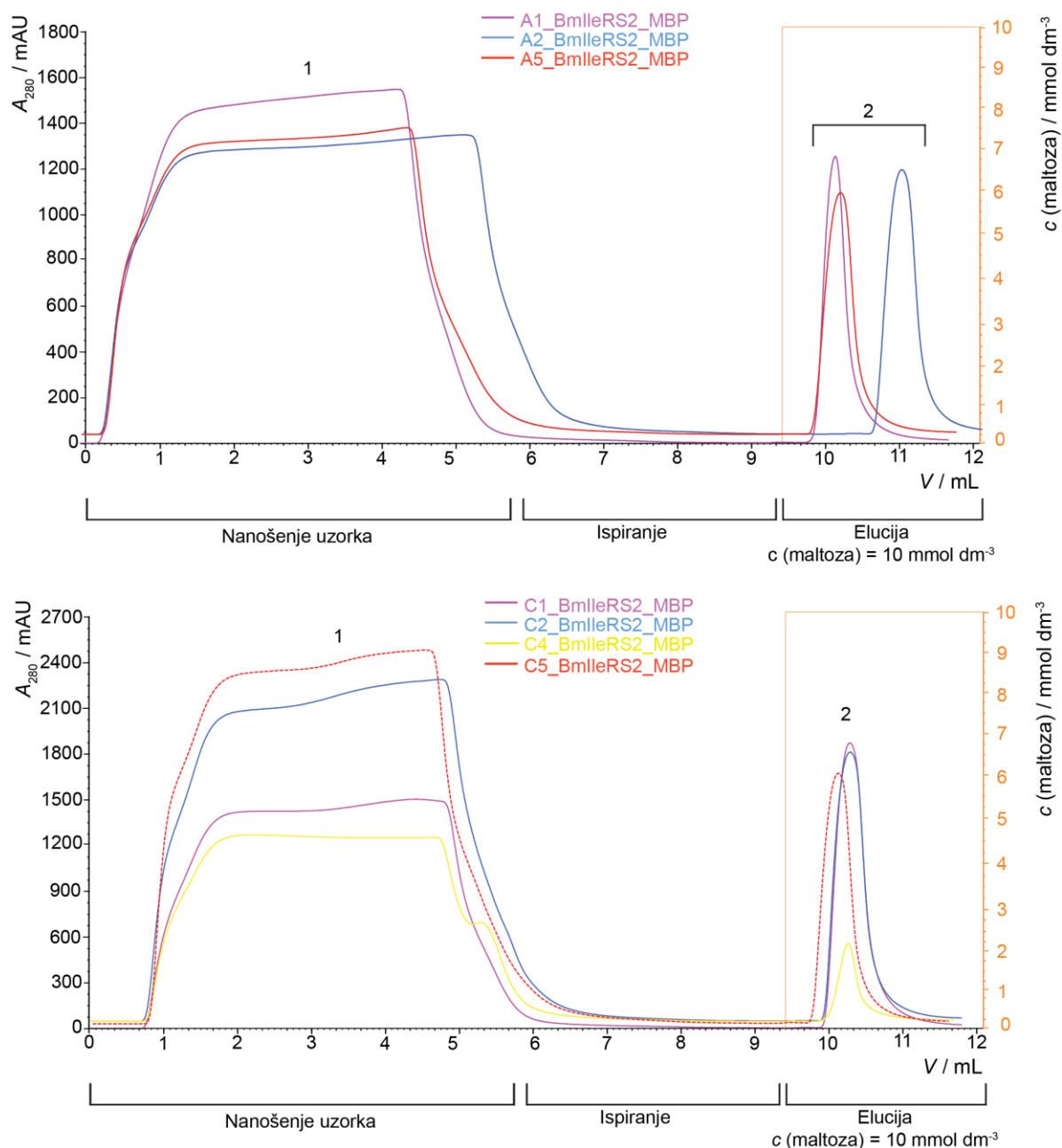
**Slika 4.23. Kromatogrami pročišćavanja eksprimiranih krnjih konstrukta BmIleRS2 A, B i C uz set šaperona 1-5 (tablica 3.10.) afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu prema metodi opisanoj u tablici 3.14.**

Na kromatogramima se može uočiti široka vrpca (1) koja odgovara nevezanim proteinima, dok sljedeća mala vrpca (2) izlazi u fazi ispiranja 2# uz  $c$  (imidazol) = 30 mmol dm<sup>-3</sup> i pripada proteinima koji se nespecifično vežu na kolonu. Treća vrpca odgovara fazi ispiranja uz  $c$  (imidazol) = 200 mmol dm<sup>-3</sup> u kojoj izlaze proteini koji se specifično vežu na kolonu jer imaju His-privjesak. Krnji proteini imaju His-privjesak i eluiraju se u frakcijama treće vrpce. Analizirani krnji oblici A, B i C Bm1leRS2 koeksprimirani uz kombinacije šaperona bili su prisutni u proteinskom ekstraktu. No, kako je prethodno pokazano da proteini formiraju topljive agregate, bilo je potrebno proteine pročišćene na Ni-NTA dodatno analizirati gel-filtracijom. Gel-filtracija provedena je na koloni Superdex Increase 200 5/150 GL. Dobiveni kromatogrami prikazani su na slici 4.24. Analizirani krnji proteini koeksprimirani sa svim kombinacijama šaperona su prisutni u obliku topljivih agregata jer izlaze na oko 1,2 mL.



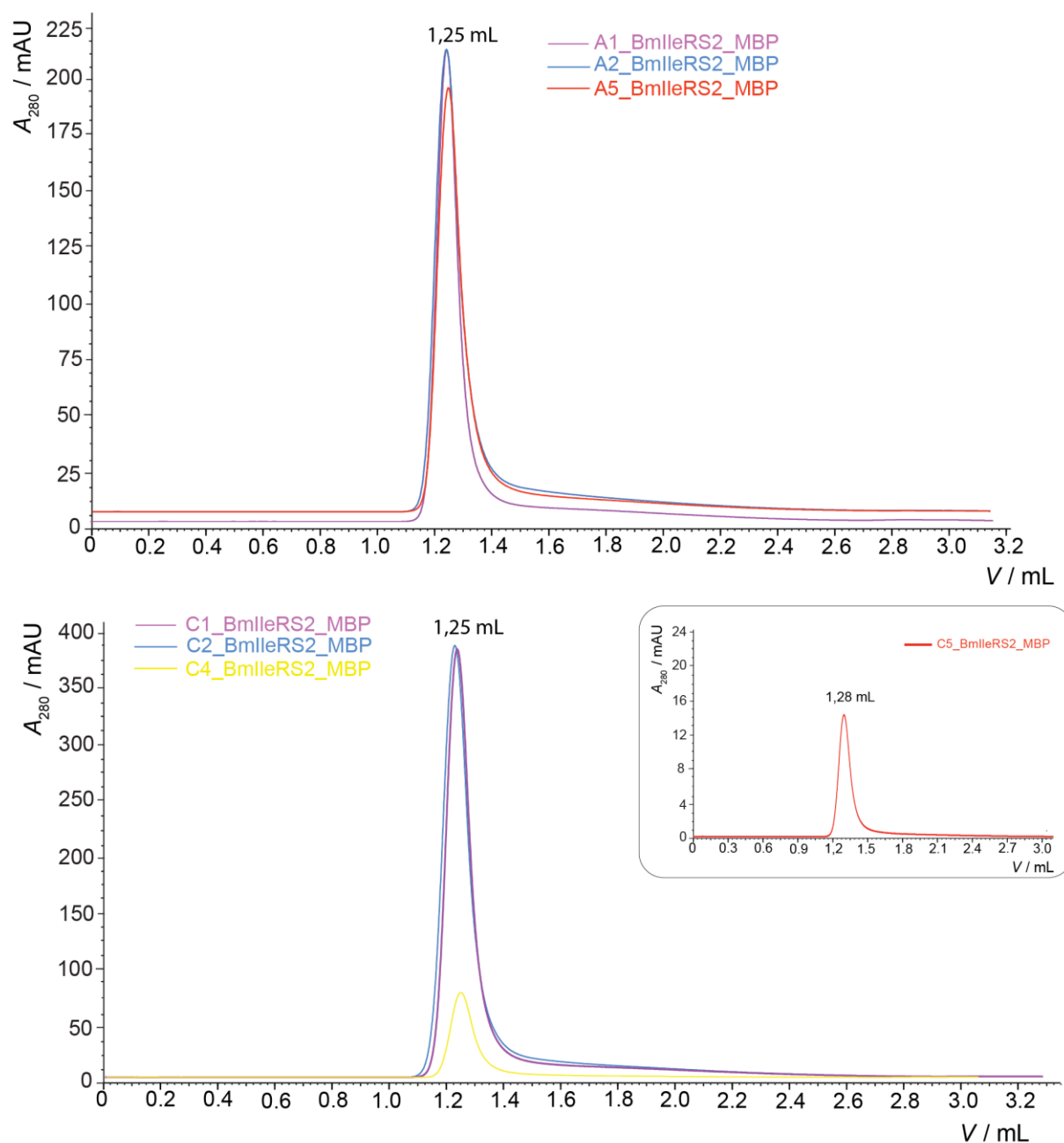
**Slika 4.24.** Kromatogrami pročišćavanja eksprimiranih krnjih konstrukta BmIleRS2 A, B i C uz setove šaperona 1-5 (tablica 3.10.) gel-filtracijom na koloni Superdex 200 Increase 5/150 GL prema metodi opisanoj u tablici 3.19.

Krnji konstrukti BmIleRS2 A i C fuzionirani s MBP-privjeskom i koekspimirani sa različitim setovima šaperona pročišćeni su afinitetnom kromatografijom na dekstrin agarozu prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.3.4. Kombinacije krnjeg konstrukta A fuzioniranog s MBP sa setovima šaperona 3 i 4, kao ni kombinacije krnjeg konstrukta C sa setom šaperona 3 nisu uspješno eksprimirane. Dobiveni kromatogrami prikazani su na slici 4.25.



**Slika 4.25. Kromatogrami pročišćavanja eksprimiranih krnjih konstrukta BmIleRS2 A i C s MBP-privjeskom uz setove šaperona 1-5 (tablica 3.10.) afinitetnom kromatografijom na dekstrin agarozu prema metodi opisanoj u tablici 3.16.**

Svi krnji proteini fuzionirani s MBP i koekspimirani uz sve kombinacije šaperona su prisutni u ekstraktu. Nakon afinitetne kromatografije, provedena je gel-filtracija na koloni Superdex Increase 200 5/150. Dobiveni kromatogrami prikazani su na slici 4.26. Svi krnji proteini fuzionirani s MBP i koekspimirani sa svim kombinacijama šaperona su prisutni u obliku topljivih agregata kao i u prethodnim ekspresijama.



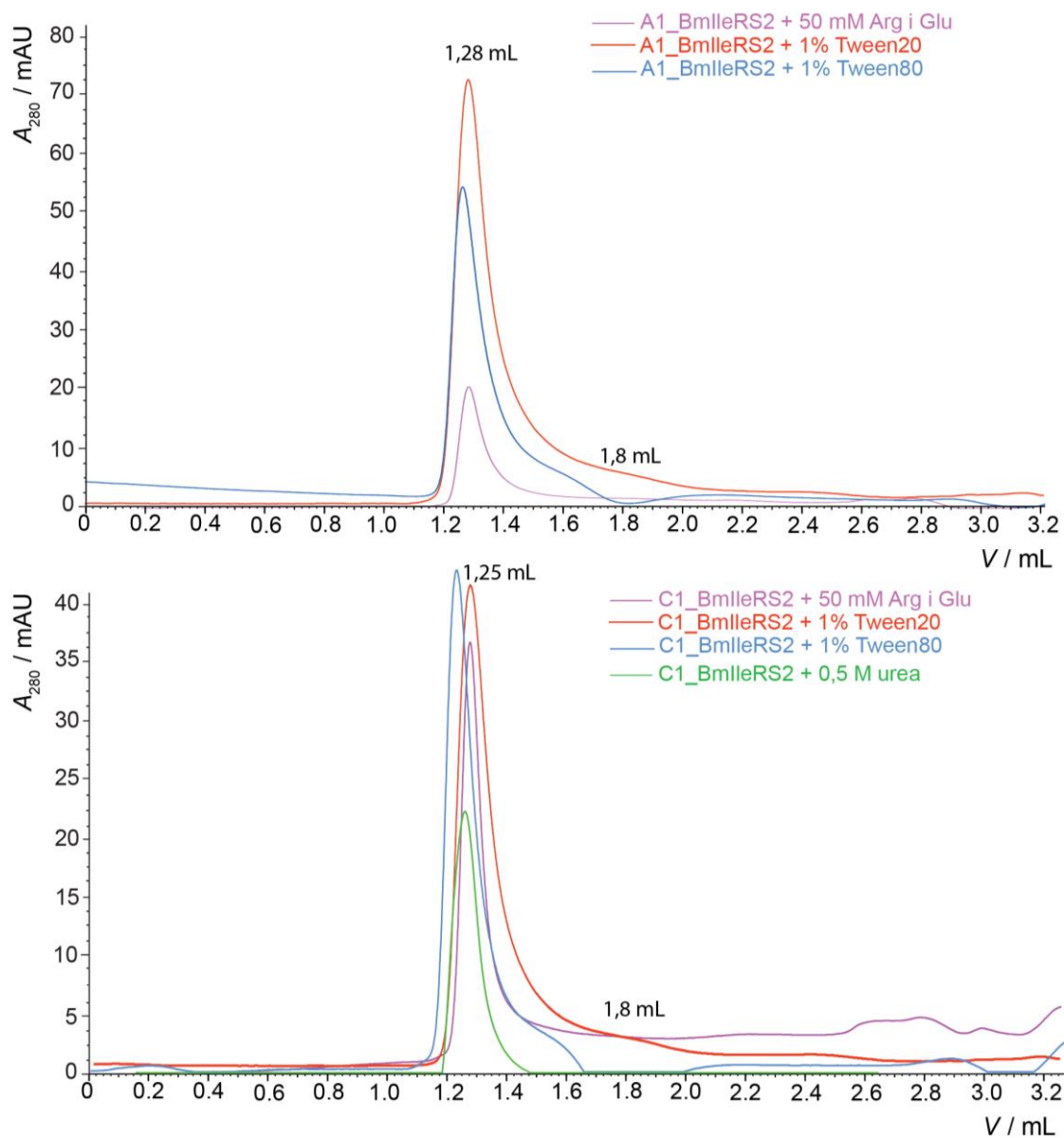
**Slika 4.26. Kromatogrami pročišćavanja eksprimiranih krnjih konstrukta BmIleRS2 A i C s MBP-privjeskom uz setove šaperona 1-5 (tablica 3.10.) gel-filtracijom na koloni Superdex 200 Increase 5/150 GL prema metodi opisanoj u tablici 3.19.**

Budući da u svim isprobanim uvjetima uzgoja, ekspresije i pročišćavanja krnji Bm1leRS2 stvaraju topljive agregate, isprobani su aditivi koji bi mogli pomoći u razbijanju agregata tijekom pročišćavanja. Pripremljene su otopine A, C (tablica 3.13.), otopina za vezanje, elucijska otopina (tablica 3.15.) i otopina za pohranu proteina (tablica 3.18.) sa sljedećim aditivima:

- 0,5 mmol dm<sup>-3</sup> urea,
- 50 mmol dm<sup>-3</sup> arginin (Arg) i 50 mmol dm<sup>-3</sup> glutamat (Glu),
- 0,1 % Tween20,
- 1 % Tween20,
- 1 % Tween80.

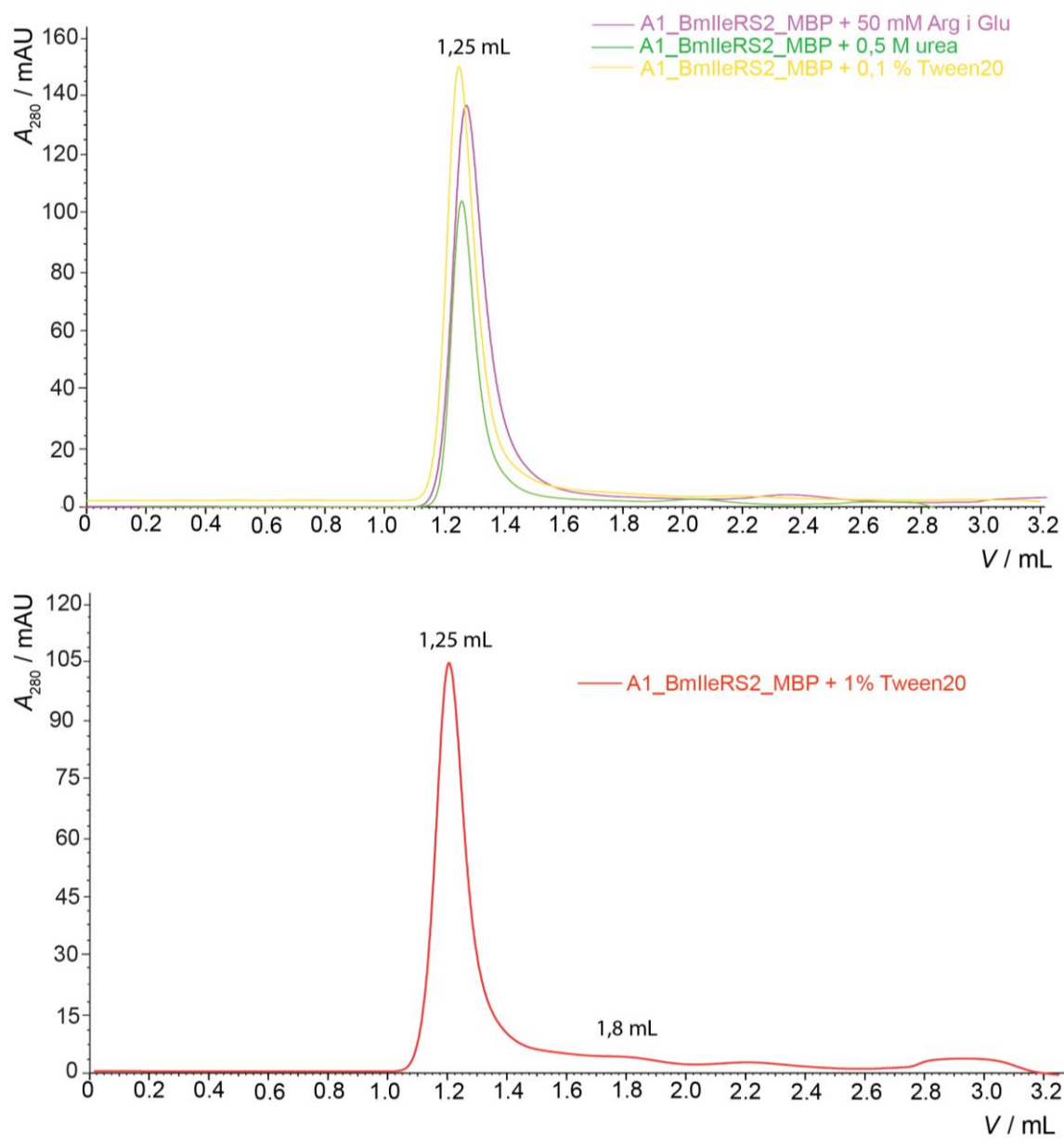
Sastav svih otopina uključivao je 30 mmol dm<sup>-3</sup> Tris (pH = 8,0) i 10 mmol dm<sup>-3</sup> β-merkptoetanol te su sve otopine titrirani do pH = 8,0 ukoliko je zbog dodavanja aditiva došlo do promjene pH. Ovi aditivi su odabrani jer je u literaturi pronađeno da pomažu u sprječavanju nastanka ili razbijanju proteinskih agregata.

Pročišćavanje s navedenim aditivima provedeno je samo za krnje konstrukte A i C sa i bez MBP-privjeska koeksprimirane uz set šaperona 1. Set šaperona 1 odabran je jer sadrži sve šaperone iz drugih setova osim šaperona Tig (engl. *trigger factor*). Svi aditivi prisutni su u otopinama od resuspendiranja istaloženih stanica do gel-filtracije i spremanja u otopini za pohranu proteina. Fuzijskim konstruktima nije uklonjen MBP-privjesak jer je prvo potrebno provjeriti mogu li se dobiti fuzije koje ne agregiraju. Pročišćavanje je provedeno afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu za krnje konstrukte i afinitetnom kromatografijom na dekstrin agarozu za krnje konstrukte s MBP-privjeskom. Kromatogrami dobiveni nakon afinitetnih kromatografija analogni su kromatogramima prethodnih pročišćavanja (slika 4.23. i 4.25.) te su krnji proteini A i C sa i bez MBP uspješno pročišćeni. Potom su eluirani proteini pročišćeni gel-filtracijom na koloni Superdex Increase 200 5/150 GL. Kromatogrami dobiveni nakon gel-filtracije prikazani su na slikama 4.27., 4.28. i 4.29.

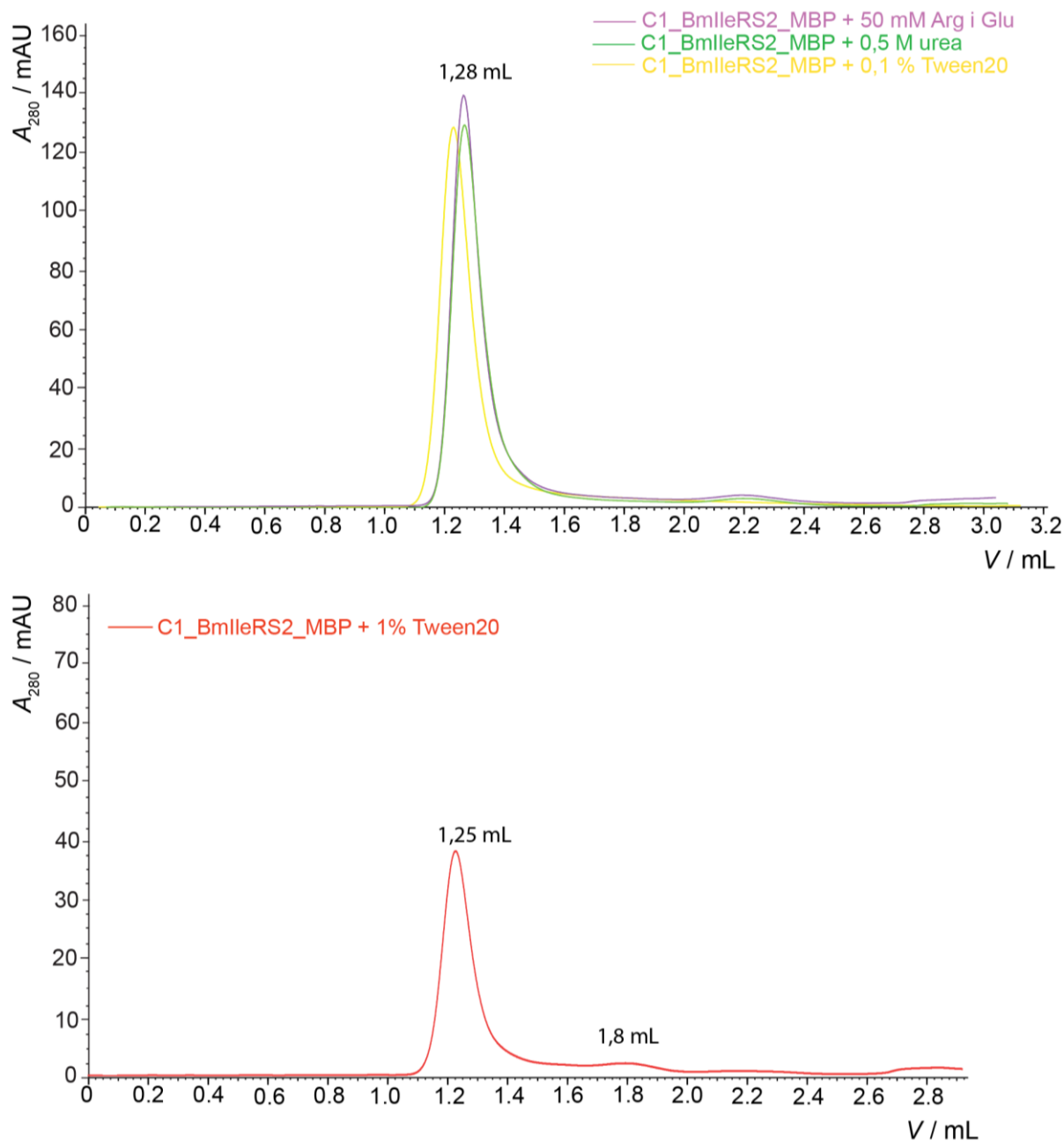


**Slika 4.27. Kromatogrami pročišćavanja eksprimiranih krnjih konstrukta BmIleRS2 A i C uz set šaperona 1 (tablica 3.10.) gel-filtracijom na koloni Superdex 200 Increase 5/150 GL prema metodi opisanoj u tablici 3.17 uz  $0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$  ureu,  $50 \text{ mmol dm}^{-3}$  Arg i Glu, 1% Tween80 i 1 % Tween20 u mobilnoj fazi.**





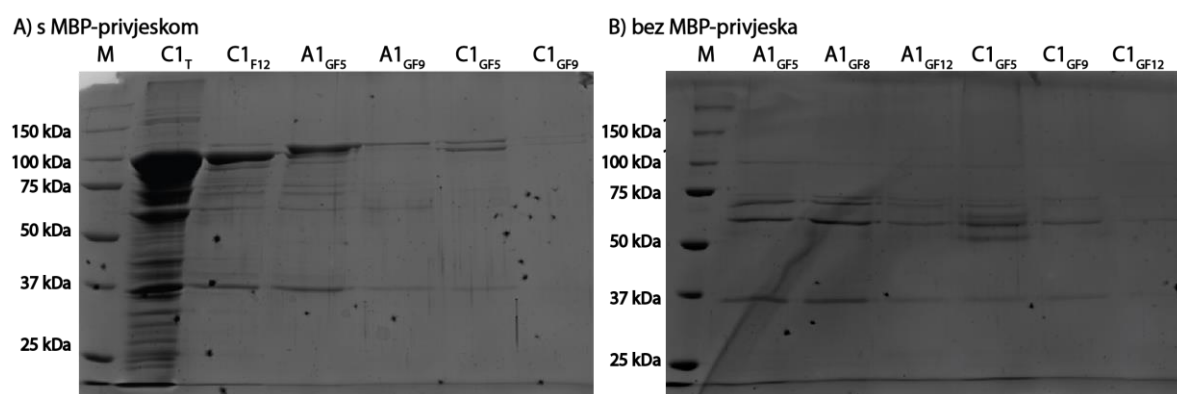
**Slika 4.28. Kromatogrami pročišćavanja eksprimiranih krnjeg konstrukta BmIleRS2 A s MBP-privjeskom uz set šaperona 1 (tablica 3.10) gel-filtracijom na koloni Superdex 200 Increase 5/150 GL prema metodi opisanoj u tablici 3.17 uz  $0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$  ureu,  $50 \text{ mmol dm}^{-3}$  Arg i Glu,  $0,1 \%$  Tween20 i  $1 \%$  Tween20 u mobilnoj fazi.**



**Slika 4.29. Kromatogrami pročišćavanja eksprimiranih krnjeg konstrukta BmIleRS2 C s MBP-privjeskom uz set šaperona 1 (tablica 3.10.) gel-filtracijom na koloni Superdex 200 Increase 5/150 GL prema metodi opisanoj u tablici 3.17 uz  $0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$  ureu,  $50 \text{ mmol dm}^{-3}$  Arg i Glu,  $0,1 \%$  Tween20 i  $1 \%$  Tween20 u mobilnoj fazi.**

Analizom dobivenih rezultata može se zaključiti da dodatkom  $0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$  uree,  $50 \text{ mmol dm}^{-3}$  Arg i  $50 \text{ mmol dm}^{-3}$  Glu,  $1 \%$  Tweenom80 i  $0,1 \%$  Tweenom20 ne dolazi do efikasnog razbijanja agregata jer se vrpce na kromatogramu nalaze na položaju koji odgovara agregatima (mrtvi volumen) na oko  $1,2 \text{ mL}$  i nema dodatne vrpce pri većim volumenima eluiranja. U slučaju pročišćavanja uz  $1 \%$  Tween20 na gel-filtracijskim kromatogramima za krnje

konstrukte A i C uz koekspresiju šaperona seta 1 sa i bez MBP-a može se vidjeti dodatna vrpca odnosno razvučena vrpca značajno manje apsorbancije pri 280 nm na oko 1,8 mL koja je odvojena od vrpce agregata. Vrpca na ovom položaju odgovara približno veličini krnjih konstrukata A (69 kDa), C (61 kDa), A\_MBP (111 kDa) i C\_MBP (103 kDa) ako se usporedi s baždarnim kromatogramom uzorka standarda na kojemu se vrpca  $\gamma$ -globulina goveda (158 kDa) nalazi na 1,78 mL, a ovalbumina kokoši (44 kDa) na 2,06 mL (slika 4.20.). Stoga bi ove vrpce mogle pripadati samostojećim pravilno smotanim krnjim konstruktima iako je njihov udio jako mali s obzirom na ukupnu količinu proteina. Kako bi se provjerio sastav frakcija koje odgovaraju vrpcama na kromatogramu provedena je analiza SDS-PAGE metodom, a rezultati se nalaze na slici 4.30.



**Slika 4.30. SDS-PAGE analiza eksprimiranih krnjih konstrukata BmIleRS2 A i C s i bez MBP-a uz set šaperona 1 (tablica 3.10.) nakon gel-filtracije na koloni Superdex 200 Increase 5/150 GL prema metodi opisanoj u tablici 3.17 uz 1 % Tween20 u mobilnoj fazi. M označava marker, C i A krnje konstrukte, T talog nakon sonikacije, F12 frakciju 12 nakon pročišćavanja na MBPTrap koloni, a GFx frakcije eluirane tijekom gel-filtracije. Korišten je marker Precision Plus Protein Standards Unstained (Bio-Rad).**

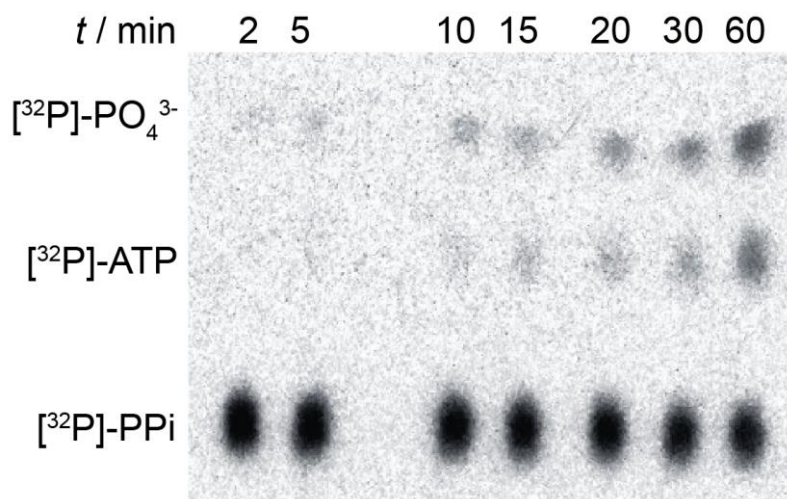
SDS-PAGE metodom analiziran je i talog nakon sonikacije te frakcija eluirana tijekom afinitetne kromatografije na dekstrin agarozu za krnji konstrukt C eksprimiran sa setom 1 šaperona jer je na kromatogramu vrpca eluiranog proteina bila niske apsorbancije pri 280 nm. Na gelu se može vidjeti da je dosta C\_MBP proteina zaostalo u talogu, ali da je prisutan i u eluiranoj vrpci. U jažicama s uzorcima proteina s MBP-om s gel-filtracije frakcije GF5 pripadaju prvoj vrpci agregata, a frakcije GF9 pripadaju frakciji druge vrpce. Kod gela s uzorcima krnjih proteina bez MBP-a, GF9 pripada frakciji između dvije vrpce, a GF12 druge vrpce. Očekivano, vrpce na gelu koje pripadaju odgovarajućim krnjim konstruktima (cca 60 kDa) i krnjim konstruktima s MBP (cca 100 kDa) su intenzivnije kod frakcija prve vrpce s gel-filtracije. U jažicama s uzorcima frakcija druge vrpce, iako puno slabijeg intenziteta, prisutne

su linije na odgovarajućim položajima za krnje proteine što ide u prilog zaključku da bi te vrpce mogle sadržavati pravilno smotane krnje oblike BmIleRS2.

S obzirom na prethodno dobivene rezultate, napravljen je veći uzgoj krnjih varijanti C i A uz koekspresiju šaperona seta 1. Pročišćavanje je provedeno postupkom opisanim u prethodnom odlomku uz otopine s 1 % Tweenom20, ali je za gel-filtraciju korištena preparativna kolona (veće zapremnine) Superdex Increase 200 10/300 GL. Sakupljene su frakcije koje odgovaraju dodatnoj manjoj vrpci nakon vrpce agregata pri oko 11-12 mL, ukoncentrirane su ultrafiltracijom i izmjerena im je koncentracija na spektrofotometru NanoDrop. Koncentracije pročišćenih proteina bile su niske što je očekivano s obzirom na omjer dvije vrpce na kromatogramu – udio krnjih proteina koji nisu agregirali u ukupnom uzorku je vrlo malen. Ovako dobivenim konstruktima A i C provjerena je enzimska aktivnost kinetičkim metodama opisanim u poglavljima 4.3. i 4.4.

### 4.3. Aktivacija aminokiselina

Prvi korak ukupne reakcije aminoaciliranja koju kataliziraju aaRS je aktivacija aminokiseline. Reakcijom između ATP-a i aminokiseline nastaje aa-AMP i PP<sub>i</sub>. Ova reakcija može se pratiti metodom izmjene pirofosfata koja je opisana u poglavlju 3.2.4.1. Praćena je izmjena radiokativiteta između PP<sub>i</sub>-a i ATP-a u ravnotežnim uvjetima što opisuje reakciju aktivacije aminokiseline. Brzina nastajanja aa-AMP mjeri se praćenjem povratne reakcije radioaktivno obilježenog [<sup>32</sup>P]-PP<sub>i</sub> i nastalog aa-AMP koja rezultira nastankom [<sup>32</sup>P]-ATP i aminokiseline. Tankoslojnom kromatografijom odvajaju se [<sup>32</sup>P]-ATP, [<sup>32</sup>P]-PP<sub>i</sub> i [<sup>32</sup>P]-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, vizualiziraju izlaganjem na zaslonu s uskladištenim fosforom te snimanjem na uređaju Typhoon (*GE Healthcare*). Dobiveni signali kvantificirani su pomoću programa ImageQuant 8.1. Na ovaj način ispitana je aktivnost krnjih oblika IleRS2 A i C iz bakterije *B. megaterium* u reakciji aktivacije izoleucina. Korišteni su krnji oblici dobiveni ekspresijom uz set šaperona 1 i pročišćeni uz 1% Tween20 u mobilnim fazama za afinitetnu kromatografiju i gel-filtracijsku kromatografiju kao što je opisano u poglavlju 4.2.4. Krnje varijante opisane su u poglavlju 4.1., tablici 4.1. Na slici 4.31. prikazan je TLC kromatogram za reakciju aktivacije uz C\_BmIleRS2.



**Slika 4.31. TLC kromatogram za reakciju aktivacije praćenu metodom izmjene  $[^{32}\text{P}]$ -pirofosfata uz krnji oblik C IleRS2 iz bakterije *B. megaterium*. Alikvoti reakcijske smjese analizirani su u naznačenim vremenskim točkama.**

Na TLC kromatogramu se svakoj vremenskoj točki nalaze se tri signala koji odgovaraju  $[^{32}\text{P}]$ -ATP,  $[^{32}\text{P}]$ -PPi i  $[^{32}\text{P}]$ - $\text{PO}_4^{3-}$ . Iz dobivenih signala može se izračunati množinski udio nastalog  $[^{32}\text{P}]$ -ATP kao:  $x([^{32}\text{P}]\text{-ATP}) = \frac{I([^{32}\text{P}]\text{-ATP})}{I([^{32}\text{P}]\text{-ATP}) + I([^{32}\text{P}]\text{-PPi})}$  pri čemu je  $I$  intenzitet signala. Koncentracija se računa množenjem množinskog udjela i koncentracije dodanog PPi:  $c([^{32}\text{P}]\text{-ATP}) = x([^{32}\text{P}]\text{-ATP}) \times c(\text{PPi})$ . Početna brzina reakcije ( $v_0$ ) dobije se linearnom regresijom promjene koncentracije  $[^{32}\text{P}]$ -ATP u vremenu, a opažen koeficijent brzine reakcije ( $k_{\text{obs}}$ ) računa se kao omjer početne brzine reakcije i početne koncentracije enzima. Dobivene vrijednosti početne brzine reakcije i opaženog koeficijenta brzine reakcije za krnji BmIleRS2 C uz 20 mM Ile i  $3,26 \mu\text{mol dm}^{-3}$  enzim nalaze se u tablici 4.8.

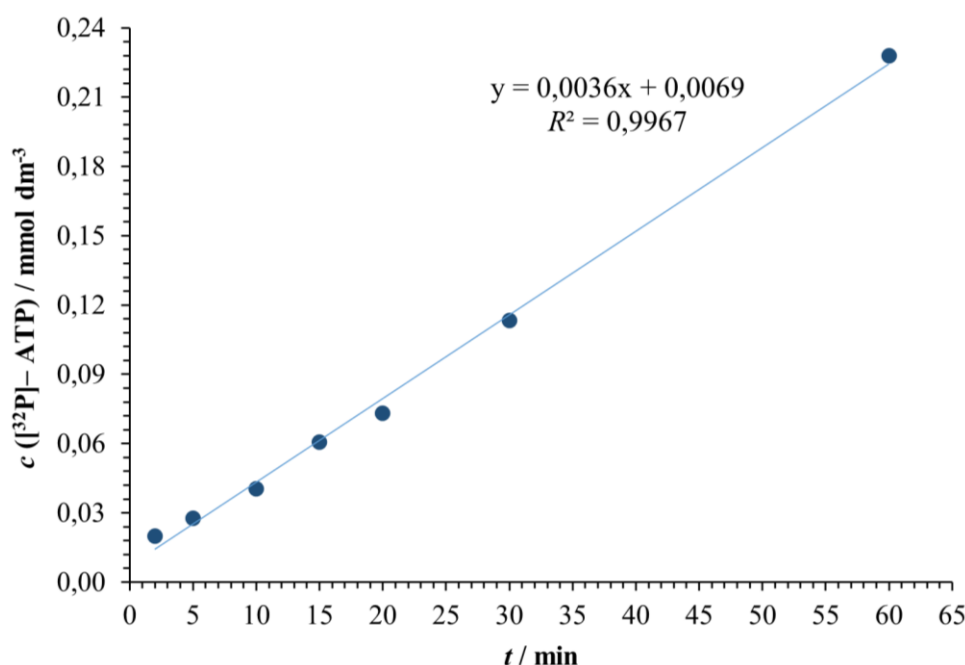
Na vrhu kromatograma nalaze se signali koji odgovaraju nastalom  $[^{32}\text{P}]$ - $\text{PO}_4^{3-}$ . Količina nastalog ortofosfata povećava se značajno u vremenu tijekom praćenja reakcije što predstavlja mogućnost da nastajanje ortofosfata nije samo posljedica spontane hidrolize već djelovanja krnjeg konstrukta BmIleRS2 C ili neke druge komponente u reakcijskoj smjesi. Ukoliko se radi o pirofosfataznoj aktivnosti krnjeg enzima onda bi ona trebala postojati i bez dodatka aminokiselina (ukoliko pretpostavimo da nije ovisna o aminokiselini). Kako bi se to ispitalo, ponovljen je eksperiment u istim uvjetima uz i bez aminokiseline. Rezultati su bili slični neovisno o prisutnosti izoleucina. Množinski udio nastalog  $[^{32}\text{P}]$ - $\text{PO}_4^{3-}$  računat je kao:  $x([^{32}\text{P}]\text{-PO}_4^{3-}) = \frac{I([^{32}\text{P}]\text{-PO}_4^{3-})}{I([^{32}\text{P}]\text{-PO}_4^{3-}) + I([^{32}\text{P}]\text{-PPi})}$ . Dobivene vrijednosti početne brzine reakcije i opaženog koeficijenta brzine reakcije za nastajanje ortofosfata uz krnji BmIleRS2 nalaze se u tablici 4.8. Prikaz promjene koncentracije  $[^{32}\text{P}]$ -ATP u vremenu tijekom reakcije aktivacije uz

C\_BmIleRS2 nalazi se na slici 4.33., a prikaz promjene koncentracije  $[^{32}\text{P}]\text{-PO}_4^{3-}$  u vremenu na slici 4.32. Nagibi pravaca odgovaraju početnim brzinama reakcije. Množinski udjeli  $[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  i  $[^{32}\text{P}]\text{-PO}_4^{3-}$  izračunati su i kao udio u ukupnom intenzitetu uključujući intenzitete svih radioaktivno obilježenih komponenti  $[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ ,  $[^{32}\text{P}]\text{-PO}_4^{3-}$  i  $[^{32}\text{P}]\text{-PP}_i$ . Dobivene  $v_0$  i  $k_{\text{obs}}$  nisu se značajno razlikovale od prethodno izračunatih u tablici 4.8. Proveden je isti postupak provjere aktivnosti krnje varijante A\_BmIleRS2 u reakciji aktivacije, ali nije bilo prisutnog signala  $[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  što ukazuje da ovaj konstrukt nije aktivan u reakciji aktivacije.

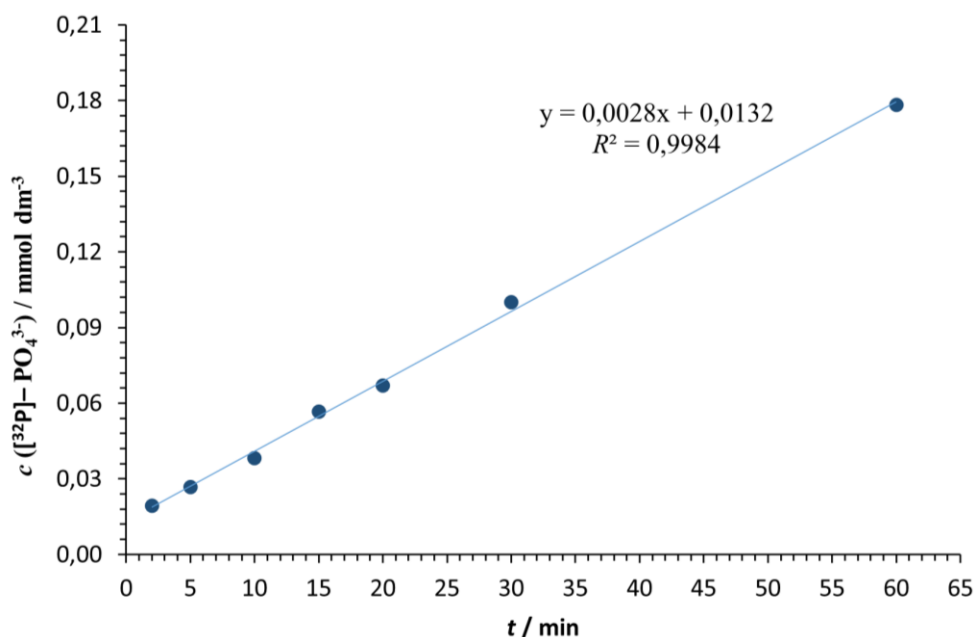
**Tablica 4.8. Vrijednosti početne brzine reakcije  $v_0$  i opaženog koeficijenta brzine reakcije  $k_{\text{obs}}$  aktivacije (praćenje nastanka  $[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ ) i reakcije hidrolize  $\text{PP}_i$  (praćenje nastanka  $[^{32}\text{P}]\text{-PO}_4^{3-}$ ) uz  $20 \text{ mmol dm}^{-3}$  izoleucin i  $3,26 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$  krnji oblik IleRS2 C.**

	$v_0 / \text{mmol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$	$v_0 / \text{mmol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}$	$k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$
Aktivacija $c ([^{32}\text{P}]\text{-ATP})$	$0,0032 \pm 0,0006$	$(5,3 \pm 1,1) \times 10^{-5}$	$0,0161 \pm 0,0033$
Hidroliza $\text{PP}_i$ $c ([^{32}\text{P}]\text{-PO}_4^{3-})$	$0,0024 \pm 0,0006$	$(4,0 \pm 1,1) \times 10^{-5}$	$0,0122 \pm 0,0095$

Prikazane vrijednosti izražene su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška dobivene iz dva neovisna eksperimenta.



**Slika 4.32. Prikaz promjene koncentracije  $[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  tijekom praćenja reakcije aktivacije metodom izmjene pirofosfata uz krnji oblik C BmIleRS2. Nagib pravca odgovara početnoj brzini reakcije pri koncentraciji izoleucina  $20 \text{ mmol dm}^{-3}$  i uz  $3,26 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$  enzim.**



**Slika 4.33. Prikaz promjene koncentracije  $[^{32}\text{P}]\text{-PO}_4^{3-}$  tijekom praćenja reakcije aktivacije metodom izmjene pirofosfata uz krnji oblik C BmIleRS2. Nagib pravca odgovara početnoj brzini reakcije pri koncentraciji izoleucina  $20 \text{ mmol dm}^{-3}$  i uz  $3,26 \text{ }\mu\text{mol dm}^{-3}$  enzim.**

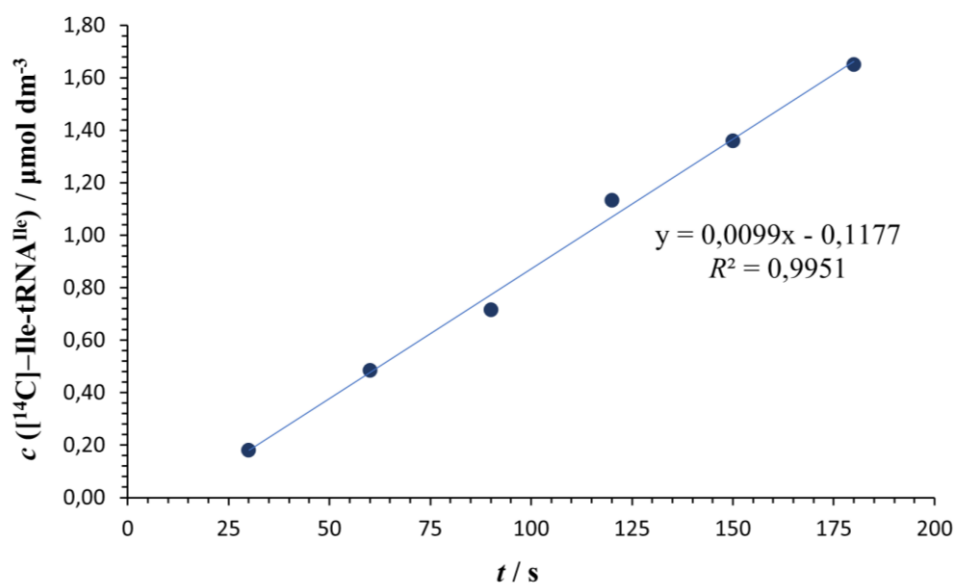
#### 4.4. Ukupna reakcija aminoaciliranja

Ukupna reakcija aminoaciliranja katalizirana aminoacil-tRNA-sintetazama može se pratiti uz radioaktivno obilježenu  $[^{14}\text{C}]$ -aminokiselinu ili  $[^{32}\text{P}]$ -tRNA<sup>aa</sup> prema postupcima opisanim u poglavljima 3.2.4.2. i 3.2.4.3.

Praćenje aminoaciliranja uz obilježenu aminokiselinu korišteno je za određivanje  $v_0$  i  $k_{\text{obs}}$  reakcije aminoaciliranja uz divlji tip IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* eksprimiranog i pročišćenog prema postupcima opisanim u poglavljima 4.2.1. i 4.2.2. Korišten je  $10 \text{ nmol dm}^{-3}$  enzim,  $15 \text{ }\mu\text{mol dm}^{-3}$  tRNA<sup>Ile</sup> i  $50 \text{ }\mu\text{mol dm}^{-3}$   $[^{14}\text{C}]$ -izoleucin. Radioaktivnost nastalog  $[^{14}\text{C}]$ -Ile-tRNA<sup>Ile</sup> u alikvotima reakcijskih smjesa u različitim vremenskim točkama određena je pomoću scintilacijske otopine i scintilacijskog brojača Tri-Carb 2900 TR (*Perkin Elmer*). Uz baždarni dijagram određene su koncentracije  $[^{14}\text{C}]$ -Ile-tRNA<sup>Ile</sup> nastale reakcijom aminoaciliranja. Početna brzina reakcije izračunata je linearnom regresijom promjene  $c$  ( $[^{14}\text{C}]$ -Ile-tRNA<sup>Ile</sup>) u vremenu,  $k_{\text{obs}}$  iz omjera početne brzine reakcije i početne koncentracije enzima, a rezultati se nalaze u tablici 4.9. Promjena koncentracije  $[^{14}\text{C}]$ -Ile-tRNA<sup>Ile</sup> u vremenu tijekom reakcije aminoaciliranja katalizirane WT BmIleRS2 prikazana je na slici 4.34.

**Tablica 4.9.** Vrijednosti početne brzine reakcije  $v_0$  i opaženog koeficijenta brzine reakcije  $k_{\text{obs}}$  aminoaciliranja dobivene praćenjem nastanka  $[^{14}\text{C}]\text{-Ile-tRNA}^{\text{Ile}}$  uz  $10 \text{ nmol dm}^{-3}$  enzim,  $15 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$  tRNA<sup>Ile</sup> i  $50 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$   $[^{14}\text{C}]\text{-izoleucin}$ .

	$v_0 / \mu\text{mol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$	$v_0 / \mu\text{mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}$	$k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$
WT BmIleRS2	0,594	0,0099	1,0

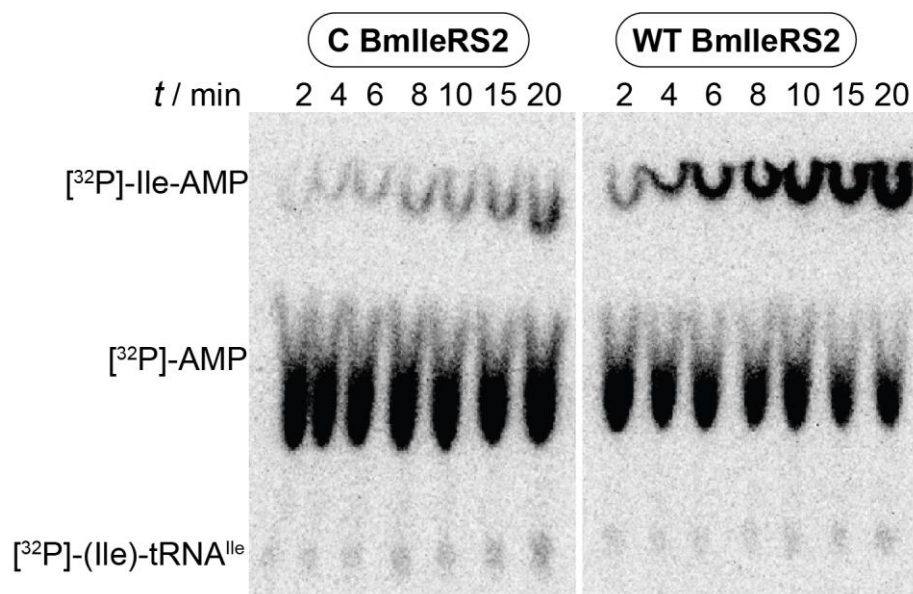


**Slika 4.34.** Prikaz promjene koncentracije  $[^{14}\text{C}]\text{-Ile-tRNA}^{\text{Ile}}$  tijekom praćenja reakcije aminoaciliranja uz divlji tip BmIleRS2. Nagib pravca odgovara početnoj brzini reakcije uz  $10 \text{ nmol dm}^{-3}$  enzim,  $15 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$  tRNA<sup>Ile</sup> i  $50 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$   $[^{14}\text{C}]\text{-izoleucin}$ .

Praćenje aminoaciliranja uz radioaktivno obilježenu  $[^{32}\text{P}]\text{-tRNA}^{\text{Ile}}$  korišteno je za određivanje  $v_0$  i  $k_{\text{obs}}$  reakcije aminoaciliranja uz krnje oblike A i C IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* eksprimiranih uz set šaperona 1 i pročišćeni uz 1% Tween20 u mobilnim fazama za afinitetnu kromatografiju i gel-filtracijsku kromatografiju kao što je opisano u poglavlju 4.2.4. Aminoaciliranjem nastaje Ile- $[^{32}\text{P}]\text{-tRNA}^{\text{Ile}}$ , ali se ne može odvojiti od  $[^{32}\text{P}]\text{-tRNA}^{\text{Ile}}$  tankoslojnom kromatografijom, zato se alikvoti reakcijskih smjesa tretiraju P1-nukleazom čime nastaju terminalni  $[^{32}\text{P}]\text{-AMP}$  (predstavlja neaminoaciliranu tRNA) i Ile- $[^{32}\text{P}]\text{-AMP}$  (predstavlja aminoaciliranu tRNA). Tankoslojnom kromatografijom odvajaju se  $[^{32}\text{P}]\text{-AMP}$  i Ile- $[^{32}\text{P}]\text{-AMP}$  i vizualiziraju izlaganjem na zaslonu s uskladištenim fosforom te snimanjem na



uređaju Typhoon (*GE Healthcare*). Dobiveni signali kvantificirani su pomoću programa ImageQuant 8.1. Kromatogram tankoslojne kromatografije nalazi se na slici 4.35.



**Slika 4.35.** TLC kromatogram za reakciju aminoaciliranja uz  $[^{32}\text{P}]\text{-tRNA}^{\text{Ile}}$  i krnji oblik C IleRS2 iz bakterije *B. megaterium*, odnosno divlji tip IleRS2 iz bakterije *B. megaterium*. Alikvoti reakcijske smjese analizirani su u naznačenim vremenskim točkama.

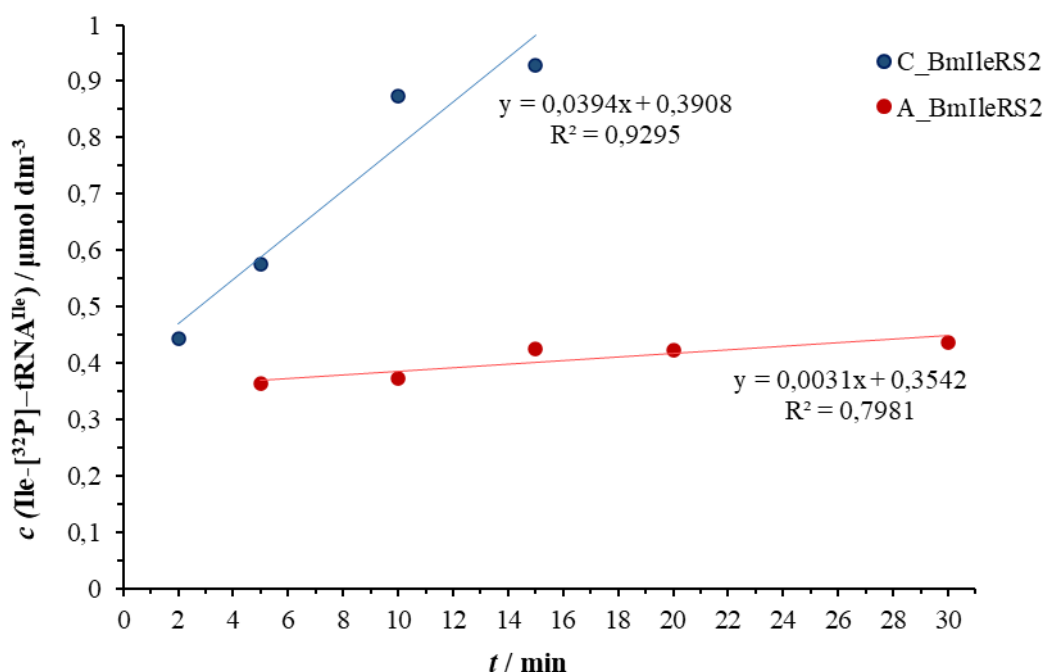
Na TLC kromatogramu se svakoj vremenskoj točki nalaze se tri signala koji odgovaraju  $[^{32}\text{P}]\text{-}(\text{Ile})\text{-tRNA}^{\text{Ile}}$ ,  $[^{32}\text{P}]\text{-AMP}$  i  $\text{Ile-}[^{32}\text{P}]\text{-AMP}$ . Koncentracija  $\text{Ile-}[^{32}\text{P}]\text{-AMP}$  (koja predstavlja  $\text{Ile-}[^{32}\text{P}]\text{-tRNA}^{\text{Ile}}$ ) određuje se kao:  $c(\text{Ile} - [^{32}\text{P}]\text{-tRNA}^{\text{Ile}}) = \frac{I([^{32}\text{P}]\text{-Ile-AMP})}{I(\text{Ile-}[^{32}\text{P}]\text{-AMP}) + I([^{32}\text{P}]\text{-AMP})} \times c(\text{tRNA})$ . Iz dobivenih signala početna brzina reakcije izračunata je kao promjena koncentracije  $\text{Ile-}[^{32}\text{P}]\text{-AMP}$  u vremenu,  $k_{\text{obs}}$  iz omjera početne brzine reakcije i početne koncentracije enzima, a rezultati se nalaze u tablici 4.10. Korišten je  $2 \mu\text{mol dm}^{-3}$  enzim,  $50 \mu\text{mol dm}^{-3}$   $[^{32}\text{P}]\text{-tRNA}^{\text{Ile}}$  i  $20 \text{ mmol dm}^{-3}$  Ile. Promjena koncentracije  $\text{Ile-}[^{32}\text{P}]\text{-tRNA}^{\text{Ile}}$  u vremenu tijekom reakcije aminoaciliranja katalizirane A i C krnjim oblicima BmIleRS2 prikazana je na slici 4.36. Rezultati pokazuju da dolazi do nastanka produkta  $\text{Ile-}[^{32}\text{P}]\text{-tRNA}^{\text{Ile}}$ , odnosno da su krnje varijante A i C katalitički aktivne u reakciji aminoaciliranja. Iako se prema dobivenim podacima čini da je krnja varijanta A aktivna, niska vrijednost  $R^2$  koja iznosi 0,7981 ukazuje na nisku pouzdanost u stvarnu aktivnost.

**Tablica 4.10.** Vrijednosti početne brzine reakcije  $v_0$  i opaženog koeficijenta brzine reakcije  $k_{\text{obs}}$  aminoaciliranja dobivene praćenjem nastanka Ile-[ $^{32}\text{P}$ ]-tRNA<sup>Ile</sup> uz  $2 \mu\text{mol dm}^{-3}$  enzim,  $50 \mu\text{mol dm}^{-3}$  [ $^{32}\text{P}$ ]-tRNA<sup>Ile</sup> i  $20 \text{mmol dm}^{-3}$  izoleucin uz krnji oblik IleRS2 A i C.

	$v_0 / \mu\text{mol dm}^{-3} \text{min}^{-1}$	$v_0 / \mu\text{mol dm}^{-3} \text{s}^{-1}$	$k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$
A_BmIleRS2 <sup>1</sup>	0,0031	$5 \times 10^{-5}$	$3 \times 10^{-5}$
C_BmIleRS2 <sup>2</sup>	$0,0289 \pm 0,0149$	$0,0007 \pm 0,0003$	$0,0002 \pm 0,0001$

<sup>1</sup>Za krnji oblik A\_BmIleRS2 napravljeno je jedno mjerenje zbog problema s pripremom i nestabilnosti proteina.

<sup>2</sup>Prikazane vrijednosti izražene su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška dobivene iz dva neovisna eksperimenta.



**Slika 4.36.** Prikaz promjene koncentracije Ile-[ $^{32}\text{P}$ ]-tRNA<sup>Ile</sup> tijekom praćenja reakcije aminoaciliranja uz krnje oblike IleRS2 A i C. Nagib pravca odgovara početnoj brzini reakcije uz  $2 \mu\text{mol dm}^{-3}$  enzim,  $50 \mu\text{mol dm}^{-3}$  [ $^{32}\text{P}$ ]-tRNA<sup>Ile</sup> i  $20 \text{mmol dm}^{-3}$  izoleucin.

#### 4.5. *In vivo* komplementacija

Kinetičkim metodama ispitana je aktivnost krnjih varijanti IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* *in vitro*, a kako bi se ispitala njihova aktivnost *in vivo* napravljen je test komplementacije. Divlji tip IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* otporan je na inhibiciju antibiotikom mupirocinom, dok je IleRS iz bakterije *E. coli* na nju osjetljiv. Testirano je preživljenje bakterije *E. coli* soja BL21(DE3) na krutoj LB agar hranjivoj podlozi s mupirocinom uz prekomjernu ekspresiju krnjih varijanti IleRS2 iz bakterije *B. megaterium*. Kao kontrole korištene su WT IleRS iz bakterije *E. coli* (negativna – bakterije ne bi smjele rasti jer je enzim osjetljiv na inhibiciju), WT IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* (pozitivna – bakterije bi morale rasti jer je enzim otporan

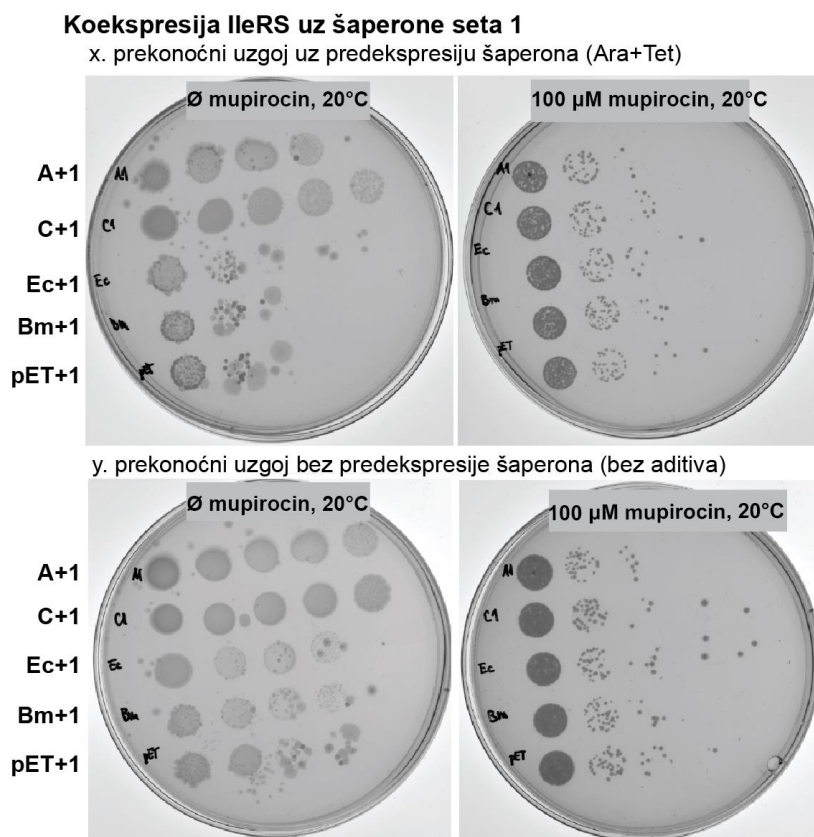
na inhibiciju) i stanice s praznim plazmidom pET28b (negativna – bakterije ne bi smjele rasti jer nema prekomjerne ekspresije proteina). Stanice bakterije *E. coli* soja BL21(DE3) transformirane su plazmidima koji sadrže gene za krnje varijante A, C BmIleS2 i za kontrole, kotransformirane su plazmidom s genima za set šaperona 1 (tablica 3.10.) i plazmidom pET3a za prekomjernu ekspresiju tRNA<sup>Ile</sup>. Istražene kombinacije u testu komplementacije navedene su u tablici 4.11. Uzgojene su prekončne kulture iz transformiranih stanica, pripremljeni alikvoti razrjeđenja prekončnih kultura i nanoseno je 10  $\mu$ L na hranjive podloge kao što je opisano u poglavlju 3.2.1.5. Sastav ploča nalazi se u tablici 3.1. Za svaki eksperiment napravljen je kontrolni duplikat na pločama sa svim antibioticima i aditivima, ali bez mupirocina. Stanice su inkubirane na 20°C i 30 °C, 2-5 dana ovisno o brzini rasta.

**Tablica 4.11. Testirani uvjeti uzgoja i ekspresije za *in vivo* komplementaciju.**

	Prekončni uzgoj (ON)	$c$ (mupirocin) / $\mu\text{mol dm}^{-3}$	$c$ (IPTG) / $\mu\text{mol dm}^{-3}$	Koekspresija šaperona seta 1	Koekspresija tRNA <sup>Ile</sup>
<b>A</b>	x. Ara+Tet y. Bez aditiva z.Ara+Tet+IPTG	Ø, 50, 100, 150, 200	50	DA i NE	NE
<b>B</b>	Bez aditiva	Ø, 150	100	NE	DA i NE

U eksperimentu A prekončne kulture uzgojene na x i y način su narasle, dok kulture uzgojene na z način nisu narasle što ukazuje na to da je IPTG (kojeg nema u x i y, a ima u z uvjetima) tijekom inicijalnog rasta letalan za stanice. Na pločama s krutom hranjivom podlogom bez mupirocina sve kolonije su narasle, dok svi isprobani uvjeti u ovom eksperimentu nisu rezultirali uspješnom komplementacijom. Na pločama s 50 i 100  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  mupirocinom rasle su stanice pozitivne kontrole, stanice s krnjim oblicima BmIleRS2, ali i negativne kontrole (za test s 100  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  mupirocin rezultati prikazani na slici 4.37.). Veličina kolonija negativnih i pozitivne kolone te kolonija s krnjim oblicima IleRS bila je gotovo identična što ukazuje na to da količina mupirocina nije dovoljna za inhibiciju. Na pločama sa 150  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  i 200  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  mupirocinom kolonije s EcIleRS i pET28b nisu rasle, dok kolonije s WT BmIleRS2 jesu pa je tako pronađena koncentracija (oko 150  $\mu\text{mol dm}^{-3}$ ) na kojoj je negativna kontrola pouzdana (slika 4.38.). Rezultati komplementacije bili su negativni, kolonije s krnjim varijantama BmIleRS2 nisu rasle u uvjetima iznad 150  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  u kojima je negativna

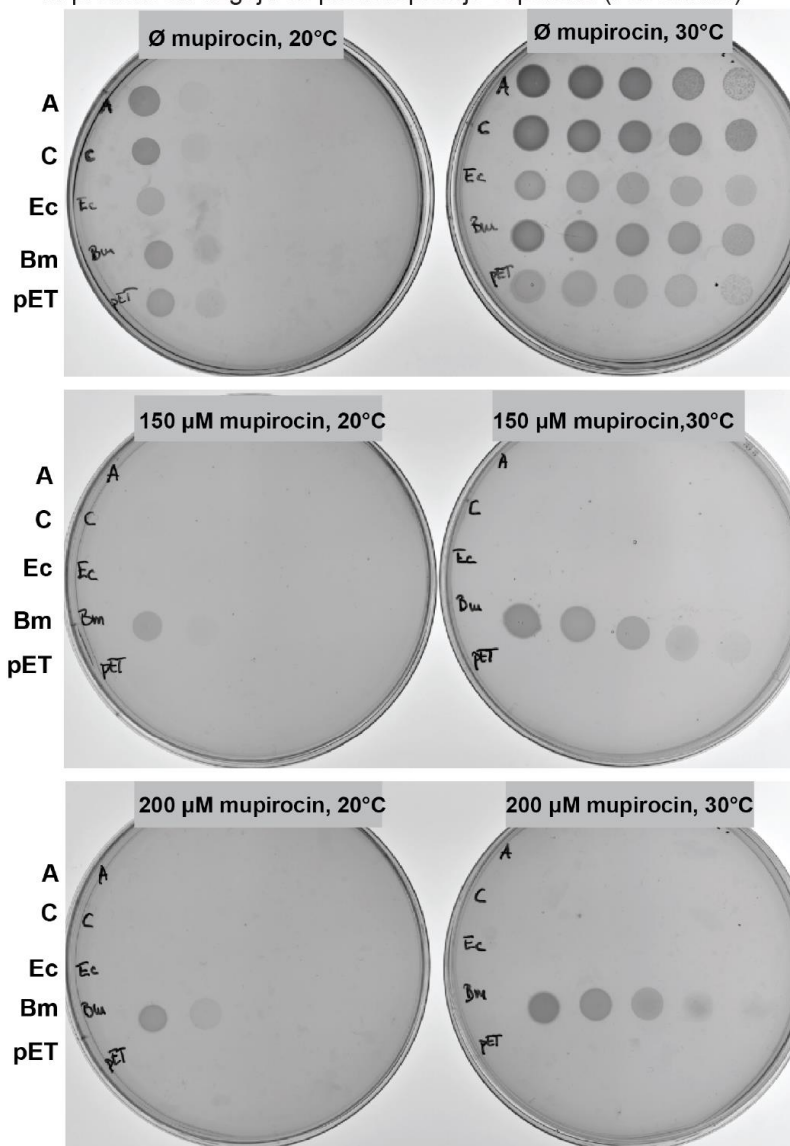
kontrola pouzdana (slika 4.38.). Kolonije stanica u kojima su prekomjerno eksprimirani i šaperoni rastu sporije ili u nekim slučajevima ne rastu uopće.



**Slika 4.37. Rezultati *in vivo* komplementacije u uvjetima A iz tablice 4.11. Nanesene su prekonoćne kulture s krnjim varijantama BmIleRS2 A i C, WT EcIleRS, WT BmIleRS2 i pET28b koji su na krutim podlogama koeksprimirani sa setom šaperona 1 na 20 °C 7 dana.**

### Ekspresija IleRS bez šaperona

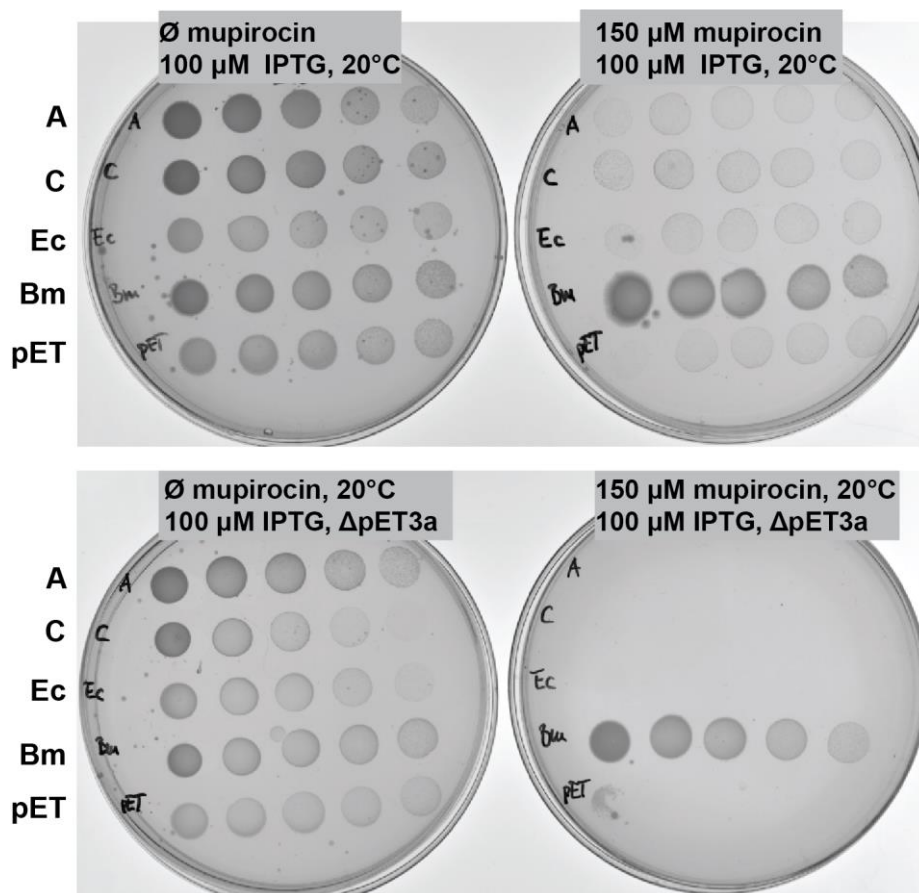
b. prekonoćni uzgoj bez predekspresije šaperona (bez aditiva)



**Slika 4.38. Rezultati *in vivo* komplementacije u uvjetima A iz tablice 4.11. bez koekspresije šaperona. Nanesene su prekonoćne kulture s krnjim varijantama BmIleRS2 A i C, WT EcIleRS, WT BmIleRS2 i pET28b eksprimiranih na 20°C i 30°C 3 dana.**

Kako bi se povećala ekspresija krnjih BmIleRS2 sljedeći testovi *in vivo* komplementacije napravljeni su uz 100  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  IPTG (uvjeti B). Također, isprobana je prekomjerna koekspresija tRNA<sup>Ile</sup> kako bi se uklonila mogućnost da je reakcija aminoaciliranja ograničena količinom tRNA<sup>Ile</sup> u stanici. Komplementacija ni u ovim uvjetima nije bila uspješna, a rezultati se nalaze na slici 4.39. Isti postupak komplementacije testiran je s krnjim IleRS2 oblikom iz bakterije *Thermus thermophilus* analognim krnjoj varijanti C BmIleRS2 koji je već spomenut

na kraju poglavlja 4.2.3. Komplementacija je bila neuspješna kao i kod varijanti iz bakterije *B. megaterium*.



Slika 4.39. Rezultati *in vivo* komplementacije u uvjetima E i F iz tablice 4.11. Nanesene su prekoćne kulture s krnjim varijantama BmIleRS2 A i C, WT EcIleRS, WT BmIleRS2 i pET28b koeksprimiranih sa i bez tRNA<sup>Ile</sup> na 20°C i 30°C 3 dana.

## § 5. RASPRAVA

### 5.1. Konstrukcija rekombinantnih plazmida za ekspresiju krnjih oblika IleRS iz bakterije *B. megaterium*

U okviru izrade ovog rada osmišljena su tri krnja oblika IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* sljedećih karakteristika:

- A – uklonjena C-terminalna i korektivna domena, nukleotidni slijed optimiran prema korištenju kodona u bakteriji *E. coli*,
- B – uklonjena C-terminalna, korektivna i CP2 domena, nukleotidni slijed optimiran prema korištenju kodona u bakteriji *E. coli*,
- C – uklonjena C-terminalna, korektivna i CP2 domena, nukleotidni slijed zadržan kao u izvornom genu iz bakterije *B. megaterium*.

Prekidi u slijedu nastali delecijama unutarnjih domena spojeni su poveznica glicin-serin (GS). Nukleotidni i aminokiselinski sljedovi prikazani su u poglavlju 4.1.1. U svrhu istraživanja ekspresije, pročišćavanja i karakterizacije funkcionalnosti krnjih oblika IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* konstruirani su rekombinantni plazmidi za njihovu prekomjernu ekspresiju. Geni za krnje konstrukte A, B i C ugrađeni su u ekspresijski vektor pET28b tako da se ekspimiraju s His-privjeskom na N-kraju. Kako bi se krnji oblici A, B i C BmIleRS2 mogli ekspimirati s privjeskom GST na N-kraju uspješno su preklonirani iz plazmida pET28b u pGEX-6P-3 (rezultati i postupak u poglavlju 4.1.2.). Za omogućavanje ekspresije krnjih oblika (A i C) s MBP-privjeskom na N-kraju korišten je modificirani plazmid pMAL-c2x (zamijenjeno mjesto prepoznavanja Faktora Xa mjestom za prepoznavanje TEV proteaze).

### 5.2. Proizvodnja i pročišćavanje krnjih oblika IleRS2 iz bakterije *B. megaterium*

Divlji tip IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* uspješno je ekspimiran u bakteriji *E. coli* soj BL21(DE3) s His-privjeskom na N-kraju. Protein je pročišćen afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu. Protein je dodatno pročišćen od supročišćenog adenilata postupkom opisanim u poglavlju 3.2.3.

Krnji oblici IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* ekspimirani su u *E. coli* soju BL21(DE3) iz plazmida pET28b u različitim uvjetima. Testirana je ekspresija pri različitim temperaturama od 37 °C (2 h), 30 °C (4 h), 16 °C (ON) i 10 °C (70 h) uz indukciju ekspresije s 0,25 mmol dm<sup>-3</sup>

<sup>3</sup> i 0,1 mmol dm<sup>-3</sup> IPTG-om te razbijanje stanica *BugBusterom* prilikom pripreme staničnom ekstrakta. U ovim uvjetima sva tri krnja proteina su eksprimirana, ali su prisutni samo u talogu. Prisutnost proteina u talogu ukazuje na agregiranje i stvaranje inkluzijskih tijela (rezultati su prikazani u poglavlju 4.2.1). Ovakav ishod nije neuobičajen za rekombinantne proteine prekomjerno eksprimirane u bateriji *E. coli* pri visokim temperaturama, visokim koncentracijama induktora ekspresije i pod jakim promotorom. Stanični sustav za osiguravanje pravilno smotanih proteina postaje preopterećen.<sup>100</sup> Nadalje, u ovom slučaju radi se o proteinima kojima je nativna struktura narušena delecijama cijelih domena. Modifikacije ovih razmjera neizbježno utječu na strukturu jer su narušene interakcije koje osiguravaju optimalno smotanu strukturu. Hidrofobni dijelovi proteina mogu se naći na površini i prouzročiti asocijaciju s drugim molekulama proteina (agregiranje) kako bi se smanjile nepovoljne interakcije s polarnom okolinom. Snižavanje temperature i koncentracije induktora su prvi alati za smanjivanje nastanka agregata tijekom ekspresije. Snižavanje temperature usporava ekspresiju i daje više vremena proteinima da se pravilno smotaju, ali smanjuje i vjerojatnost stvaranje agregata jer su hidrofobne interakcije koje određuju agregiranje favorizirane visokim temperaturama.<sup>100,101</sup> Niža koncentracija IPTG-a u stanici kao induktora može djelovati tako da uspori brzinu ekspresije i osigura razinu ekspresije koja predstavlja manji teret za stanicu.<sup>102</sup> Potrebno je naglasiti da osjetljivost stanice na promjenu koncentracije IPTG-a u otopini ovisi o prijenosu IPTG-a u stanicu i količini *lac*-represora u stanici, što znači da promjena koncentracije IPTG-a u otopini ne mora utjecati na razinu indukcije.<sup>103</sup> Kako sprječavanje stvaranja agregata snižavanjem temperature i koncentracije IPTG-a nisu pomogli, isprobane su dodatne metode.

Testirana je primjena toplinskog šoka, hladnog šoka, dodavanje EtOH i kaotropne soli MgCl<sub>2</sub>. Primjenom toplinskog šoka na 47 °C prije i na početku ekspresije inducirana je ekspresija šaperona toplinskog šoka.<sup>102,105,106</sup> Primjenom hladnog šoka prije ekspresije inducirana je ekspresija šaperona koji se eksprimiraju pri niskim temperaturama.<sup>104</sup> Dodatak 3% EtOH neposredno prije ekspresije izazva odgovor stanice kao na toplinski šok (ekspresija šaperona toplinskog šoka). Iako mehanizam djelovanja nije u potpunosti razjašnjen, dodatak 0,1 mmol dm<sup>-3</sup> MgCl<sub>2</sub> prije uzgoja može pomoći u stabilizaciji strukture i smanjiti agregaciju. Učinak se može objasniti time da kaotropne soli nasumično mijenjaju raspored molekula vode u otapalu i smanjuju jačinu hidrofobnih interakcija što smanjuje agregiranje.<sup>107</sup> Ekspresija je provedena na 16 °C i inducirana s 0,05 mmol dm<sup>-3</sup> IPTG-om. Stanice su razbijene *BugBusterom*,



ali i sonikacijom kako bi se uklonila mogućnost da sastav otopine *BugBuster* ne utječe na stvaranje agregata. Ekspimirani proteini u ovim uvjetima također su agregirali.

Da bi im se povećala topljivost, krnji IleRS2 ekspimirani su koekspresiju šaperona. Korišteno je pet plazmida s različitim setovima šaperona (tablica 3.10). Proteini su uspješno ekspimirani i bili su prisutni u proteinskom ekstraktu. Nakon pročišćavanja afinitetnom kromatografijom, eluati su analizirani gel-filtracijom. Krnji proteini izlazili su u mrtvom volumenu što znači da koekspresija šaperona nije spriječila agregiranje krnjih konstrukata, ali su nastali agregati topljivi.

Budući da je ustanovljeno da su topljivi krnji proteini agregati, nastavljeno je optimiranje ekspresije. Krnji IleRS2 ekspimirani su kao fuzije s proteinima GST i MBP na N-kraju. Postoje i drugi fuzijski privjesci koji se koriste za povećavanje topljivosti, ali MBP i GST su odabrani na temelju njihove efikasnosti u poboljšanje. GST fuzioniran s ciljnim proteinom može spriječiti agregiranje i zaštititi ga od proteolitičke razgradnje.<sup>109,113</sup> GST je u usporedbi s drugim fuzijskim proteinima, kao što je MBP, inferiorniji u povećavanju topljivosti.<sup>114–116</sup> MBP povećava topljivost proteina jer ima intrinzičnu aktivnost sličnu aktivnosti šaperona.<sup>108,117,118</sup> Mehanizam djelovanja nije u potpunosti razjašnjen, ali pretpostavlja se da MBP svojim hidrofobnim utorom na površini interagira s fuzioniranim proteinom i potiče njegovo pravilno smatanje sprječavajući samoasocijaciju.<sup>108,118</sup> Krnji oblici A, B i C IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* fuzionirani s GST-privjeskom ekspimirani su u bakteriji *E. coli* soju BL21(DE3) iz plazmida pGEX-6P-3 pri 37 °C (3 h), 25 °C (5 h) i 16 °C (preko noći) i uz 0,25 mmol dm<sup>-3</sup> IPTG. Sva tri krnja proteina s GST-privjeskom bila su ekspimirana, ali su agregirali i taložili (rezultati u poglavlju 4.2.3.). Krnji oblici BmIleRS2 A i C fuzionirani s MBP-privjeskom ekspimirani su u bakterijskim stanicama bakterije *E. coli* soja BL21(DE3) iz plazmida pMAL-c2x-TEV. Provedena je ekspresija pri 37 °C (3 h), 25 °C (5 h) i 16 °C (ON) uz 0,25 mmol dm<sup>-3</sup> IPTG, a priprema proteinskog ekstrakta provedena je uz sonikaciju. Krnji oblik C s MBP-privjeskom bio je prisutan u ekstraktu nakon ekspresije na 25 °C (5 h) i 16 °C (ON), dok je krnji oblik A uz lizu stanica *BugBusterom* istaložio, a uz sonikaciju je bio prisutan u ekstraktu. Prethodno navedeno sugerira da je postupak lize stanica uz *BugBuster* utjecao na agregiranje krnjeg proteina A. Konstrukti A i C s MBP-privjescima uspješno su ekspimirani pri temperaturama 25 °C i 16 °C uz 0,25 mmol dm<sup>-3</sup> IPTG te su nakon razbijanja stanica sonikacijom prisutni u proteinskom ekstraktu (rezultati u poglavlju 4.2.3.). MBP-fuzije pročišćene su afinitetnom kromatografijom na dekstrin agarozu nakon čega je uklonjen MBP-

privjesak TEV-proteazom i reakcijska smjesa ponovno pročišćena na dekstrin agarozu. Krnji proteini bez MBP-privjeska i TEV-proteaza izlaze u nevezanoj frakciji, a MBP i zaostale cjelovite fuzije izlaze kao vezane frakcije nakon ispiranja mobilnom fazom s maltozom. Nevezane frakcije su nakon ukoncentriravanja analizirane gel-filtracijom. Dobiveni kromatogrami pokazali su da krnji proteini A i C izlaze u mrtvom volumenu, odnosno da su pročišćeni topljivi agregati. Na isti način analizirane su i fuzije bez uklanjanja MBP te je dobiven isti rezultat (poglavlje 4.2.4.).

Sljedeća strategija bila je ekspresija krnji oblika IleRS2 A i C fuzioniranih s MBP-privjeskom uz koekspresiju šaperona. Korišteno je pet plazmida s različitim setovima šaperona (tablica 3.10). Proteini su uspješno eksprimirani i bili su prisutni u proteinskom ekstraktu. Nakon pročišćavanja afinitetnom kromatografijom, eluati su analizirani gel-filtracijom. Krnji proteini s MBP-privjeskom izlazili su u mrtvom volumenu što znači da su pročišćeni u obliku topljivih agregata kao i u slučaju koekspresije šaperona s krnjim IleRS2 bez MBP-privjeska.

Budući da ekspresija fuzija i koekspresija šaperona nisu rezultirali topljivim samostojećim proteinima, daljnja strategija uključivala je aditive za koje je prethodno pokazano da pomažu u sprječavanju nastanka ili razbijanju proteinskih agregata. Otopine korištene kao mobilne faze tijekom postupka pročišćavanja pripremljene su s  $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$  ureom,  $50 \text{ mmol dm}^{-3}$  Arg i Glu, 0,1 % i 1 % Tweenom20 i 1 % Tweenom80. Urea pri koncentracijama do  $2 \text{ mol dm}^{-3}$  djeluje kao kaotrop i destabilizira agregiranje tako da smanjuje ukupni efekt hidrofobnih regija preuređivanjem molekula voda oko proteina ostvarivanjem vodikovih veza.<sup>125,126</sup> Mehanizam djelovanja kombinacije  $50 \text{ mmol dm}^{-3}$  Arg i Glu u sprječavanju agregiranja pri tim (nižim) koncentracijama nije u potpunosti poznat. Pretpostavlja se da Arg i Glu interagiraju sa suprotno nabijenim skupinama na površini proteina, a pri tome njihovi alifatski dijelovi bočnih ogranaka stvaraju interakcije i prekrivaju hidrofobne dijelove u susjedstvu.<sup>127</sup> Neionski detergentski Tween20 i Tween80 (polioksietilen sorbitan monolaurat) razlikuju u duljini alifatskog lanca (Tween80 ima duži alifatski lanac). Ovi detergentski sprječavaju agregiranje smještanjem na površinu proteina čime je onemogućena međusobna adsorpcija proteina i prekrivanjem hidrofobnih dijelova koji favoriziraju agregiranje.<sup>125,128,129</sup> Pročišćavanje s navedenim aditivima provedeno je samo za krnje konstrukte A i C sa i bez MBP-privjeska koeksprimirane uz set šaperona DnaK, DnaJ, GroEL, GroES i GrpE. Ostali setovi, a koji svi sadrže manji broj šaperona su se pokazali jednako efikasni u povećavanju topljivosti agregata. Jedini aditiv s kojim je dobivena dodatna vrpca na kromatogramu gel-

filtracije koja nije u mrtvom volumenu, odnosno ne odgovara agregatima je 1% Tween20 (rezultati u poglavlju 4.2.4.). Iako je dodatna vrpca izrazito mala moguće ju je razlučiti, odnosno na taj način bilo je moguće pročitati monomerne oblike krnjih proteina. Ovaj rezultat dobiven je s oba krnja konstrukta A i C, sa i bez MBP-a. Iako su količine pročišćenih krnjih varijanti na ovaj način bile izrazito male, uspješno je pročišćena dovoljna količina za osnovnu karakterizaciju katalitičke aktivnosti.

### 5.3. Aktivnost krnjih oblika IleRS2 iz bakterije *B. megaterium*

Katalitička aktivnost pročišćenih krnjih oblika A i C IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* ispitana je u reakciji aktivacije aminokiselina i ukupnoj reakciji aminoaciliranja. Reakcije aktivacije praćene su metodom izmjene radioaktivno obilježenog pirofosfata. Rezultati su pokazali da krnji oblik IleRS2 C katalizira reakciju aktivacije, ali je aktivnost značajno manja od aktivnosti divljeg tipa IleRS2. Vrijednost opaženog koeficijenta brzine reakcije aktivacije iznosi  $k_{\text{obs}} 0,0161 \pm 0,0033 \text{ s}^{-1}$  uz  $20 \text{ mmol dm}^{-3}$  izoleucin. Vrijednost obrtnog broja  $k_{\text{cat}}$  divljeg tipa BmIleRS2 za reakciju aktivacije iznosi  $66 \text{ s}^{-1}$  što je tri reda veličine veće od  $k_{\text{obs}}$  određenog za krnji oblik C.<sup>84</sup> Ovako niska vrijednost nije neočekivana s obzirom na to da su enzimu uklonjene tri domene (C-terminalna, korektivna domena i CP2). Prisutna aktivnost krnjih enzima potvrđuje da su ovakvi konstrukti mogući modelni predstavnici evolucijskih predaka. Odsutnost uklonjenih domena utječe na funkcionalnost jer je narušena nativna arhitektura enzima. Narušavaju se interakcije sa supstratima, ali i sama struktura što može utjecati i na konformaciju aktivnog mjesta te smanjiti njegovu katalitičku aktivnost. Osim prethodno navedenog, na opaženu smanjenu aktivnost krnjih varijanti BmIleRS2 u reakciji aktivacije može utjecati i činjenica da se u uzorku i dalje nalazi dio agregata koji su supročišćeni zbog djelomičnog preklapanja vrpce. Nadalje, tijekom provođenja same enzimske reakcije (pri  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) moglo je doći do ponovnog agregiranja zbog više temperature ili promjene sastava otopine u kojem se krnji protein nalazi. Ukoliko je protein tijekom reakcije dijelom prisutan u obliku agregata, iz bilo kojeg od navedenih razloga, to zasigurno dodatno smanjuje njegovu katalitičku aktivnost.

Zanimljivi su dobiveni signali nastalog radioaktivno obilježenog ortofosfata. Uobičajena je spontana hidroliza pirofosfata u otopinama, ali je ta reakcija spora i količina nastalog fosfata je zanemariva te se obično ne povećava značajno tijekom trajanja reakcije (u različitim vremenskim točkama). U reakciji aktivacije s krnjim oblikom C detektirano je

značajnije nastajanje  $[^{32}\text{P}]\text{-PO}_4^{3-}$  tijekom trajanja reakcije u usporedbi s divljim tipom enzima. Uzrok tome može biti pirofosfatazna aktivnost krnjeg IleRS2, djelovanje neke druge komponente supročišćene uz enzim ili hidroliza  $\gamma\text{-}[^{32}\text{P}]\text{-fosfata}$  iz  $[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ -a nastalog u pirofosforolizi. Napravljena je i testna reakcijska smjesa bez dodatka izoleucina koja je rezultirala nastankom  $[^{32}\text{P}]\text{-PO}_4^{3-}$  u bliskoj količini kao i u prethodnim eksperimentima s izoleucinom. U reakciji bez dodatka enzima nastalo je minimalno  $[^{32}\text{P}]\text{-PO}_4^{3-}$  kao i u slučaju reakcije s divljim tipom. Pripremljena je i reakcijska smjesa bez ATP-a u kojoj je nastao  $[^{32}\text{P}]\text{-PO}_4^{3-}$  u nešto većoj količini nego u reakcijama s ATP-om. Kako bi se detaljnije proučila aktivnost krnjih oblika IleRS2 potrebno je ponoviti eksperimente s različitim koncentracijama izoleucina kako bi se odredili kinetički parametri  $k_{\text{cat}}$  i  $K_M$  te s norvalinom i valinom kako bi se okarakterizirala specifičnost enzima. Krnji konstrukt A nije bio aktivan u katalizi reakcije aktivacije što je kontrainuitivno s obzirom na činjenicu da mu je uklonjena jedna manje domena u usporedbi s konstruktom C. Treba uzeti u obzir da razlog može biti način pročišćavanja i/ili izvođenje eksperimenta budući da su ovi krnji konstrukti izrazito osjetljivi na uvjete u kojima se nalaze te je potrebno ponoviti postupak pripreme i testiranja aktivnosti za donošenje jasnijih zaključaka.

Reakcija aminoaciliranja praćena je korištenjem radioaktivno obilježene tRNA<sup>Ile</sup>. Krnji konstrukti BmIleRS2 A i C katalizirali su ukupnu reakciju aminoaciliranja (rezultati u poglavlju 4.4.). Aktivnost je značajno manja od aktivnosti divljeg tipa IleRS2 kao i u slučaju reakcije aktivacije. Vrijednost opaženog koeficijenta brzine ukupne reakcije aminoaciliranja  $k_{\text{obs}}$  iznosila je  $0,0002 \pm 0,0001 \text{ s}^{-1}$  uz krnji konstrukt C i  $0,00003 \text{ s}^{-1}$  uz krnji konstrukt A uz  $50 \mu\text{mol dm}^{-3}$   $[^{32}\text{P}]\text{-tRNA}^{\text{Ile}}$  i  $20 \text{ mmol dm}^{-3}$  izoleucin. Ove vrijednosti manje su 5000 puta, odnosno 30000 puta od obrtnog broja divljeg tipa BmIleRS2 koji iznosi oko  $1 \text{ s}^{-1}$ . Kao i u slučaju aktivacije, niske vrijednosti nisu neočekivane s obzirom na to da su enzimima uklonjene dvije (A), odnosno tri domene (C) što narušava nativnu strukturu enzima i interakcije sa supstratima (npr. C-terminalna s antikodonskom peteljkom tRNA). Zanimljivo je da je konstrukt A aktivan u ukupnoj reakciji aminoaciliranja, a nije aktivan u reakciji aktivacije, ali kao što je već prethodno spomenuto razlog može biti, između ostalog, način pročišćavanja i/ili izvođenje eksperimenta.

Test *in vivo* komplementacije proveden je kako bi se ispitala aktivnost krnjih varijanti IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* u bakterijskim stanicama. U ovakvom testu na aktivnost proteina ne može utjecati postupak pročišćavanja ili provođenja testne reakcije te se enzimi

nalaze u njima prirodnijem okruženju (bakterijskoj stanici) od *in vitro* uvjeta. Test komplementacije temeljio se na otpornosti divljeg tipa IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* na inhibiciju antibiotikom mupirocinom. IleRS iz bakterije *E. coli* osjetljiv je na inhibiciju mupirocinom pa je tako moguće prekomjernom ekspresijom istraživanog provjeriti posjeduje li aktivnost *in vivo* ili u ovom konkretnom slučaju otpornost na antibiotik mupirocin. Korištene su krnje varijante A i C sa i bez koekspresije šaperona seta 1, te uz koekspresiju tRNA<sup>Ile</sup>. Utvrđena je minimalna količina mupirocina koja u potpunosti inhibira rast bakterije *E. coli* koja iznosi 150  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  u uvjetima eksperimenta. Komplementacija u svim testiranim uvjetima nije bila uspješna, stanice transformirane plazmidima s ugrađenim genima za krnje varijante A i C nisu rasle na pločama s mupirocinom (rezultati u poglavlju 4.5.). Razlozi zašto komplementacija nije uspješna mogu biti narušena aktivnost zbog agregiranja krnjih konstrukata, neoptimalni uvjeti ili narušena otpornost na mupirocin zbog uklonjenih domena.

Cilj ovog rada bio je istražiti mogućnost proizvodnje i funkcionalnost krnjih oblika BmIleRS2 kao mogućih polaznih modela za daljnju evolucijsku analizu pretka ovog enzima. Rezultati kinetičkih mjerenja koji karakteriziraju aktivnost krnjih konstrukata BmIleRS2 A (uklonjene C-terminalna i korektivna domena) i C (uklonjena C-terminalna, korektivna i CP2 domena) pokazuju da su oni funkcionalni u ukupnoj reakciji aminoaciliranja. Iako je njihova aktivnosti značajno smanjena (tri do četiri reda veličine) u usporedbi s cjelovitim enzimom, njezina prisutnost sugerira da su oni mogući polazni modeli za daljnju rekonstrukciju ancestralnog oblika BmIleRS2. Uzimajući u obzir faktore koji dodatno utječu na rezultate i aktivnost krnjih oblika, kao što je nestabilnost i sklonost agregiranju, njihove aktivnosti su vjerojatno i podcijenjene. Dobiveni rezultati ukazuju na to da uklonjene C-terminalna, korektivna i CP2-domena nisu neophodne za postojanje minimalne aktivnosti IleRS u katalizi reakcije aminoaciliranja, ali očekivano, značajno utječu na njezinu razinu. Ovaj rad predstavlja početnu točku u istraživanju ancestralnih oblika BmIleRS2 te otvara nova pitanja i istraživačke smjerove. Povećanje aktivnosti krnjih oblika može se istražiti daljnjom optimizacijom uvjeta pripreve, ali i optimizacijom aminokiselinskog slijeda kako bi se povećala stabilnost krnje strukture.

## § 6. ZAKLJUČAK

- Dizajnirana su tri krnja oblika IleRS2 iz bakterije *B. megaterium*. Konstrukt A uklonjene su C-terminalna i korektivna domena. Konstrukt B uklonjene su C-terminalna, korektivna i CP2 domena. Konstruktima A i B nukleotidni slijed je optimiran prema korištenju kodona u bakteriji *E. coli*. Konstrukt C strukturno je identičan konstrukt B, ali je nukleotidni slijed zadržan kao u izvornom genu.
- Ekspimirani krnji oblici IleRS2 su slabo topljivi, agregiraju i talože u obliku inkluzijskih tijela. Optimizacija uvjeta ekspresije i pripreme proteinskih ekstrakata nisu pospješili proizvodnju topljivih krnjih oblika.
- Fuzioniranje krnjih oblika IleRS2 sa GST-privjeskom nije pospješilo njihovu topljivost. Krnji oblici fuzionirani s MBP-privjeskom i krnji oblici ekspimirani uz različite setove šaperona bili su prisutni u proteinskom ekstraktu, ali je analiza gel-filtracijskom kromatografijom pokazala da u oba slučaja stvaraju topljive agregate. Prethodno navedeno ukazuje na važnost analize uzoraka proteina gel-filtracijskom kromatografijom.
- Pročišćavanjem krnjih oblika sa i bez MBP-privjeska, ekspimiranih uz koekspresiju šaperona DnaK, DnaJ, GrpE, GroES i GroEL i uz 1%-tni Tween20 dobiven je mali udio topljivih, samostojećih, neagregiranih krnjih proteina. Pročišćavanje s drugim aditivima nije rezultiralo razbijanjem agregata (urea, Arg i Glu, 1% Tween80, 0,1% Tween20).
- Katalitička aktivnost krnjih oblika IleRS2 je niska (barem tri reda veličine manja s obzirom na cjeloviti enzim). Redukcija u aktivnosti krnjih oblika je očekivana, ali samo postojanje aktivnosti potvrđuje da su ovakvi konstrukti mogući modelni predstavnici evolucijskih predaka. Iako su krnji IleRS2 *in vitro* katalitički aktivni, *in vivo* testovi komplementacije pokazali su da njihova aktivnost nije dovoljna da omogućí preživljavanje stanice koja ovisi samo o njima.
- Tijekom praćenja reakcije aktivacije izoleucina krnjim oblicima u reakcijskim smjesama došlo je do značajnog nastajanja  $[^{32}\text{P}]\text{-PO}_4^{3-}$  s obzirom na reakciju s divljim tipom BmIleRS2. Ovo ukazuje na moguću pirofosfataznu aktivnost u smjesi koja bi mogla biti i svojstvo krnjeg oblika IleRS2, no potrebna su daljnja istraživanja kako bi se objasnila ova pojava.

## § 7. POPIS OZNAKA KRATICA I SIMBOLA

### Popis kratica za aminokiseline:

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

**Popis ostalih kratica:**

aa	aminokiselina
aa-AMP	aminoacil-adenilat
aa-tRNA <sup>aa</sup>	aminoacilirana tRNA
aaRS	aminoacil-tRNA-sintetaza
AMP	adenozin-5'-monofosfat
APS	amonijev peroksodisulfat
ATP	adenozin-5'-trifosfat
$\alpha$ -[ <sup>32</sup> P]-ATP	ATP koji na $\alpha$ položaju ima radioaktivni izotop <sup>32</sup> P
BmIleRS2	izoleucil-tRNA-sintetaza tipa 2 iz bakterije <i>Bacillus megaterium</i>
BSA	albumin iz goveđeg seruma
[ <sup>14</sup> C]-aa	aminokiselina obilježena radioaktivnim izotopom <sup>14</sup> C
[ <sup>14</sup> C]-Ile	izoleucin obilježen radioaktivnim izotopom <sup>14</sup> C
CP1	engl. <i>connective peptide 1</i> , povezujući peptid 1
CP2	engl. <i>connective peptide 2</i> , povezujući peptid 12
cpm	engl. <i>counts per minute</i> , broj otkucaja u minuti pri scintilacijskom mjerenju radioaktivnosti
<i>D</i>	diskriminacijski faktor
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
dNTP	deoksinukleozid-5'-trifosfat
EcIleRS	izoleucil-tRNA-sintetaza iz bakterije <i>Escherichia coli</i>
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
EF-Tu	elongacijski faktor Tu
fMet	<i>N</i> -formilmetionin
GTP	gvanozin-5'-trifosfat
Hepes	<i>N</i> -(2-hidroksietil)piperazin- <i>N'</i> -2-etansulfonska kiselina
IF	inicijacijski faktor
Ile-AMS	5'- <i>N</i> -[ <i>N</i> -(L-izoleucil)sulfamoil]adenozin
IleRS1	izoleucil-tRNA-sintetaza tip 1
IleRS2	izoleucil-tRNA-sintetaza tip 2
IPTG	izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktopiranozid
$k_{cat}$	obrtni broj



---

$K_M$	Michaelisova konstanta
$k_{trans}$	koeficijent brzine reakcije prijenosa aminokiseline na tRNA
LB	Luria-Bertani
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i> , glasnička RNA
Ni-NTA	nikal-nitrilotriocena kiselina
OD <sub>600</sub>	optička gustoća pri valnoj duljini od 600 nm
PCR	lančana reakcija polimerazom
PMSF	fenilmetilsulfonil-fluorid
POPOP	1,4-bis(2-(4-metil-5-fenil)oksazolil)benzen
[ <sup>32</sup> P]-PP <sub>i</sub>	pirofosfat obilježen radioaktivnim izotopom <sup>32</sup> P
PP <sub>i</sub>	pirofosfat
PPO	2,5-difenil oksazol
RF	faktor otpuštanja
RNA	ribonukleinska kiselina
rRNA	ribosomska ribonukleinska kiselina
tRNA	transportna ribonukleinska kiselina
SDS	natrijev dodecilsulfat
SDS-PAGE	elektroforeza na poliakrilamidnom gelu uz prisutnost natrijevog dodecilsulfata
TCA	triklorocena kiselina
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletildiamin
TFA	trifluorocena kiselina
TIPP	termostabilna anorganska pirofosfataza
$v_0$	početna brzina reakcije
$V_{max}$	maksimalna brzina enzimski katalizirane reakcije
XCFE	ksilencijanil-fluorofosfat

## § 8. LITERATURNI IZVORI

1. Crick, F. Central Dogma of Molecular Biology. *Nature* (1970) **227**, 561–563.
2. Cusack, S. Aminoacyl-tRNA synthetases. *Curr. Op. Struct. Biol.* (1997) **7**, 881–889.
3. Ibba, M. & Söll, D. Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* (2000) **69**, 617–650.
4. Yadavalli, S. S. & Ibba, M. Quality control in aminoacyl-tRNA synthesis: Its role in translational fidelity. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* (2012) **86**, 1–43.
5. Perona, J. J. & Gruic-Sovulj, I. Synthetic and editing mechanisms of aminoacyl-tRNA synthetases. *Top. Curr. Chem.* (2014) **344**, 1–41.
6. Eriani, G., Delarue, M., Poch, O., Gangloff, J. & Moras, D. Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature* (1990) **347**, 203–206.
7. Fersht, A. R. Editing Mechanisms in Protein Synthesis. Rejection of Valine by the Isoleucyl-tRNA Synthetase? *Biochemistry* (1977) **16**, 1025–1030.
8. Bilus, M. *et al.* On the Mechanism and Origin of Isoleucyl-tRNA Synthetase Editing against Norvaline. *J. Mol. Biol.* (2019) **431**, 1284–1297.
9. Cveticic, N. *et al.* Naturally occurring Isoleucyl-tRNA synthetase without tRNA-dependent pre-transfer editing. *Journal of Biological Chemistry* (2016) **291**, 8618–8631.
10. Perona, J. J. & Hadd, A. Structural diversity and protein engineering of the aminoacyl-tRNA Synthetases. *Biochemistry* (2012) **51**, 8705–8729.
11. Nureki, O. *et al.* Enzyme Structure with Two Catalytic Sites for Double-Sieve Selection of Substrate. *Science* (1998) **280**, 578–582.
12. Silvian, L. F., Wang, J. & Steitz, T. A. Insights into Editing from an Ile-tRNA Synthetase Structure with tRNA<sup>Ile</sup> and Mupirocin. *Science* (1999) **285**, 1074–1077.
13. Gruic-Sovulj, I., Longo, L. M., Jabłońska, J. & Tawfik, D. S. The evolutionary history of the HUP domain. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* (2021) **57**, 1–15.
14. Anantharaman, V., Koonin, E. & Aravind, L. Comparative genomics and evolution of proteins involved in RNA metabolism. *NAR* (2002) **30**, 1427–1464.

15. Woese, C. R., Olsen, G. J., Ibba, M. & Soll, D. Aminoacyl-tRNA Synthetases, the Genetic Code, and the Evolutionary Process. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* (2000) **64**, 202–236.
16. Ribas de Pouplana, L. The evolution of aminoacyl-tRNA synthetases: From dawn to LUCA. *Enzymes* (2020) **48**, 11–37.
17. O’Donoghue, P. & Luthey-Schulten, Z. On the Evolution of Structure in Aminoacyl-tRNA Synthetases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* (2003) **67**, 550–573.
18. Starzyk, R. M., Webster, T. A. & Schimmel, P. Evidence for Dispensable Sequences Inserted into a Nucleotide Fold. *Science* (1987) **237**, 1614–1618.
19. Augustine, J. & Francklyn, C. Design of an Active Fragment of a Class II Aminoacyl-tRNA Synthetase and Its Significance for Synthetase Evolution. *Biochemistry* (1997) **36**, 3473–3482.
20. Schimmel, P., Giege, R., Moras, D. & Yokoyama, S. An operational RNA code for amino acids and possible relationship to genetic code. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (1993) **90**, 8763–8768.
21. Harms, M. J. & Thornton, J. W. Analyzing protein structure and function using ancestral gene reconstruction. *Curr. Opin. Struct. Biol.* (2010) **20**, 360–366.
22. Thornton, J. W. Resurrecting ancient genes: Experimental analysis of extinct molecules. *Nat. Rev. Genet.* (2004) **5**, 366–375.
23. Fuller, A. T. *et al.* Pseudomonic Acid: an Antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Nature* (1971) **234**, 416–417.
24. Brown, J. R., Zhang, J. & Hodgson, J. E. A bacterial antibiotic resistance gene with eukaryotic origins. *Curr. Biol.* (1998) **8**, 365–367.
25. Rosano, G. L. & Ceccarelli, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Front. Microbiol.* (2014) **5**,.
26. Kozak, M. Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* (1999) **234**, 187–208.
27. Asano, K. Why is start codon selection so precise in eukaryotes? *Translation* (2014) **2**, 1–15.
28. Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M. & Bretscher, A. *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman and Company, 2016.

29. Allen, G. S., Zavialov, A., Gursky, R., Ehrenberg, M. & Frank, J. The cryo-EM structure of a translation initiation complex from *Escherichia coli*. *Cell* (2005) **121**, 703–712.
30. Myasnikov, A. G. *et al.* Conformational transition of initiation factor 2 from the GTP- to GDP-bound state visualized on the ribosome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* (2005) **12**, 1145–1149.
31. Steitz, T. A. & Moore, P. B. RNA, the first macromolecular catalyst: The ribosome is a ribozyme. *Trends Biochem. Sci.* (2003) **28**, 411–418.
32. Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B. & Steitz, T. A. The Structural Basis of Ribosome Activity in Peptide Bond Synthesis. *Science (1979)* (2000) **289**, 920–930.
33. Gao, H. *et al.* Study of the Structural Dynamics of the *E. coli* 70S Ribosome Using Real-Space Refinement. *Cell* (2003) **113**, 789–801.
34. Steitz, J. A. & Jakes, K. How ribosomes select initiator regions in mRNA: base pair formation between the 3' terminus of 16S rRNA and the mRNA during initiation of protein synthesis in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1975) **72**, 4734–4738.
35. Shine, J. & Dalgarno, L. The 3'-Terminal Sequence of *Escherichia coli* 16S Ribosomal RNA: Complementarity to Nonsense Triplets and Ribosome Binding Sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1974) **71**, 1342–1346.
36. Nelson, D. L. & Cox, M. M. *Lehninger: Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman and Company, 2013.
37. de Smit, M. H. & van Duin, J. Translational Initiation on Structured Messengers Another Role for the Shine-Dalgarno Interaction. *J. Mol. Biol* (1994) **235**, 173–184.
38. Hiller, D. A., Singh, V., Zhong, M. & Strobel, S. A. A two-step chemical mechanism for ribosome-catalysed peptide bond formation. *Nature* (2011) **476**, 236–239.
39. Kisselev, L., Ehrenberg, M. & Frolova, L. Termination of translation: interplay of mRNA, rRNAs and release factors? *EMBO J.* (2003) **22**, 175–182.
40. Ogle, J. M. *et al.* Recognition of Cognate Transfer RNA by the 30S Ribosomal Subunit. *Science* (2001) **292**, 897–902.
41. Zaher, H. S. & Green, R. Quality control by the ribosome following peptide bond formation. *Nature* (2009) **457**, 161–166.

42. Cvetešić, N., Akmačić, I. & Gruić-Sovulj, I. Lack of discrimination against non-proteinogenic amino acid norvaline by elongation factor Tu from *Escherichia coli*. *Croatica Chemica Acta* (2013) **86**, 73–82.
43. Stanzel, M., Schon, A. & Sprinzl, M. Discrimination against misacylated tRNA by chloroplast elongation factor Tu. *Eur. J. Biochem* (1994) **219**,.
44. <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/Organic/translation.html> (datum pristupa: 12.7.2022.).
45. Hartl, F. U., Bracher, A. & Hayer-Hartl, M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* (2011) **475**, 324–332.
46. Calloni, G. *et al.* DnaK Functions as a Central Hub in the E. coli Chaperone Network. *Cell Rep.* (2012) **1**, 251–264.
47. Langer, T. *et al.* Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature* (1992) **356**, 683–689.
48. Levinthal, C. How to Fold Graciously. *Mossbauer spectroscopy in biological systems: Proceedings* (1969) **67**, 22–24.
49. Dill, K. A., Ozkan, S. B., Shell, M. S. & Weikl, T. R. The protein folding problem. *Ann. Rev. Biophys.* (2008) **37**, 289–316.
50. Ribas de Pouplana, L. & Schimmel, P. Two Classes of tRNA Synthetases Suggested by Sterically Compatible Dockings on tRNA Acceptor Stem. *Cell* (2001) **104**, 191–193.
51. Zhang, C. M., Perona, J. J., Ryu, K., Francklyn, C. & Hou, Y. M. Distinct Kinetic Mechanisms of the Two Classes of Aminoacyl-tRNA Synthetases. *J. Mol. Biol.* (2006) **361**, 300–311.
52. Rodin, S. N. & Ohno, S. Two types of aminoacyl-tRNA-synthetases could be originally encoded by complementary strands of the same nucleic acid. *Orig. Life Evol. Biosph.* (1995) **25**, 565–589.
53. Ibba, M. *et al.* A Euryarchaeal Lysyl-tRNA Synthetase: Resemblance to Class I Synthetases. *Science* (1997) **278**, 1119–1122.
54. Aravind, L., Anantharaman, V. & Koonin, E. Monophyly of Class I aminoacyl tRNA synthetase, USPA, ETFP, photolyase, and PP-ATPase nucleotide-binding domains: Implications for protein evolution in the RNA world. *Proteins: Structure, Function and Genetics* (2002) **48**, 1–14.

55. Perona, J. J., Rould, M. A. & Steitz, T. A. Structural Basis for Transfer RNA Aminoacylation by Escherichia coli Glutamyl-tRNA Synthetase. *Biochemistry* (1993) **32**, 8758–8771.
56. Schmidt, E. & Schimmel, P. Residues in a Class I tRNA Synthetase Which Determine Selectivity of Amino Acid Recognition in the Context of tRNA? *Biochemistry* (1995) **34**, 1210.
57. Cusack, S. Sequence, structure and evolutionary relationships between class 2 aminoacyl-tRNA synthetases: An update. *Biochimie* (1993) **75**, 1077–1081.
58. Griffin, B. E., Jarman, M., Reese, C. B., Sulston, J. E. & Trentham, D. R. Some Observations Relating to Acyl Mobility in Aminoacyl Soluble Ribonucleic Acids. *Biochemistry* (1966) **5**, 3638–3649.
59. Weinger, J. S. & Strobel, S. A. Participation of the tRNA A76 hydroxyl groups throughout translation. *Biochemistry* (2006) **45**, 5939–5948.
60. Pang, L., Weeks, S. D. & van Aerschot, A. Aminoacyl-tRNA synthetases as valuable targets for antimicrobial drug discovery. *Int. J. Mol. Sci.* (2021) **22**, 1–34.
61. Cveticic, N., Bilus, M. & Gruic-Sovulj, I. The tRNA A76 hydroxyl groups control partitioning of the tRNA-dependent pre- and post-transfer editing pathways in class I tRNA synthetase. *Journal of Biological Chemistry* (2015) **290**, 13981–13991.
62. Cvetešić, N. *Mehanizmi popravka pogreške leucil-tRNA-sintetaze sprječavaju nekanonsku mistranlaciju proteoma bakterije Escherichia coli*. Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2015.
63. Bullwinkle, T. J. & Ibba, M. Emergence and evolution. *Top. Curr. Chem.* (2014) **344**, 43–87.
64. Caetano-Anollés, G., Wang, M. & Caetano-Anollés, D. Structural Phylogenomics Retrodicts the Origin of the Genetic Code and Uncovers the Evolutionary Impact of Protein Flexibility. *PLoS One* (2013) **8**,.
65. Caetano-Anollés, G., Kim, K. M. & Caetano-Anollés, D. The phylogenomic roots of modern biochemistry: Origins of proteins, cofactors and protein biosynthesis. *J. Mol. Evol.* (2012) **74**, 1–34.
66. Zivkovic, I., Ivkovic, K., Cveticic, N., Marsavelski, A. & Gruic-Sovulj, I. Negative catalysis by the editing domain of class I aminoacyl-tRNA synthetases. *NAR* (2022).

67. Fukunaga, R. & Yokoyama, S. Structural Basis for Substrate Recognition by the Editing Domain of Isoleucyl-tRNA Synthetase. *J. Mol. Biol.* (2006) **359**, 901–912.
68. Zhou, X. L., Zhu, B. & Wang, E. D. The CP2 domain of leucyl-tRNA synthetase is crucial for amino acid activation and post-transfer editing. *Journal of Biological Chemistry* (2008) **283**, 36608–36616.
69. Fukunaga, R. & Yokoyama, S. Crystal structure of leucyl-tRNA synthetase from the archaeon *Pyrococcus horikoshii* reveals a novel editing domain orientation. *J. Mol. Biol.* (2005) **346**, 57–71.
70. Hou, Y.-M., Shiba, K., Mottes, C. & Schimmel, P. Sequence determination and modeling of structural motifs for the smallest monomeric aminoacyl-tRNA synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1991) **88**, 976–980.
71. Zhou, X. L., Zhu, B. & Wang, E. D. The CP2 domain of leucyl-tRNA synthetase is crucial for amino acid activation and post-transfer editing. *Journal of Biological Chemistry* (2008) **283**, 36608–36616.
72. Zu, R., Salazar, J., Canales, M. & Orellana, O. A dispensable peptide from *Acidithiobacillus ferrooxidans* tryptophanyl-tRNA synthetase affects tRNA binding. *FEBS Lett.* (2002) **532**, 387–390.
73. Caetano-Anollés, D., Kim, K. M., Mittenthal, J. E. & Caetano-Anollés, G. Proteome evolution and the metabolic origins of translation and cellular life. *J. Mol. Evol.* (2011) **72**, 14–33.
74. Glasfeld, E., Landro, J. A. & Schimmel, P. C-Terminal Zinc-Containing Peptide Required for RNA Recognition by a Class I tRNA Synthetase. *Biochemistry* (1996) **35**, 4139–4145.
75. Zivkovic, I., Moschner, J., Kokschi, B. & Gruic-Sovulj, I. Mechanism of discrimination of isoleucyl-tRNA synthetase against nonproteinogenic  $\alpha$ -aminobutyrate and its fluorinated analogues. *FEBS Journal* (2020) **287**, 800–813.
76. Jakubowski, H. & Fersht, A. R. Alternative pathways for editing non-cognate amino acids by aminoacyl-tRNA synthetases. *NAR* (1981) **9**, 3105–3117.
77. Fersht, A. R. & Kaethner, M. M. Mechanism of Aminoacylation of tRNA. Proof of the Aminoacyl Adenylate Pathway for the Isoleucyl- and Tyrosyl-tRNA Synthetases from *Escherichia coli*. *Biochemistry* (1976) **15**, 818–823.

78. Loftfield, R. B. & Vanderjagt, D. The Frequency of Errors in Protein Biosynthesis. *Biochem. J.* (1972) **128**, 1353–1356.
79. Dulic, M., Cvetesic, N., Perona, J. J. & Gruic-Sovulj, I. Partitioning of tRNA-dependent editing between pre- and post-transfer pathways in class I aminoacyl-tRNA synthetases. *Journal of Biological Chemistry* (2010) **285**, 23799–23809.
80. Baldwin, A. N. & Berg, P. Transfer ribonucleic acid-induced hydrolysis of valyladenylate bound to isoleucyl ribonucleic acid synthetase. *Journal of Biological Chemistry* (1966) **241**, 839–845.
81. Živković, I. *Mehanizmi ostvarivanja supstratne specifičnosti u sintetskom i korektivnom mjestu izoleucil-tRNA-sintetaze*. Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2021.
82. Nureki, O. *et al.* Molecular recognition of the identity-determinant set of isoleucine transfer RNA from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* (1994) **236**, 710–724.
83. Gupta, R. S., Patel, S., Saini, N. & Chen, S. Robust demarcation of 17 distinct bacillus species clades, proposed as novel bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: Description of *robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *bacillus* limiting it only to the members of the *subtilis* and *cereus* clades of species. *Int. J. Syst. and Evol. Microbiol.* (2020) **70**, 5753–5798.
84. Zanki, V., Bozic, B., Mocibob, M., Ban, N. & Gruic-Sovulj, I. A pair of isoleucyl-tRNA synthetases in *Bacilli* fulfill complementary roles to keep fast translation and provide antibiotic resistance. *Protein Science* (2022) **31**, 1–11.
85. Ruff, M. *et al.* Class II Aminoacyl Transfer RNA Synthetases: Crystal Structure of Yeast Aspartyl-tRNA Synthetase Complexed with tRNA<sup>Asp</sup>. *Science* (1992) **252**, 1682–1689.
86. Carter, C. W. Cognition, mechanism, and evolutionary relationships in aminoacyl-tRNA-synthetases. *Annu. Rev. Biochem.* (1993) **62**, 715–748.
87. Carter, C. W. & Duax, W. L. Did tRNA Synthetase Synthetase Classes Arise on Opposite Strands of the Same Gene? *Mol. Cell* (2002) **10**, 705–708.
88. Li, L., Weinreb, V., Francklyn, C. & Carter, C. W. Histidyl-tRNA synthetase urzymes: Class I and II aminoacyl trna synthetase urzymes have comparable catalytic activities for cognate amino acid activation. *Journal of Biological Chemistry* (2011) **286**, 10387–10395.



89. Cusack, S., Hartlein, M. & Leberman, R. Sequence, structural and evolutionary relationships between class 2 aminoacyl-tRNA synthetases. *NAR* (1991) **19**, 3489–3498.
90. Hobson, J. J., Li, Z., Hu, H. & Carter, C. W. A Leucyl-tRNA Synthetase Urzyme: Authenticity of tRNA Synthetase Catalytic Activities and Promiscuous Phosphorylation of Leucyl-5'AMP. *Int. J. Mol. Sci.* (2022) **23**, 4229.
91. Pham, Y. *et al.* Tryptophanyl-tRNA synthetase urzyme: A model to recapitulate molecular evolution and investigate intramolecular complementation. *Journal of Biological Chemistry* (2010) **285**, 38590–38601.
92. Li, L., Francklyn, C. & Carter, C. W. Aminoacylating urzymes challenge the RNA world hypothesis. *Journal of Biological Chemistry* (2013) **288**, 26856–26863.
93. 260/280 and 260/230 Ratios. *Thermo Fisher T042– Technical Bulletin, Nanodrop Spectrophotometers* (2009).
94. Wolfson, A. D. & Uhlenbeck, O. C. Modulation of tRNA<sup>Ala</sup> identity by inorganic pyrophosphatase. *PNAS* (2022) **99**, 5965–5970.
95. Cveticic, N. & Gruic-Sovulj, I. Synthetic and editing reactions of aminoacyl-tRNA synthetases using cognate and non-cognate amino acid substrates. *Methods* (2017) **113**, 13–26.
96. Sorensen, M. A., Kurland, C. G. & Pedersen, S. Codon Usage Determines Translation Rate in Escherichia coli. *J. Mol. Biol.* (1989) **207**, 365–377.
97. Varenne, S., Bug, J., Llobes, R. & Lazdunski, C. Translation is a Non-uniform Process Effect of tRNA Availability on the Rate of Elongation of Nascent Polypeptide Chains. *J. Mol. Biol* (1984) **180**, 549–576.
98. Komar, A. A., Lesnik, T. & Reiss, C. Synonymous codon substitutions affect ribosome traffic and protein folding during in vitro translation. *FEBS Lett.* (1999) **462**, 387–391.
99. Baek, M. *et al.* Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network. *Science* (2021) **373**, 871–876.
100. Sørensen, H. P. & Mortensen, K. K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of Escherichia coli. *Microb. Cell Fact.* (2005) **4**,.
101. Makhatadze, G. I & Privalov, P. L. Energetics of protein structure. *Adv. Protein Chem.* (1995) **47**, 307–425.

102. Bhatwa, A. *et al.* Challenges Associated With the Formation of Recombinant Protein Inclusion Bodies in *Escherichia coli* and Strategies to Address Them for Industrial Applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* (2021) **9**, 1-18
103. Donovan, R. S., Robinson, C. W. & Glick, B. R. Review: Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. *J. Ind. Microbiol.* (1996) **16**, 145–154.
104. Vasina, J. A. & Baneyx, F. O. Recombinant Protein Expression at Low Temperatures under the Transcriptional Control of the Major *Escherichia coli* Cold Shock Promoter *cspA*. *Appl. Environ. Microbiol.* (1996) **62**, 1444–1447.
105. Baneyx, F. & Mujacic, M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* (2004) **22**, 1399–1407.
106. Hoffmann, F. & Rinas, U. Kinetics of heat-shock response and inclusion body formation during temperature-induced production of basic fibroblast growth factor in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* (2000) **16**, 1000–1007.
107. Costa, S., Almeida, A., Castro, A. & Domingues, L. Fusion tags for protein solubility, purification, and immunogenicity in *Escherichia coli*: The novel Fh8 system. *Front. Microbiol.* (2014) **5**,.
108. Kapust, R. B. & Waugh, D. S. *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci.* (1999) **8**, 1668–1674.
109. Smith, D. B. & Johnson, K. S. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* (1988) **67**, 31–40.
110. Butt, T. R., Edavettal, S. C., Hall, J. P. & Mattern, M. R. SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein Expr. Purif.* (2005) **43**, 1–9.
111. Davis, G. D., Elisee, C., Newham, D. M. & Harrison, R. G. New Fusion Protein Systems Designed to Give Soluble Expression in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* (1999) **65**, 382–388.
112. Baker, R. T. Protein expression using ubiquitin fusion and cleavage. *Cur. Opin. Biotechnol.* (1996) **7**, 541–546.

113. Kaplan, W. *et al.* Conformational stability of pGEX-expressed *Schistosoma japonicum* glutathione S-transferase: a detoxification enzyme and fusion-protein affinity tag. *Protein Science* (1997) **6**, 399–406.
114. Hammarström, M., Woestenenk, E. A., Hellgren, N., Härd, T. & Berglund, H. Effect of N-terminal solubility enhancing fusion proteins on yield of purified target protein. *J. Struct. Funct. Genomics* (2006) **7**, 1–14.
115. Dyson, M. R., Shadbolt, S. P., Vincent, K. J., Perera, R. L. & McCafferty, J. Production of soluble mammalian proteins in *Escherichia coli*: Identification of protein features that correlate with successful expression. *BMC Biotechnol* (2004) **4**, 1–18.
116. Hammarström, M., Hellgren, N., van den Berg, S., Berglund, H. & Härd, T. Rapid screening for improved solubility of small human proteins produced as fusion proteins in *Escherichia coli*. *Protein Science* (2009) **11**, 313–321.
117. Bach, H. *et al.* *Escherichia coli* maltose-binding protein as a molecular chaperone for recombinant intracellular cytoplasmic single-chain antibodies. *J. Mol. Biol.* (2001) **312**, 79–93.
118. Fox, J. D., Kapust, R. B. & Waugh, D. S. Single amino acid substitutions on the surface of *Escherichia coli* maltose-binding protein can have a profound impact on the solubility of fusion proteins. *Protein Science* (2001) **10**, 622–630.
119. Argos, P. *et al.* Thermal Stability and Protein Structure. *Biochemistry* (1979) **18**, 5698–5703.
120. Razvi, A. & Scholtz, J. M. Lessons in stability from thermophilic proteins. *Protein Science* (2006) **15**, 1569–1578.
121. Adams, M. W. W. Enzymes and proteins from organisms that grow near and above 100°C. *Annu. Rev. Microbiol.* (1993) **47**, 627–658.
122. Raju, S. T. Proteolysis of Proteins. in *Co- and Post-Translational Modification of Therapeutic Antibodies and Proteins* (John Wiley & Sons, Inc., 2019). 183–202.
123. Vagenende, V., Yap, M. G. S. & Trout, B. L. Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol. *Biochemistry* (2009) **48**, 11084–11096.
124. Arakawa, T. & Timasheff, S. N. Stabilization of Protein Structure by Sugars. *Biochemistry* (1982) **21**, 6536–6544.
125. Lebendiker, M. & Danieli, T. Production of prone-to-aggregate proteins. *FEBS Lett.* (2014) **588**, 236–246.

126. Lebendiker, M., Maes, M. & Friedler, A. A screening methodology for purifying proteins with aggregation problems. *Methods in Molecular Biology* (2015) **1258**, 261–281.
127. Golovanov, A. P., Hautbergue, G. M., Wilson, S. A. & Lian, L. Y. A simple method for improving protein solubility and long-term stability. *J. Am. Chem. Soc.* (2004) **126**, 8933–8939.
128. Krielgaard *et al.* Effect of Tween 20 on Freeze-Thawing- and Agitation-Induced Aggregation of Recombinant Human Factor XIII. *J. Pharm. Sci.* (1998) **87**, 1597–1603.
129. Kerwin, B. A., Heller, M. C., Levin, S. H. & Randolph, T. W. Effects of Tween 80 and Sucrose on Acute Short-Term Stability and Long-Term Storage at  $-20^{\circ}\text{C}$  of a Recombinant Hemoglobin. *J. Pharm. Sci.* (1998) **87**, 1062–1068.

## § 9. DODATAK

atq	aaa	qaa	qtq	aat	qtc	cga	qaa	tcq	tca	caq	qaa	cqq	qaa	caa	aga	ata	caq	caq	caq
M	K	E	V	N	V	R	E	S	S	Q	E	R	E	Q	R	I	Q	Q	Q
tqq	caq	aaa	qqc	aat	qtq	ttc	caq	caq	tct	qtt	caa	aat	cqa	qaa	qqa	tat	cca	agc	ttc
W	Q	K	G	N	V	F	Q	Q	S	V	Q	N	R	E	G	Y	P	S	F
qtq	ttt	tac	qaa	qqa	cct	cca	acc	qca	aat	qgt	ttq	cct	cac	qtq	qqc	cat	qca	tta	qqq
V	F	Y	E	G	P	P	T	A	N	G	L	P	H	V	G	H	A	L	G
cqq	acc	ata	aaq	qat	qtq	qta	qct	cgt	tat	aaq	act	atq	aca	qqa	cac	caq	qtc	att	cqt
R	T	I	K	D	V	V	A	R	Y	K	T	M	T	G	H	Q	V	I	R
aaa	qcc	qqc	tqq	qat	acc	cac	qqc	ctq	ccq	qta	qaa	ctt	qqc	qta	qaa	aaa	caa	ctc	qqc
K	A	G	W	D	T	H	G	L	P	V	E	L	G	V	E	K	Q	L	G
ata	tca	qgc	aaq	cac	qat	atc	qaa	aaa	tac	qga	qvt	qaa	qcc	ttt	att	aac	aaa	tqc	aaa
I	S	G	K	H	D	I	E	K	Y	G	V	E	A	F	I	N	K	C	K
qaa	tcc	qtt	ttc	qtq	tac	qaa	aaq	caa	tqq	cqc	act	ttc	acq	qaa	caq	tta	qqc	tat	tqq
E	S	V	F	V	Y	E	K	Q	W	R	T	F	T	E	Q	G	Y	W	
qtt	qat	atq	qaa	qat	ccc	tat	att	aca	ttq	raq	aat	tcq	tat	ata	qaa	tct	qtq	tqq	aat
V	D	M	E	D	P	Y	I	T	L	E	N	S	Y	I	E	S	V	W	N
qta	ctq	qqc	acc	atc	qat	qat	aaq	qgt	ctq	ctc	tat	aaa	qqc	cac	aga	qtq	tca	cct	tat
V	L	G	T	I	H	D	K	G	L	L	Y	K	G	H	R	V	S	P	Y
tqc	cct	agt	tgt	caa	aca	tcq	ttq	tcq	agc	cac	qaa	qta	qct	caq	qgt	tac	aaq	qgt	agc
C	P	S	C	Q	T	S	L	S	S	H	E	V	A	Q	G	Y	K	G	S
tac	ccq	ttt	tgt	tqq	cgt	tgt	qac	tcq	ccc	ctt	tta	tat	tat	qcc	aat	qaa	agc	tqq	ttt
Y	P	F	C	W	R	C	D	S	P	L	L	Y	Y	A	N	E	S	W	F
ata	caq	acc	aca	qca	tta	aaq	qaa	caa	ttc	ctc	aaq	aat	aac	qaa	agt	qtt	aaa	tqq	tac
I	Q	T	T	A	L	K	E	Q	F	L	A	N	N	E	S	V	K	W	Y
ccq	qat	cac	att	aaa	cat	qqc	cqt	ttt	qqc	aaa	ttt	ctq	qaa	aac	atq	qtq	qat	tqq	aac
P	D	H	I	K	H	G	R	F	G	K	F	L	E	N	M	V	D	W	N
att	agt	cqq	aaa	cqc	tac	tqq	qga	acc	cct	ctt	aac	qtt	tqq	qaa	tgt	qaa	qqc	tqc	caq
I	S	R	K	R	Y	W	G	T	P	L	N	V	W	E	C	E	G	C	Q
cac	caq	qtq	qca	ccq	aaa	tcc	atc	aaa	qaa	ctc	caq	aaa	cat	qca	tcq	cat	tat	qtt	qat
H	Q	V	A	P	K	S	I	K	E	L	Q	K	H	A	S	H	Y	V	D
qat	agt	att	qaa	ctq	cat	aaa	cca	tac	qtq	qat	qat	qtq	caa	ttq	aca	tqc	cca	qtc	tgt
D	S	I	E	L	H	K	P	Y	V	D	D	V	Q	L	T	C	P	V	C
agc	qqq	qaa	atq	aaa	cqc	aca	cca	qaa	qtq	att	qat	qta	tqq	ttt	qat	agc	qqq	tct	atq
S	G	E	M	K	R	T	P	E	V	I	D	V	W	F	D	S	G	S	M
ccq	ttt	qcc	caq	tat	cat	tat	cca	ttt	vaq	aac	tct	ctc	ttt	caa	aaa	caq	ttt	cct	
P	F	A	Q	Y	H	Y	P	F	E	N	S	E	L	F	Q	K	Q	F	P
qcc	qat	qta	ata	qct	qaa	qqc	ata	qac	caq	aca	cqq	qqq	tqq	ttt	tat	tca	ctq	atq	qcc
A	D	V	I	A	E	G	I	D	Q	T	R	G	W	F	Y	S	L	M	A
qtq	agt	acc	ctc	ttt	aca	qqc	aaa	qct	cct	tat	aaa	cqq	qtt	ctc	agc	ttq	qgt	cac	qtt
V	S	T	L	F	T	G	K	A	P	Y	K	R	V	L	S	L	G	H	V
ctq	qat	qaa	aat	qgt	caa	aaa	atq	tct	aaa	agc	aaq	qqq	aat	qcc	tta	qac	ccq	qta	qat
L	D	E	N	G	Q	K	M	S	K	S	K	G	N	A	L	D	P	V	D
tta	att	cat	acq	ttt	qgt	qca	qat	qcc	ctt	cqq	tqq	qcq	ctq	ctt	qcq	qac	tca	qcc	cct
L	I	H	T	F	G	A	D	A	L	R	W	A	L	L	A	D	S	A	P
tqq	aat	cct	aaa	aaq	ttt	tca	qaa	cqc	qtt	qtq	caq	qaa	qcc	aaa	tcc	aaa	qtq	ata	qac
W	N	P	K	K	F	S	E	R	V	V	Q	E	A	K	S	K	V	I	D
acc	ctc	qta	aat	qtt	tat	qgt	ttt	tat	qta	ttq	tac	qct	aaa	ttq	qac	qqa	tac	qat	cct
T	L	V	N	V	Y	G	F	Y	V	L	Y	A	K	L	D	G	Y	D	P
qaa	caq	acc	tac	qaa	ctq	aaa	aaa	aca	aaq	ttq	qat	qaa	tqq	att	ctc	tct	cga	ctq	cat
E	Q	T	Y	E	L	K	K	T	K	L	D	E	W	I	L	S	R	L	H
tcc	acq	qtc	aaa	cgt	qca	act	qtq	cat	ctq	qaa	qac	tat	qqc	ttc	acq	tcc	qcc	qcc	aga
S	T	V	K	R	A	T	V	H	L	E	D	Y	G	F	T	S	A	A	R
qaa	atc	qct	qtt	ttc	atc	qaa	qaa	tta	tcc	aat	tqq	tat	qtq	cqq	cqc	tca	cqq	qat	cga
E	I	A	V	F	I	E	E	L	S	N	W	Y	V	R	R	S	R	D	R
ttt	tqq	agt	qaa	qqa	atq	qat	qqq	qaa	aaq	qcq	qca	tac	qac	acc	ctt	cat	qaa	qtc	
F	W	S	E	G	M	D	G	E	K	A	A	Y	D	T	L	H	E	V	
ctq	qtc	acq	tta	tcc	caq	ctc	ctc	qcc	ccq	ttt	acq	cct	ttc	qta	qcq	qat	qat	qtq	cat
L	V	T	L	S	Q	L	L	A	P	F	T	P	F	V	A	D	D	V	H
qaa	aac	ctt	acc	qqc	aaa	agc	qtq	cac	ctq	qcc	qac	tat	ccc	qcq	tqc	qac	caq	act	aaa
E	N	L	T	G	K	S	V	H	L	A	D	Y	P	A	C	D	Q	T	K
qtt	aat	tta																	
V	N	-																	

Slika D1. Nukleotidni i aminokiselinski slijed krnjeg oblika A\_IleRS iz bakterije *B. megaterium*.

```

atg aag gaa gtc aat gtt cgc gag agc tca cag gaa cgc gaa cag cgc ata cag cag caa
M K E V N V R E S S Q E R E Q R I Q Q Q
tgg cag aaa ggt aat gtc ttc caa cag tgc gtt caa aat cgc gaa ggt tac ccg agc ttc
W Q K G N V F Q S V Q N R E G Y P S F
gtt ttt tac gag ggc cca cct acc gcg aat gga ctg ccg cac gtt ggt cat gcg ctg gga
V F Y E G P P T A N G L P H V G H A L G
cgc acg atc aaa gat gtt gtt gct cgt tac aag act atg aca ggg cat caa gtt atc cgt
R T I K D V V A R Y K T M T G H Q V I R
aaa gcc ggg tgg gat acg cat ggt ctg cct gtt gaa tta gga gtc gaa aag cag ctc ggg
K A G W D T H G L P V E L G V E K Q L G
att tcc ggt aag cat gat att gaa aaa tat ggt gta gag gct ttc ata aac aaa tgt aag
I S G K H D I E K Y G V E A F I N K C K
gaa tct gtt ttc gtg tat gaa aag cag tgg aga acc ttc act gaa cag tta ggc tat tgg
E S V F V Y E K Q W R T F T E Q L G Y W
gtg gat atg gag gat ccg tac att acc ctg gaa aac tct tat atc gag agc gta tgg aac
V D M E D P Y I T L E N S Y I E S V W N
gtt ctg ggt acg ata cat gac aag ggg ctg ctt tac aaa ggt cac cga gtt tca cct tat
V L G T I H D K G L Y K G H R V S P Y
tgt cct tcc tgt cag acg tcc ctt tca tct cat gaa gtg gcc cag gga tac aaa gga agt
C P S C Q T S L S S H E V A Q G Y K G S
tat ccg ttt tgc tgg cgt tgt gat agt ccc ctg ctg tat tat gct aat gaa tca tgg ttt
Y P F C W R C D S P L L Y Y A N E S W F
atc cag act acc gct ctg aaa gag cag ttc ctg aaa aac aat gag tct gta aaa tgg tat
I Q T T A L K E Q F L K N N E S V K W Y
cca gat cat ata aaa cat ggg cga ttc ggc aaa ttt tta gaa aac atg gtg gat tgg aac
P D H I K H G R F G K F L E N M V D W N
ata ggg tct atc gat gtt tgg ttc gat tcc ggg agt atg cct ttt gcc cag tat cat tat
I G S I D V W F D S G S M P F A Q Y H Y
cct ttt gaa aat tca gaa ctc ttt cag aag caa ttt ccg gcc gat gtg att gcg gaa gga
P F E N S E L F Q K Q F P A D V I A E G
att gat cag acg cgc ggg tgg ttc tat tcc tta atg gcc gta agc acg tta ttt acc gga
I D Q T R G W F Y S L M A V S T L F T G
aaa gcc cct tac aag cgc gta tta tcc ttg ggg cat gtg ttg gat gaa aat ggc caa aag
K A P Y K R V L S L G H V L D E N G Q K
atg tcc aaa tcc aag ggc aat gcg ctg gat ccg gtg gac ctg atc cat act ttt gga gcc
M S K S K G N A L D P V D L I H T F G A
gac gca ctg cgc tgg gcc ctg tta gcg gac agc gcg cct tgg aat ccg aag aaa ttc tca
D A L R W A L L A D S A P W N P K K F S
gag cgc gtc gtc cag gaa gcg aaa tcg aaa gtt att gat acg ctg gtt aat gtc tat ggt
E R V V Q E A K S K V I D T L V N V Y G
ttt tat gtt ttg tat gct aaa tta gat ggt tat gat ccg gaa cag act tat gaa ctc aag
F Y V L Y A K L D G Y D P E Q T Y E L K
aaa aca aaa ctc gat gag tgg ata tta agt cgt ttg cac tca aca gtt aaa cgg gct acg
K T K L D E W I L S R L H S T V K R A T
gtg cac tta gaa gac tac ggc ttt acc tct gcg gcc ccg gag ata gcc gtc ttt att gaa
V H L E D Y G F T S A A R E I A V F I E
gaa ctt agt aat tgg tat gtt cgt cgt tca cgt gat cgt ttt tgg tct gaa ggt atg gat
E L S N W Y V R R S R D R F W S E G M D
ggc gag aag gct gca gca tat gat acc ctc cat gaa gtg ttg gtg aca ctc agc cag ctc
G E K A A A Y D T L H E V L V T L S Q L
ctt gct cca ttt aca ccc ttc gta gca gac gat gtg cat gaa aac tta acc ggc aaa tcg
L A P F T P F V A D D V H E N L T G K S
gtg cac tta gcg gat tac cca gca tgc gat caa act aaa gtg aac taa
V H L A D Y P A C D Q T K V N -

```

Slika D2. Nukleotidni i aminokiselinski slijed krnjeg oblika B\_IleRS iz bakterije *B. megaterium*.

```

atg aaa gaa gtg aat gta agg gag tct tcg caa gag cgc gaa cag cgt atc cag cag cag
M K E V N V R E S S Q E R E Q R I Q Q Q
tgg caa aaa gga aat vtg ttt cag cag tcg gtt caa aat cga gaa ggg tat cct tcg ttt
W Q K G N V F Q Q S V Q N R E G Y P S F
gta ttt tat gaa ggg cct cca aca gca aat vgt ttg cct cac gtt ggg cac gcg cta ggc
V F Y E G P P T A N G L P H V G H A L G
cgg acg att aaa gac gtg gtg gct cgt tat aag acg atg aca ggg cat caa gta atc aga
R T I K D V V A R Y K T M T G H Q V I R
aaa gca ggc tgg gat acg cac gga ctt ccg gtt gag ctc ggt gtt gaa aag cag ctc gga
K A G W D T H G L P V E L G V E K Q L G
att tca gga aag cat gat att gaa aaa tac ggg gta gaa gct ttt atc aac aag tgt aag
I S G K H D I E K Y G V E A F I N K C K
gaa agt gtg ttt gtg tat gaa aag cag tgg cgc acg ttc aca gag cag ctt ggc tat tgg
E S V F V Y E K Q W R T F T E Q L G Y W
gtt gat atg gaa gac cct tac atc acc ttg gag aat tca tac att gaa agt gta tgg aac
V D M E D P Y I T L E N S Y I E S V W N
gtg ctt ggc acg att cat gat aaa gga ctt ctt tat aaa ggc cac cgc gta tca cct tac
V L G T I H D K G L Y K G H R V S P Y
tgc ccg agc tgt caa acg tcg ctg agt tcg cat gaa gtg gcg caa ggg tat aaa gga tct
C P S C Q T S L S S H E V A Q G Y K G S
tat ccg ttt tgc tgg aga tgt gac tcg ccg ctt ctt tat tac gca aat gaa agc tgg ttt
Y P F C W R C D S P L L Y Y A N E S W F
atc caa acg acg gcg tta aaa gaa caa ttt ttg aaa aat aat gaa agc gtg aag tgg tac
I Q T T A L K E Q F L K N N E S V K W Y
ccg gat cat atc aag cac ggt cgc ttt ggc aaa ttt ttg gaa aat atg gtg gac tgg aac
P D H I K H G R F G K F L E N M V D W N
atc gga tct att gac gtt tgg ttt gac agc ggg tcg atg ccg ttt gca cag tat cac tat
I G S I D V W F D S G S M P F A Q Y H Y
ccg ttt gaa aac agc gaa ctg ttt caa aag cag ttt cca gca gac gtt atc gca gaa gga
P F E N S E L F Q K Q F P A D V I A E G
att gat caa acg cgc ggc tgg ttt tac agc ttg atg gca gtt tca acg ttt tta aca gga
I D Q T R G W F Y S L M A V S T L C F T G
aaa gca ccg tat aag cgc gtt ttg tct ctt ggc cac gtc tta gat gaa aac ggt caa aag
K A P Y K R V L S L G H V L D E N G Q K
atg tct aaa agt aaa gga aat gcg cta gac cct gtt gat ctt att cat aca ttt ggt gcg
M S K S K G N A L D P V D L I H T F G A
gat gcg ctt aga tgg gcg ctt tta gca gac agt gca cct tgg aat ccg aag aaa ttt tca
D A L R W A L A D S A P W N P K K F S
gag cgt gtc gtg caa gaa gcg aag tca aaa gtc att gat aca ctt gtg aac gtg tac ggc
E R V V Q E A K S K V I D T L V N V Y G
ttt tac gtg ctg tac gct aag ctt gac ggc tat gat ccg gag caa acg tat gaa tta aaa
F Y V L Y A K L D G Y D P E Q T Y E L K
aaa aca aaa ttg gat gaa tgg att ctt tca cgt ttg cac agc acg gtc aag cgc gca aca
K T K L D E W I L S R L H S T V K R A T
gta cat ctt gaa gat tac gga ttt aca agc gcg gct cgt gaa atc gct gta ttc att gaa
V H L E D Y G F T S A A R E I A V F I E
gag cta agc aac tgg tat gtg cga cgt tcc cgc gat cgt ttt tgg tca gaa gga atg gac
E L S N W Y V R R S R D R F W S E G M D
ggc gaa aaa gca gca gct tac gat acg ctt cat gaa gta cta gtg aca tta agt caa cta
G E K A A A Y D T L H E V L V T L S Q L
tta gca ccg ttt acc ccg ttt gtt gcg gat gat gtt cat gaa aat ctg aca ggg aaa agc
L A P F T P F V A D D V H E N L T G K S
gtt cat tta gca gac tat cct gca tgt gat caa acg aaa gtg aac tga
V H L A D Y P A C D Q T K V N -

```

Slika D3. Nukleotidni i aminokiselinski slijed krnjeg oblika C\_IleRS iz bakterije *B. megaterium*.

```

atg tcc cct ata cta ggt tat tgg aaa att aag ggc ctt gtg caa ccc act cga ctt ctt
M S P I L G Y W K I K G L V Q P T R L L
ttg gaa tat ctt gaa gaa aaa tat gaa gag cat ttg tat gag cgc gat gaa ggt gat aaa
L E Y L E gaa E K Y E E H L Y E R D gaa E G D D K
tgg cga aac aaa aag ttt gaa ttg ggt ttg gag ttt ccc aat ctt cct tat tat att gat
W R N K K F E L G L E F P N L P Y Y I D
ggt gat gtt aaa tta aca cag tct atg gcc atc ata cgt tat ata gct gac aag cac aac
G D V K L T Q S M A I I R Y I A D K H N
atg ttg ggt ggt tgt cca aaa gag cgt gca gag att tca atg ctt gaa gga gcg gtt ttg
M L G G C P K E R A E I S M L E G A V L
gat att aga tac ggt gtt tcg aga att gca tat agt aaa gac ttt gaa act ctc aaa gtt
D I R Y G V S R I A Y S K D F E T L K V
gat ttt ctt agc aag cta cct gaa atg ctg aaa atg ttc gaa gat cgt tta tgt cat aaa
D F L S K L P E M L K M F E D R L C H K
aca tat tta aat ggt gat cat gta acc cat cct gac ttc atg ttg tat gac gct ctt gat
T Y L N G D H V T H P D F M L Y D A L D
ggt gtt tta tac atg gac cca atg tgc ctg gat gcg ttc cca aaa tta gtt tgt ttt aaa
V V L Y M D P M C L D A F P K L V C F K
aaa cgt att gaa gct atc cca caa att gat aag tac ttg aaa tcc agc aag tat ata gca
K R I E A I P Q I D K Y L K S S K Y I A
tgg cct ttg cag ggc tgg caa gcc acg ttt ggt ggt ggc gac cat cct cca aaa
W P L Q G W Q A T F G G G D H P P K

```

Slika D4. Nukleotidni i aminokiselinski slijed GST-privjeska.

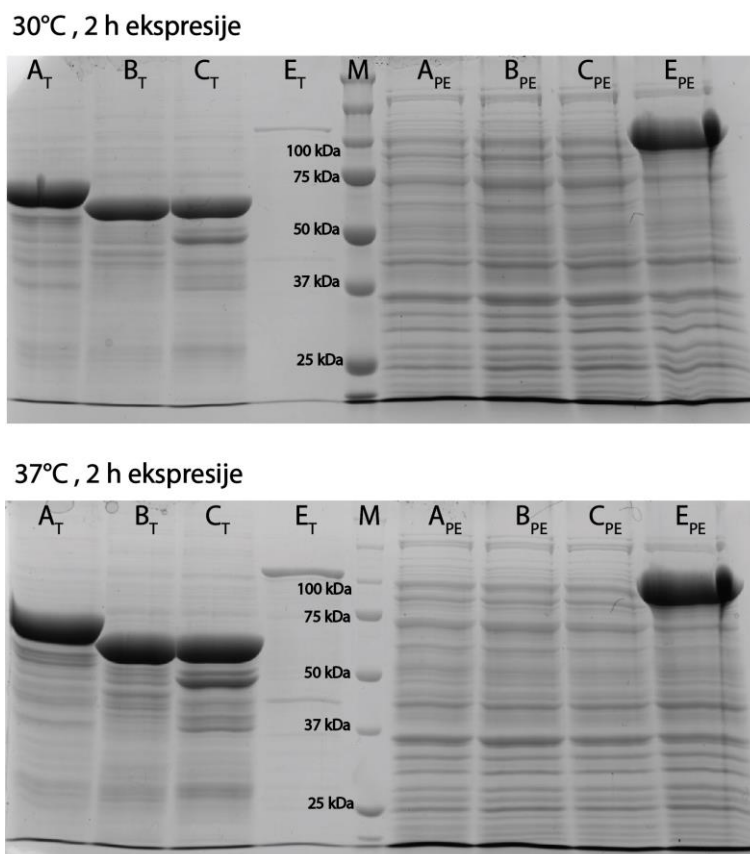
```

atg aaa atc gaa gaa ggt aaa ctg gta atc tgg att aac ggc gat aaa ggc tat aac ggt
M K I E E G K L V I W I N G D K G Y N G
ctc gct gaa gtc ggt aag aaa ttc gag aaa gat acc gga att aaa gtc acc gtt gag cat
L A E V G K K F E K D T G I K V T V E H
ccg gat aaa ctg gaa gag aaa ttc cca cag gtt gcg gca act ggc gat ggc cct gac att
P D K L E E K F P Q V A A T G D G P D I
atc ttc tgg gca cac gac gcg ttt ggt ggc tac gct caa tct ggc ctg ttg gct gaa atc
I F W A H D R F G G Y A Q S G L L A E I
acc ccg gac aaa gcg ttc cag gac aag ctg tat ccg ttt acc tgg gat gcc gta cgt tac
T P D K A F Q D K L Y P F T W D A V R Y
aac ggc aag ctg att gct tac ccg atc gct gtt gaa gcg tta tcg ctg att tat aac aaa
N G K L I A Y P I A V E A L S L I Y N K
gat ctg ctg ccg aac ccg cca aaa acc tgg gaa gag atc ccg gcg ctg gat aaa gaa ctg
D L L P N P P K T W E E I P A L D K E L
aaa gcg aaa ggt aag agc gcg ctg atg ttc aac ctg caa gaa ccg tac ttc acc tgg ccg
K A K G K S A L M F N L Q E P Y F T W P
ctg att gct gct gac ggg ggt tat gcg ttc aag tat gaa aac ggc aag tac gac att aaa
L I A A D G G Y A F K Y E N G K Y D I K
gac gtg ggc gtg gat aac gct ggc gcg aaa gcg ggt ctg acc ttc ctg gtt gac ctg att
D V G V D N A G A K A G L T F L V D L I
aaa aac aaa cac atg aat gca gac acc gat tac tcc atc gca gaa gct gcc ttt aat aaa
K N K H M N A D T D Y S I A E A A F N K
ggc gaa aca gcg atg acc atc aac ggc ccg tgg gca tgg tcc aac atc gac acc agc aaa
G E T A M T I N G P W A W S N I D T S K
gtg aat tat ggt gta acg gta ctg ccg acc ttc aag ggt caa cca tcc aaa ccg ttc gtt
V N Y G V T V L P T F K G Q P S K P F V
ggc gtg ctg agc gca ggt att aac gcc gcc agt ccg aac aaa gag ctg gca aaa gag ttc
G V L S A G I N A A S P N K E L A K E F
ctc gaa aac tat ctg ctg act gat gaa ggt ctg gaa gcg gtt aat aaa gac aaa ccg ctg
L E N Y L L T D E G L E A V N K D K P L
ggt gcc gta gcg ctg aag tct tac gag gaa gag ttg gcg aaa gat cca cgt att gcc gcc
G A V A L K S Y E E E L A K D P R I A A
act atg gaa aac gcc cag aaa ggt gaa atc atg ccg aac atc ccg cag atg tcc gct ttc
T M E N A Q K G E I M P N I P Q M S A F
tgg tat gcc gtg cgt act gcg gtg atc aac gcc gcc agc ggt cgt cag act gtc gat gaa
W Y A V R T A V I N A A S G R Q T V D E
gcc ctg aaa gac gcg cag act
A L K D A Q T

```

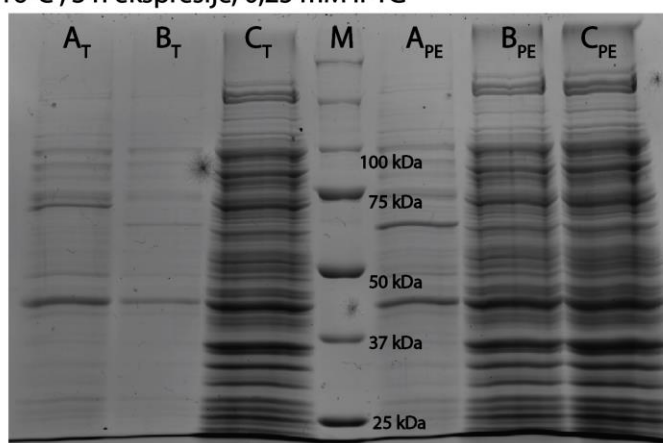
Slika D5. Nukleotidni i aminokiselinski slijed MBP-privjeska.



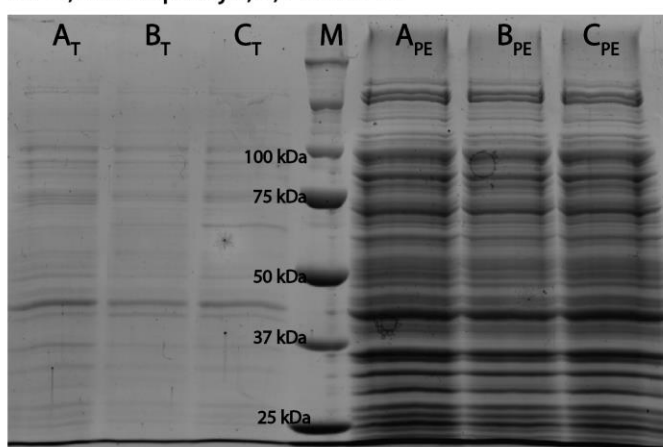


**Slika D6. SDS-PAGE analiza ekspresije krnjih oblika BmIleRS2 i WT EcIleRS na 30 °C i 37 °C uz 0,25 mmol dm<sup>-3</sup> IPTG te razbijanje stanica uz *BugBuster* nakon 2 h. A, B, C označavaju krnje IleRS2, E označava EcIleRS, M marker, T u indeksu talog, a PE proteinski ekstrakt. Korišten je marker Precision Plus Protein Standards Unstained (*Bio-Rad*).**

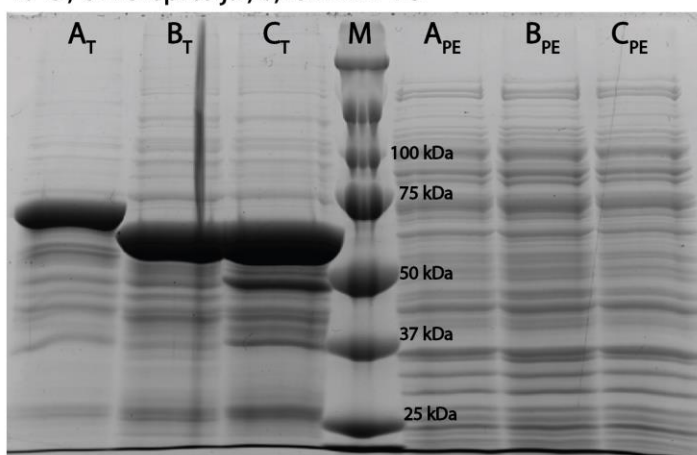
16°C , 3 h ekspresije, 0,25 mM IPTG



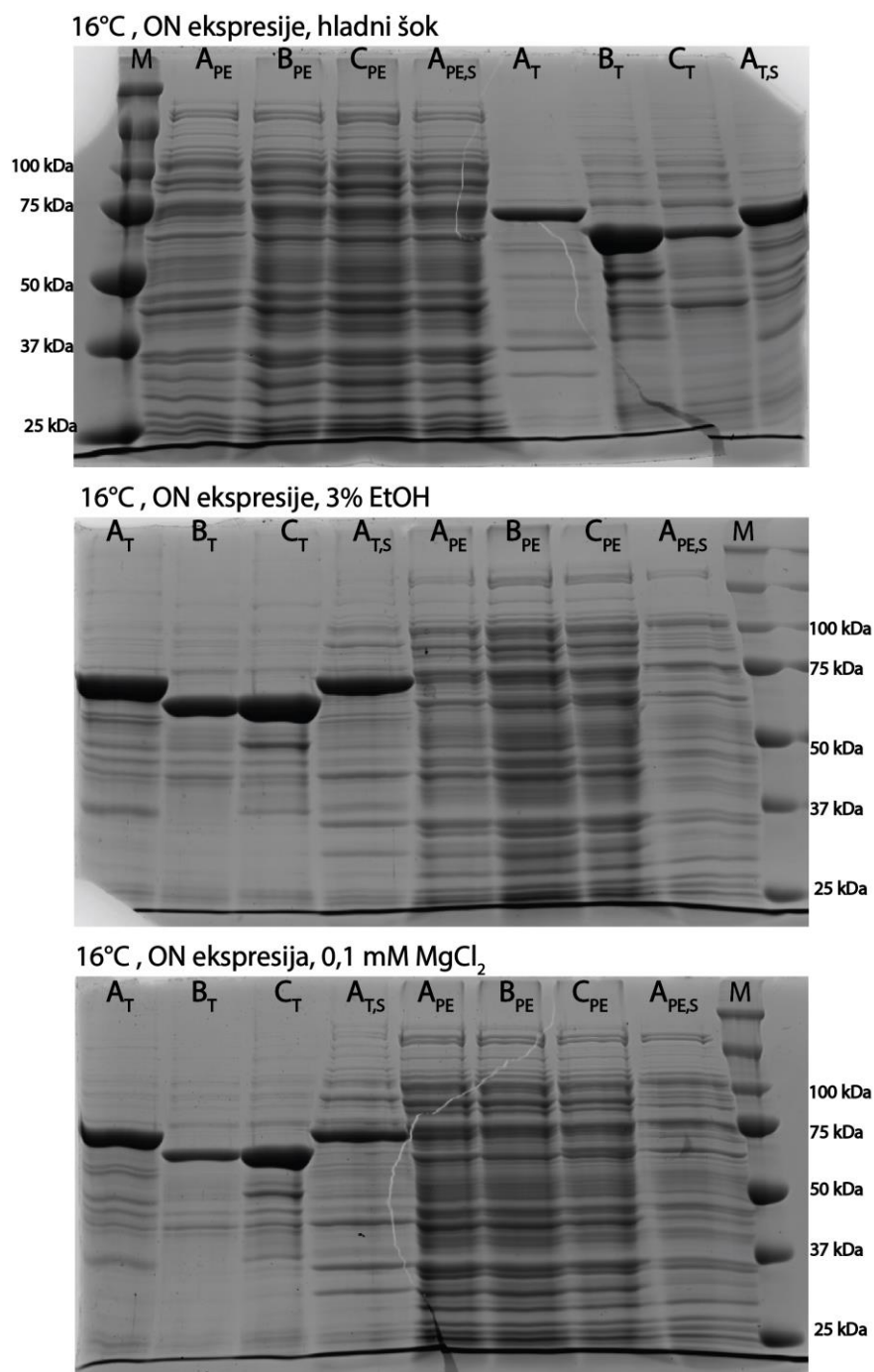
16°C , 3 h ekspresije , 0,1 mM IPTG



16°C , ON ekspresija , 0,25 mM IPTG

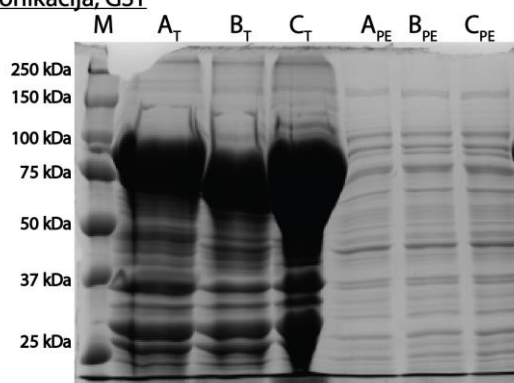


**Slika D7. SDS-PAGE analiza ekspresije krnjih oblika BmIleRS2 na 16 °C uz 0,25 mmol dm<sup>-3</sup> IPTG i razbijanje stanica uz *BugBuster*. ON označava ekspresiju preko noći, A, B, C krnje IleRS2, M marker, T u indeksu talog, a PE proteinski ekstrakt. Korišten je marker Precision Plus Protein Standards Unstained (*Bio-Rad*).**

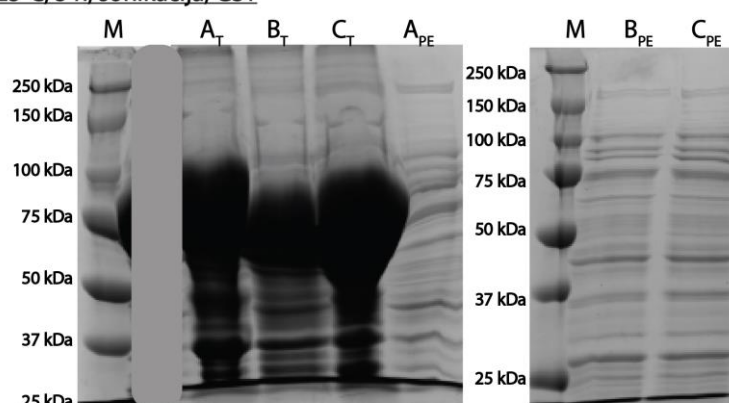


Slika D8. SDS-PAGE analiza ekspresije krnjih oblika BmIleRS2 na 16 °C uz 0,05 mmol dm<sup>-3</sup> IPTG, razbijanje stanica uz *BugBuster* uz hladni šok, 3% EtOH ili 0,1 mM MgCl<sub>2</sub>. ON označava ekspresiju preko noći, A, B, C krnje IleRS2, M marker, T u indeksu talog, a PE proteinski ekstrakt, S označava lizu stanica sonikacijom. Korišten je marker Precision Plus Protein Standards Unstained (*Bio-Rad*).

A) 37°C, 3 h, sonikacija, GST

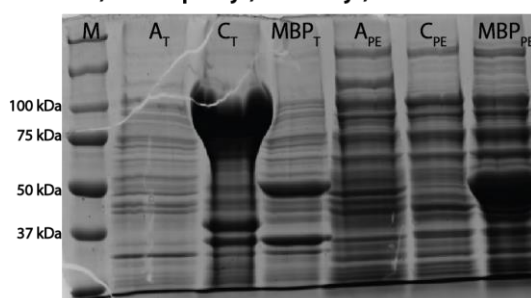


B) 25°C, 5 h, sonikacija, GST

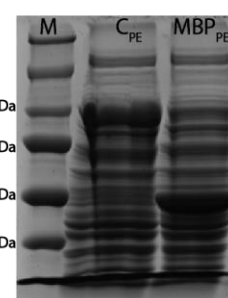
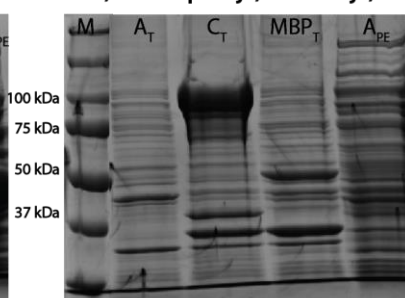


**Slika D9.** SDS-PAGE analiza ekspresije krnjih oblika BmIleRS2 fuzioniranih s GST-privjeskom na 25 °C i 37 °C uz 0,25 mmol dm<sup>-3</sup> IPTG, razbijanje stanica uz sonikaciju, A, B, C označava krnje IleRS2 fuzionirane s GST, M marker, T u indeksu talog, a PE proteinski ekstrakt. Korišten je marker Precision Plus Protein Standards Unstained (*Bio-Rad*).

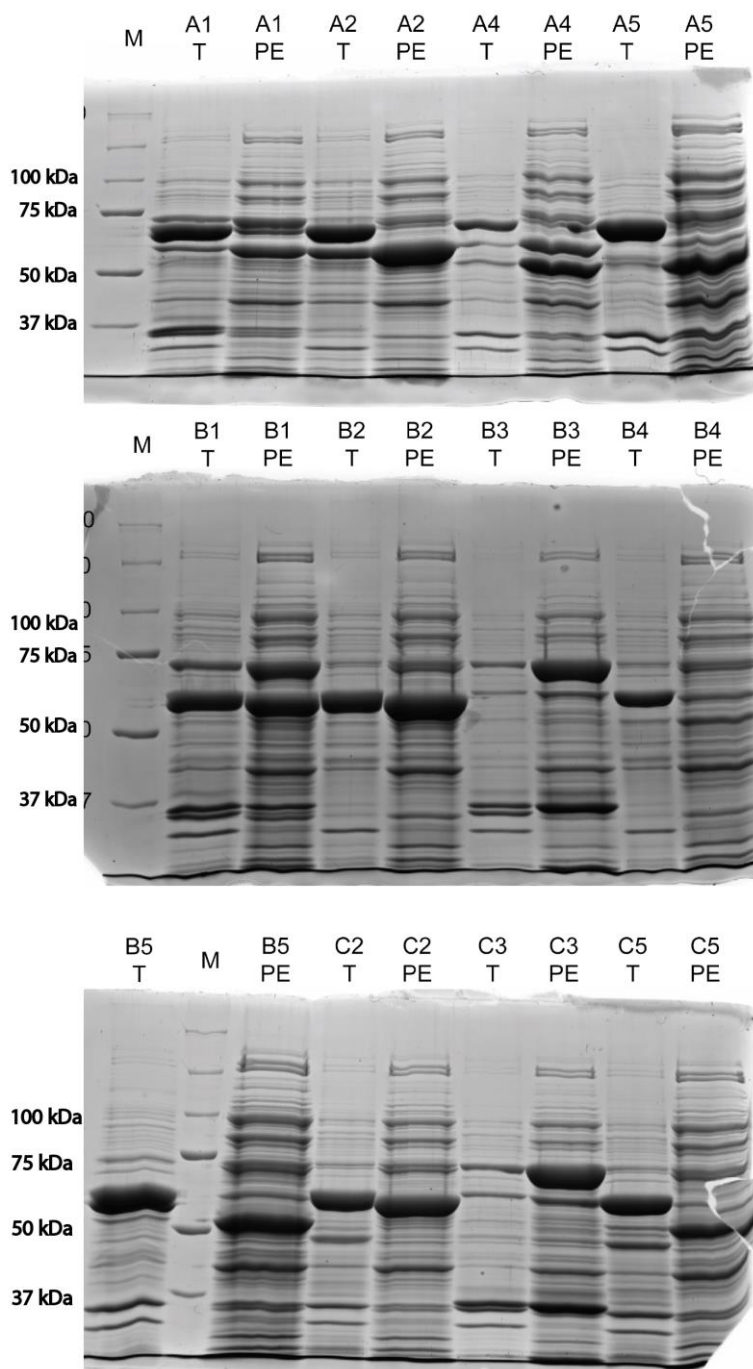
37°C, 3 h ekspresija, sonikacija, MBP



25°C, 5 h ekspresija, sonikacija, MBP



**Slika D10.** SDS-PAGE analiza ekspresije krnjih oblika BmIleRS2 fuzioniranih s GST-privjeskom na 16 °C i 37 °C uz 0,25 mmol dm<sup>-3</sup> IPTG, razbijanje stanica uz *BugBuster*. ON označava ekspresiju preko noći, A, B, C krnje IleRS2 fuzionirane s GST, M marker, T u indeksu talog, a PE proteinski ekstrakt. Korišten je marker Precision Plus Protein Standards Unstained (*Bio-Rad*).



**Slika D11. SDS-PAGE analiza koekspresije krnjih oblika BmIleRS2 i različitih kombinacija šaperona na 30 °C uz 0,25 mmol dm<sup>-3</sup> IPTG i razbijanje stanica sonikacijom. A, B i C označavaju krnje IleRS2, 1-5 setove šaperona navedene u tablici 3.8., M marker, T u indeksu talog, a PE proteinski ekstrakt. Korišten je marker Precision Plus Protein Standards Unstained (*Bio-Rad*).**

## § 10. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Melody Škulac

Datum rođenja: 21. svibnja 1997.

Mjesto rođenja: Osijek

### Obrazovanje

2004.–2012. Osnovna škola Draž, Draž

2012.–2016. Opća gimnazija, Gimnazija Beli Manastir, Beli Manastir

2016.–2020. Preddiplomski studij kemije, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2020.-2022. Diplomski studij kemije, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, istraživački smjer, grane: biokemija i organska kemija

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2017. Otvoreni dan kemije

2019. Otvoreni dan kemije