Kinetička karakterizacija homologno nadeksprimiranih izoleucil-tRNA-sintetaza iz bakterije Bacillus megaterium

Božić, Bartol

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:456924

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

zir.nsk.hr

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Bartol Božić

KINETIČKA KARAKTERIZACIJA HOMOLOGNO NADEKSPRIMIRANIH IZOLEUCIL–tRNA–SINTETAZA IZ BAKTERIJE *Bacillus megaterium*

Diplomski rad

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

Zagreb, 2020.

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 Vladimira Zankija, mag. biol. mol.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost i Švicarske nacionalne zaklade za znanost pod nazivom *Investigation of substrate and editing specificity in tRNA synthetases and the mechanism of antibiotic action* (IZHRZ0_180567, voditelji projekta: prof. dr. sc. Ita Gruić Sovulj i prof. dr. sc. Nenad Ban).

Zahvale

Od srca hvala mentorici prof. dr. sc. Iti Gruić Sovulj, na iskazanom povjerenju i pruženoj prilici da izradim diplomski rad pod Vašim mentorstvom. Hvala Vam na svim smjernicama i savjetima koje ste mi dali tijekom eksperimentalnog dijela te pisanja ovog rada. Ovim putem bih Vam zahvalio i za cjelokupno znanje koje ste mi prenijeli tijekom preddiplomskog i diplomskog studija, uživao sam slušajući Vaša predavanja.

Neizmjerno hvala Vladi, na svemu što si me naučio, svom trudu i vremenu koje si uložio tijekom izrade ovog rada. Hvala na izrazito poticajnoj, ugodnoj i prijateljskoj atmosferi zbog koje se sve činilo lakše. Tvoji savjeti oko osmišljavanja pokusa i pristupa znanstvenim problemima su znantno obogatili moje znanje. Pomogao si mi da napravim svoje prve znanstvene korake i na tome ti nikad neću moći dovoljno zahvaliti.

Puno hvala svim članovima Zavoda za biokemiju na svoj pomoći pruženoj tijekom mog boravka na ZBK–u. Još vam više hvala na izrazito ugodnoj atmosferi, bilo mi je zadovoljstvo raditi u takvoj okolini.

Najviše hvala mami Tamari, tati Frani i sestri Ani što su uvijek bili uz mene, puni podrške i ljubavi. Bez vas ovo ne bih mogao ostvariti.

Veliko, veliko hvala mojoj Marti koja je bila uz mene tijekom cijelog studija. Hvala ti na svim lijepim trenucima, razgovorima, savjetima, razumijevanju... Hvala ti što postojiš i presretan sam što te imam.

Sadržaj

SAŽETAK ..... **X**

ABSTRACT ..... **XII**

§ 1. UVOD **1**

§ 2. LITERATURNI PREGLED **4**

2.1. Biosinteza proteina **4**

2.2. tRNA **7**

2.2.1. Struktura molekule tRNA *7*

2.2.2. Dorada 5'–kraja i 3'–kraja molekula pre–tRNA *10*

2.2.3. Modificirani nukleotidi u molekulama tRNA *12*

2.3. Aminoacil–tRNA–sintetaze **13**

2.3.1. Podjela aminoacil–tRNA–sintetaza *13*

2.3.2. Reakcija aminoaciliranja i mehanizmi popravak pogreške *15*

2.3.3. Prepoznavanje molekule tRNA i elementi identiteta *18*

2.3.4. Izoleucil–tRNA–sintetaze tipa 1 i 2 ..... *19*

2.4. Bakterija *B. megaterium* i njeni sustavi za ekspresiju proteina **20**

§ 3. MATERIJALI I METODE **23**

3.1. Materijali **23**

3.1.1. Standardne kemikalije *23*

3.1.2. Aminokiseline i nukleotidi *23*

3.1.3. Radioaktivno obilježeni spojevi *24*

3.1.4. Nukleinske kiseline *24*

3.1.5. Boje *24*

3.1.6. Enzimi i proteini *24*

3.1.7. Hranjive podloge i mediji za uzgoj bakterija *24*

3.1.8. Otopine korištene za transformaciju protoplasta bakterije B. megaterium *25*

3.1.9. Komercijalni kompleti za izolaciju i pročišćavanje DNA *26*

3.1.10. Kromatografska punila, kolone i membrane *26*

3.1.11. Markeri veličine *26*

3.1.12. Bakterijski sojevi *27*

3.1.13. Plazmidni vektori *28*

3.2. Metode **30**

3.2.1. Metode rada s bakterijama *30*

3.2.2. Metode rada s DNA *33*

3.2.3. Metode rada s proteinima *44*

3.2.4. Metode rada s tRNA *49*

3.2.5. Metode enzimske kinetike *53*

§ 4. REZULTATI **60**

4.1. Konstrukcija rekombinantnog plazmida za homolognu nadekspresiju proteina IleRS1 iz bakterije *B. megaterium* **60**

4.2.* Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje proteina iz bakterije *B. megaterium **65**

4.3.* Homologna proizvodnja $tRNA^{Ile}$ u bakteriji *B. megaterium **70**

4.3.1. Ciljana mutageneza plazmida pP_{T7} *70*

4.3.2. Konstrukcija rekombinantnih plazmida za homolognu nadeskpresiju $tRNA^{Ile}$ iz bakterije B. megaterium *73*

4.3.3. Prekomjerna ekspresija $tRNA^{Ile}$ u bakteriji B. megaterium *77*

4.4.* Heterologna proizvodnja $tRNA^{Ile}$ u bakteriji *E. coli **82**

4.4.1. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje heterologne $tRNA^{Ile}$ u bakteriji E. coli *82*

4.4.2. Pročišćavanje heterologno nadeksprimirane $tRNA^{Ile}$ kromatografijom obrnutih faza *84*

4.4.3. Određivanje akceptorske aktivnosti heterologno nadeksprimirane $tRNA^{Ile}$ i vremenski tijek aminoacilacije uz radioaktivno obilježeni $[^{14}C]$–Ile *85*

4.5.* Kinetička karakterizacija homologno proizvedenih proteina IleRS1 i IleRS2 iz bakterije *B. megaterium **90**

4.5.1. Aktivacija izoleucina *90*

4.5.2. Aminoacilacija uz $[^{32}P]$–tRNA *93*

§ 5. RASPRAVA **99**

5.1. Homologna prekomjerna ekspresija proteina IleRS1 i IleRS2 ..... **99**

5.2. Proizvodnja $tRNA^{Ile}$ iz bakterije *B. megaterium* **103**

5.3.* Kinetičke karakteristike proteina IleRS1 i IleRS2 iz bakterije *B. megaterium **105**

§ 6. ZAKLJUČAK **110**

§ 7. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA **111**

§ 8. LITERATURNI IZVORI **114**

§ 9. ŽIVOTOPIS ..... **XIV**

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

KINETIČKA KARAKTERIZACIJA HOMOLOGNO NADEKSPRIMIRANIH IZOLEUCIL–tRNA–SINTETAZA IZ BAKTERIJE *Bacillus megaterium*

Bartol Božić

Izoleucil–tRNA–sintetaze (IleRS) su enzimi koji u dva koraka kataliziraju nastajanje kovalentne veze između izoleucina (Ile) i pripadne molekule $tRNA^{Ile}$ u procesu biosinteze proteina. U prvom koraku, koji se naziva aktivacija, nastaje izoleucil–adenilat dok se u drugom koraku aktivirana aminokiselina prenosi na molekulu $tRNA^{Ile}$. Postoje dva tipa IleRS koji se razlikuju po strukturnim karakteristikama i rezistenciji na antibiotik mupirocin. Genom bakterije *Bacillus megaterium* neuobičajeno sadrži gene za oba tipa IleRS, što čini navedene proteine zanimljivim za istraživanje. U sklopu ovog rada, proteini IleRS1 i IleRS2 dobiveni su homolognom nadekspresijom u bakteriji *B. megaterium* te pročišćeni afinitetnom kromatografijom. Molekula $tRNA^{Ile}$ heterologno je nadeksprimirana u bakteriji *Escherichia coli* i pročišćena kromatografijom obrnutih faza. Kinetička karakterizacija navedenih enzima je pokazala da u aktivaciji IleRS2 ima oko 25 × veći K_M (Ile) od IleRS1. Međutim, u ukupnoj reakciji aminoacilacije, koja uključuje i molekulu tRNA, dolazi do znatne promjene K_M (Ile) za oba enzima što rezultira većim K_M (Ile) za IleRS1 u odnosu na IleRS2. To sugerira da interakcija s tRNA različito utječe na mehanistička svojstva IleRS1 i IleRS2.

(117 + XV stranica, 38 slika, 15 tablica, 74 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: aktivacija aminokiseline, bakterija *Bacillus megaterium*, izoleucil–tRNA–sintetaze, kromatografija obrnutih faza, $tRNA^{Ile}$, ukupna aminoacilacija

Mentor: prof. dr. sc. Ita Gruić Sovulj
Neposredni voditelj: Vladimir Zanki, mag. biol. mol.
Ocjenitelji: 1. prof. dr. sc. Ita Gruić Sovulj
2. prof. dr. sc. Davor Kovačević
3.prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
Zamjena: doc. dr. sc. Marko Močibob

Datum diplomskog ispita: 1. rujna 2020.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

KINETIC CHARACTERIZATION OF HOMOLOGOUSLY OVEREXPRESSED ISOLEUCYL–tRNA SYNTHETATES IN *Bacillus megaterium*

Bartol Božić

Isoleucyl–tRNA synthetases (IleRS) are enzymes that catalyze covalent attachment of amino acid isoleucine to the cognate $tRNA^{Ile}$ during protein biosynthesis. The first step of the reaction (activation) results in the formation of isoleucyl adenylate, while the second step comprises the transfer of activated isoleucine to the cognate $tRNA^{Ile}$. There are two types of IleRSs that differ mainly in structural elements and resistance to antibiotic mupirocin. The genome of *Bacillus megaterium* uncommonly contains genes encoding both IleRSs making these proteins interesting for studying. Within this work, proteins IleRS1 and IleRS2 were homologously overexpressed in *B. megaterium* and purified by affinity chromatography. The $tRNA^{Ile}$ molecule was overexpressed in *Escherichia coli* and purified by reverse–phase chromatography. The kinetic characterization of both enzymes showed that, in the activation step, IleRS2 has 25 × higher K_M (Ile) than IleRS1. In overall aminoacylation, which includes the tRNA, the K_M (Ile) values change for both enzymes, resulting in the higher K_M (Ile) for IleRS1 than for IleRS2. The obtained results suggest that interaction with the tRNA promotes a different influence on the mechanistic properties of IleRS1 and IleRS2.

(117 + XV pages, 38 figures, 15 tables, 74 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, amino acid activation, *Bacillus megaterium*, isoleucyl–tRNA synthetases, reverse–phase chromatography, $tRNA^{Ile}$

Mentor: Prof. Ita Gruić Sovulj, Ph.D.
Assistant mentor: Vladimir Zanki, mag. biol. mol.
Reviewers: 1. Prof. Ita Gruić Sovulj, Ph.D.
2. Prof. Davor Kovačević, Ph.D.
3. Prof. Iva Juranović Cindrić, Ph.D.
Substitute: Assistant Professor Marko Močibob, Ph.D.

Date of exam: September 1st, 2020

§ 1. UVOD

Proteini su linearni polimeri aminokiselina, a u stanici se sintetiziraju na ribosomima prema informaciji zapisanoj u molekuli DNA preko posrednika, molekule mRNA. Prijenos informacije iz molekule DNA u molekulu mRNA naziva se transkripcija, a sinteza proteina prema informaciji iz molekule mRNA naziva se translacija. Aminokiseline potrebne za biosintezu proteina u stanici se do ribosoma dopremaju vezane na pripadnu molekulu tRNA. Pripadna molekula tRNA je ona koja ima antikodon komplementaran kodonu koji kodira za određenu aminokiselinu. Reakciju nastajanja kovalentne veze između aminokiseline i pripadne molekule tRNA kataliziraju enzimi aminoacil–tRNA–sintetaze (aaRS). Reakcija aminoacilacije tRNA zbiva se u dva koraka. U prvom koraku koji se naziva aktivacija, iz aminokiseline i ATP–a nastaju aminoacil–adenilat (aa–AMP) i pirofosfat (PP_i). Nukleofilni napad 2'– ili 3'–OH skupine terminalnog adenozina (A76) molekule tRNA na aa–AMP čini drugi korak reakcije koji obuhvaća prijenos aminokiseline na tRNA pri čemu nastaje aminoacil–tRNA (aa–tRNA).[1,2] Točnost biosinteze proteina ključna je za preživljavanje i normalno funkcioniranje stanice. Na ribosomu tijekom sinteze proteina vrši se stroga selekcija aa–tRNA pomoću specifičnih kodon–antikodon interakcija. Svaka aa–tRNA svojim antikodonom ostvaruje specifične interakcije s kodonom u molekuli mRNA čime omogućava ciljanu ugradnju aminokiseline, ali se na ribosomu ne provjerava ispravnost vezane aminokiseline na molekuli tRNA. Iz navedenog razloga je vrlo važna aminoacilacijska točnost enzima aaRS jer time značajno definiraju točnost biosinteze proteina. Ugradnja pogrešne aminokiseline na određeno mjesto u polipeptidnom lancu koja je tolerabilna *in vivo* može varirati, a općeprihvaćena vrijednost je otprilike 1 na 10 000.[3,4] Kako bi se postigla niska stopa pogrešne ugradnje aminokiselina u polipeptidni lanac, aaRS koje ne mogu dovoljno dobro diskriminirati nepripadne aminokiseline od pripadne, koriste različite mehanizme popravka pogreške. Popravak pogreške može se odvijati prije ili poslije prijenosa aminokiseline na molekulu tRNA. Kod popravka pogreške prije prijenosa nepripadni aa–AMP se enzimski hidrolizira u istom aktivnom mjestu u kojem se i sintetizira te u nekim slučajevima taj proces može biti stimuliran molekulom tRNA. Osim toga, pogrešno nastali aa–AMP može disocirati s enzima i zatim se neenzimski hidrolizirati. Popravak pogreške poslije prijenosa, hidrolize misacilirane molekule tRNA, događa se u zasebnoj proteinskoj domeni.[1]

Izoleucil–tRNA–sintetaza (IleRS) katalizira vezanje izoleucina na $tRNA^{Ile}$ te na taj način omogućava ugradnju izoleucina u polipeptide. Postoje dva tipa IleRS, tip 1 (IleRS1) i tip 2 (IleRS2). Najistaknutija razlika između ta dva tipa enzima je struktura C–terminalne domene u kojoj se samo kod enzima IleRS tipa 1 nalazi klaster Cys_4 koji koordinira Zn^{2+}–ion koji je ključan za aminoacilacijsku aktivnost enzima.[5] Druga važna razlika među proteinima IleRS1 i IleRS2 je različita osjetljivost na inhibiciju antibiotikom mupirocinom. Mupirocin proizvodi bakterija *Pseudomonas fluorescens*.[6] Poznato je da je mupirocin kompetitivni inhibitor enzima IleRS mnogih bakterijskih vrsta, dok eukarioti, uključujući i vrstu *Homo sapiens* imaju IleRS znatno otporniju na inhibiciju mupirocinom.[7] Ovisno o vrstama iz kojih proteini potječu, IleRS1 može biti i do 10^8 puta osjetljiviji od IleRS2 na inhibiciju mupirocinom.[8] Mupirocin je iskorišten za razvoj antibakterijskog terapeutika i najpoznatiji je pripravak koji kao metu za antibakterijsko djelovanje koriste aaRS.[9]

Bakterija *Bacillus megaterium* zanimljiva je jer u genomu sadrži gene koji kodiraju oba tipa IleRS te za sad nije poznato zbog čega su bakteriji potrebna oba enzima. Bakterija *B. megaterium* pripada skupini Gram–pozitivnih bakterija, ima sposobnost sporulacije te se može pronaći u različitim staništima kao što su: suha hrana, riba, med, rižina polja, more i tlo. Navedena bakterija predmet je znanstvenih istraživanja, a koristi se i u industriji. Ne posjeduje alkalne proteaze i mnogi su plazmidni vektori kompatibilni s bakterijom *B. megaterium* što ju čini pogodnim organizmom za proizvodnju intra– i ekstracelularnih proteina. Uz to, razvijeni su i dodatni sojevi sa željenim karakteristikama kao što je nemogućnost sporulacije.[10] Napravljeni su plazmidni vektori s različitim inducibilnim promotorima za prekomjernu ekspresiju proteina u bakteriji *B. megaterium*, između ostalog i s promotorom iz bakteriofaga T7.[11] Zbog komercijalne dostupnosti same bakterije, plazmidnih vektora i postojanja protokola za genetičku manipulaciju[12], upravo je ova bakterija izabrana za istraživanje.

Cilj ovog diplomskog rada je kinetički okarakterizirati obje IleRS iz bakterije *B. megaterium* što može doprinijeti razumijevanju potrebe spomenute bakterije za oba enzima. Kako bi kinetička karakterizacija bila moguća, potrebno je proizvesti proteine kao i pripadnu molekulu $tRNA^{Ile}$. U tu svrhu konstruirat će se rekombinantni plazmidni vektor za homolognu prekomjernu ekspresiju proteina IleRS1 u bakteriji *B. megaterium*. Optimizirat će se uvjeti i homologno će se prekomjerno eksprimirati oba proteina u bakteriji *B. megaterium* te će se isti izolirati iz stanice i pročistiti afinitetnom kromatografijom. Kodirajući slijed za molekulu

$tRNA^{Ile}$ uklonirat će se u plazmidni vektor pogodan za prekomjernu ekspresiju u bakteriji *B. megaterium* te će se molekula $tRNA^{Ile}$ pokušati homologno prekomjerno eksprimirati. Ukoliko homologna proizvodnja molekule $tRNA^{Ile}$ ne bude uspješna, heterologno će se proizvesti u bakteriji *Escherichia coli*. Kako su prethodna istraživanja pokazala, $tRNA^{Ile}$ potrebno je pročistiti kromatografijom obrnutih faza da bi se dobila kinetički pogodna tRNA.[13] Nakon određivanja akceptorske aktivnosti i aminoacilacijskog profila proizvedene tRNA, prekomjerno eksprimirana $tRNA^{Ile}$ će se prema potrebi pročistiti kromatografijom obrnutih faza. Kinetička karakterizacija enzima uključivat će određivanje obrtnog broja (k_{cat}) te Michaelisove konstante (K_M) za izoleucin u reakciji aktivacije što će se mjeriti metodom izmjene pirofosfata. U reakciji aminoacilacije odredit će se k_{cat} i K_M vrijednosti za supstrate Ile i ATP. Rezultati ovog diplomskog rada pokazat će postoji li razlika u afinitetu dviju IleRS prema supstratima, mijenja li se afinitet enzima prema supstratima u reakciji aktivacije u odnosu na ukupnu aminoacilaciju te jesu li obje IleRS iz bakterije *B. megaterium* kinetički jednako efikasne.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Biosinteza proteina

Proteini zbog širokog spektra svojstava vrše različite funkcije u živim organizmima, a samo neke od njih su: katalitička aktivnost (enzimi), prijenos signala ili molekula, strukturna uloga te kao antitijela imaju važnu ulogu u imunosnom sustavu. Stanica za normalno funkcioniranje treba na tisuće proteina te se proteini sintetiziraju po potrebi, trebaju se smjestiti na odgovarajuća mjesta u stanici, ali i razgraditi kad više nisu potrebni. Važnost biosinteze proteina može se shvatiti i iz činjenice da se u određenim trenucima 90 % ukupne kemijske energije u stanici može trošiti za sintezu proteina.[14]

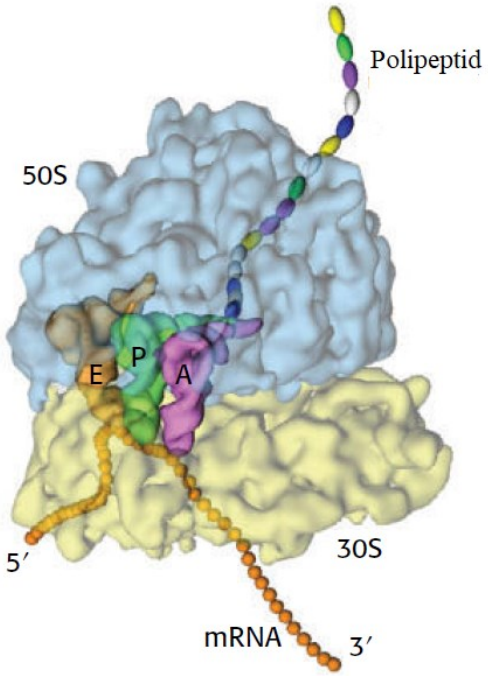
Genetička informacija svakog organizma zapisana je u obliku slijeda nukleotida u molekuli DNA. Molekula DNA kodira sve proteine i sve molekule RNA u stanici i posredno preko enzima utječe na sintezu svih ostalih staničnih komponenti. Ispoljavanje genetičke informacije zapisane u molekuli DNA kroz proteine određuje funkcioniranje svakog živog organizma.[14] Informacija sadržana u slijedu nukleotida u molekuli DNA prepisuje se u slijed nukleotida u molekuli glasničke RNA (engl. *messenger* RNA, mRNA) i taj se proces naziva transkripcija. Sinteza molekule mRNA odvija se u 5' → 3' smjeru i kataliziraju je enzimi koji se zovu RNA–polimeraze (RNAP). Jedan od lanaca dvolančane molekule DNA služi kao predložak za sintezu molekule mRNA.[14] Transkripcija se može podijeliti u tri dijela: inicijacija, elongacija i terminacija. Vrlo je važno da se u procesu transkripcije selektivno prepisuju dijelovi molekule DNA jer bi inače proces bio beskoristan i uz to energetski vrlo skup za stanicu. Uzvodno, u neposrednoj blizini nukleotidnih slijedova koji se transkribiraju u molekuli DNA nalaze se nukleotidni sljedovi koji se nazivaju promotori, a koje prepoznaje i selektivno se na njih veže RNAP . DNA–ovisna–RNAP u bakteriji *E. coli* oligomerni je protein sastavljen od 5 podjedinica ($\alpha_2\beta\beta'\omega$) koje čine srž proteina i šeste σ–podjedinice. Spomenuta σ–podjedinica selektivno se veže na promotor i na taj se način selektira dio molekule DNA koji će se transkribirati. Bakterija *E. coli* posjeduje niz σ–podjedinica koje prepoznaju različite promotore. Kod eukariota, situacija je očekivano kompleksnija pa tako eukarioti imaju 3 vrste RNAP (RNAP I, RNAP II i RNAP III) za razliku od bakterija koje imaju samo jednu. Za inicijaciju transkripcije kod eukariota nije dovoljan samo jedan protein (kao σ–podjedinica kod

bakterija), već je potrebno više proteina koji se nazivaju transkripcijski faktori. RNAP II je kod eukariota zadužena za sintezu molekula mRNA te postoji homologija s bakterijskom RNAP, a isto tako i njihova homologija s RNAP u arhejama. Osim toga, sve RNAP u eukariotima međusobno su homologne. Sličnosti u funkciji, strukturi i nukleotidnom slijedu RNAP u sve tri domene života pokazuju da je proces transkripcije na fundamentalnoj razini jednak u svim živim organizmima i da ima zajedničko evolucijsko podrijetlo. Molekula mRNA koja nastaje djelovanjem RNAP naziva se pre–mRNA i ona se ovisno o organizmu može naknadno dorađivati drugim enzimima koji uz proteine uključuju i katalitički aktivne molekule RNA. Neke od tih posttranskripcijskih dorada uključuju izrezivanje introna i vezanje 7'–metilgvanozina na 5'–kraj molekule mRNA preko neuobičajene 5',5'–trifosfatne veze.[14,15]

Nakon procesa transkripcije, slijedi proces translacije. Translacija uključuje sintezu polipetida na ribosomu koristeći uputu zapisanu u molekuli mRNA i koristeći molekule aa–tRNA kao supstrate. Ribosomi su velike ribonukleoproteinske čestice građene od velike (50S[1] kod bakterija, 60S kod eukariota) i male podjedinice (30S kod bakterija i 40S kod eukariota). Translacija započinje sklapanjem inicijacijskog kompleksa. Kod bakterija inicijacija započinje vezanjem triju inicijacijskih faktora (IF 1–3) i molekule mRNA na 30S podjedinicu te smještanjem molekule tRNA s vezanim N–formilmetioninom (fMet–tRNA^{fMet}) u P–mjesto (engl. *peptidyl site*, P.) ribosoma iznad start kodona u molekuli mRNA (najčešće je to AUG, ali mogu biti i neki drugi). Pravilno pozicioniranje molekule mRNA tako da start kodon bude u P–mjestu osiguravaju interakcije koje se stvaraju između slijeda nukleotida uzvodno od start kodona u molekuli mRNA poznatog pod nazivom Shine–Dalgarnova sekvenca i komplementarne sekvence koja se nalazi na 3'–kraju 16S rRNA koja je dio male podjedinice ribosoma. Iako se fMet–tRNA^{fMet} veže u P–mjesto, ostale molekule aa–tRNA tijekom sinteze polipeptida vežu se u A–mjesto (engl. *aminoacyl site,* A.) ribosoma. Vezanje 50S podjedinice na prethodno stvoren kompleks (30S podjedinica, molekula mRNA, IF 1–3 i fMet–tRNA^{fMet}) zahtijeva energiju koja se oslobađa hidrolizom GTP–a vezanog na IF–2 nakon čega dolazi do disocijacije IF–ova i započinje sinteza polipeptida. Kad započne sinteza polipeptidnog lanca, fMet se preko svoje karboksilne skupine veže na amino skupinu aminokiseline koja se nalazi vezana preko svojeg C–kraja na molekulu tRNA u A–mjestu ribosoma te se zatim dipeptid

[1] S (*Svedberg*): jedinica je brzine sedmimentacije, 1S = 10^{-13} s

vezan na molekuli tRNA (pripadnoj za drugu aminokiselinu) pomiče u P–mjesto, a slobodna molekula $tRNA^{fMet}$ pomiče se u treće, E–mjesto (engl. *exit site*, E.) na ribosomu. U svakom sljedećem krugu nadogradnje polipeptidnog lanca molekula tRNA će se iz A–mjesta prebaciti u P–mjesto, ona iz P–mjesta u E–mjesto dok će molekula u E–mjestu iz prethodnog kruga elongacije disocirati s ribosoma (mjesta za vezanje molekula tRNA na ribosomu shematski su prikazana na slici 2.1.).[14,16]



Slika 2.1. Shematski prikaz sinteze polipeptidnog lanca na bakterijskom ribosomu. Na slici su naznačene velika (50S) i mala (30S) podjedinica ribosoma te mjesta (E, P, A) za vezanje molekula tRNA. Preuzeto i prilagođeno prema ref. 17.

Kod eukariota, translacija započinje stvaranjem kompleksa koji se sastoji od 40S podjedinice, molekule mRNA, inicijatorske molekule tRNA s vezanim Met i cijelog niza inicijacijskih faktora (kojih je najmanje 9) te se finalno veže 60S podjedinica i nastaje cjelokupni ribosom spreman za sintezu polipeptida. Eukariotska mRNA ne sadrži Shine–Dalgarnovu sekvencu već se start kodon pronalazi „pretraživanjem“ molekule mRNA dok se ne pronađe kodon AUG u takozvanoj Kozakovoj sekvenci.[14]

Terminacija sinteze polipeptidnog lanca događa se kad jedan od stop kodona (UGA, UAA, UAG) dođe u A–mjesto ribosoma, nakon čega se vežu terminacijski faktori i uzrokuju hidrolizu veze između molekule tRNA i zadnje aminokiseline u novosintetiziranom polipeptidnom lancu, disocijaciju polipeptida s ribosoma i međusobnu disocijaciju podjedinica

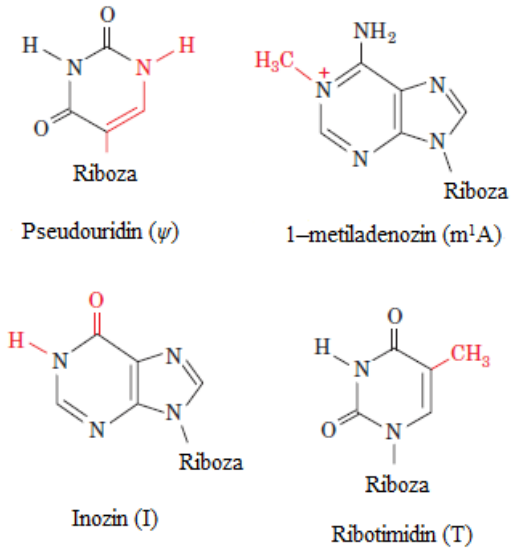
ribosoma. Novosintetizirani polipeptidni lanci, naročito kod eukariota, podložni su posttranslacijskim doradama kao što su proteolitičko cijepanje, acilacija, metilacija, glikozilacija te završetkom tih dorada nastaje funkcionalni protein.[14]

2.2. tRNA

2.2.1. Struktura molekule tRNA

Krajem 50–ih godina 20. stoljeća Francis Crick postavio je hipotezu o postojanju molekula adaptora koje nose vezanu odgovarajuću aminokiselinu te ujedno dekodiraju informaciju zapisanu u nukleotidnom slijedu molekule mRNA. Pretpostavio je postojanje barem 20 različitih molekula adaptora koje bi bile specifične za svaku pojedinu proteinogenu aminokiselinu, a uz to i specifične enzime koji bi katalizirali vezanje aminokiseline na adaptorsku molekulu.[18] Danas se zna da su molekule „adaptori“ molekule tRNA, a enzimi koji kataliziraju vezanje aminokiseline na molekulu tRNA su aminoacil–tRNA–sintetaze.

Sve molekule tRNA dijele neke zajedničke karakteristike. Molekule tRNA jednolančane su molekule RNA koje imaju 73–93 nukleotida, sličnu dvodimenzionalnu i vrlo definiranu trodimenzionalnu strukturu.[14] Nukleotidni slijed molekule $tRNA^{Ala}$ iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae* bio je prvi ikad određeni nukleotidni slijed neke molekule tRNA. Tad je postavljen, danas već općepoznat, model sekundarne strukture molekule tRNA koji ima oblik lista djeteline (vidljivo na slici 2.3.).[19] Isto tako je tada pokazano da je molekula tRNA djelomično građena od modificiranih nukleotida kao što su: pseudouridin (ψ), 1–metiladenozin (m^1A), inozin (I), ribotimidin (strukture modificiranih nukleotida prikazane na slici 2.2.).

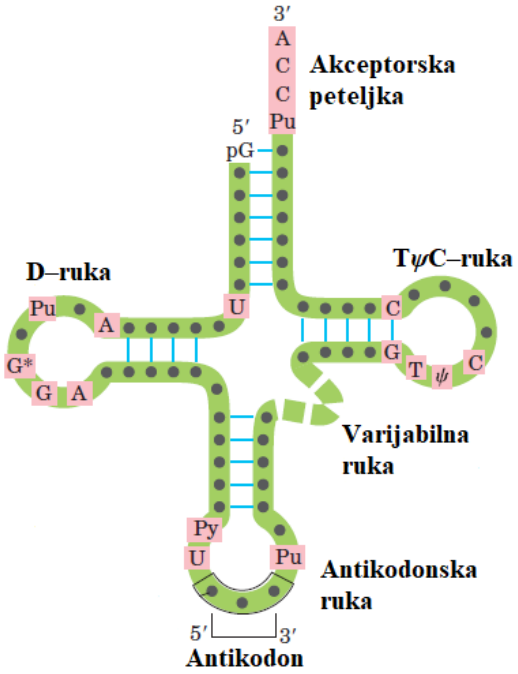


Slika 2.2. Kemijske strukture nekih od modificiranih nukleotida koji se mogu nalaziti u molekulama tRNA. Slika je preuzeta i prilagođena prema ref. 20.

Glavni dijelovi sekundarne strukture molekule tRNA su: antikodonska ruka, akceptorska peteljka, D–ruka, TψC–ruka te varijabilna ruka (strukturni dijelovi molekule tRNA prikazani su na slici 2.3.). Na 5'–kraju svih molekula tRNA nalazi se gvanilat, a 3'–kraj sadrži trinukleotidni slijed CCA.[14] Slijed CCA neophodan je za aminoacilaciju molekule tRNA što je dokazano ispitujući varijante molekule koje nisu sadržavale jedan, dva ili sva tri nukleotida na 3'–kraju.[21] Spomenuti CCA kraj može biti sadržan u kodirajućem slijedu za molekulu tRNA ili može biti naknadno nadodan djelovanjem enzima CTP:(ATP) tRNA–nukleotidil–transferaze (CCA enzim) koji je neophodan za stvaranje funkcionalne tRNA kod organizama kod kojih se molekule tRNA sintetiziraju bez tog dijela.[22] Hoće li CCA kraj biti sintetiziran istovremeno s ostatkom molekule tRNA ili će biti naknadno nadodan ovisi od organizma do organizma. Sedam uzastopnih nukleotida uključujući i gvanilat na 5'–kraju molekule tRNA ostvaruje interakcije s nukleotidima u blizini 3'–kraja te tako tvore akceptorsku peteljku. Akceptorska peteljka završava trinukleotidnim slijedom CCA koji se nalazi na 3'–kraju molekule i na koji se kao što i samo ime sugerira veže aminokiselina. Kako bi se omogućilo vezanje aminokiseline na OH skupinu terminalnog adenilata, CCA kraj ne ostvaruje nikakve interakcije s ostatkom molekule.

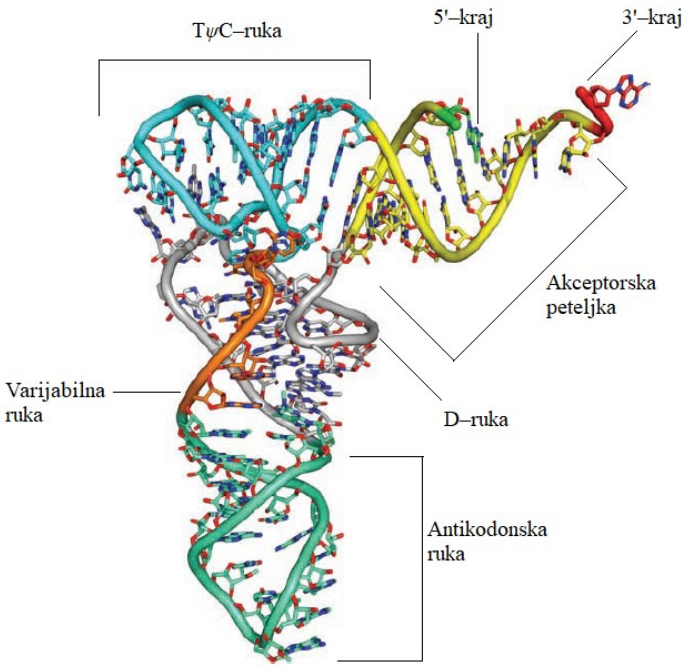
D–ruku i TψC–ruku karakterizira prisutnost modificiranih nukleotida, dihidrouridin se nalazi u D–ruci, a pseudouridin u TψC–ruci koja je poznata i kao T–ruka. Antikodonsku ruku čini 5 povezanih parova baza koji završavaju omčom u kojoj se nalazi antikodonski slijed

komplementaran kodonskom slijedu u molekuli mRNA. Postoji 15 očuvanih pozicija na kojima se nalaze isti nukleotidi u svim molekulama tRNA te još njih 8 koji su djelomično očuvani što znači da se na tim mjestima uvijek nalazi ili purin ili pirimidin i najčešće se nalaze u omčama molekule. Međutim, jedan dio molekule izrazito se razlikuje među molekulama tRNA, a to je varijabilna ruka koja može sadržavati 3–21 nukleotida.[20]



Slika 2.3. Shematski prikaz sekundarne strukture molekule tRNA. Na slici su označeni glavni dijelovi molekule: antikodonska ruka, akceptorska peteljka, D–ruka, TψC–ruka te varijabilna ruka. Sivim kružićima su prikazani nukleotidi, a plavom bojom prikazani su Watson–Crickovi parovi baza. Nukleotidi zadržani na istim položajima kod svih molekula tRNA označeni su ružičastom bojom. Preuzeto i prilagođeno prema ref. 14.

Trodimenzionalna struktura molekula tRNA ima oblik slova L (slika 2.4). Prva trodimenzionalna struktura neke molekule tRNA određena je 1974. godine i radilo se o $tRNA^{Phe}$ iz kvasca *S. cerevisiae*. Ako se oblik molekule tRNA promatra kao slovo L, 3'–kraj se nalazi na jednom kraju, antikodonska ruka na drugom dijelu dok se na pregibu nalazi TψC–ruka. Trodimenzionalna struktura molekule tRNA ostvaruje se zbog vodikovih veza među nukleotidima, a naročito zbog vertikalnih hidrofobnih interakcija (engl. *stacking interactions*) koje su značajno zastupljene u molekuli.[23]



Slika 2.4. Trodimenzionalna struktura molekule tRNA ima oblik slova L. Na slici je prikazana molekula $tRNA^{Phe}$ iz kvasca *S. cerevisiae*. Zelenom bojom označen je 5'–kraj, crvenom 3'–kraj, TψC–ruka označena je plavom bojom, varijabilna ruka narančastom, D–ruka sivom i antikodonska ruka tirkiznom bojom. Slika je preuzeta i prilagođena prema ref. 20.

2.2.2. Dorada 5'–kraja i 3'–kraja molekula pre–tRNA

Kako bi nastala funkcionalna molekula tRNA, nakon transkripcije su potrebne mnoge posttranskripcijske dorade primarnog transkripta (pre–tRNA). Posttranskripcijske dorade pre–tRNA uključuju: uklanjanje dijela nukleotidnog slijeda na 5'–kraju i 3'–kraju; nadodavanje CCA nukleotidnog slijeda na 3'–kraj kod eukariota, dijela eubakterija i nekih arheja; izrezivanje introna kod eukariota i nekih arheja; te modifikacije nukleotida u molekuli tRNA.[24]

Ribonukleoproteinska čestica RNaza P cijepa dio nukleotidnog slijeda na 5'–kraju pre–tRNA i zbog toga ima vrlo važnu ulogu u stvaranju funkcionalne molekule tRNA. RNaza P u različitim domenama (eubakterijama, arhejama i eukariotima) života građena je uglavnom od molekule RNA i barem jednog proteina. Zastupljenost proteinskih podjedinica u RNazi P razlikuje se u trima domenama života (eubakterijama, arhejama i eukariotima) pa tako RNaza P iz eubakterija ima samo jednu proteinsku podjedinicu, iz arheja 4 ili 5 proteinskih podjedinica, a kod eukariota može imati i do 10 proteinskih podjedinica.[25] Poznato je da za

razliku od eukariotskih, RNA molekule RNaze P iz bakterija i nekih arheja mogu *in vitro* katalizirati hidrolizu molekula tRNA što je dokaz da RNA molekula RNaze P ima katalitičku aktivnost, odnosno da je RNaza P ribozim kao što je slučaj i kod ribosoma. *In vitro* aktivnost spomenutih RNA molekula je moguća pri višim koncentracijama soli jer veća količina pozitivnih iona stabilizira značajan negativni naboj molekule RNA i samim time omogućava nastajanje katalitički aktivne konformacije, a *in vivo* proteinski dio vrši tu funkciju.[26, 27] Potpuno novo shvaćanje RNaza P i dodatni interes prema tim enzimima izazvalo je otkriće da RNaza P iz mitohondrija čovjeka uopće ne sadrži molekule RNA[28] što je ukazalo na to da nisu sve RNaze P ribozimi.

Kao što je već rečeno, molekule tRNA dijele se na one koje se sintetiziraju s CCA krajem i na one na koje se CCA kraj naknadno nadodaje te se s obzirom na to 3'–kraj pre–tRNA različito dorađuje. Budući da postoji puno više istraživanja napravljenih na bakteriji *Bacillus subtilis*, nego na bakteriji *B. megaterium* i da su te dvije vrste bliski evolucijski srodnici, određeni metabolički procesi će se opisivati za bakteriju *B. subtilis*. Kod bakterije *E. coli* svi geni za molekule tRNA sadrže nukleotidni slijed CCA, a kod bakterije *B. subtilis* oko 2/3 gena za molekule tRNA sadrži slijed CCA.[29] Primarni transkript u oba slučaja zahtijeva uklanjanje dijela nukleotidnog slijeda na 3'–kraju molekule tRNA kako bi se stvorila funkcionalna molekula. Putevi dorade 3'–kraja molekule tRNA razlikuju se po tome što se 3'–kraj primarnih transkripata koji sadrže CCA slijed uklanja djelovanjem endoribonukleaze i egzoribonukleaza, a kod primarnih transkripata koji ne sadrže CCA slijed djelovanjem samo endoribonukleaze. Nukleotidni slijed s 3'–kraja molekula tRNA u bakteriji *E. coli* uklanja se prvo djelovanjem endoribonukleaze RNaze E, a zatim djelovanjem egzoribonukleaza: RNaze D, RNaze BN, RNaze T, RNaze PH i RNaze II.[30,31] Kod bakterije *B. subtilis* nukleotidni slijed na 3'–kraju uklanja se endoribonukleazom RNazom Z do 73. nukleotida u molekuli tRNA na koji se onda direktno nadodaje CCA kraj.[32] Bioinformatički alat tRNAscan–SE korišten je za pronalazak gena koji bi mogli kodirati molekule tRNA u soju DSM319 bakterije *B. megaterium*.[33] Spomenuti bioinformatički alat korišten je zbog vrlo visoke točnosti, pomoću tog alata može se identificirati 99–100% gena za molekule tRNA u sekvencama molekule DNA s tim da se u rezultatu dobije manje od 1 lažan pozitiv na pretraženih 15 Gb.[34] Geni za molekule tRNA se u genomu bakterije *B. megaterium* nalaze u klasterima kao i kod bakterija *E. coli* i *B. subtilis*, a samo oko 6 % identificiranih gena postoje kao zasebni geni. Za razliku od bakterije *E. coli*, 18 % gena za molekule tRNA ne sadrži slijed

koji kodira za CCA kraj. Budući da se određeni udio molekula tRNA u bakteriji *B. megaterium* sintetizira bez CCA kraja, pretpostavljeno je postojanje CCA enzima u toj bakteriji koji je identificiran kao homolog proteina s istom funkcijom iz bakterije *B. subtilis*.[33] Izrezivanje introna u procesu stvaranja funkcionalne molekule tRNA karakteristično je za eukariote i neke arheje, a u centru ovog istaživanja je bakterija *B. megaterium*, stoga se proces izrezivanja introna neće detaljnije opisivati. Stvaranje CCA nukleotidnog slijeda na 3'–kraju detaljnije je opisano u prethodnom poglavlju, a modifikacije nukleotida u molekulama tRNA opisani su u sljedećem poglavlju.

2.2.3. Modificirani nukleotidi u molekulama tRNA

Za molekule tRNA karakteristična je visoka zastupljenost modificiranih nukleotida koji grade molekulu. Od ukupno 109 poznatih modifikacija u molekulama RNA, čak 93 se nalaze u molekulama tRNA.[35] Po kompleksnosti modifikacije nukleotida u molekulama tRNA mogu se podijeliti u dvije skupine pa bi tako brojne jednostavne modifikacije (npr. metilacija riboze ili dušične baze) koje zahtijevaju djelovanje samo jednog enzima pripadale prvoj skupini, a drugoj skupini bi pripadale kompleksnije modifikacije za čije je nastajanje potrebna cijela enzimska kaskada. Nukleotidi koji sadrže samo jednu modifikaciju najviše su zastupljeni u TψC–ruci i D–ruci te imaju vrlo važnu ulogu u stabilizaciji trodimenzionalne strukture molekule tRNA. Kompleksnije modificirani nukleotidi koji su poznati i kao hipermodificirani nalaze se uglavnom u antikodonskoj petlji i potrebni su za preciznu translaciju.[36] Utjecaj modifikacija na kinetička i biofizička svojstva molekule tRNA može se ispitati usporedbom nativne i *in vitro* sintetizirane tRNA. Poznato je da se $tRNA^{Phe}$ iz kvasca *S. cerevisiae* sintetizirana *in vitro* pomoću T7–polimeraze može aminoacilirati korištenjem PheRS iz kvasca *S. cerevisiae*, ali pri tome V_{max} jako ovisi o koncentraciji Mg^{2+}–iona dok je K_M vrijednost za *in vitro* sintetiziranu tRNA 4 × veća u odnosu na nativnu tRNA. Usporedbom temperatura mekšanja također je utvrđeno da je tercijarna struktura *in vitro* transkripta manje stabilna u odnosu na nativnu $tRNA^{Phe}$.[37] Zastupljenost broja modifikacija po molekuli tRNA varira u različitim domenama života, ali i u značajno manjim skupinama organizama kao što su Gram–pozitivne bakterije. Kod Gram–pozitivnih bakterija u prosjeku 6,5 % nukleotida u molekulama tRNA je modificirano za razliku od jednostaničnih eukariota kod kojih je prosjek 16,5 %. Mitohondrijska $tRNA^{Ser}$ u zlatnom hrčku *Mesocricetus auratus* ima samo jedan modificirani nukleotid (1,7 % ukupne tRNA je modificirano), a citoplazmatska $tRNA^{Trp}$ iz obične pšenice

Triticum aestivum ima čak 18 modificiranih nukleotida, tj. 23,7 % nukleotida u molekuli tRNA je modificirano. Analizom 584 molekula tRNA iz različitih organizama utvrđeni su neki očuvani položaji u molekulama tRNA na kojima se nalazi isti nukleotid neovisno iz kojeg organizma molekula tRNA potječe. Najočuvaniji je pseudouridin (struktura prikazana na slici 2.2.) na 55. položaju u TψC–ruci koji je na tom mjestu pronađen kod 84,2 % analiziranih molekula tRNA, a dihidrouridin na poziciji 20 pronađen je u 75,8 % slučajeva. Na nekim položajima nije striktno očuvan isti modificirani nukleotid, ali je očuvan tip nukleotida, purin ili pirimidin. Na položaju 37, koji je susjedan antikodonu s 3'–kraja u 72,9 % analiziranih molekula nalazi se purin. Na pozicijama 34 i 37 pojavljuje se najveća raznolikost modificiranih, čak i hipermodificiranih nukleotida pa je tako pronađeno 29 različitih nukleotida na položaju 34, odnosno 13 na položaju 37. Budući da je ukupni broj različitih modificiranih nukleotida u molekulama tRNA koje su korištene za analizu iznosio 60, varijacije na položajima 34 i 37 čine čak 70 % ukupnih modificiranih nukleotida u analiziranim molekulama tRNA.[38] Položaji 34 i 37 imaju važnu ulogu u aminoacilaciji. Izoakceptor $tRNA^{Ile}_{CAU}$ iz bakterije *E. coli* na 34. položaju sadrži lizidin, modificirani citidin koji umjesto karbonilnog kisika ima vezanu aminokiselinu lizin preko njenog bočnog ogranka. Molekula $tRNA^{Ile}$ iz bakterije *E. coli* koja na 34. položaju sadrži citidin (C34) aminoacilira se 10 × sporije od nativne tRNA te čak postaje supstrat za MetRS. Molekula $tRNA^{Phe}$ iz kvasca na položaju 37 sadrži vibutin koji je neophodan za aminoacilaciju jer se molekula $tRNA^{Phe}$ bez te modifikacije ne može aminoacilirati.[39] Osim položaja koji često sadrže modificirane nukleotide, postoje položaji na kojima nije pronađen modificirani nukleotid niti kod jedne molekule tRNA, a to su položaji: 5, 11, 23, 24, 33, 42, 43, 45, 53, 59, 62, 63, 73–76 kao i većina položaja u varijabilnoj ruci. Molekule tRNA iz Gram–pozitivnih bakterija općenito imaju najmanji udio modificiranih nukleotida. Jedini karakteristični položaj u molekulama tRNA kod Gram–pozitivnih bakterija je položaj 22 na kojem se nalazi 1–metiladenozin (m1A, struktura prikazana na slici 2.2.).[38]

2.3. Aminoacil–tRNA–sintetaze

2.3.1. Podjela aminoacil–tRNA–sintetaza

Aminoacil–tRNA–sintetaze su enzimi koji kataliziraju nastajanje kovalentne veze između aminokiseline i 2'– ili 3'–OH skupine terminalnog adenozina pripadne molekule tRNA. Enzimi

aaRS poveznica su između svijeta nukleinskih kiselina i svijeta proteina te imaju vrlo važnu ulogu u održavanju točnosti biosinteze proteina tj. u točnom prijepisu informacije sadržane u nukleotidnom slijedu molekule DNA.[1] Aminoacil–tRNA–sintetaze sudjeluju u ispoljavanju genetičke informacije u svim živim organizmima. Iako je kanonska funkcija aaRS u svim organizmima ista, postoje određene strukturne razlike među enzimima na temelju kojih se aaRS mogu svrstati u dva razreda. Enzimi aaRS različitih razreda, ali jedinstvene funkcije pravi su primjer konvergentne evolucije. Poznate su 24 vrste aaRS koje se definiraju prema vrsti aminokiseline kojom mogu aminoacilirati pripadnu molekulu tRNA. Sve aaRS dijele se u dva razreda: I i II. Razred I sačinjava 11 vrsta aaRS, a razred II 13 vrsta aaRS. Isto tako postoje dodatne podjele razreda na podrazrede (klasifikacija je prikazana u tablici 2.1.). Jedina aaRS koja postoji u oba razreda je LysRS koja ovisno o organizmu iz kojeg potječe može pripadati ili razredu I ili razredu II. LysRS koja pripada razredu I može se pronaći u nekim bakterijama i mnogim arhejama, ali do sad nije pronađena niti u jednom eukariotu. Bitno je naglasiti kako je samo struktura aktivnog mjesta sačuvana među aaRS istog razreda, dok se struktura ostatka enzima može značajno razlikovati, a razlika je tim manja što je manja evolucijska udaljenost među vrstama iz kojih potječu promatrane aaRS.[40]

Sve aaRS koje pripadaju razredu I sadrže Rossmannovu strukturu (eng. *Rossmann fold*) građenu od peterolančane paralelne β–ploče povezane α–zavojnicama. Rossmannova struktura nalazi se u blizini N–kraja proteina te insertirana CP1 domena (engl. *connective peptide* 1) dijeli tu strukturu na dva dijela. CP1 domena znatno je veća u enzimima LeuRS, IleRS i ValRS jer se u CP1 domeni tih enzima nalazi još jedno aktivno mjesto u kojem dolazi do hidrolize misacilirane molekule tRNA. Kod dimernih aaRS razreda I (TyrRS i TrpRS) CP1 domena sudjeluje u dimerizaciji podjedinica. Unutar Rossmannove strukture vrlo su važna dva očuvana aminokiselinska slijeda HIGH i KMSKS koja sudjeluju u vezanju ATP–a. Osim ATP–a, kod monomernih aaRS razreda I, Rossmannova struktura veže i 3'–kraj molekule tRNA. Antikodonsku regiju molekule tRNA veže C–terminalna domena uz iznimku LeuRS gdje to nije slučaj.[1,40]

Katalitička domena svih aaRS razreda II sačinjena je od sedmerolančane β–ploče okružene α–zavojnicama. Kao i kod aaRS razreda I, katalitička domena aaRS razreda II veže aminokiselinu, ATP i 3'–kraj molekule tRNA te pozicionira sve supstrate za enzimski kataliziranu reakciju aminoacilacije. Većina aaRS razreda II (sve aaRS iz podrazreda IIA i IIB) su homodimeri iako u podrazredu IIC postoje aaRS koje su homo– (α_4) i heterotetrameri ($(\alpha\beta)_2$).

U katalitičkim podjedinicama aaRS razreda II očuvana su 3 strukturna motiva. Motiv 1 sačinjen je od dugačke α–zavojnice i uglavnom je uključen u formiranje dimera podjedinica. Motive 2 i 3 sačinjava par antiparalelnih β–lanaca povezanih petljom te se ta dva motiva nalaze u samom aktivnom mjestu enzima. Motiv 2 ima ključnu ulogu u vezanju aminokiseline, ATP–a i 3'–kraja molekule tRNA, a motiv 3 veže ATP. Zbog uloge vezanja ATP–a, motiv 3 bio bi analogan HIGH i KMSKS motivima aaRS razreda I, dok analog motiva 2 kod aaRS razreda I ne postoji.[40]

Tablica 2.1. Klasifikacija aminoacil–tRNA–sintetaza prema razredima i podrazredima. Tablica je izrađena prema podacima preuzetim iz ref. 40.

Razred I			Razred II		
Podrazred	aaRS	Kvaterna struktura	Podrazred	aaRS	Kvaterna struktura
A	MetRS	α, α_2	A	SerRS	α_2
	LeuRS	α		ProRS	α_2
	IleRS	α		ThrRS	α_2
	ValRS	α		GlyRS	α_2
				HisRS	α_2
B	CysRS	α, α_2	B	AspRS	α_2
	GlnRS	α		AsnRS	α_2
	GluRS	α		LysRS	α_2
C	TyrRS	α_2			
	TrpRS	α_2			
D	ArgRS	α	C	PheRS	$(\alpha\beta)_2$, β
E	LysRS	α		GlyRS	$(\alpha\beta)_2$
				AlaRS	α_2, α^m
				SepRS	α_4
				PylRS	α_2

2.3.2. Reakcija aminoaciliranja i mehanizmi popravak pogreške

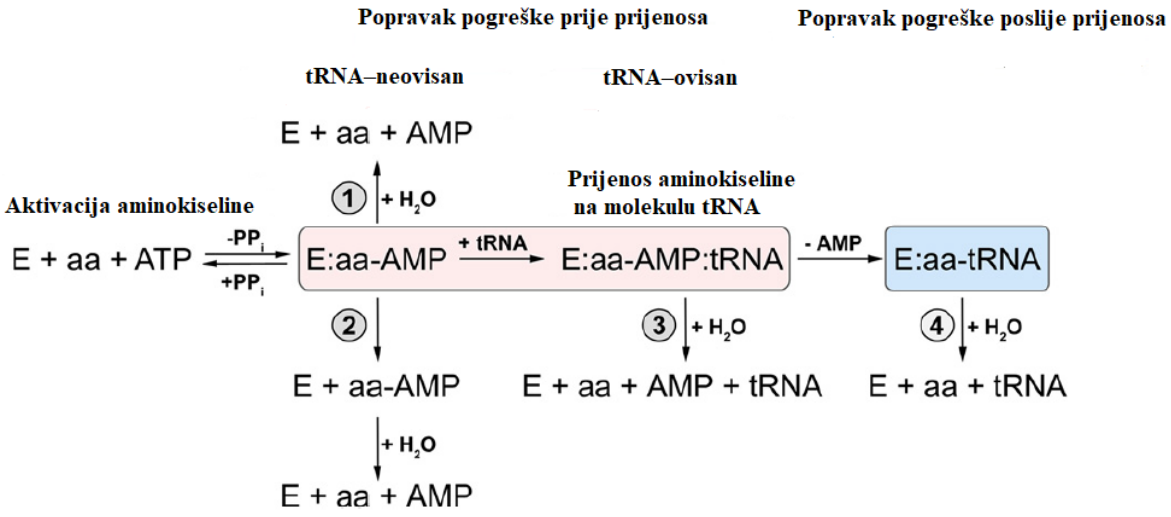
Aminoacilacija molekule tRNA kod svih aaRS odvija se u 2 koraka. U prvom koraku reakcije koji se naziva aktivacija, karboksilni kisikov atom aminokiseline nukleofilno napada fosfor na α–položaju u molekuli ATP–a pri čemu se stvara nova anhidridna veza i nastaje aa–AMP uz

otpuštanje PP_i. U drugom koraku ukupne reakcije aminoacilacije dolazi do vezanja aminokiseline na 2'– ili 3'–OH skupinu terminalnog adenozina (A76) molekule tRNA esterskom vezom uz oslobađanje AMP–a. Ono što reakciju aminoacilacije čini energetski povoljnom je hidroliza anorganskog pirofosfata nastalog u prvom koraku reakcije (aktivaciji). Dakle, sinteza aa–$tRNA^{aa}$ zahtjeva hidrolizu dvije visokoenergetske fosfoanhidridne veze. Sve aaRS razreda I kataliziraju aminoacilaciju 2'–OH skupine terminalnog adenozina (A76), a aaRS razreda II (osim PheRS) kataliziraju aminoacilaciju 3'–OH skupine A76. Aminoacilacija 2'–ili 3'–OH skupine korelira s načinom vezanja molekule tRNA na aaRS. Interakcija aaRS i akceptorske peteljke molekule tRNA ostvaruje se primarno preko malog utora u slučaju aaRS razreda I, odnosno preko velikog utora u slučaju aaRS razreda II.[1] Bez obzira dolazi li u enzimski kataliziranoj reakciji do aminoacilacije 2'– ili 3'–OH skupine A76 molekule tRNA, u otopini dolazi do transacilacije između dviju spomenutih –OH skupina i brzog uspostavljanja ravnoteže dvaju izomera.[41] Tijekom sinteze polipeptida na ribosomu (detaljnije opisano u odjeljku 2.1.) kao supstrat se koristi molekula tRNA aminoacilirana na 3' položaju terminalnog A76. Nakon enzimski katalizirane aminoacilacije, molekula tRNA u stanici veže se na elongacijski faktor Tu (EF–Tu) koji stabilizira 3'–aa–$tRNA^{aa}$ izomer i na taj način nastaje aminoacilirana molekula tRNA pogodna za sintezu polipeptida na ribosomu.[42]

Aminoacil–tRNA–sintetaze razreda I i II osim po već spomenutim strukturnim svojstvima, različitom vezanju molekule tRNA, a samim time i aminoaciliranju različitih –OH skupina terminalnog A76, razlikuju se i po kinetičkim karakteristikama. U kinetici ustaljenog stanja, kod aaRS razreda I korak koji određuje ukupnu brzinu reakcije je otpuštanje finalnog produkta (aa–$tRNA^{aa}$). U slučaju aaRS razreda II, neki od koraka koji prethodi prijenosu aminokiseline na molekulu tRNA je korak koji određuje ukupnu brzinu aminoacilacije. Petlja koja čini motiv 2 kod aaRS razreda II sadrži aminokiseline s kiselim bočnim ograncima koji tijekom aktivacije aminokiseline stabiliziraju Mg^{2+}–ion ili PP_i. Kako bi se omogućilo pravilno pozicioniranje 3'–kraja molekule tRNA, spomenuti motiv mora promijeniti položaj i upravo se ta promjena položaja motiva 2 smatra korakom koji određuje ukupnu brzinu aminoacilacije.[43]

Budući da se tijekom sinteze polipeptida na ribosomu ne provjerava aminokiselina koja je vezana na određenu molekulu tRNA, aaRS koje svojim mehanizmima osiguravaju ispravnu aminoacilaciju molekula tRNA, imaju nezamjenjivu ulogu u kontroli točnosti biosinteze proteina. Molekule tRNA puno su veće od aminokiselina i posjeduju mnoge posttranskripcijske modifikacije (detaljnije u odjeljku 2.2.3.) što omogućava ostvarivanje brojnih specifičnih

interakcija s aaRS i u principu aaRS mogu s dovoljnim stupnjem točnosti selektirati pripadnu molekulu tRNA iz mnoštva molekula tRNA koje su prisutne u stanici. Tijekom selekcije zahtjevnije je eliminirati nepripadne molekule tRNA čije su sekundarne i tercijarne strukture slične pripadnoj molekuli tRNA, dok se nepripadne molekule tRNA znatno različitije strukture lako eliminiraju. Međutim, aminokiseline su puno manji supstrati od molekula tRNA te samim time ostvaruju puno manje interakcija s aaRS zbog čega je selekcija pripadne aminokiseline puno teži zadatak za aaRS.[44] Zbog slične strukture nekih aminokiselina, pojedine aaRS u nezanemarivoj mjeri mogu aktivirati nepripadnu aminokiselinu te misaktiviranu aminokiselinu prenijeti na molekulu tRNA. Tako na primjer, IleRS s visokom frekvencijom (1 u 200) misaktivira Val. Kako bi se osigurala nužna točnost sinteze proteina, navedene aaRS razvile su različite mehanizme popravka vlastite pogreške (shematski prikazano na slici 2.5.). Pogrešno nastali aa–AMP može se hidrolizirati u istom aktivnom mjestu u kojem se i sintetizirao i to u prisutnosti ili u odsutnosti molekule tRNA, ali isto tako može doći do disocijacije nastalog aa–AMP–a s enzima i enzimski neovisne hidrolize u citosolu. Ukoliko ne dođe do hidrolize pogrešno nastalog aa–AMP–a, misaktivirana aminokiselina će se prenijeti na molekulu tRNA. Postoji i mehanizam popravka misacilirane molekule tRNA, popravak pogreške nakon prijenosa.[4] Zbog nedovoljne inicijalne selektivnosti, 10 vrsta aaRS posjeduje neki od mehanizama popravka pogreške. Od spomenutih 10, 7 aaRS posjeduje posebnu domenu za popravak pogreške nakon prijenosa. SerRS, MetRS i LysRS (iz razreda II) isključivo koriste popravak pogreške prije prijenosa. Ostale aaRS koje koriste popravak pogreške su: LeuRS, IleRS, ValRS, ProRS, ThrRS, PheRS, AlaRS. Preostalih 14 aaRS s dovoljnom selektivnošću prepoznaju pripadnu aminokiselinu i nemaju potrebu za popravkom pogreške.[1]



Slika 2.5. Mehanizmi popravka pogreške aminoacil–tRNA–sintetaza. Popravak pogrešno aktivirane aminokiseline može se dogoditi u odsutnosti molekule tRNA u sintetskom mjestu enzima (1) ili u stanici nakon disocijacije s enzima (2). Molekula tRNA može stimulirati hidrolizu pogrešno aktivirane aminokiseline (3), a može doći i do hidrolize aa–tRNA u drugom aktivnom mjestu enzima (4). Slika je preuzeta i prilagođena prema ref. 45.

2.3.3. Prepoznavanje molekule tRNA i elementi identiteta

U svrhu ispravnog aminoaciliranja pripadne molekule tRNA, a posljedično i točne biosinteze proteina, važno je ostvarivanje specifičnih interakcija između aaRS i pripadne molekule tRNA kao i sprječavanje interakcija između svih ostalih (nepripadnih) molekula tRNA i aaRS. Elementi identiteta koji doprinose vezanju molekule tRNA na aaRS nazivaju se pozitivne determinante, a elementi koji sprječavaju vezanje određene molekule na aaRS nazivaju se negativne determinante ili anti–determinante. Ulogu determinanti mogu imati pojedinačni modificirani ili nemodificirani nukleotidi u jednolančanim dijelovima molekule tRNA, parovi nukleotida ili određeni strukturni elementi. Elementi identiteta najbolje su istraženi kod bakterije *E. coli* kod koje su određeni elementi identiteta za molekule tRNA koje su specifične za 20 različitih aminokiselina. U većini slučajeva elementi identiteta su nemodificirani nukleotidi, međutim modificirani nukleotidi također služe kao elementi identiteta kod molekula tRNA specifičnih za: Ile, Glu, Lys. Spomenuti modificirani nukleotidi nalaze se isključivo u antikodonskoj petlji. Općenito se kod molekula tRNA iz bakterije *E. coli* elementi identiteta nalaze na dva prostorno najudaljenija kraja molekule, u antikodonskom slijedu i diskriminatornom nukleotidu N73. Antikodonski nukleotidi i diskriminatorni nukleotid N73 služe kao elementi identiteta kod gotovo svih molekula tRNA. Diskriminatorni nukleotid N73

služi kao element identiteta kod čak 18 molekula tRNA iz bakterije *E. coli*. Antikodonski nukleotidi služe kao elementi identiteta 16 vrsta molekula tRNA s tim da je središnji nukleotid (pozicija 35) u antikodonu uvijek uključen, dok su nukleotidi na pozicijama 34 i 36 nešto manje zastupljeni, kod 11, odnosno 12 vrsta tRNA. Elementi identiteta u antikodonskoj ruci pronađeni su kod molekula tRNA za aminokiseline: Ile, Ser, Pro, Phe. Specifičnosti pojedinih molekula tRNA, kao što su velika varijabilna ruka $tRNA^{Ser}$ i atipični nukleotidni par G15–G48 u molekuli $tRNA^{Cys}$, također služe kao elementi identiteta. Ukupno 40 položaja u molekulama tRNA iz bakterije *E. coli* može služiti kao element identiteta, a neki nukleotidi, kao što su oni koji grade T–ruku, nikad nemaju tu ulogu. Različitosti aaRS razreda I i II i ovdje se očituju pa tako nukleotid na poziciji 37 služi kao element identiteta samo kod onih molekula tRNA koje aminoaciliraju aaRS razreda I.[39]

2.3.4. Izoleucil–tRNA–sintetaze tipa 1 i 2

Aminoacilaciju molekule $tRNA^{Ile}$ pripadnom aminokiselinom (izoleucinom) katalizira IleRS. IleRS iz organizama iz svih triju domena života na temelju strukturnih i biokemijskih karakteristika dijele se na dvije skupine pa tako postoje IleRS tipa 1 (IleRS1) i IleRS tipa 2 (IleRS2). Sve mitohondrijske IleRS iz eukariota pripadaju tipu 1, a sve citosolne IleRS iz eukariota pripadaju tipu 2. Bakterije mogu imati IleRS tipa 1 ili tipa 2, a ista bakterijska vrsta čak može imati oba tipa IleRS. IleRS2 uglavnom imaju Gram–pozitivne bakterije i to pretežno vrste koje pripadaju koljenima: *Firmicutes* i *Actinobacteria*, ali i vrste koje pripadaju redovima: *Chlamydiae*, *Spirochaete* i *Deinococcale*. IleRS1 uglavnom imaju bakterijske vrste iz koljena *Proteobacteria*.[8] Jedna od bakterijskih vrsta koja ima oba tipa IleRS je bakterija *B. megaterium* koja je korištena u ovom istraživanju i do sad nije razjašnjeno zbog čega su toj vrsti potrebne IleRS1 i IleRS2 te zašto nije došlo do gubitka jedne od te dvije vrste IleRS tijekom evolucije.

Najistaknutija strukturna razlika između dva tipa IleRS je struktura C–terminalne domene u kojoj se kod enzima IleRS tipa 1 nalazi klaster Cys_4 koji koordinira Zn^{2+}–ion i koji je ključan za aminoacilacijsku aktivnost enzima dok kod IleRS2 navedeni klaster ne postoji.[5] Druga važna razlika među proteinima IleRS1 i IleRS2 koja je predmet mnogih znanstvenih istraživanja je različita osjetljivost na inhibiciju antibiotikom mupirocinom. Mupirocin proizvodi bakterija *Pseudomonas fluorescens*.[6] Poznato je da je mupirocin kompetitivni inhibitor enzima IleRS mnogih bakterijskih vrsta, dok eukarioti, uključujući i vrstu *H. sapiens* imaju IleRS znantno otporniju na inhibiciju mupirocinom.[7]

Osjetljivost pojedine IleRS na inhibiciju mupirocinom znatno se razlikuje ne samo između enzima različitih tipova, već i između enzima istog tipa koji potječu iz različitih vrsta. Tako se na primjer konstanta inhibicije (K_i) mupirocinom enzima IleRS2 iz bakterija *Thermus thermophilus* i *P. fluorescens* razlikuje čak za 10^4 puta. Ovisno o organizmima iz kojih potječu, IleRS različitih tipova mogu imati konstantu inhibicije koja se razlikuje i do 10^8 puta. Još jedna važna karakteristika pojedinih IleRS vezana je uz sposobnost tRNA–ovisnog popravka pogreške misaktivirane aminokiseline. IleRS jedina je aaRS iz razreda Ia koja u značajnijoj mjeri koristi tRNA–ovisni popravak pogreške prije prijenosa u svrhu povećanja točnosti aminoacilacije pripadne molekule $tRNA^{Ile}$. Međutim, pokazano je da IleRS iz bakterije *Streptomyces griseus* ne posjeduje tRNA–ovisni popravak pogreške prije prijenosa. IleRS iz bakterije *S. griseus* izuzetno je otporna na inhibiciju mupirocinom (K_i = 10 mmol dm^{-3}) te se smatra da je tako evoluirala jer dijeli staniše s bakterijom *P. fluorescens* koja prirodno sintetizira mupirocin. Iako je potrebno detaljnije istražiti, moguće je da gubitak tRNA–ovisnog popravka pogreške prije prijenosa povezan s izuzetno visokom rezistencijom na mupirocin kod nekih skupina organizama.[8]

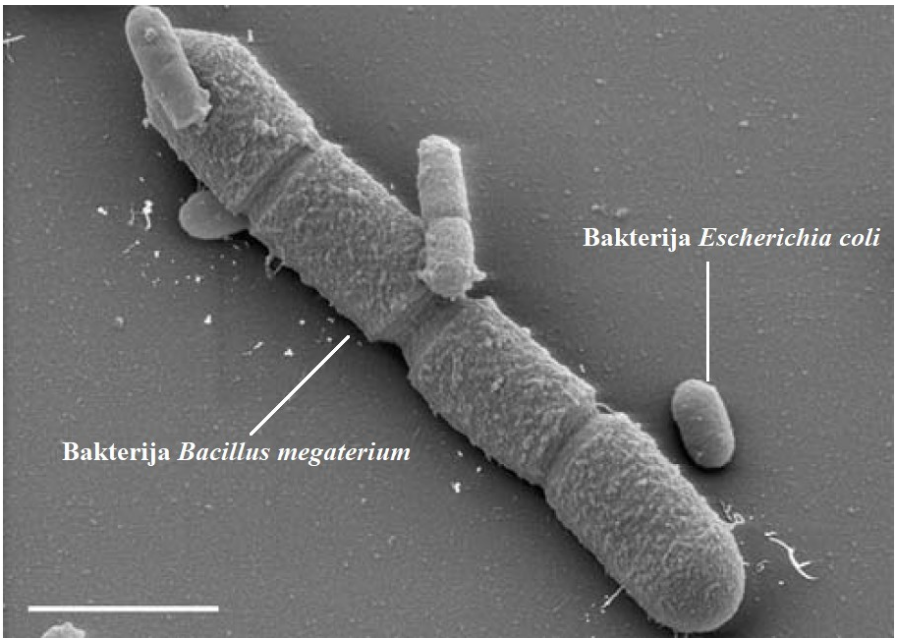
2.4. Bakterija *B. megaterium* i njeni sustavi za ekspresiju proteina

Bakterija *B. megaterium* pripada skupini Gram–pozitivnih bakterija, a otkrio ju je De Bary 1884. godine. Ime je dobila zbog svoje veličine, naime bakterija *B. megaterium* ima oko 100 puta veći volumen od bakterije *E. coli* (razlika u veličini bakterija vidljiva je na slici 2.6.). Navedena bakterija predmet je znanstvenih istraživanja, a koristi se i u industriji. U znanosti se koristi za proučavanje stanične strukture, membrana, sporulacije i lokalizacije proteina. Ne posjeduje alkalne proteaze, a uz to može i sadržavati različite plazmidne vektore što ju čini pogodnom bakterijom za prekomjernu ekspresiju proteina. Sposobnost proizvodnje proteina u bakteriji *B. megaterium* prepoznata je i u industriji, stoga se u industriji između ostalog ta bakterija koristi za proizvodnju: penicilin–acilaze (koristi se za sintezu penicilina), različitih amilaza (koriste se u pekarskoj industriji), glukoza–dehidrogenaze (koja se koristi za regeneraciju NADH/NADPH kofaktora u biokemijskim pokusima i testovima za analizu glukoze u krvi). Uz to se bakterija *B. megaterium* koristi i za proizvodnju: piruvata, vitamina B_{12}, fungicidnih toksina te ihibitora različitih virusa opasnih za ljudsko zdravlje.[10]

Kao što je već spomenuto, za proizvodnju rekombinantih proteina u bakteriji *B. megaterium* napravljeni su mnogi plazmidni vektori. Rygus i Hillen 1991. godine razvili su

plazmidni vektor pWH1520 koji posjeduje višestruko mjesto za kloniranje pod kontrolom ksiloznog promotora P_{xylA} te dva ishodišta replikacije koja omogućavaju plazmidu umnažanje u bakterijama *E. coli* i *B. megaterium*. Pomoću tog plazmida uspješno su u bakteriji *B. megaterium* proizveli proteine iz bakterija: *B. megaterium*, *E. coli*, *Acinetobacter calcoaceticus* te čovjeka (*H. sapiens*). Korišteni promotor P_{xylA} dio je operona za metabolizam ksiloze u bakteriji *B. megaterium*.[46] U odsutnosti ksiloze u stanici, *xylR* gen kodira represor XylR koji se veže na operator *xylA* i onemogućava djelovanje RNA–polimeraze te tako suprimira ekspresiju gena pod kontrolom ksiloznog promotora (P_{xylA}). D–ksiloza veže se na represor XylR što uzrokuje konformacijsku promjenu proteina XylR i onemogućava njegovo vezanje na operator *xylA* čime se kodirajući slijed pod kontrolom promotora P_{xylA} može neometano transkribirati, stoga se ksiloza može koristiti kao induktor ekspresije proteina pod kontrolom promotora P_{xylA}.[47,48] Saharozni promotor P_{sacB} koji se prirodno pojavljuje u bakteriji *B. megaterium* također je iskorišten za proizvodnju proteina u toj bakteriji, a aktivnost spomenutog promotora može se inducirati saharozom. Korištenjem promotora P_{sacB} uspješno je homologno proizveden izvanstanični protein levansaharoza SacB i heterologno zeleni fluorescentni protein (engl. *green fluorescent protein*, GFP). Budući da korištenje saharoze kao induktora genske ekspresije uzrokuje smanjenje rasta bakterije *B. megaterium* u tekućoj kulturi, količina prekomjerno eksprimiranog GFP–a korištenjem promotora P_{sacB} je dvostruko manja od količine dobivene korištenjem promotora P_{xylA} iz istog volumena inducirane bakterijske kulture. Ako se uspoređuje količina prekomjerno ekspimiranog proteina po jedinici suhe bakterijske mase, ona je gotovo ista bez obzira je li korišten promotor P_{sacB} ili P_{xylA}.[49] Jedan od najčešće korištenih sustava za proizvodnju proteina u bakteriji *E. coli* je sustav pET koji koristi RNA–polimerazu iz bakteriofaga T7. T7–RNA–polimeraza (T7–RNAP) visoko je procesivna i strogo selektivna prema pripadnom T7–promotoru (P_{T7}). Zbog vrlo visoke procesivnosti, korištenjem T7–RNAP prekomjerno eksprimirani protein od interesa može sačinjavati 50 % ukupnih staničnih proteina u induciranim bakterijskim stanicama. Budući da promotor P_{T7} ne prepoznaju bakterijske RNA–polimeraze, u bakterijskim stanicama prije indukcije nema nikakve ekspresije proteina pod kontrolom promotora P_{T7} što je vrlo važno kod proizvodnje proteina koji su letalni ili toksični za organizam u kojem se proizvode. Sustav koji koristi T7–polimerazu u bakteriji *B. megaterium* sastoji se od dva plazmida, jedan (pP_{T7}) sadrži višestruko mjesto za kloniranje pod kontrolom promotora P_{T7}, a drugi (pT7–RNAP) sadrži gen za T7–RNAP pod kontrolom inducibilnog promotora P_{xylA}. Oba plazmida imaju dva ishodišta

replikacije tako da se mogu umnažati u bakterijama *E. coli* i *B. megaterium* s tim da se ishodišta replikacije iz bakterije *B. megaterium* razlikuju između navedena dva plazmida što omogućava njihovo istovremeno repliciranje u bakteriji *B. megaterium*. Zbog prirode korištenog sustava, ksiloza se koristi za indukciju ekspresije gena pod kontrolom promotora P_{T7} posredovanjem promotora P_{xylA} i T7–RNAP.[11]



Slika 2.6. Slika bakterija *B. megaterium* i *E. coli*. Slika je dobivena elektronskim mikroskopom. Preuzeto i prilagođeno prema ref. 10.

§ 3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Standardne kemikalije

Agar (*BD Difco)*, agaroza (*Sigma*), akrilamid (*Sigma*), arabinoza (*Sigma*), 2–amino–2–hidroksimetilpropan–1,3–diol (Tris) (*Merck*), amonijev acetat (*Kemika*), amonijev klorid (NH_4Cl) (*Zorka Šabac*), amonijev peroksodisulfat (APS) (*Serva*), ampicilin (*Sigma*), baktotripton (*BD Difco*), 1,4–bis(2–(4–metil–5–fenil)oksazolil)benzen (POPOP) (*Calbiochem*), borna kiselina (H_3BO_3) (*Kemika*), ekstrakt kvasca (*BD Difco*), etanol (*Kefo*), etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) (*Sigma*), 2,5–difenil oksazol (PPO) (*Merck*), fenilmetilsulfonil–fluorid (PMSF) (*Sigma*), fenol (*Kemika*), trifluoroctena kiselina (TFA) (*Kemika*), glicerol (*Kemika*), glicin (Thermo), glukoza (*Kemika*), goveđi ekstrakt (*Biolife*), gvanidin–hidroklorid (*Sigma*), imidazol (*Sigma*), izopropil–β–D–tiogalaktopiranozid (IPTG) (*Sigma*), izopropanol (*Kemika*), kalijev hidroksid (KOH) (*Kemika*), kalijev klorid (KCl) (*Kemika*), karbenicilin (*Sigma*), kloramfenikol (*Sigma*), D–(+)–ksiloza (*CarlRoth*), trikloroctena kiselina (TCA) (*Kemika*), kloroform (*Kemika*), klorovodična kiselina (HCl) (*Kemika*), *Luria–bertani* agar (LB agar) (*Liofilchem*), β–merkaptoetanol (*Serva*), magnezijev acetat tetrahidrat ($Mg(CH_3COO)_2 \times 4\ H_2O$) (*Kemika*), magnezijev klorid heksahidrat ($MgCl_2 \times 6\ H_2O$) (*Kemika*), natrijev acetat ($Na(CH_3COO)$) (*Kemika*), natrijev dihidrogenfosfat (NaH_2PO_4) (*Sigma*), natrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4) (*Kemika*), *N*–(2–hidroksietil)piperazin–*N*′–2–etansulfonska kiselina (Hepes) (*AppliChem PanReac*) natrijev dodecilsulfat (*USB Corporation*), *N,N,N′,N′*–tetrametiletilendiamin (TEMED) (*Serva*), natrijev klorid (NaCl) (*Gram–Mol*), octena kiselina (CH_3COOH) (*Kemika*), pepton (*Sigma*), polietilenglikol 4000 (PEG–4000) (*Sigma*), polietilenglikol 8000 (PEG–8000) (*Sigma*), tetraciklin (*Sigma*), toluen (*T. T. T.*), ditiotreitol (DTT) (*Sigma*), urea (*Kemika*)

3.1.2. Aminokiseline i nukleotidi

ATP (*Sigma*), dNTP smjesa (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (*Sigma*), izoleucin (≥ 99,5 %) (*Sigma*)

3.1.3. Radioaktivno obilježeni spojevi

α–[^{32}P]–ATP (*Perkin Elmer*), [^{32}P]–PP$_i$ (*Perkin Elmer*), [^{14}C]–izoleucin (*Perkin Elmer*)

3.1.4. Nukleinske kiseline

Oligonukleotidi korišteni kao početnice u lančanoj reakciji polimerazom i sintetski gen za molekulu tRNA^{Ile} naručeni su od komercijalnog dobavljača (*Macrogen*).

3.1.5. Boje

Bromfenol plavilo (*Serva*), *Coomassie Brilliant Blue* G–250 (*Merck*), *Coomassie Brilliant Blue* R–250 (*Merck*), ksilencijanol–fluorofosfat (XCFF) (*Serva*), toluidinsko modrilo (*Sigma*)

3.1.6. Enzimi i proteini

Albumin iz goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumin*, BSA) (*NEB*), DNaza I (*Sigma*), *Dpn*I (*NEB*), T4–DNA–ligaza (*Thermo*), Phusion–DNA–polimeraza (*Thermo*), *Taq*–DNA–polimeraza (*Thermo*), Q5–DNA–polimeraza (*NEB*), lizozim (*Sigma*), termostabilna anorganska pirofosfataza (TIPP) (*NEB*), restrikcijske endonukleaze: *Bam*HI, *Spe*I, *Xho*I, *Nhe*I s pripadajućim puferima (*NEB*), nukleaza P1 (*Sigma*)

3.1.7. Hranjive podloge i mediji za uzgoj bakterija

Tekući hranjivi medij za uzgoj bakterije *E. coli*: ekstrakt kvasca (γ = 5 g dm^{-3}), baktotripton (γ = 10 g dm^{-3}), NaCl (γ = 10 g dm^{-3})

Kruta hranjiva podloga za bakteriju *E. coli*: ekstrakt kvasca (γ = 5 g dm^{-3}), baktotripton (γ = 10 g dm^{-3}), NaCl (γ = 10 g dm^{-3}), agar (γ = 15 g dm^{-3})

Hranjivi mediji za bakteriju *B. megaterium* su isti kao i za bakteriju *E. coli* uz razliku u koncentraciji NaCl koja je iznosila γ = 5 g dm^{-3}.

Za selekciju bakterijskih kolonija *E. coli* koje sadrže željeni plazmidni vektor korišteni su antibiotici: ampicilin (100 μg mL^{-1}), karbenicilin (100 μg mL^{-1}), kloramfenikol (33 μg mL^{-1}).[50]

Minimalni medij za bakteriju *B. megaterium*: KH_2PO_4 (γ = 3,52 g dm^{-3}), Na_2HPO_4 (γ = 5,81 g dm^{-3}), pH 7,0-7,2, $MgSO_4 \times 7\ H_2O$ (γ = 0,3 g dm^{-3}), glukoza (0,5 % *w*/*V*), $(NH_4)_2SO_4$ (0,2 % *w*/*V*), $MnCl_2 \times 2\ H_2O$ (γ = 40 mg dm^{-3}), $CaCl_2 \times 2\ H_2O$ (γ = 53 mg dm^{-3}), $FeSO_4 \times 7\ H_2O$ (γ = 2,5 mg dm^{-3}), $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times H_2O$ (γ = 2,5 mg dm^{-3}), $CoCl_2 \times 6\ H_2O$ (γ = 2,5 mg dm^{-3}). Otopina spojeva KH_2PO_4 i Na_2HPO_4 (pH = 7,0–7,2) korištena je kao pufer.

PM medij: pepton (γ = 5 g dm^{-3}) i ekstrakt goveda (γ = 3 g dm^{-3})

3.1.8. Otopine korištene za transformaciju protoplasta bakterije B. megaterium

SMMP: 2 × AB3 i 2 × SMM pomiješani u volumnom omjeru 1:1

PEG–P: PEG–4000 (γ = 400 g dm^{-3}), maleinska kiselina (γ = 2,23 g dm^{-3}), NaOH (γ = 1,60 g dm^{-3}), $MgCl_2 \times 6\ H_2O$ (γ = 4,06 g dm^{-3}), saharoza (γ = 171,16 g dm^{-3})

2 × AB3: ekstrakt goveda (γ = 1,5 g dm^{-3}), kvaščev ekstrakt (γ = 1,5 g dm^{-3}), pepton (γ = 5 g dm^{-3}), glukoza (γ = 1 g dm^{-3}), NaCl (γ = 3,5 g dm^{-3}), K_2HPO_4 (γ = 3,68 g dm^{-3}), KH_2PO_4 (γ = 1,32 g dm^{-3})

2 × SMM: maleinska kiselina (γ = 4,46 g dm^{-3}), NaOH (γ = 3,20 g dm^{-3}), $MgCl_2 \times 6\ H_2O$ (γ = 8,12 g dm^{-3}), saharoza (γ = 342,32 g dm^{-3}), pH vrijednost otopine (pH = 6,5) postignuta je titracijom s NaOH.

Otopina A: saharoza (γ = 206 g dm^{-3}), MOPS (γ = 13 g dm^{-3}), NaOH (γ = 1,2 g dm^{-3}), pH = 7,3

CR5–soli: K_2SO_4 (γ = 2 g dm^{-3}), $MgCl_2 \times 6\ H_2O$ (γ = 80 g dm^{-3}), KH_2PO_4 (γ = 0,4 g dm^{-3}), $CaCl_2$ (γ = 17,6 g dm^{-3})

Otopina B: agar (γ = 14 g dm^{-3}), kazamino kiseline (γ = 0,7 g dm^{-3}), ekstrakt kvasca (γ = 35 g dm^{-3})

Inicijalno pripremljena otopina 2 × AB3 autoklavirana je 15 min na 121 ˚C i p = 2 bar, otopina 2 × SMM sterilizirana je filtriranjem kroz filter koji ima promjer pora 0,22 μm, otopina PEG–P autoklavirana je 11 min na 121 ˚C i p = 2 bar. Otopina CR5–top agar pripremljena je miješanjem 1,25 mL otopine A, 288 μL otopine CR5–soli, 125 μL prolina (γ = 120 g dm^{-3}) 125 μL glukoze (γ = 200 g dm^{-3}), 713 μL otopine B, otopine su dodavane točno navedenim redoslijedom, a otopina A, otopina prolina i otopina glukoze prethodno su sterilizirane filtracijom kroz filter koji ima promjer pora 0,22 μm, dok su otopina B i otopina CR5–soli sterilizirane autoklaviranjem 20 minuta na 121 ˚C i p = 2 bar.

3.1.9. Komercijalni kompleti za izolaciju i pročišćavanje DNA

QIAprep Spin Miniprep Kit (*Qiagen*) za izolaciju plazmidne DNA iz bakterije *E. coli*, *QIAquick PCR Purification Kit* (*Qiagen*) za pročišćavanje DNA

3.1.10. Kromatografska punila, kolone i membrane

Centrikoni *Amicon Ultra Centrifugal Filters* (*Millipore*), polietilenimin–celuloza pločice za tankoslojnu kromatografiju (*Fluka*), filtracijski sustav *Corning bottle–top vacuum filter system* i filtrirni papiri od celuloznog acetata promjera pora 0,22 μm (*Sartorius*), Jupiter C4 5 μm 300 Å 4,6 × 250 mm (*Phenomenex)*, Ni–NTA agaroza (*Qiagen*), gel-filtracijske kolone *Micro Bio-Spin 30* (*Bio-Rad*)

3.1.11. Markeri veličine

Marker za agaroznu gel–elektroforezu *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (*Thermo Fischer Scientific*), marker za poliakrilamidnu gel–elektroforezu *Precision Plus Protein Standards Unstained* (*Bio–Rad*)

3.1.12. Bakterijski sojevi

3.1.12.1. Sojevi bakterije E. coli

BL21(DE3) (F^- *dcm ompT hsdS*$_B$ (r_B^- m_B^-) *gal dcm* (DE3)) (*Novagen)*: soj koji nema gene *ompT* i *lon* zbog čega nema ekspresije Lon i OmpT proteaza što soj čini pogodnim za prekomjernu ekspresiju proteina zbog smanjene proteolitičke razgradnje proteina eksprimiranih u stanici. Navedeni bakterijski soj koristi se za nadekspresiju gena ukloniranih u pET plazmidni vektor. Soj BL21(DE3) sadrži u genomu gen za T7–RNA–polimerazu koji se nalazi pod kontrolom inducibilnog promotora *lac*UV5 čija se ekspresija može inducirati IPTG–om. Soj je korišten za prekomjernu ekspresiju molekule $tRNA^{Ile}$.

BL21 (DE3) Rosetta (F^- *ompT hsdSB* (rB^- mB^-) *gal dcm* (DE3) *pRARE* (CmR) (*Novagen*): soj koji se koristi za prekomjernu ekspresiju proteina. Ovaj soj nosi plazmid (Cm^R) koji kodira molekule tRNA s kodonima koji su slabo zastupljeni u bakteriji *E. coli*, a to su: AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA.[50]

NovaBlue (*endA1 hsdR17* (r_{K12}^- m_{K12}^+) *supE44 thi–1 recA1 gyrA96 relA1 lac* F' [*proA*$^+$*B*$^+$ *lacI*^{q} *ZΔM15* ::Tn*10*] (Tet^R)) (*Novagen*): zbog velike kompetentnosti, plavo–bijele selekcije (ukoliko se koristi odgovarajući plazmid) i mutacijama u genima *recA* čime je smanjena rekombinacija plazmidne DNA i *endA* čime je eliminirana aktivnost nespecifične endonukleaze, ovaj je soj pogodan za kloniranje i daje visoki prinos kvalitetne rekombinantne DNA.[50]

NEB Stable (F' *proA+B+ lacI*^{q} Δ*(lacZ)M15 zzf::Tn10* (Tet^R) Δ*(ara-leu) 7697 araD139 fhuA* Δ*lacX74 galK16 galE15 e14- Φ80dlacZΔM15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL* (Str^R) *rph spoT1* Δ*(mrr-hsdRMS-mcrBC))* (*NEB*): soj koji ima smanjenu rekombinantu aktivnost zbog mutacija u *recA* genu te utišanu aktivnost nespecifične endonukleaze I (*endA1*). Pogodan je za plavo–bijelu selekciju ukoliko se koristi odgovarajući plazmid. Bakterijske stanice ovog soja mogu biti efikasno transformirane metiliranom DNA koja je eukariotskog podrijetla ili nemetiliranom DNA koja je npr. sintetizirana PCR–om. Soj NEB Stable preporuča se za kloniranje sekvenci s ponavljajućim sljedovima kao i za kloniranje gena u retroviralne i lentiviralne vektore.[51]

XL10–Gold (Tet^{r}Δ(*mcrA*)*183* Δ(*mcrCB–hsdSMR–mrr*)*173 endA1 supE44 thi–1 recA1 gyrA96 relA1 lac* Hte [F' *proAB lacI*^{q} *ZΔM15* Tn*10* (Tet') Amy Cam']) (*Agilent*): soj pogodan za transformaciju velikih molekula DNA visokom efikasnošću zbog čega se koristi za stvaranje knjižnica plazmidne DNA. Soj nema gen *endA* koji kodira nespecifičnu endonukleazu čime se značajno povećava kvaliteta izolirane i pročišćene plazmidne DNA dok nedostatak rekombinaze kodirane genom *recA* osigurava stabilnost inserta. Soj se može koristiti i za plavo–bijelu selekciju ukoliko se koristi odgovarajući plazmid.[52]

3.1.12.2. Sojevi bakterije B. megaterium

***B. megaterium* DSM–32** (*DSMZ*): divlji tip bakterije *B. megaterium*.

3.1.13. Plazmidni vektori

ΔpET3a_tRNA$^{Ile}_{GAU}$: rekombinantni plazmidni vektor ΔpET3a u koji je ugrađen kodirajući slijed za izoakceptor tRNA$^{Ile}_{GAU}$ iz bakterije *B. megaterium*. Sintetski oligonukleotid koji se sastoji od T7–promotora na koji se direktno nastavlja kodirajući slijed za molekulu tRNA^{Ile} ukloniran je u ΔpET3a plazmidni vektor između restrikcijskih mjesta *Sal*I i *Bam*HI. Za selekciju bakterija *E. coli* koje su primile rekombinanti plazmid korišten je ampicilin koncentracije $\gamma = 100\ \mu g\ mL^{-1}$. Rekombinanti plazmid ljubazno mi je ustupio Vladimir Zanki, mag. biol. mol.

pMGBm19_P$_{xylA}$_ileS2: rekombinanti plazmidni vektor pMGBm19 u koji je ugrađen kodirajući slijed za protein IleRS2 iz bakterije *B. megaterium*. Insert je ukloniran u *Nde*I i *Bam*HI restrikcijska mjesta pod kontrolom inducibilnog ksiloznog promotora (P_{xylA}). Rekombinantni plazmid ljubazno mi je ustupio Vladimir Zanki, mag. biol. mol.

pP$_{T7}$: plazmidni vektor koji ima dva ishodišta replikacije, iz bakterije *E. coli* i bakterije *B. megaterium* zbog čega se plazmid može umnažati u objema vrstama. Plazmid ima *repU* ishodište replikacije iz bakterije *B. megaterium* te mjesto za višestruko kloniranje između promotora kojeg prepoznaje T7–RNA–polimeraza i T7–terminatora te gene za antibiotsku rezistenciju na ampicilin (selekcija u bakteriji *E. coli*) i tetraciklin (selekcija u bakteriji *B. megaterium*). Za selekciju su korištene koncentracije antibiotika: γ (ampicilin) = 50–100 $\mu g\ mL^{-1}$ i γ (tetraciklin) = 5 $\mu g\ mL^{-1}$. T7–RNA–polimeraza vrlo je

selektivna i procesivna što može dovesti do znatne količine rekombinantog proteina u stanici pa tako čak 50 % ukupnih staničnih proteina može činiti rekombinatni protein.[53]

pT7–RNAP: plazmidni vektor koji ima ugrađen gen za T7–RNA–polimerazu pod inducibilnim ksiloznim (P_{xylA}) promotorom. Plazmid ima dva ishodišta replikacije, iz bakterije *E. coli* i bakterije *B. megaterium* zbog čega se može umnažati u objema vrstama, a isto tako ima i gene za antibiotsku rezistenciju na ampicilin (selekcija u bakteriji *E. coli*) i kloramfenikol selekcija u bakteriji *B. megaterium*). Za selekciju su korištene koncentracije antibiotika: γ (ampicilin) = 50–100 μg mL^{-1} i γ (kloramfenikol) = 4,5 μg mL^{-1}. Plazmid pT7–RNAP koristi se u kombinaciji s plazmidom pP_{T7} što je moguće s obzirom da plazmid pT7–RNAP sadrži *repM100* ishodište replikacije, različito od onog u plazmidu pP_{T7}. Za korištenje ovog sustava za prekomjernu ekspresiju potrebno je da se s oba plazmida kotransformira bakterija *B. megaterium* ili da se rekombinantnim plazmidom pP_{T7} transformiraju bakterijske stanice *B. megaterium* koje su prethodno transformirane plazmidom pT7–RNAP. Dodatkom ksiloze (finalno γ = 5 g dm^{-3}) inducira se ekspresija T7–RNA–polimeraze koja zatim vrlo selektivno prepoznaje T7–promotor i dolazi do transkripcije rekombinantnog gena pod kontrolom T7–promotora.[53]

pMGBm19: plazmidni je vektor koji ima mjesto za višestruko kloniranje pod kontrolom inducibilnog ksiloznog (P_{xylA}) promotora. Represor XylR veže se na operator *xylA* i onemogućava ekspresiju gena pod kontrolom tog promotora. D–ksiloza veže se na represor XylR što uzrokuje konformacijsku promjenu represora i posljedično njegovu disocijaciju s operatora *xylA* čime se omogućava vezanje bakterijske RNA–polimeraze i ekspresija gena pod kontrolom spomenutog promotora, stoga se ekspresija inducira dodatkom D–ksiloze (finalno γ = 5 g dm^{-3}). Plazmid pMGBm19 sadrži 2 ishodišta replikacije koja mu omogućavaju umnažanje u bakterijama *E. coli* i *B. megaterium* te nosi gene za antibiotsku rezistenciju na ampicilin (selekcija u bakteriji *E. coli*) i kloramfenikol (selekcija u bakteriji *B. megaterium*).[54]

pMMEc4: plazmidni je vektor koji nosi gen *xylR* koji kodira represor XylR koji se veže na operator *xylA* i inhibira ekspresiju gena pod kontrolom promotora P_{xylA}. Svi rekombinatni plazmidi kojima se transformira bakterija *B. megaterium* prvo se umnažaju *in vivo* u bakteriji *E. coli* kako bi se dobila dovoljna količina plazmida za transformaciju bakterije

B. megaterium. Promotor P_{xylA} nije potpuno utišan u bakteriji *E. coli*, nego dolazi do određene razine ekspresije gena pod kontrolom tog promotora čak i bez dodatka induktora (tzv. bazalna ekspresija). Ukoliko je protein kojeg kodira gen ukloniran u rekombinatni plazmid toksičan za bakteriju *E. coli*, umnažanje neće biti moguće jer će bakterijske stanice početi umirati. Bazalna ekspresija gena pod promotorom P_{xylA} dodatno se može smanjiti prekomjernom ekspresijom represora XylR. U plazmidu pMMEc4 gen za XylR nalazi se pod inducibilnim arabinoznim promotorom P_{BAD} koji se aktivira vezanjem proteina AraC u prisutnosti arabinoze, stoga se dodatkom arabinoze (finalno $\gamma = 2$ g dm^{-3}) inducira ekspresija gena *xylR* i posljedično smanjuje bazalna ekspresija gena pod promotorom P_{xylA}. Plazmid pMMEc4 sadrži gen za rezistenciju na antibiotik kloramfenikol te sadrži p15A ishodište replikacije zbog čega se može umnažati u bakteriji *E. coli* zajedno sa plazmidnim vektorom pP_{T7} koji sadrži drugo ishodište replikacije.[55]

Plazmidni vektori za bakteriju *B. megaterium* poklon su od Dr. Rebekka Biedendieck.

3.2. Metode

3.2.1. Metode rada s bakterijama

3.2.1.1. Priprema elektrokompetentnih bakterijskih stanica E. coli

Elektrokompetentne stanice su stanice koje su pogodne za unos strane DNA metodom elektroporacije (elektroporacija je opisana u odjeljku 3.2.1.2.). Takve stanice moraju biti dobro isprane od hranjivog medija i soli kako bi se spriječilo iskrenje i samim time ubijanje bakterijskih stanica tijekom procesa elektroporacije. Tijekom pripreme elektrokompetentnih stanica svi koraci su rađeni u sterilnim uvjetima, u laminaru uz šušteći plamen. Prvo je uzgojena prekonoćna kultura bakterije *E. coli* soj BL21(DE3) u LB mediju (sastav opisan u odjeljku 3.1.5.). Zasićena prekonoćna kultura razrijeđena je 100 puta pa je tako za inokulaciju 500 mL LB medija korišteno 5 mL zasićene prekonoćne kulture. Stanice su zatim uzgajane na 37 ˚C uz protresanje od 200 okretaja u minuti (engl. *revolutions per minute*, rpm) do vrijednosti optičke gustoće pri $\lambda = 600$ nm (OD_{600}) u rasponu 0,4–0,6. Vrijednosti $OD_{600} = 0{,}4–0{,}6$ ukazuju da se bakterije nalaze u eksponencijalnoj fazi rasta kad su metabolički najaktivnije. Zatim su stanice ohlađene na 4 ˚C te istaložene centrifugiranjem pri 5000 g i 4 ˚C u trajanju od 10 minuta. Nakon početnog taloženja, stanice su resuspendirane u 250 mL sterilnog i ohlađenog glicerola

(φ = 10 %). Stanice su ponovno istaložene na isti način. Drugi put su stanice isprane s 50 mL glicerola (φ = 10 %). Zatim su stanice još dva puta isprane s 25 mL glicerola (φ = 10 %). Finalno su stanice resuspendirane u 4,5 mL glicerola (φ = 10 %) te su pripravljeni alikvoti od 50 μL koji su pohranjeni na –80 ˚C.

3.2.1.2. Transformacija bakterije E. coli elektroporacijom

Elektoporacija je jedna od metoda za unos strane DNA u bakterijsku stanicu, a temelji se na korištenju kratkih električnih pulseva visokog napona koji stvaraju pore u staničnoj stijenci bakterija i time povećavaju permeabilnost stijenke čime se omogućava ulazak strane DNA. Za elektroporaciju je korišten uređaj *MicroPulser* (*Bio–Rad*), a primijenjen je električni puls od 2,5 kV i kapacitet od 25 μF u trajanju od 4–6 ms te je korišten uređaj za nadzor pulsa s otporom od 200 μΩ (*Pulse Contoller*, *Bio–Rad*). Budući da je elektroporacija efikasnija na nižim temperaturama (0–4 ˚C), elektrokivete i držač za elektrokivete prethodno su ohlađeni na –20 ˚C. Sojevi bakterije *E. coli* korišteni za elektrotransformaciju su: BL21(DE3), BL21(DE3) Rosetta, XL10–Gold i NovaBlue.

U alikvot elektrokompetentnih stanica bakterije *E. coli* (V = 50 μL) (priprema elektrokompetentnih bakterijskih stanica opisana je u odjeljku 3.2.1.1.) dodan je plazmid (m = 1–2 ng) kojim se želi transformirati stanica. Zatim je tako pripravljena suspenzija prebačena u ohlađenu elektrokivetu te je primijenjen električni puls. Nakon elektroporacije, stanice su resuspendirane u LB mediju (V = 900 μL) te su inkubirane do 1,5 h na 15, 30 ili 37 ˚C i 350 rpm. Nakon inkubacije, volumeni bakterija 50 i 850 μL razmazani su na kruti hranjivi LB medij koji je sadržavao odgovarajući antibiotik te su bakterije inkubirane preko noći na 15, 30 ili 37 ˚C. Budući da plazmidi nose gen za rezistenciju na antibiotik, na hranjivim pločama će narasti samo one bakterije koje su uspješno transformirane plazmidnom DNA.

3.2.1.3. Kemijska transformacija bakterije E. coli

Kemijska transformacija metoda je za transformaciju bakterijskih stanica stranom DNA, a temelji se na temperaturnom šoku čime se povećava propusnost stanične stijenke bakterija i omogućava ulazak strane DNA u stanicu. Sojevi bakterije *E. coli* koji su kemijski transformirani su: XL10–Gold i NEB Stable.

Kemijski kompetentnim stanicama dodano je 5 μL ligacijske smjese nakon čega su stanice inkubirane na ledu 30 min. Nakon inkubacije, stanice su povrgnute temperaturnom šoku u trajanju od 30 s na 42 ˚C nakon čega su inkubirane na ledu 2 min. Zatim je stanicama dodano 500 μL LB medija te su inkubirane 45 min na 350 rpm i 30 ili 37 ˚C. Poslije inkubacije, alikvoti od 50 i 450 μL bakterijskih stanica su razmazani na krute LB hranjive podloge s odgovarajućim antibiotikom te inkubirane preko noći na 30 ili 37 ˚C.

3.2.1.4. Priprema protoplasta i transformacija bakterije B. megaterium

Bakterija *B. megaterium* pripada skupini Gram–pozitivnih bakterija čija je stanična stijenka građena od debelog sloja peptidoglikana. Da bi transformacija bakterije *B. megaterium* bila moguća, potrebno je peptidoglikansku staničnu stijenku enzimski razgraditi pri čemu nastaju protoplasti (bakterije bez stanične stijenke). Protoplasti su zbog nedostatka stanične stijenke izuzetno osjetljivi, stoga treba biti vrlo oprezan tijekom njihove pripreme. Stanična stijenka između ostalog daje čvrstoću i oblik bakterijskoj stanici pa će nakon razgradnje stanične stijenke inače izdužena bakterija *B. megaterium* postati okrugla što se može pratiti mikroskopom. Protoplasti *B. megaterium* i transformacija napravljeni su prema publiciranom postupku.[12]

Sastav svih otopina korištenih za pripremu protoplasta i transformaciju bakterije *B. megaterium* opisani su u odjeljku 3.1.7. Za pripremu protoplasta pripravljena je prekonoćna bakterijska kultura. Bakterije su uzgojene preko noći u LB mediju na 37 ˚C i 100 rpm. Zasićena prekonoćna kultura je razrijeđena 50 puta tako što je 50 mL LB medija inokulirano s 1 mL zasićene prekonoćne kulture. Nakon razrjeđenja, stanice su inkubirane na 37 ˚C i 250 rpm dok bakterijska kultura nije postigla vrijednost 1 optičke gustoće na λ = 578 nm (OD_{578}). Zatim su bakterijske stanice ohlađene na 4 ˚C te potom istaložene centrifugiranjem pri 2500 g na sobnoj temperaturi u trajanju od 15 min. Istaložene stanice su resuspendirane u 5 mL svježe pripremljenog SMMP medija te je u suspenziju dodano 100 μL lizozima (γ = 10 mg mL^{-1}) i smjesa je inkubirana na 37 ˚C uz lagano protresanje. Bakterijske stanice su inkubirane u prisutnosti lizozima dok 80–90 % bakterija nisu postali protoplasti (nastajanje protoplasta prati se mikroskopom). Novonastali protoplasti su istaloženi centrifugiranjem na 1300 g i sobnoj temperaturi u trajanju od 10 min. Nakon taloženja, pažljivo je uklonjen supernatant kojeg nije potrebno u potpunosti ukloniti kako se ne bi izgubio dio protoplasta. Protoplasti su resuspendirani u novih 5 mL SMMP medija te ponovno istaloženi

na isti način nakon čega je uklonjen supernatant. Protoplasti su finalno resuspendirani u 5 mL SMMP medija te je u suspenziju dodano 750 μL sterilnog glicerola (φ = 100 %). Suspenzija je lagano promiješana i alikvotirana po 500 μL te su alikvoti spremljeni na –80 ˚C.

Za transformaciju protoplasta *B. megaterium* potrebno je puno više strane DNA nego što je potrebno za transformaciju bakterije *E. coli* pa je tako za transformaciju protoplasta *B. megaterium* korišteno 4–5 μg plazmidne DNA. Plazmidna DNA dodana je u 500 μL protoplasta otopljenih na ledu te je smjesa zatim prebačena u 1,5 mL PEG–P otopine, lagano promiješana i inkubirana 2 min na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije u smjesu je dodano 5 mL SMMP otopine i lagano promiješano. Proplasti su istaloženi centrifugiranjem na 1300 g i sobnoj temeperaturi u trajanju od 10 minuta i odmah po taloženju je pažljivo uklonjen supernatant (kojeg nije potrebno u potpunosti ukloniti da se ne bi izgubili protoplasti jer oni nisu vidljivi u ovom dijelu protokola). Istaloženi protoplasti su resuspendirani u 500 μL SMMP otopine te su inkubirani prvih 45 min bez rotacije, nakon čega su inkubirani 45 min uz rotaciju od 300 rpm, a temperatura je cijelo vrijeme iznosila 30 ˚C. Neposredno prije kraja inkubacije pripravljeno je 2,5 mL CR5–top agara po transformaciji. Agar se ne smije previše ohladiti kako se ne bi skrutio, ali ne smije biti ni prevruć zbog osjetljivih protoplasta. Po završetku inkubacije, protoplasti su dodani u CR5–top agar, smjesa je promiješana i izlivena na kruti LB medij za bakteriju *B. megaterium* s dodanim odgovarajućim antibiotikom nakon čega su bakterije inkubirane na 30 ˚C do pojave bakterijskih kolonija na ploči (obično 2 dana).

3.2.1.5. Priprema glicerolskih bakterijskih kultura

Bakterijske kolonije za koje je pokazano da sadrže željeni plazmidni vektor pripravljene su kao glicerolske kulture. Zasićena prekonoćna bakterijska kultura u LB mediju s dodanim odgovarajućim antibiotikom ohlađena je na 4 ˚C te je tako ohlađena dobro resuspendirana u autoklaviranom glicerolu (finalno φ = 25 %) i zatim pohranjena na –80 ˚C.

3.2.2. Metode rada s DNA

3.2.2.1. Lančana reakcija polimerazom

Lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) metoda je za brzo i relativno jednostavno *in vitro* umnažanje određenog segmenta molekule DNA. Reakcija se

provodi uzastopnim ponavljanjem tri koraka, a broj ponavljanja najčešće iznosi 30–35 puta. Tri uzastopna koraka od kojih se PCR sastoji su: denaturacija, prilikom koje dolazi do razdvajanja lanaca dvolančane DNA molekule, sparivanje (engl. *annealing*) oligonukleotidnih početnica i molekule DNA koja se želi amplificirati pri čemu početnice omeđuju nukleotidni slijed koji se želi umnožiti i treći korak je produljivanje oligonukleotidnih početnica korištenjem termostabilne DNA–polimeraze. Korak početne denaturacije vremenski je duži od denaturacije u ponavljajućim koracima jer je vrlo važno da se u prvom koraku kalup potpuno denaturira. Završna elongacija je također duža od elongacije u ponavljajućim koracima da se osigura potpuna sinteza novonastalih DNA fragmenata. Teorijski se u svakom ciklusu PCR–a poveća broj molekula DNA dva puta, stoga bi nakon *n* ponovljenih ciklusa u reakcijskoj smjesi trebalo biti 2^n puta više željenog segmenta DNA u odnosu na početnu količinu.

PCR–om su umnoženi kodirajući sljedovi za protein IleRS1 i $tRNA^{Ile}$. Za optimizaciju uvjeta PCR–a korištena je *Taq*–DNA–polimeraza, a za reakciju kloniranja korištena je *Q5*–DNA–polimeraza visoke vjernosti s 3' → 5' egzonukleaznom aktivnošću koja joj omogućava da ispravi pogrešno umetnutu bazu tijekom sinteze novog lanca. Volumen reakcijske smjese iznosio je 25 μL u optimizaciji reakcijskih uvjeta, odnosno 50 μL u slučaju optimizirane reakcije. Reakcijska smjesa za optimizaciju pripravljena je u redestiliranoj vodi, a sadržavala je: pufer za *Taq*–DNA–polimerazu (c (Tris–HCl) = 10 mmol dm^{-3}, c (KCl) = 50 mmol dm^{-3}, pH = 8,3), c (dNTP) = 0,2 mmol dm^{-3}, c ($MgCl_2$) = 1,5 mmol dm^{-3}, c (odgovarajuće početnice) = 0,5 μmol dm^{-3}, *Taq*–DNA–polimeraza (0,02 U^2 μL^{-1}). Reakcijska smjesa za umnažanje ciljnih slijedova s optimiranim uvjetima pripravljena je u redistiliranoj vodi, a sadržavala je: pufer za *Q5*–DNA–polimerazu (c ($MgCl_2$) = 2 mmol dm^{-3}), c (dNTP) = 0,2 mmol dm^{-3}, c (odgovarajuće uzvodne početnice) = c (odgovarajuće nizvodne početnice) = 0,5 μmol dm^{-3}, *Q5*–DNA–polimerazu (0,02 U^3 μL^{-1}). Za umnažanje gena *ileS*1 korišteno je 100 ng genomske DNA iz bakterije *B. megaterium* te su korištene početnice BM1_cp_ileS_4G_F i BM1_cp_ileS_R za kloniranje spomenutog gena u plazmidni vektor pMGBm19, odnosno

[2] U (engl. *unit*): jedinica koja je definirana kao količina *Taq*–DNA–polimeraze koja će ugraditi 15 nmol dNTP–a u polinukleotidni lanac u 30 minuta na 75 ˚C

[3] U (engl, *unit*): jedinica koja je definirana kao količina *Q5*–DNA–polimeraze koja će ugraditi 10 nmol dNTP–a u polinukleotidni lanac u 30 minuta na 74 ˚C

početnice BM_ileS1_F i BM1_cp_ileS_R za kloniranje gena *ileS1* u plazmidni vektor pP_{T7} (nukleotidni slijed početnica naveden je u tablici 3.1.). Gen za molekulu $tRNA^{Ile}$ umnožen je korištenjem pP_{T7}_tRNAIle_F i pP_{T7}_tRNAIle_R početnica (nukleotidni slijed početnica naveden je u tablici 3.1.) s ΔpET3a plazmida koji je sadržavao prethodno ukloniran gen za molekulu $tRNA^{Ile}$. Uspješnost PCR–a provjerena je elektroforezom na gelu 1 % agaroze.

Tablica 3.1. Nukleotidni slijed početnica korištenih za umnažanje kodirajućih slijedova za protein IleRS1 i molekulu $tRNA^{Ile}$ lančanom reakcijom polimeraze uz pripadajuće T_m vrijednosti i udio GC parova te temperaturu sljepljivanja (T_a) korištenu u reakciji. Stršeći krajevi početnica su podebljani, slijed koji kodira 4 uzastopna glicina označen je tirkiznom bojom te su pojedina restrikcijska mjesta također označena bojama: G▼GATCC – *Bam*HI, A▼CTAGT – *Spe*I, C▼TCGAG – *Xho*I, G▼CTAGC – *Nhe*I.

Naziv početnice	Nukleotidni slijed (5' → 3')	GC %	T_m/ °C	T_a/ °C
BM1_cp_ileS_4G_F	**GAGAGAGACTAGTGGAGGAGGAGGA**ATGGAATATAAAGATACATTATTGATGCC	28	60	61
BM1_cp_ileS_R	**GAGAGAGGATCCGGTCTCATTAATTAATGATGATGGTGATGATG**CTGCTGAACGTAGTGATTTTTTAC	38	62	61 64
BM_ileS1_F	**GAGAGAGGCTAGC**ATGGAATATAAAGATACATTATTGATGCC	30	61	64
pP_{T7}_$tRNA^{Ile}$_F	**GAGAGAGCTCGAG**TAAGTGCGGCGACGATAG	56	64	61
pP_{T7}_$tRNA^{Ile}$_R	**GAGAGAGACTAGT**CGGATATAGTTCCTCCTTTCAG	45	62	61

Tablica 3.2. Uvjeti pri kojima je proveden PCR za umnažanje kodirajućih slijedova za protein IleRS1 i molekulu $tRNA^{Ile}$.

	***T*/ °C**	**Trajanje**
Početna denaturacija	98	1 min
Denaturacija	98	10 s
Sparivanje početnica	61–64	20 s
Elongacija	72	1,5 min
Finalna elongacija	72	2 min

3.2.2.2. Ciljana mutageneza

Ciljana mutageneza metoda je koja se koristi za specifičnu, ciljanu promjenu u nukleotidnom sastavu dvolančanih DNA molekula. Ciljanom mutagenezom može se napraviti insercija,

delecija ili zamjena jednog ili više nukleotida. U ovom radu, ciljanom mutagenezom su zamijenjena dva uzastopna nukleotida čime je *Afl*II restrikcijsko mjesto promijenjeno u *Xho*I u plazmidu pP_{T7} pogodnom za prekomjernu ekspresiju proteina u bakteriji *B. megaterium*. Zamjena nukleotida napravljena je lančanom reakcijom polimeraze u kojoj su korištene početnice koje su sadržavale željene točkaste mutacije. Produkt takve reakcije je linearni plazmid sa stršećim krajevima koji sadrži željene promjene. Kako bi se osigurala uspješna transformacija bakterija mutiranim plazmidom, izvorni plazmid koji služi kao kalup u PCR–u potrebno je ukloniti. Izvorni, nemutirani plazmid je *in vivo* sintetiziran i metiliran zbog djelovanja Dam metilaze te ga je moguće razgraditi koristeći enzim *Dpn*I, restrikcijsku endonukleazu koja cijepa hemimetiliranu i metiliranu DNA pri čemu će novosintetizirani, mutirani plazmid ostati očuvan. Reakcijskom smjesom se transformiraju bakterije iz kojih se potom izolira plazmida DNA. Budući da se u ovom slučaju ciljanom mutagenezom uvodi novo restrikcijsko mjesto (*Xho*I) moguće je restrikcijskom razgradnjom provjeriti je li ciljana mutageneza bila uspješna.

Reakcijska smjesa pripravljena je u ultračistoj vodi, a sadržavala je: HF pufer za *Phusion*–DNA–polimerazu, c (dNTP) = 0,2 mmol dm^{-3}, c ($MgCl_2$) = 2,5 mmol dm^{-3}, c (odgovarajuće početnice) = 140 nmol dm^{-3}, *Phusion*–DNA–polimeraza (0,032 U μL^{-1}), pP_{T7} plazmid (m = 20 ng). Ciljana mutageneza je zbog visokih T_m vrijednosti početnica (vrijednost navedena u tablici 3.4.) napravljena PCR–om u dva koraka (engl. *two–step* PCR) u kojem su koraci prianjanja početnica i produljenja polinukleotidnog lanca spojeni u jedan korak. Početna denaturacija napravljena je na 98 ˚C u trajanju od 1 min, zatim je napravljeno 28 ciklusa koji su se sastojali od denaturacije (15 s na 98˚C) i drugog koraka koji uključuje prianjanje početnica i produljenje polinukleotidnog lanca (5 min na 72 ˚C) te finalna elongacija na 72 ˚C u trajanju od 6 minuta.

Tablica 3.3. Nukleotidni slijed početnica korištenih za ciljanu mutagezu plazmida pP_{T7} s pripadajućim T_m vrijednostima. Žutom su bojom istaknuti nukleotidi koji promijenjeni ciljanom mutagenezom kako bi se *Afl*II restrikcijsko mjesto promijenilo u *Xho*I. Restrikcijsko mjesto C▼TCGAG koje prepoznaje endonukleaza *Xho*I označeno je zelenom bojom.

Naziv početnice	**Nukleotidni slijed (5' → 3') početnice**	**T_m/ ˚C**
pPT7_XhoI_S	AAGGCTTTTAAGCCGTCTGTACGTTCCTCGAGGCG AAATTAATAC	74
pPT7_XhoI_A	GTATTAATTTCGCCTCGAGGAACGTACAGACGGC TTAAAAGCCTT	74

3.2.2.3. Pročišćavanje DNA

Pročišćavanje DNA je napravljeno prema uputama proizvođača koristeći komercijalno dostupan komplet za pročišćavanje DNA, *QIAquick PCR Purification Kit* (*Qiagen*).

3.2.2.4. Određivanje koncentracije DNA

Koncentracija DNA u uzorku određena je spektrofotometrijski na uređaju *NanoDrop* 1000. Na uređaj koji je prethodno nuliran puferom u kojem je otopljena DNA, naneseno je 2 μL uzorka te je mjerenjem apsorbancije (A) pri λ = 260 nm određena koncentracija DNA. Mjerenje apsorbacije je napravljeno i na valnim duljinama od 230 i 280 nm kako bi se odredila čistoća DNA u uzorku. Omjer $A_{260/280}$ daje informaciju o onečišćenju uzorka ribonukleinskim kiselinama, a $A_{260/230}$ o onečišćenju uzorka organskim otapalima. DNA je prihvatljive čistoće ukoliko je vrijednost $A_{260/280}$ veća od 1,8, a vrijednost $A_{260/230}$ veća od vrijednosti $A_{260/280}$. Instrument može izmjeriti koncentracije dvolančane DNA u rasponu 2–3700 ng μL^{-1}.

3.2.2.5. Elektroforeza nukleinskih kiselina na agaroznom gelu

Elektroforeza na agaroznom gelu široko je rasprostranjena metoda za razdvajanje fragmenata DNA veličine od 100 do 25 000 pb. Svaka fosfatna skupina u molekuli DNA ima naboj –1, stoga će omjer naboja i mase u bilo kojoj molekuli DNA biti jednak i iznosit će –2 po paru nukleotida pri pH = 7. Zbog ukupnog negativnog naboja, DNA će se kretati prema pozitivnom električnom polu tijekom elektroforeze. Brzina kretanja molekula u elektroforezi ovisi o veličini i obliku molekule. Budući da je omjer naboja i mase jednak za svaku molekulu DNA neovisno o veličini molekule, moguće je linearne fragmente različitih duljina razdvajati u električnom polju isključivo na temelju razlike u masi, tj. veličini. Molekule jednake molekulske mase gibat će se različito ovisno o formi pa će se tako superzavijene molekule gibati najbrže, linearne nešto sporije, a relaksirane cirkularne molekule gibat će se najsporije. Elektroforezom na agaroznom gelu razdvajaju se fragmenti DNA korištenjem vanjskog električnog polja, a agarozni gel služi kao molekulsko sito kojim se osigurava da se veće molekule gibaju sporije. Ovisno o apsolutnoj i relativnoj veličini fragmenata može se pripremiti agarozni gel s različitim udjelom agaroze.

Agarozni gelovi (1 % *w*/*V* agaroza) pripremljeni su otapanjem 3 g agaroze u 300 mL pufera TAE (c (Tris) = 40 mmol dm^{-3}, c (EDTA) = 1 mmol dm^{-3} titrirana ocetnom kiselinom do pH = 8,0). Smjesa pufera TAE i krute agaroze stavljena je u tikvicu i zatim u mikrovalnu pećnicu. Smjesu je potrebno zagrijavati nekoliko minuta pri P = 600 W. Važno je da se sva agaroza otopi. Kad se sva agaroza otopi, tikvica se izvadi iz mikrovalne pećnice i otopina se zatim nalije u kadicu s češljevima koji služe za formiranje jamica. Nakon što se gel skruti, pažljivo se izvade češljići, gel se izreže na 4 jednaka dijela i pohrani u puferu TAE.

Prije nanošenja na gel, uzorci DNA su pomiješani s puferom za nanošenje (γ (ksilencijanolfluorofosfat) = 2 g dm^{-3}, γ (bromfenolno plavilo) = 2,5 g dm^{-3}, boja *GelRed* razrijeđena 10 000 ×, c (EDTA) = 0,07 mol dm^{-3}, φ (glicerol) = 30 %, pH = 8,0). Elektroforeza je napravljena u puferu TAE pri naponu od 120 V na sobnoj temperaturi koristeći uređaj za horizontalnu elektroforezu *Sub Cell GT Cell* (*Bio–Rad*). Kao standard veličine korišten je *GeneRuler 1 kb DNA Ladder*.

3.2.2.6. Izolacija plazmidne DNA

Za izolaciju plazmidne DNA iz bakterije *E. coli* korišten je komercijalno dostupan komplet *QIAprep Spin Miniprep Kit* (*Qiagen*) te je izolacija napravljena prema uputama proizvođača.

3.2.2.7. Razgradnja DNA restrikcijskim endonukleazama

Restrikcijske endonukleaze su enzimi koji hidroliziraju fosfodiestersku vezu u DNA, bakterije ih prirodno posjeduju te služe bakteriji za obranu od strane DNA. Nakon što prepoznaju specifični nukleotidni slijed u molekuli DNA, endonukleaze mogu hidrolizirati fosfodiestersku vezu unutar sekvence koju prepoznaju ili na nekom udaljenijem mjestu u polinukleotidnom lancu. Klasificiraju se u 4 skupine na temelju: građe podjedinica, pozicije na kojoj cijepaju DNA, specifičnosti sekvence koju prepoznaju te potrebe za kofaktorom. Restrikcijske endonukleaze tipa II prepoznaju palindromske sljedove veličine 4–8 nukleotida i cijepaju fosfodiestersku vezu polinukleotida unutar sekvence koju prepoznaju pri čemu nastaju stršeći ili tupi krajevi molekule DNA. Budući da endonukleaze cijepaju palindromske sljedove, stršeći krajevi nastali djelovanjem iste endonukleaze bit će komplementarni te su zbog toga ovi enzimi iskorišteni u genetičkom inženjerstvu za stvaranje rekombinantne DNA. Za razgradnju plazmidnog vektora i PCR produkta korištene su sljedeće restrikcijske endonukleaze:

1. *BamH*I i *Spe*I – za razgradnju IleRS1_4G PCR produkta i pMGBm19 plazmidnog vektora
2. *Xho*I i *Spe*I – za razgradnju $tRNA^{Ile}$ PCR produkta i pP_{T7}_XhoI plazmidnog vektora
3. *BamH*I i *Nhe*I – za razgradnju IleRS1 PCR produkta, odnosno *BamH*I i *Spe*I za razgradnju pP_{T7} plazmidnog vektora (*Nhe*I i *Spe*I su izokaudomeri što znači da stvaraju jednake stršeće krajeve)
4. *Xho*I i *BamH*I za razgradnju pP_{T7}_XhoI plazmidnog vektora (*Sal*I i *Xho*I su izokaudomeri) koji je onda ligiran sa sintetskim oligonukleotidom $tRNA^{Ile}$ koji sadrži *Sal*I i *Bam*HI stršeće krajeve

a) TCGACTAATACGACTCACTATAGGGCCTATAGCTCAGCTGGTTAGAGCGCA
CGCCTGATAAGCGTGAGGTCGGTGGTTCGAGTCCACTTAGGCCCACCAG

b) GATCCTGGTGGGCCTAAGTGGACTCGAACCACCGACCTCACGCTTATCAGG
CGTGCGCTCTAACCAGCTGAGCTATAGGCCCTATAGTGAGTCGTATTAG

Slika 3.1. a) Nukleotidni slijed kodirajućeg lanca sintetskog oligonukleotida koji sadrži kodirajući slijed za $tRNA^{Ile}$ (označeno crvenom bojom), T7–promotor (označeno plavom bojom) te sršeće krajeve: *Sal*I (označeno sivom bojom) i *Bam*HI (označeno narančastom bojom); b) komplementarni lanac s istim oznakama. Slijed nukleotida oba lanca prikazan je u 5' → 3' smjeru.

Reakcijske smjese ukupnog volumena 50 μL sadržavale su: *CutSmart, NEB 2.1* ili *NEB 3.1* pufer, restrikcijski enzim (400–800 U[4] mL^{-1}) te DNA koja se želi razgraditi (m = 1–3 μg). Reakcijske smjese su inkubirane 3,5–4 h na 37 ˚C. Nakon razgradnje restrikcijski su enzimi termički inaktivirani na temperaturi od 65 ˚C (*Xho*I, *Nhe*I) ili 80 ˚C (*Spe*I) u trajanju od 20 min. Enzim *BamH*I ne može se termički inaktivirati. Ukoliko je istovremeno rađena razgradnja s dva enzima koji se ne mogu inaktivirati na istoj temperaturi, enzimi su inaktivirati na temperaturi na kojoj se inaktivira enzim s višom temperaturom za inaktivaciju. Po potrebi je plazmidni vektor defosforiliran korištenjem alkalne fosfataze (rSAP) iz škampa

[4] U (engl. *unit*) je jedinica aktivnosti koja se definira kao količina enzima potrebna da se razgradi 1 μg DNA faga λ u sat vremena na 37 ˚C u reakcijskom volumenu od 50 μL za enzim *Bam*HI, odnosno 1 μg DNA faga λ prethodno razgrađenu enzimom *Hind*III pri istim uvjetima za enzime *Nhe*I i *Xho*I, a za *Spe*I kao količina enzima potrebna za se razgradi 1 μg pXba-XbaI DNA pri istim reakcijskim uvjetima.

aktivnosti 0,02 U[5] μL^{-1} 30 minuta prije kraja restrikcijske razgradnje te je nakon dodatka rSAP–a nastavljena inkubacija na 37 ˚C. Plazmidi i inserti su nakon razgradnje i termičke inaktivacije restrikcijskih enzima pročišćeni komercijalno dostupnim kompletom *QIAquick PCR Purification Kit* (*Qiagen*). Za provjeru uspješnosti razgradnje uzet je alikvot reakcijske smjese po završetku reakcije te je analiziran elektroforezom na agaroznom gelu. Puferi korišteni za pojedini restrikcijski enzim navedeni su u tablici 3.4. Ukoliko je pojedina razgradnja rađena s dva enzima koji nemaju maksimalnu aktivnost u istom puferu, svaki od enzima je korišten u puferu u kojem ostvaruje maksimalnu aktivnost, a nakon svake od razgradnji uzorak je bio pročišćen.

Tablica 3.4. Korišteni komercijalno dostupni puferi i restrikcijske endonukleaze koje u navedenim puferima ostvaruju maksimalnu aktivnost.

Restrikcijska endonukleaza	**Pufer**
*BamH*I	*NEBuffer* 3.1
*Spe*I	*CutSmart* i *NEBuffer* 2.1
*Xho*I	*CutSmart*
*Nhe*I	*NEBuffer* 2.1

3.2.2.8. Ligacija fragmenata DNA

Za stvaranje rekombinantne DNA prvo je potrebno djelovanjem restrikcijskih endonukleaza stvoriti komplementarne stršeće krajeve na plazmidnom vektoru i insertu, nakon čega je potrebno fosfodiesterskom vezom povezati plazmid i insert. Ligaze su enzimi koji kataliziraju stvaranje fosfodiesterske veze između dva nukleotidna lanca od kojih jedan ima fosfatnu skupinu na 5'–kraju, a drugi hidroksilnu skupinu na 3'–kraju pri čemu dolazi do utroška jedne molekule ATP–a. U ovom istraživanju je korištena *T4*–DNA–ligaza koja katalizira navedenu reakciju u 3 koraka pa tako u prvom koraku amino skupina bočnog ogranka lizina nukleofilno napada molekulu ATP–a pri čemu se otpušta PP_i, u drugom koraku AMP se prenosi na fosfatnu skupinu na 5'–kraju nukleotidnog lanca koju zatim nukleofilno napada –OH skupina s 3'–kraja drugog lanca pri čemu dolazi do otpuštanja AMP–a i formiranja fosfodiesterske veze.

[5] U (engl. *unit*) je jedinica aktivnosti koja se definira kao količina enzima potrebna da se hidrolizira 1 μmol *p*–nitrofenil fosfata u 1 min na 37 ˚C u volumenu reakcijske smjese od 1 mL

Reakcijske smjese pripravljene su u ultračistoj vodi, a sadržavale su: pufer za *T4*–DNA–ligazu (c (Tris–HCl) = 40 mmol dm^{-3}, c ($MgCl_2$) = 10 mmol dm^{-3}, c (DTT) = 10 mmol dm^{-3}, c (ATP) = 0,5 mmol dm^{-3}, pH = 7,8), 5 % (*w*/*V*) PEG–4000, T4–DNA–ligaze (0,2 U^6 μL^{-1}), te insert i plazmid u molarnom omjeru 5:1 ili 7:1. Ukupni volumen reakcijske smjese bio je 20 µL. Molarni omjeri inserta i vektora te mase plazmidnih vektora korištenih u ligaciji navedeni su u tablici 3.5. U ultračistu vodu prvo su dodani insert i plazmidni vektor te je smjesa inkubirana 5 min na 65 ˚C nakon čega je inkubirana 10–ak minuta na sobnoj temperaturi, potom su dodane ostale komponente i reakcijska smjesa je inkubirana 1 h na 22 ˚C. Za transformaciju kemijski kompetentnih stanica korišteno je 5 µL ligacijske smjese, odnosno 1,5–2 µL za transformaciju elektrokompetentnih stanica.

Tablica 3.5. Molarni omjeri inserta i plazmidnih vektora te količine plazmidnih vektora korištenih u ligaciji.

Insert	**Plazmidni vektor**	**Molarni omjer inserta i plazmida**	***m* (plazmidni vektor)/ ng**
ileS1_4G	pMGBm19	7:1	40
$tRNA^{Ile}$	pP_{T7}_XhoI	7:1	100
ileS1	pP_{T7}	5:1	50
$tRNA^{Ile}$ (sintetski)	pP_{T7}_XhoI	7:1	100

3.2.2.9. Lančana reakcija polimerazom na bakterijskim kolonijama

Lančana reakcija polimerazom na bakterijskim kolonijama (engl. *colony PCR*) jednostavna je metoda za utvrđivanje bakterijskih kolonija koje sadrže rekombinantni plazmid. Bakterije mogu prilikom transformacije primiti i prazan plazmid (bez inserta) zbog čega steknu antibiotsku rezistenciju i narastu na hranjivoj podlozi s dodanim odgovarajućim antibiotikom. Metoda je u suštini identična PCR–u (opisano u odjeljku 3.2.2.1.), jedina razlika je u duljini trajanja početne denaturacije koja je u ovoj metodi vremenski duža kako bi se bakterijske stanice rasprsnule što omogućava oslobađanja plazmidne DNA u otopinu.

Bakterijske kolonije analizirane PCR–om ponovno su uzgojene na novoj hranjivoj podlozi pri istim uvjetima kao i u inicijalnom uzgoju kako bi se sačuvale za kasniju analizu.

[6] U (engl. *unit*) je jedinica aktivnosti koja se definira kao količina enzima potrebna za 50 %–tnu ligaciju fragmenata DNA faga λ nastalih restrikcijskom razgradnjom enzimom *Hind*III

PCR na bakterijskim kolonijama napravljen je u ukupnom volumenu reakcijske smjese od 25 μL, korištena je *Taq*–DNA–polimeraza te je sastav smjese bio identičan opisan onom u odjeljku 3.2.2.1. Za određivanje bakterijskih kolonija koje sadrže kodirajući slijed za molekulu $tRNA^{Ile}$ korištene su iste početnice kao i u PCR–u u kojem je taj slijed umnažan, a za određivanje kolonija koje sadrže kodirajući slijed za protein IleRS1 korištene su početnice navedene u tablici 3.6. PCR–om su analizirane bakterijske kolonije za koje se htjelo utvrditi sadrže li kodirajući slijed za $tRNA^{Ile}$, odnosno za protein IleRS1 sa i bez tetraglicinskog privjeska na N–kraju koristeći odgovarajuće početnice. Inicijalna denaturacija trajala je 10 min na 95 ˚C u svim reakcijama dok je denaturacija u ciklusima trajala 30 s na 95 ˚C, prianjanje početnica je trajalo 30 s, a rađeno je pri 49 ili 50 ˚C, elongacija je napravljena na 72 ˚C te je trajala 1 ili 3,5 min, finalna elongacija je trajala 3–5 minuta. Rezultati PCR–a analizirani su elektroforezom na agaroznom gelu.

Tablica 3.6. Nukleotidni sljedovi početnica korištenih za lančanu reakciju polimerazom na bakterijskim kolonijama u svrhu određivanja kolonija koje sadrže kodirajući slijed za protein IleRS1.

Naziv početnice	**Nukleotidni slijed (5' → 3')**
xylR_seq	ATCCACCGAACTAAGTTGGTG
BM1_ileS1_R	CATTTTTTAGTGATGCAAGTCGTCATTGAGCTCGAGAGAG
BM_ileS1_seq3	GTCACCCGACTTTACTTATAAATAC

3.2.2.10. Restrikcijska analiza plazmidne DNA

Prije nego što je rekombinantni plazmid sekvenciran, restrikcijskom razgradnjom je provjereno sadrži li plazmid željeni kodirajući slijed. Teorijski se mogu izračunati veličine fragmenata koje će nastati restrikcijskom razgradnjom rekombinantnog plazmida i plazmida koji ne sadrži insert te se usporedbom teorijskih i eksperimentalnih podataka može zaključiti sadrži li pojedini plazmid željeni kodirajući slijed. Osim što se rekombinantni plazmid i plazmid bez inserta razlikuju po veličini, umetanjem inserta potencijalno se uvodi novo restrikcijsko mjesto koje onda može poslužiti za analizu rekombinantnog plazmida. Restrikcijskom razgradnjom provjerena je i uspješnost ciljane mutageneze plazmida pP_{T7}.

Restrikcijska razgradnja je napravljena u ukupnom volumenu reakcijske smjese od 20 μL sljedećeg sastava: odgovarajući pufer, 400 U mL^{-1} restrikcijske endonukleaze te 25–30 ng plazmida. Reakcijske smjese su inkubirane 3,5–4 h na 37 ˚C. Puferi te enzimi

korišteni za restrikcijsku razgradnju kao i veličina fragmenata nastalih razgradnjom navedeni su u tablici 3.7. Rezultati restrikcijske razgradnje provjereni su elektroforezom na 1 % (*w*/*V*) agaroznom gelu koristeći napon od 120 V u trajanju od 45 min.

Tablica 3.7. Rekombinanti plazmidi provjereni razgradnjom restrikcijskim endonukleazama s teorijski izračunatim veličinama fragmenata dobivenih razgradnjom.

Rekombinantni plazmid	**Restrikcijski enzim**	**Pufer**	**Veličina fragmenta/ pb**
pMGBm19_P_{xylA}_ileS2	*BamH*I + *Xho*I	NEB 3.1	5577+3695
pMGBm19_P_{xylA}_ileS2	*Hind*III	NEB 2.1	4710 + 2323 + 1631 + 539 + 69
pMGBm19_P_{xylA}_ileS2	*EcoR*I	NEB 2.1	5825 + 2460 + 987
pP_{T7}	*Xho*I + *Nco*I	NEB 3.1	3692 + 1550
pP_{T7}_XhoI	*Xho*I + *Nco*I	NEB 3.1	3181 + 1550 + 511
pP_{T7}_XhoI_$tRNA^{Ile}$	*Pvu*II	NEB 3.1	3383 + 1698 + 230 + 153
pP_{T7}_ileS1	*Nco*I	NEB 3.1	5153 + 1550 + 913 + 3993
pP_{T7}_XhoI_$tRNA^{Ile}$_2	*Pvu*II	NEB 3.1.	3221 + 1700 + 153 + 147

3.2.2.11. Sekvenciranje plazmidne DNA

Razgradnjom plazmida restrikcijskim endonukleazama i elektroforezom na agaroznom gelu može se utvrditi sadrži li plazmid željeni kodirajući slijed, ali se ne može utvrditi postoji li neka mutacija u kodirajućem slijedu pa se to provjerava sekvenciranjem. Sekvencirani su svi plazmidi koji su korišteni u istraživanju. Na sekvenciranje je poslano 20 μL plazmida (γ = 100–170 ng μL^{-1}) te 30 ili 50 μL otopine početnice (c = 10 μmol dm^{-3}) kojom se sekvencira. Nukleotidni sljedovi početnica korištenih za sekvenciranje navedeni su u tablici 3.8. Uzorci su poslani na sekvenciranje u DNA–servis tvrtke *Macrogen*.

Tablica 3.8. Nukleotidni sljedovi početnica korištenih za sekvenciranje kodirajućih slijedova ugrađenih u pojedinih plazmida.

Plazmid	Naziv početnice	Nukleotidni slijed (5' → 3') početnice
pP_{T7}_$tRNA^{Ile}$	pP_{T7}_$tRNA^{Ile}$_F	GAGAGAGCTCGAGTAAGTGCGGCGAC GATAG
pMGBm19_P_{xylA}_ileS2	xylR_seq	ATCCACCGAACTAAGTTGGTG
	BM_ileS1_seq1	GCGGTGCATGAAGAGATGAG
	BM_ileS1_seq2	CGATGCCGTTTGCACAGTATC
	BM_ileS2_seq4	GTCTTTCACTTGTGGTAACGG
pP_{T7}_ileS1	BM_ileS1_seq1	GCGGTGCATGAAGAGATGAG
	BM_ileS1_seq2	CGATGCCGTTTGCACAGTATC
	BM_ileS2_seq4	GTCTTTCACTTGTGGTAACGG
pP_{T7}_$tRNA^{Ile}$_2	ori_seq_Fw	TTGTTTGCCGGATCAAGAGC

3.2.3. Metode rada s proteinima

3.2.3.1. Prekomjerna ekspresija proteina od interesa

U ovom istraživanju homologno su nadeksprimirani proteini IleRS1 i IleRS2 za koje su korištena dva različita ekspresijska sustava u bakteriji *B. megaterium*. Kodirajući slijed za protein IleRS1 ukloniran je u plazmidni vektor pP_{T7}. Plazmid pP_{T7} koristi se u sustavu za prekomjernu ekspresiju proteina u bakteriji *B. megaterium*, a temelji se na RNA–polimerazi (RNAP) iz bakteriofaga T7. T7–RNA–polimeraza visoko je procesivni enzim i specifično se veže na T7–promotor, ali ne prepoznaje bakterijske promotore što ju čini pogodnom za proizvodnju rekombinantnih proteina. Zbog visoke transkripcijske aktivnosti T7–RNA–polimeraze, rekombinantni protein može činiti čak 50 % ukupnih staničnih proteina. Sustav za prekomjernu ekspresiju rekombinantnih proteina u bakteriji *B. megaterium* koji koristi T7–RNAP sastoji se od 2 plazmidna vektora od kojih jedan vektor (pT7–RNAP) sadrži gen za T7–RNAP, a drugi vektor (pP_{T7}) sadrži gen za protein od interesa. Gen za T7–RNAP nalazi se pod kontrolom promotora kojeg može prepoznati endogena bakterijska RNA polimeraza, a nakon promotora nalazi se operator na koji se veže protein XylR koji suprimira ekspresiju. Vezanjem ksiloze na protein XylR dolazi do konformacijske promjene represorskog proteina što dovodi do disocijacije proteina s operatorske sekvence čime se omogućava nesmetano djelovanje RNA–polimeraze i upravo se zbog toga ksiloza koristi za indukciju ekspresije proteina od interesa. Plazmidni vektori pT7–RNAP i pP_{T7} pripadaju skupini plazmida koji se mogu umnažati i u bakteriji *E. coli* i u bakteriji *B. megaterium* (engl. *shuttle*

vector) jer sadrže ishodišta replikacije koja mogu biti prepoznata u obje navedene bakterijske vrste. Osim toga, plazmid pT7–RNAP sadrži *repM100* ishodište replikacije iz bakterije *B. megaterium*, a plazmid pP_{T7} *repU* zbog čega se ta dva plazmida mogu paralelno umnažati u bakteriji *B. megaterium*. Selekcija bakterijskih kolonija koje su primile navedene plazmide radi se pomoću antibiotika. Oba plazmida nose gen potreban za rezistenciju na antibiotik ampicilin u bakteriji *E. coli*. Selekcija bakterijskih kolonija *B. megaterium* koje su primile željene plazmide također se radi antibiotikom jer plazmid pT7–RNAP nosi gen za rezistenciju na antibiotik kloramfenikol u bakteriji *B. megaterium*, a plazmid pP_{T7} nosi gen za rezistenciju na tetraciklin.[11]

Kodirajući slijed za protein IleRS2 ukloniran je u plazmidni vektor pMGBm19 direktno pod ksilozni promotor pa se dodatkom ksiloze inducira ekspresija gena koji kodira protein od interesa.[54]

Pripremljene su prekonoćne bakterijske kulture *B. megaterium* koje sadrže plazmide pP_{T7}_ileS1 i pT7–RNAP, odnosno plazmid pMGBm19_P_{xylA}_ileS2 u 50 mL LB medija za uzgoj bakterije *B. megaterium* (odjeljak 3.1.7.) s dodanim odgovarajućim antibiotikom. Bakterije su u hranjivom mediju uzgajane preko noći na 30 ˚C uz vrtnju od 200 rpm. Zasićene bakterijske kulture su razrijeđene u omjeru 1:25 u LB mediju volumena 150 mL s dodanim odgovarajućim antibioticima i $ZnCl_2$ (c = 0,1 mmol dm^{-3}) te je uzgoj nastavljen na 30 ˚C uz vrtnju od 250 rpm. Kad je dostignuta vrijednost OD_{578} = 0,3–0,4, započeta je indukcija dodatkom D–ksiloze (γ = 5 g dm^{-3}). Nakon 3 h indukcije, bakterijske stanice su oborene centrifugiranjem na 4 ˚C i 5 000 g u trajanju od 10 min.

3.2.3.2. Liza bakterijskih stanica B. megaterium

Talog bakterijskih stanica resuspendiran je na 4 ˚C u 3 mL pufera A za pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom (c (Hepes) = 20 mmol dm^{-3} (pH = 7,5), c (NaCl) = 500 mmol dm^{-3}, c ($MgCl_2$) = 5 mmol dm^{-3}, c (imidazol) = 10 mmol dm^{-3}, c (β–merkaptoetanol) = 10 mmol dm^{-3}). U smjesu resuspendiranih stanica dodan je PMSF (c = 0,1 mmol dm^{-3}), inhibitor serinskih proteaza kojim se štiti nadeksprimirani protein od proteolitičke aktivnosti proteaza te lizozim (γ = 5 mg mL^{-1}) koji razgrađujući staničnu stijenku olakšava lizu stanica i DNaza I (γ = 3 ng μL^{-1}). Kako bi se pospješilo djelovanje lizozima, smjesa je inkubirana 25 minuta na 30 ˚C uz vrtnju od 250 rpm nakon čega je stanični lizat centrifugiran 1 sat na 4 ˚C i 10 000 g. Poslije centrifugiranja, supernatant i talog su razdvojeni

te je supernatant korišten za pročišćavanje nadeskprimiranog proteina afinitetnom kromatografijom na Ni–NTA agarozi (odjeljak 3.2.4.3.).

3.2.3.3. Pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom na Ni–NTA agarozi

Nadeksprimirani proteini IleRS1 i IleRS2 pročišćeni su afinitetnom kromatografijom iz supernatanta dobivenog centrifugiranjem staničnog lizata. Korištena afinitetna kromatografija temelji se na interakciji dušikovih atoma iz bočnog ogranka histidina i Ni^{2+}–iona vezanog na stacionarnu fazu kolone. Nitrilotrioctena kiselina je tetradentatni kelirajući agens koji stvara 4 koordinativne veze s ionom Ni^{2+} dok dva koordinacijska mjesta u oktaedarskoj koordinacijskoj sferi Ni^{2+}–iona ostaju slobodna te se na njih mogu vezati dušici iz imidazolnih skupina histidina.[56,57] Kako bi se omogućilo pročišćavanje proteina od interesa, genetskim inženjeringom dodani su nukleotidi koji kodiraju 6 uzastopnih histidina na C–kraju proteina. Za ispiranje proteina vezanih na imobilizirani ion Ni^{2+} korišten je pufer s visokom koncentracijom slobodnog imidazola koji kompetira za vezanje na Ni^{2+}–ion i na taj način se ispire vezani protein s kolone. Kapacitet smole je 5–10 mg proteina po mL smole.[58]

Pročišćavanje proteina rađeno je na 4 ˚C u ledenici. Na kolonu je naneseno 0,3 mL (1 CV) agaroze koja je zatim isprana s 10 CV autoklavirane Mili–Q vode i ekvilibrirana s 13 CV pufera A (c (Hepes) = 20 mmol dm^{-3} (pH = 7,5), c (NaCl) = 500 mmol dm^{-3}, c ($MgCl_2$) = 5 mmol dm^{-3}, c (imidazol) = 10 mmol dm^{-3}, c (β–merkaptoetanol) = 10 mmol dm^{-3}). Proteinski ekstrakt dobiven nakon centrifugiranja staničnog lizata nanesen je na kolonu, a potom je nevezana frakcija koja je prošla kroz kolonu još dva puta nanesena na kolonu. Kolona je zatim isprana s 50 CV pufera A, a onda i s 15 CV pufera B (c (Hepes) = 20 mmol dm^{-3} (pH = 7,5), c (NaCl) = 500 mmol dm^{-3}, c ($MgCl_2$) = 5 mmol dm^{-3}, c (imidazol) = 20 mmol dm^{-3}, c (β–merkaptoetanol) = 10 mmol dm^{-3}). Potom je izlaz kolone zatvoren čepom, kolona je napunjena s 1,2 mL pufera D (c (Hepes) = 20 mmol dm^{-3} (pH = 7,5), c (NaCl) = 500 mmol dm^{-3}, c ($MgCl_2$) = 5 mmol dm^{-3}, c (imidazol) = 200 mmol dm^{-3}, c (β–merkaptoetanol) = 10 mmol dm^{-3}), inkubirana 5 minuta s puferom D nakon čega je skupljen eluat. Na kolonu je dodatno naneseno još 1,3 mL pufera D te je eluat isto tako skupljen. Ukupno je skupljeno 5 frakcija po 0,5 mL eluata pufera D. Skupljene frakcije analizirane su elektroforezom na poliakrilamidnom gelu u prisustvu natrijevog dodecilsulfata te nakon analize ukoncentrirane na centrikonu i pohranjene na –80 ˚C. Po završetku elucije proteina od interesa,

kolona je isprana redom s 2 CV otopine imidazola (c = 2 mol dm^{-3}), 30 CV Mili–Q vode, 10 CV EtoH (φ = 20 %) te je u konačnici pohranjena u EtOH (φ = 20 %) na 4 ˚C.

3.2.3.4. Ultrafiltracija

Frakcije proteina za koje je SDS–poliakrilamidnom gel elektroforezom pokazano da sadrže znatnu količinu proteina od interesa zadovoljavajuće čistoće skupljene su i potom ukoncentrirane ultrafiltracijom. Za ultrafiltraciju korišteni su ultrafiltratori *Amicon Ultra Centrifugal Filters* (*Milipore*) koji imaju pore kroz koje mogu proći proteini manji od 30 kDa. Otopina proteina od interesa stavljena je u ultrafiltrator i centrifugirana na 4 ˚C i 3000 g do željene koncentracije.

3.2.3.5. Gel–elektroforeza na poliakrilamidnom gelu uz prisutstvo natrijevog dodecilsulfata

Gel–elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u prisustvu natrijevog dodecilsulfata (engl. *sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electophoresis*, SDS–PAGE) široko je raširena metoda u biokemiji i srodnim znanostima koja se koristi za analizu proteina molekulske mase od 5 do 250 kDa. SDS–PAGE može se koristiti za provjeru ekspresije određenog proteina u stanici, određivanje molekulske mase proteina (uz poznatu kvaternu strukturu proteina), provjeru čistoće proteina. Budući da je ovo elektroforetska metoda, uzorak koji se želi analizirati stavlja se u vanjsko električno polje i zbog naboja samih molekula koje se analiziraju uzorak će se kretati prema pozitivnoj ili negativnoj elektrodi. U slučaju proteina, gibanje molekula u vanjskom električnom polju ovisi o ukupnom naboju, molekulskoj masi i obliku proteina. Natrijev dodecilsulfat anionski je deterdžent koji se veže na proteine i denaturira ih. Jedna molekula SDS–a veže se na dvije aminokiseline. Zbog velikog broja molekula SDS–a koje se vežu na protein, nastajanjem kompleksa SDS–protein, intrinzični naboj proteina postaje zanemariv. Zbog repulzivnih elektrostatskih interakcija između anionskih skupina SDS–a protein u kompleksu s SDS–om poprima izduženu konformaciju, stoga svi proteini u prisustvu SDS–a imaju jednak omjer mase i naboja. Jednak omjer mase i naboja i posljedično izdužena konformacija proteina u prisustvu SDS–a omogućavaju razdvajanje proteina pomoću SDS–PAGE metode isključivo na temelju molekulske mase proteina. Gel kao i kod agarozne

gel–elektroforeze ima ulogu molekulskog sita i omogućava fino razdvajanje proteina širokog raspona molekulskih masa.

Za provjeru uspješnosti i čistoće izoliranog nadeskprimiranog proteina korišteni su diskontinuirani gelovi, donji za razdvajanje proteina i gornji za sabijanje proteina. Gel za sabijanje bio je sastava: 4 % (*w*/*V*) akrilamid–bisakrilamid (29:1), *c* (Tris–HCl) = 125 mmol dm^{-3} (pH = 6,8), γ (SDS) = 1 g dm^{-3}, γ (APS) = 0,7 μg mL^{-1}, 0,05 % (*w*/*V*) TEMED, a gel za razdvajanje: 9 % (*w*/*V*) akrilamid–bisakrilamid (29:1), *c* (Tris–HCl) = 375 mmol dm^{-3} (pH = 8,8), γ (SDS) = 1 g dm^{-3}, γ (APS) = 0,7 μg mL^{-1}, 0,05 % (V/V) TEMED. APS i TEMED dodani su neposredno prije izlijevanja gela kako ne bi došlo do prijevremene polimerizacije. Nakon izlijevanja gela za razdvajanje, na vrh je dodana voda kako bi se onemogućila interakcija s atmosferskim kisikom koji inhibira polimerizaciju, a ujedno je i poravnat gornji rub gela. Nakon što je gel za razdvajanje polimerizirao (30–40 min), voda je izlivena, dodana je smjesa za gel za sabijanje te su umetnuti češljići za formiranje jamica. Proteini za analizu pomiješani su s puferom za nanošenje (*c* (Tris–HCl) = 62,5 mmol dm^{-3} (pH = 6,8), *c* (β–merkaptoetanol) = 12,5 mmol dm^{-3}, φ (glicerol) = 6,25 %, 1,25 % (*w*/*V*) SDS, 0,002 % (*w*/*V*) bromfenolno plavilo) te su zagrijavani 5 minuta na 100 ˚C kako bi se proteini denaturirali. Za elektroforezu korišten je uređaj *Mini–PROTEAN Tetra Cell* (*Bio–Rad*) i pufer sastava: γ (glicin) = 14,4 g dm^{-3}, γ (Tris–HCl) = 3,0 g dm^{-3} (pH = 8,3), γ (SDS) = 1,0 g dm^{-3}. Korišten je marker veličina *Precision Plus Protein Standards Unstained* (*Bio–Rad*). Elektroforeza je rađena na sobnoj temperaturi, prvo 15 minuta uz napon od 120 V u svrhu sabijanja proteina, zatim 45 minuta uz napon od 180 V radi razdvajanja proteina. Po završetku elektroforeze radi vizualizacije proteina na gelu, gel za razdvajanje inkubiran je na sobnoj temperaturi 20 minuta uz vrtnju u otopini boje *Coomassie Brilliant Blue R–250* (φ (CH_3COOH) = 10 %, φ (etanol) = 45 %, γ (*Coomassie Brilliant Blue R–250*) = 2,5 g dm^{-3}). Nespecifično vezana boja uklonjena je kuhanjem gela u vrućoj destiliranoj vodi.

3.2.3.6. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija pročišćenih proteina određena je spektrofotometrijski na uređaju *NanoDrop* 1000. Za određivanje koncentracije proteina potrebno je unijeti molarnu masu i ekstinkcijski koeficijent proteina. Molarna masa masa proteina IleRS1 iznosi 106 330,32 g mol^{-1}, ekstinkcijski koeficijent 172 120 dm^3 mol^{-1} cm^{-1}, a molarna masa proteina IleRS2 iznosi 119 206,74 g mol^{-1} dok ekstinkcijski koeficijent iznosi 184 040 dm^3 mol^{-1} cm^{-1}. Budući da su

proteini bili u puferu u kojem se nalazi β–merkaptoetanol, proteini su u reduciranom stanju, stoga su korišteni ekstinkcijski koeficijenti za reduciranu formu proteina. Uređaj je prvo nuliran puferom u kojem je otopljen protein te je potom naneseno 2 μL uzorka i mjerenjem apsorbancije pri λ = 280 nm određena je koncentracija proteina. Instrument može izmjeriti koncentraciju proteina u rasponu 0,10–100 mg mL^{-1}.

3.2.4. Metode rada s tRNA

3.2.4.1. Prekomjerna ekspresija $tRNA^{Ile}$ u bakterijama E. coli i B. megaterium te izolacija ukupne tRNA

Gen za molekulu $tRNA^{Ile}$ iz bakterije *B. megaterium* ukloniran je u pP_{T7} plazmid u kojem se navedeni gen nalazi pod kontrolom promotora iz bakteriofaga T7. Protoplasti *B. megaterium* kotransformirani su rekombinantnim plazmidnim vektorom pP_{T7}–$tRNA^{Ile}$ te plazmidom pT7–RNAP. Korištena su konstrukti pP_{T7}_$tRNA^{Ile}$ i pP_{T7}–$tRNA^{Ile}$_2, potonji sadrži jedan T7–terminator dok pP_{T7}_$tRNA^{Ile}$ sadrži dva uzastopna T7–terminatora. Zbog korištenog sustava (detaljnije opisano u odjeljku 3.2.3.1.), za indukciju je korištena D–ksiloza.

Prvo je pripremljena zasićena prekonoćna kultura bakterije *B. megaterium* koja je transformirana plazmidima pP_{T7}_$tRNA^{Ile}$ i pT7–RNAP u LB hranjivom mediju (za bakteriju *B. megaterium*) s dodanim antibioticima: tetraciklinom (γ = 5 μg mL^{-1}) i kloramfenikolom (γ = 4,5 μg mL^{-1}). Zasićena prekonoćna kultura uzgojena je na 30 ˚C uz protresanje od 150 rpm. Zasićena prekonoćna bakterijska kultura razrijeđena je 50 puta u 20 mL hranjivog LB medija s dodanim antibioticima nakon čega je nastavljen uzgoj bakterija na 30 ˚C uz protresanje od 250 rpm. Kad su bakterijske kulture dostigle OD_{578} = 0,3–0,4 indukcija je započeta dodatkom D–ksiloze te su uvjeti ostali isti kao i tijekom uzgoja. Tijekom optimizacije indukcije $tRNA^{Ile}$ u bakteriji *B. megaterium* isprobani su različiti uvjeti. Bakterije inducirane ksilozom (γ = 5 g dm^{-3}) analizirane su nakon 5 i 18 h od početka indukcije. Isprobana je indukcija različitim koncentracijama ksiloze u LB mediju: 10, 20, 50 g dm^{-3} te ksilozom (γ = 10 g dm^{-3}) u PM mediju, a uzorci su analizirani nakon 4, 18, 24, 40 h od početka indukcije. Također je isprobana indukcija ksilozom (γ = 5 i 20 g dm^{-3}), s dodanim $MgCl_2$ (c = 1; 2,5 i 5 mmol dm^{-3}) u LB mediju i ksilozom (γ = 5 i 20 g dm^{-3}) u minimalnom glukoznom mediju bez dodanog $MgCl_2$ te su svi navedeni uzorci analizirani nakon 12 h od početka indukcije. Sve

prethodno navedene indukcije su napravljene na 30 ˚C, a također je isprobana i indukcija ksilozom (γ = 5 g dm^{-3}) na 37 ˚C te su uzorci analizirani nakon 2; 3,5 i 12 h od početka indukcije. U konačnici je isprobana i indukcija ksilozom (γ = 5 g dm^{-3}) u LB mediju uz dodatak izoleucina finalnih koncentracija: 10, 100 i 1000 μmol dm^{-3}, a u jedan uzorak je uz Ile (c = 100 μmol dm^{-3}) dodan i $MgCl_2$ (c = 1 mmol dm^{-3}).

Prekomjerna ekspresija molekule $tRNA^{Ile}$ u bakteriji *E. coli* s plazmidnog vektora ΔpET3a napravljena je prema prethodno uspostavljenom protokolu u laboratoriju.[12] Uzgojena je zasićena prekonoćna kultura bakterije *E. coli* (soj BL21 (DE3)) transformirane plazmidom ΔpET3a u LB mediju s dodanim ampicilinom (γ = 100 μg mL^{-1}) na 37 ˚C uz protresanje od 250 rpm. Zasićena prekonoćna kultura razrijeđena je 100 puta u 500 mL tekućeg LB medija s dodanim ampicilinom (γ = 100 μg mL^{-1}) i $MgCl_2$ (c = 1 mmol dm^{-3}), zatim je nastavljen uzgoj pri istim uvjetima do OD_{600} = 0,45–0,55 nakon čega je indukcija započeta dodatkom IPTG–a (c = 1 mmol dm^{-3}) i nastavljena na 30 ˚C uz protresanje od 200 rpm u trajanju od 15 h.

Kako bi se provjerilo postoji li prekomjerna ekspresija molekule $tRNA^{Ile}$ u bakteriji *B. megaterium*, izolirana je ukupna bakterijska tRNA i analizirana elektroforezom na poliakrilamidnom gelu uz pristustvu uree. U željenim vremenskim intervalima od početka indukcije, bakterijske su stanice istaložene centrifugiranjem 10 minuta na sobnoj temperaturi pri 10 000 g. Istaložene stanice iz bakterijske kulture volumena 5 mL resuspendirane su u 500 μL pufera za izolaciju tRNA (c (Tris–HCl) = 10 mmol dm^{-3} (pH = 8,0) i c ($Mg(OAc)_2$) = 10 mmol dm^{-3}) s dodanim lizozimom (γ = 2 mg mL^{-1}) te su inkubirane 30 minuta na 37 ˚C uz protresanje od 400 rpm. Nakon inkubacije, dodan je 1 volumen fenola zasićenog vodom te je smjesa vorteksirana 6 puta po 30 sekundi, a između vorteksiranja je držana 30 sekundi na ledu. U svrhu odvajanja vodenog i fenolnog sloja, uzorak je centrifugiran 5 minuta pri 10 000 g na sobnoj temperaturi nakon čega je pipetom prikupljen gornji (vodeni) sloj u kojem se nalazi tRNA. U vodeni sloj zatim je dodan 1 volumen otopine fenol–kloroform (smjesa fenola zasićenog vodom i kloroforma u volumnom omjeru 1:1), smjesa je vorteksirana na prethodno spomenuti način, zatim je ponovno centrifugirana 5 min pri 10 000 g na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja je prikupljen gornji (vodeni) sloj (oko 500 μL). U vodeni sloj nakon ekstrakcije fenolom i fenol–kloroformom dodano je 1/10 volumena NaOAc (c = 3 mol dm^{-3}, pH = 4,5), smjesa je vorteksirana i potom su dodana 3 volumena ledeno hladnog EtOH (φ = 96 %). Uzorak je stavljen na –20 ˚C minimalno 4 h kako bi precipitirale nukleinske kiseline nakon čega je centrifugiran 20 min na sobnoj temperaturi pri 17 900 g.

Nakon centrifugiranja potpuno osušeni talozi nukleinskih kiselina otopljeni su u Hepesu (c = 5 mmol dm^{-3}, pH = 7,5) i analizirani elektroforezom na poliakrilamidnom gelu uz prisustvo uree.

Bakterijske kulture *E. coli* uzgojene za preparativnu proizvodnju tRNA^{Ile} iz bakterije *B. megaterium* po završetku indukcije hlađene su 25 min na ledu u ledenici te su zatim stanice istaložene centrifugiranjem 15 min na 4 ˚C pri 5000 g. Bakterijski talozi su resuspendirani u 10 mL Mili–Q vode nakon čega su bakterijske stanice ponovno oborene na isti način. Cijelo vrijeme tijekom rada bakterije i otopine tRNA držani su na ledu. Bakterijski talozi iz 1,5 L bakterijske kulture su skupljeni i resuspendirani u 30 mL pufera za izolaciju tRNA već navedenog sastava. Izolacija tRNA iz bakterije *E. coli* rađena je na isti način kao i izolacija iz bakterije *B. megaterium*, osim što nije korišten lizozim te su uzorci centrifugirani u trajanju od 15 min na 4 ˚C pri 5000 g. Precipitirane nukleinske kiseline istaložene su centrifugiranjem na 4 ˚C pri 5000 ili 10 000 g u trajanju od 2 h. Osušeni talozi su otopljeni u Hepesu (c = 5 mmol dm^{-3}, pH = 7,5). Uz tRNA kopurificira i DNA prisutna u stanicama koju je potrebno ukloniti. Otopina tRNA temperirana je na sobnu temperaturu, zatim je dodana otopina PEG8000/NaCl. Ishodna otopina PEG8000/NaCl sadržavala je PEG_{8000} (γ = 24 g dm^{-3}) i NaCl (c = 1,5 mol dm^{-3}) te je pomiješana s otopinom tRNA u volumnom omjeru 1:2. Smjesa je inkubirana 10 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega je centrifugirana 15 min na sobnoj temperaturi pri 10 000 g. Nakon centrifugiranja, supernatant u kojem se nalazi tRNA odvojen je od taloga u kojem se nalazi DNA te je na isti način ponovljena precipitacija i centrifugiranje. Uspješnost odvajanja molekula tRNA i DNA provjerena je elektroforezom na poliakrilamidnom gelu u prisutstvu uree. Talog tRNA otopljen je u Trisu (c = 250 mmol dm^{-3}, pH = 8,8) i inkubiran 2 h na 37 ˚C kako bi se deacilirala izolirana tRNA. Reakcija deacilacije zaustavljena je snižavanjem pH otopine do pH < 5, dodatkom koncentrirane octene kiseline. Izolirana tRNA dijalizom na 4 ˚C prevedena je u Hepes (c = 5 mmol dm^{-3}, pH = 7,5). Crijevo za dijalizu je prethodno prokuhano 1 min u kipućoj vodi s dodanom EDTA (c = 1 mmol dm^{-3}). Dijalizirana tRNA pohranjena je na –20 ˚C.

3.2.4.2. Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu uz prisutstvo uree

Uspješnost prekomjerne ekspresije, čistoća te prisutnost genomske DNA u uzorku tRNA analizirani su elektroforezom na poliakrilamidnom gelu u prisutnosti uree koja denaturira molekule DNA i RNA i omogućava razdvajanje molekula u uzorku isključivo na temelju

molekulske mase. Za analizu su korišteni gelovi sastava: 6 % (*w*/*V*) akrilamid–bisakrilamid (19:1), pufer TBE (*c* (Tris) = 90 mmol dm^{-3}, *c* (H_3BO_3) = 90 mmol dm^{-3}, *c* (EDTA) = 10 mmol dm^{-3}, pH = 8,3), *c* (urea) = 6 mol dm^{-3}, *γ* (APS) = 0,7 μg mL^{-1}, 0,05 % (*w*/*V*) TEMED. Elektroforeza je provedena u puferu TBE. Jamice gela isprane su resuspendiranjem pipetom nakon čega je napravljena predelektroforeza pri naponu od 80 V u trajanju od 30 min. Kako bi se uzorci pripremili za elektroforezu, uzorci su inkubirani 5 min na 80 ˚C u dodatak jednakog volumena pufera za nanošenje (*c* (urea) = 6 mol dm^{-3}, *c* (Tris) = 40 mmol dm^{-3}, *c* (CH_3COOH) = 20 mmol dm^{-3}, *c* (EDTA) = 1 mmol dm^{-3}, *φ* (glicerol) = 30 %, *γ* (bromfenol plavo) = 0,5 g dm^{-3}, *γ* (ksilencijanolfluorofosfat) = 0,5 g dm^{-3}, pH = 8,3)). Elektroforeza je provedena pri 120 V u trajanju od 50 minuta. Nakon elektroforeze, uzorci na gelu vizualizirani su protresanjem gela u trajanju od 20 min u otopini toluidinskog modrila (*γ* (toluidinsko modrilo) = 40 μg mL^{-1}, *φ* (EtOH) = 50 %, *φ* (CH_3COOH) = 0,1 %) nakon čega je nespecifično vezana boja uklonjena kuhanjem gela u vrućoj destiliranoj vodi.

3.2.4.3. Pročišćavanje tRNA tekućinskom kromatografijom obrnutih faza

Tekućinska kromatografija korištena je za razdvajanje različitih formi molekule $tRNA^{Ile}$ prisutnih u uzorku nakon izolacije i pročišćavanja, napravljena je prema djelomično modificiranom protokolu prethodno uspostavljenom u laboratoriju[12]. Kromatografija je rađena na sobnoj temperaturi te su korišteni pufer A (*c* (NH_4OAc) = 20 mmol dm^{-3} (pH = 5,0), *c* ($Mg(OAc)_2$) = 10 mmol dm^{-3}, *c* (NaCl) = 400 mmol dm^{-3}) i pufer B (*c* (NH_4OAc) = 20 mmol dm^{-3} (pH = 5,0), *c* ($Mg(OAc)_2$) = 10 mmol dm^{-3}, *c* (NaCl) = 400 mmol dm^{-3}, *φ* (EtOH) = 30 %), a za čišćenje sustava za kromatografiju korišten je EtOH (*φ* = 20 i 96 %). Sve navedene otopine kao i Mili–Q voda su prije upotrebe profiltrirane korištenjem sustava za filtraciju *Corning bottle–top vacuum filter system* i filter papira od celuloznog acetata s porama veličine 0,22 μm. Pufer A i voda su nakon filtriranja degazirani 30 min pomoću ultrazvučne kupelji uz sniženi tlak, a pufer B te otopine etanola su degazirane 15 min na atmosferskom tlaku. Za kromatografiju je korištena kolona Jupiter C4 5 μm 300 Å 4,6 × 250 mm (*Phenomenex*). Volumen kolone je 4,1 mL i volumeni korištenih otopina u ostatku teksta bit će izražavani preko volumena kolone (CV).

Sustav za kromatografiju čuva se u otopini EtOH (*φ* = 20 %) pa je na samom početku cijeli sustav ispran Mili–Q vodom. Kolona je isprana s 10 CV vode i potom uravnotežena s

15 CV pufera A pri brzini protoka od 2 mL min^{-1}. Na kolonu se nanosilo 50 μL uzorka izolirane ukupne tRNA obogaćene s $tRNA^{Ile}$ (γ = 60–100 mg mL^{-1}) pročišćene od staničnih proteina, molekula DNA i ostalih staničnih komponenti. Uzorak je prije kromatografije centrifugiran 15 min pri 10 000 g na sobnoj temperaturi te zatim korištenjem pufera A nanesen na kolonu pri brzini protoka od 1,5 mL min^{-1}. Molekule koje se nisu vezale na kolonu isprane su s 2,5 CV pufera A pri protoku od 1,5 mL min^{-1}, a elucija željenog izoakceptora postignuta je ispiranjem kolone s linearnim gradijentom etanola promjenjivog nagiba:

1. dio φ (EtOH) = 0–0,9 % kroz 2,5 CV
2. dio φ (EtOH) = 0,9–1,8 % kroz 10 CV
3. dio φ (EtOH) = 1,8–3 % kroz 3 CV
4. dio φ (EtOH) = 3–10,5 % kroz 5 CV

Tijekom elucije brzina protoka bila je 1,5 mL min^{-1} te su skupljane frakcije u volumenu od 1,5 mL. Skupljene su sve frakcije koje odgovaraju pojedinom kromatografskom vrhu, zatim su molekule tRNA precipitirane, dijalizirane i potom im je određena akceptorska aktivnost i aminoacilacijski profili.

3.2.5. Metode enzimske kinetike

3.2.5.1. Aktivacija aminokiselina

Aktivacija aminokiseline mjeri se metodom izmjene pirofosfata koja se temelji na mjerenju brzine pirofosforolize, povratne reakcije aktivacije aminokiseline. U reakciji aktivacije, aminokiselina i ATP su supstrati koji se prevode u produkte aa–AMP i PP_i. Povratna reakcija aktivacije je pirofosforoliza u kojoj se PP_i ugrađuje u novonastali ATP i nastaje aminokiselina. U ovoj metodi koristi se radioaktivno obilježen [^{32}P]–PP_i kako bi se mogla odrediti količina ATP–a nastalog pirofosforolizom. Budući da je pirofosforoliza puno brža od nastajanja aa–AMP–a, ovom metodom moguće je pratiti brzinu nastajanja aa–AMP–a. Uz radioaktivno obilježeni [^{32}P]–PP_i, u reakcijskoj smjesi nalazi se i neobilježeni PP_i (c = 1 mmol dm^{-3}) čime se potiče povratna reakcija (pirofosforoliza). Shema reakcije aktivacije i povratne reakcije pirofosforolize prikazana je na slici 3.2.

$$\mathrm{aaRS} + \mathrm{aa} + \mathrm{ATP} \rightleftarrows \mathrm{aaRS{:}aa{-}AMP} + \mathrm{PP_i}$$
$$\mathrm{aaRS{:}aa{-}AMP} + [^{32}\mathrm{P}]{-}\mathrm{PP_i} \rightleftarrows \mathrm{aaRS} + \mathrm{aa} + [^{32}\mathrm{P}]{-}\mathrm{ATP}$$

Slika 3.2. Shema reakcije aktivacije i povratne reakcije pirofosforolize na kojima se temelji metoda izmjene pirofosfata.

Sve dijelove ovog i ostalih eksperimenata koji uključuju direktno korištenje radioaktivnog materijala napravio je Vladimir Zanki, mag. biol. mol. Reakcije su započete dodatkom 10 μL Ile dvostruko veće koncentracije od finalne u 10 μL smjese koja je sadržavala sve ostale komponente reakcije te je ukupni volumen reakcijske smjese bio 20 μL. Reakcija je rađena na 30 ˚C, a finalni sastav reakcijske smjese bio je: pufer za aktivaciju (c (Hepes) = 50 mmol dm^{-3} (pH = 7,5), c ($MgCl_2$) = 20 mmol dm^{-3}, c (DTT) = 5 mmol dm^{-3}, c ([^{32}P]–PP_i, specifična aktivnost 0,2–0,4 μCi μmol^{-1}) = 1 mmol dm^{-3}, c (enzim) = 20 nmol dm^{-3}, ATP (c = 4 mmol dm^{-3} uz IleRS1, odnosno c = 15 mmol dm^{-3} uz IleRS2). Enzimi su razrijeđeni u puferu sastava (c (Hepes) = 50 mmol dm^{-3} (pH = 7,5), γ (BSA) = 1 mg mL^{-1}) te je enzim uvijek dodavan kao 1/10 volumena reakcijske smjese. Za oba enzima napravljena je reakcija aktivacije koristeći 8 različitih koncentracija Ile u rasponu 0,1–10 × K_M vrijednosti u vremenskom periodu u kojem su zadovoljeni uvjeti ustaljenog stanja. Uzimani su alikvoti reakcijske smjese od 1,5 μL koji su zatim dodavani u 3 μL smjese za zaustavljanje reakcije (c (CH_3COONa) = 750 mmol dm^{-3} (pH = 4,5) i 0,15 % (w/V) SDS) te je po 1,5–2 μL naneseno na prethodno razvijenu (u Mili–Q vodi) i osušenu polietileniminsku pločicu za tankoslojnu kromatografiju. Tankoslojna kromatografija je napravljena u puferu sastava: c (KH_2PO_4) = 750 mmol dm^{-3} (pH = 3,5), c (urea) = 4 mol dm^{-3}. Pločice su nakon razvijanja posušene fenom, omotane folijom i izložene na zaslonu s uskladištenim fosforom te je ploča s uskladištenim fosforom snimljena na uređaju *PhosphorImager Typhoon* 9410. Rezultati su kvantificirani pomoću programa *ImageQuant* 5.2, a zatim su kvantificirani podaci obrađeni pomoću programa *GraphPad Prism* 6.01 i *MS Office Excel*. Omjer intenziteta signala radioaktivnog [^{32}P]–ATP i zbroja intenziteta signala [^{32}P]–ATP i [^{32}P]–PP_i odgovara množinskom udjelu nastalog [^{32}P]–ATP u reakciji pirofosforolize. Umnožak množinskog udjela [^{32}P]–ATP i početne koncentracije PPi (c = 1 mmol dm^{-3}) odgovara koncentraciji nastalog [^{32}P]–ATP. Analizirajući vremensku ovisnost koncentracije nastalog [^{32}P]–ATP linearnom regresijom određena je početna brzina reakcije nastanka [^{32}P]–ATP. Početna brzina nastanka [^{32}P]–ATP izračunata je pri različitim koncentracijama izoleucina, nakon čega su iz

ovisnosti početne brzine o koncentraciji Ile nelinearnom regresijom prema jednadžbi Michaelis–Menten (slika 3.3.) dobiveni kinetički parametri k_{cat} i K_M za izoleucin.

$$v_0 = \frac{V_{max} \times [S]}{K_M + [S]}$$

Slika 3.3. Jednadžba Michaelis–Menten u kojoj v_0 predstavlja početnu brzinu, V_{max} maksimalnu brzinu reakcije, K_M Michaelisovu konstantu i [S] početnu koncentraciju supstrata.

Obrtni broj enzima (k_{cat}) odgovara broju molekula supstrata koje se prevedu u molekule produkta po molekuli enzima u jedinici vremena u uvjetima potpunog zasićenja enzima supstratom. Kvocijent V_{max} i koncentracije enzima u reakcijskoj smjesi predstavlja k_{cat} vrijednost. Michaelisova konstanta (K_M) odgovara onoj koncentraciji supstrata pri kojoj je početna brzina reakcije jednaka polovici maksimalne brzine.

3.2.5.2. Aminoacilacija uz [^{14}C]–Ile

Aminoacilacija uz [^{14}C]–izoleucin je metoda korištena u ovom istraživanju za mjerenje brzine reakcije aminoacilacije te za određivanje akceptorske aktivnosti tRNA (odjeljak 3.2.5.4.). Metoda se temelji na detekciji i određivanju količine radioaktivno obilježenih molekula ([^{14}C]–Ile–tRNA^{Ile}), produkta reakcije katalizirane enzimom IleRS. Radioaktivni biljeg nalazi se u produktu jer se u reakciji koristi [^{14}C]–Ile obilježen na α–C atomu (slika 3.4.).

$$\text{IleRS} + [^{14}\text{C}]\text{–Ile} + \text{ATP} \rightleftarrows \text{IleRS:}[^{14}\text{C}]\text{–Ile–AMP} + \text{PP}_\text{i}$$
$$\text{IleRS:}[^{14}\text{C}]\text{–Ile–AMP} + \text{tRNA}^{\text{Ile}} \rightleftarrows \text{IleRS} + [^{14}\text{C}]\text{–Ile–tRNA}^{\text{Ile}} + \text{AMP}$$

Slika 3.4. Kemijska jednadžba reakcije aminoacilacije uz korištenje radioaktivno obilježene aminokiseline [^{14}C]–Ile na α–C atomu.

Reakcija je napravljena na 30 ˚C u volumenu od 50 μL, a sastav reakcijske smjese bio je: pufer za aminoacilaciju (c (Hepes–KOH) = 50 mmol dm^{-3} (pH = 7,5), c (NH_4Cl) = 150 mmol dm^{-3}, c ($MgCl_2$) = 10 mmol dm^{-3}, c (ATP) = 4 mmol dm^{-3},

TIPP[7] (0,008 U μL^{-1}), *c* (enzima) = 20 nmol dm^{-3}, *c* ([^{14}C]–Ile) = 50 μmol dm^{-3} specifične aktivnosti 100 μCi μmol^{-1}, *c* (tRNA) = 20 μmol dm^{-3}. Enzimi su razrijeđeni u puferu (*c* (Hepes) = 50 mmol dm^{-3} (pH = 7,5), *γ* (BSA) = 1 mg mL^{-1}) te je u reakcijsku smjesu dodavano 1/10 ukupnog volumena reakcijske smjese. Prije same reakcije, molekule tRNA potrebno je renaturirati. Ovom metodom analizirana je ukupna izolirana tRNA s nadeksprimiranom $tRNA^{Ile}$ iz bakterije *E. coli* te tRNA koja odgovara različitim formama razdvojenim tekućinskom kromatografijom obrnutih faza. Reakcija je započeta dodatkom enzima u ostatak reakcijske smjese. U određenim vremenskim intervalima od početka reakcije, uzeti su alikvoti od 7–9 μL reakcijske smjese, naneseni na *Whatman* 3*MM* diskiće dimenzija 2 × 1 cm te su potom diskići uronjeni u TCA (*φ* = 10 %) ohlađenu u ledenoj kupelji. Nakon što je ubačen zadnji diskić u TCA, inkubacija je nastavljena još 10 minuta. Poslije inkubacije, diskići su dva puta po 5 minuta ispirani hladnom TCA (*φ* = 5 %) nakon čega su 5 minuta ispirani u hladnom EtOH (*φ* = 96 %) i zatim posloženi na aluminijsku foliju te sušeni 30 minuta na 80 ˚C u peći. Osušeni diskići ubačeni su u scintilacijske bočice, dodano je 2,5 mL scintilacijske tekućine (*γ* (2,5–difenil oksazol) = 5 g dm^{-3}, *γ* (1,4–bis(2–(4–metil–5–fenil)oksazolil)benzen) = 0,3 g dm^{-3}, otopljeno u toluenu) te je u scintilacijskom brojaču izmjerena aktivnost. Za određivanje količine radioaktivno obilježenog [^{14}C]–Ile–$tRNA^{Ile}$ bilo je potrebno napraviti baždarni dijagram. Baždarni dijagram je napravljen tako što su u scintilacijskom brojaču izmjereni otkucaji otopina koje sadrže [^{14}C]–Ile točno poznate množine. Za generiranje baždarnog dijagrama korištene su sljedeće množine [^{14}C]–Ile: 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 80 pmol. Ovisnost broja otkucaja u minuti (engl. *count per minute*, CPM) o množini radioaktivno obilježene aminokiseline [^{14}C]–Ile predstavlja baždarni pravac, a linearnom regresijom dobiveni su nagib i odsječak pravca pomoću kojih je zatim izračunata množina [^{14}C]–Ile–$tRNA^{Ile}$. Budući da je poznat volumen uzetog alikvota reakcijske smjese, iz izračunate množine [^{14}C]–Ile–$tRNA^{Ile}$ izračunata je i koncentracija. Iz vremenske ovisnosti koncentracije [^{14}C]–Ile–$tRNA^{Ile}$ linearnom regresijom izračunata je početna brzina reakcije.

[7] U (engl. *unit*) je jedinica definirana kao količina enzima koja će generirati 1 μmol fosfata iz anorganskog pirofosfata u 10 minuta na 75 ˚C u reakcijskoj smjesi ukupnog volumena od 0,5 mL i sastava: 50 mmol dm^{-3} Tricin (pH = 8,5), 1 mmol dm^{-3} $MgCl_2$, 0,32 mmol dm^{-3} PP_i.

3.2.5.3. Obilježavanje tRNA radioaktivnim izotopom [^{32}P]

Molekula tRNA radioaktivno obilježena izotopom [^{32}P] korištena je za praćenje reakcije aminoaciliranja. Korištenjem tRNA nukleotidil–transferaze (enzim CCA) i ATP–a obilježenog radioaktivnim izotopom na α–fosfatnoj skupini pripremljena je obilježena [^{32}P]–tRNA koja ima radioaktivni izotop [^{32}P] u fosfodiesterskoj vezi između nukleotida C75 i A76. Neke molekule tRNA sadrže CCA kraj kodiran genom za tu tRNA, a na molekule tRNA koje ne sadrže taj slijed u genomu enzim CCA nadodaje spomenuti nukleotidni slijed. Osim toga, enzim CCA katalizira i reverznu reakciju pirofosforolize u kojoj se djelovanjem PP_i razgrađuje CCA slijed. Postupak obilježavanja tRNA radioaktivnim izotopom [^{32}P] sastoji se od dva koraka. U prvom koraku reakcije dodatkom PP_i u reakcijsku smjesu potiče se razgradnja neobilježenog nukleotida A76 nakon čega se dodatkom anorganske pirofosfataze u reakcijsku smjesu potiče ugradnja obilježenog [^{32}P]–ATP. Vrijeme tijekom kojeg dolazi do uklanjanja terminalnog A76 molekule tRNA mora biti optimirano da se ne bi uklonili i nukleotidi C74 i C75 te da se smanji količina nusprodukata rekacije.[59]

Prije obilježavanja, tRNA je renaturirana. Renaturacija tRNA napravljena je zagrijavanjem određenog volumena tRNA željene koncentracije 3 minute na 80 ˚C nakon čega je dodan jednak volumen $MgCl_2$ (c = 20 mmol dm^{-3}, finalno c = 10 mmol dm^{-3}) isto tako zagrijanog na 80 ˚C, smjesa je dobro resuspendirana i ostavljena da se postepeno hladi do 37 ˚C. Reakcija je napravljena na 37 ˚C u ukupnom volumenu od 20 μL te je sastav reakcijske smjese bio: c (Tris–HCl) = 200 mmol dm^{-3} (pH = 8,0), c ($MgCl_2$) = 20 mmol dm^{-3}, c (DTT) = 500 μmol dm^{-3}, c ($NaPP_i$) = 6 mmol dm^{-3}, (tRNA) = 5 μmol dm^{-3}, c (CCA enzim) = 5 μmol dm^{-3}, 5 μL α–[^{32}P]–ATP (specifična aktivnost 3000 Ci mmol^{-1}). Reakcija je započeta dodatkom enzima CCA u reakcijsku smjesu nakon čega je smjesa inkubirana 1 min na 37 ˚C tijekom čega dolazi do razgradnje CCA kraja molekule tRNA. Nakon razgradnje 3'–kraja molekule tRNA, u reakcijsku smjesu dodana je anorganska pirofosfataza (0,1 U μL^{-1}) te je smjesa inkubirana na sobnoj temperaturi 2 min tijekom kojih dolazi do ugrađivanja radioaktivnog α–[^{32}P]–ATP–a u molekulu tRNA. U svrhu uklanjanja proteina iz uzorka tRNA napravljena je ekstrakcija s jednim volumenom fenola zasićenog vodom, a nakon toga i s jednim volumenom fenol–kloroforma (smjesa fenola zasićenog vodom i kloroforma u omjeru 1:1). Radioaktivni α–[^{32}P]–ATP uklonjen je iz uzorka tRNA korištenjem *Micro Bio–Spin* 30 (*BioRad*) kromatografskih kolona. Uzorak tRNA je uzastopno propušten kroz

dvije kolone te je tRNA dijalizom prevedena u Hepes (c = 5 mmol dm^{-3}, pH = 7,5) i čuvana na –20 °C.

3.2.5.4. Aminoacilacija uz [^{32}P]–tRNA

Aminoacilacija uz [^{32}P]–tRNA korištena je za određivanje početnih brzina aminoacilacije, kinetičkih parametara k_{cat} i K_M za supstrate L–Ile i ATP u reakciji aminoacilacije te za određivanje akceptorske aktivnosti tRNA (odjeljak 3.2.5.5.). Zbog same izvedbe eksperimenta i korištenja radioaktivno obilježene tRNA, a ne izoleucina (aminoacilacija uz [^{14}C]–Ile opisana u odjeljku 3.2.5.2.), u ovom eksperimentu je moguće koristiti puno veće koncentracije Ile zbog čega je ova metoda korištena za računanje K_M vrijednosti za Ile i ATP. Reakcija se odvijala na 30 ˚C, a započeta je dodatkom supstrata u reakcijsku smjesu finalnog sastava: pufer za aminoacilaciju (c (Hepes) = 50 mmol dm^{-3} (pH = 7,5), c (NH_4Cl) = 150 mmol dm^{-3}, c ($MgCl_2$) = 10 mmol dm^{-3}, c (DTT) = 1 mmol dm^{-3}), TIPP (0,008 U μL^{-1}), c ([^{32}P]-tRNA) = 30 μmol dm^{-3}, c (enzim) = 5–20 nmol dm^{-3} uz dodatak izoleucina i ATP–a. Za određivanje K_M vrijednosti za izoleucin i ATP u reakcijama je varirana koncentracija supstrata za koji se određivala K_M vrijednost u rasponu 0,1–10 × K_M. U reakcijama rađenim za određivanje K_M vrijednosti za izoleucin koncentracija ATP–a iznosila je c = 4 mmol dm^{-3}, dok je u reakcijama za određivanje K_M vrijednosti za ATP koncentracija izoleucina iznosila c = 1 mmol dm^{-3}. Alikvoti od 1,5 μL reakcijske smjese uzimani su u vremenskim intervalima u kojima je zadovoljen uvjet ustaljenog stanja. Alikvoti su zatim pomiješani s 3 μL smjese za zaustavljanje reakcije (c (NaOAc) = 750 mmol dm^{-3} (pH = 4,5) i 0,15 % (w/V) SDS), a kasnije je uzeto 1,5 μL od tako nastale smjese te je taj volumen dodan u 3 μL otopine P1 nukleaze (c ($ZnCl_2$) = 150 μmol dm^{-3}, c (NaOAc) = 300 mmol dm^{-3} (pH = 5,0), P1 nukleaza (≥ 0,01 U μL^{-1})). Reakcija je inkubirana 1 h na sobnoj temperaturi te je zatim nanenseno 1,5–4 μL smjese na predrazvijenu (u Mili–Q vodi) i posušenu TLC pločicu koja je razvijena u puferu sljedećeg sastava: c (NH_4OAc) = 0,1 mol dm^{-3} i φ (CH_3COOH) = 5 %. P1 nukleaza razgrađuje molekulu tRNA na pojedinačne nukleotide pa će tako razgradnjom aminoacilirane tRNA nastati Ile–[^{32}P]–AMP, a razgradnjom neaminoacilirane tRNA nastat će [^{32}P]–AMP koji se mogu razdvojiti tankoslojnom kromatografijom i zasebno kvantificirati. Razvijena pločica je omotana folijom i izlagana na zaslonu s uskladištenim fosforom te je ploča s uskladištenim fosforom snimljena na uređaju *PhosphorImager Typhoon* 9410. Rezultati su kvantificirani

pomoću programa *ImageQuant* 5.2, a zatim su kvantificirani podaci obrađeni pomoću programa *GraphPad Prism* 6.01 i *MS Office Excel*.

3.2.5.5. Određivanje akceptorske aktivnosti tRNA

Određivanje akceptorske aktivnosti podrazumijeva određivanje udjela aktivne tRNA u uzorku, tj. one tRNA koja se može aminoacilirati. Akceptorska aktivnost određuje se metodama koje se koriste za praćenje reakcije aminoacilacije uz [^{14}C]–Ile (odjeljak 3.2.5.2.) i [^{32}P]–tRNA (odjeljak 3.2.5.4.), ali su za određivanje akceptorske aktivnosti tRNA korištene drugačije koncentracije enzima (c = 5 μmol dm^{-3}) i tRNA (c = 2 μmol dm^{-3}). U reakcijama u kojima se određuje akceptorska aktivnost tRNA, koristi se koncentracija enzima veća od koncentracije tRNA kako bi se osiguralo da će se aminoacilirati sva aktivna tRNA. U reakcijama u kojima je korišten [^{14}C]–Ile alikvoti reakcijske smjese uzimani su 5 i 20 minuta nakon početka reakcije, odnosno nakon 5, 10 i 20 minuta u reakcijama u kojima je korištena [^{32}P]–tRNA. Omjer koncentracije aminoacilirane tRNA i ukupne tRNA u reakcijskoj smjesi odgovara akceptorskoj aktivnosti tRNA.

§ 4. REZULTATI

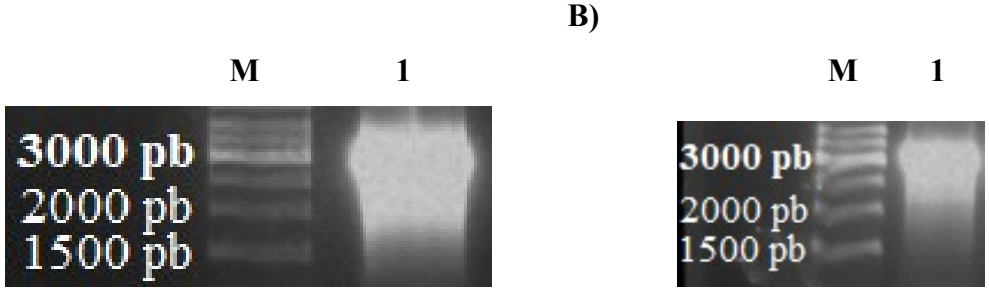
4.1. Konstrukcija rekombinantnog plazmida za homolognu nadekspresiju proteina IleRS1 iz bakterije *B. megaterium*

Kako bi se dobio homologno nadeksprimiran protein IleRS1 iz bakterije *B. megaterium*, prvo je bilo potrebno nukleotidni slijed koji kodira za protein IleRS1 uklonirati u odgovarajući plazmid. Za kloniranje je izabran plazmidni vektor pMBGm19 koji posjeduje ishodišta replikacije iz bakterija *B. megaterium* i *E. coli* što mu omogućava umnažanje u objema vrstama. Plazmid isto tako sadrži mjesto za višestruko kloniranje pod kontrolom inducibilnog ksiloznog promotora (P_{xylA}), stoga se ekspresija gena inducira dodatkom ksiloze u bakteriji *B. megaterium*. Prekomjerna ekspresija proteina napravljena je u bakteriji *B. megaterium*, a ne u najčešće korištenoj bakteriji *E. coli*, kako bi se osiguralo da određena svojstva prekomjerno eksprimiranih proteina uistinu odgovaraju svojstvima nativnih proteina.

Za umnažanje kodirajućeg slijeda za protein IleRS1 korištene su početnice naručene od komercijalnog dobavljača, tvrtke *Macrogen*. Početnice su dizajnirane na način da uzvodna i nizvodna početnica imaju T_m = 60-65 ˚C pa je tako uzvodna početnica sadržavala 29 nukleotida, a nizvodna 24 nukleotida koji su bili potpuno komplementarni kodirajućem slijedu za protein IleRS1. Na 5'–kraj obje početnice dodan je nukleotidni slijed GAGAGAG kako bi se olakšalo vezanje restrikcijske endonukleaze, a neposredno poslije navedenog slijeda nadodan je slijed nukleotida kojeg prepoznaje ciljana restrikcijska endonukleaza. Restrikcijsko mjesto za endonukleazu *Spe*I korišteno je u uzvodnoj početnici, a mjesto za endonukleazu *Bam*HI u nizvodnoj. Pokušaji ugradnje gena *ile*S1 direktno pod ksilozni promotor koji su prethodili ovom radu nisu bili uspješni bez obzira u kojem bakterijskom soju bakterije *E. coli* se pokušao umnožiti rekombinanti plazmidni vektori i bez obzira na temperaturu na kojoj su transformirane bakterijske stanice uzgajane. Ksilozni promotor u bakteriji *E. coli* nije potpuno utišan, već postoji cureća (engl. *leaky*) ekspresija gena koji se nalazi pod ksiloznim promotorom. Budući da najvjerojatnije postoji određena razina ekspresije gena *ile*S1 i da bakterijske stanice koje bi trebale sadržavati rekombinanti plazmidni vektor umiru, zaključeno je da je ekspresija proteina IleRS1 iz bakterije *B. megaterium* najvjerojatnije letalna za bakteriju *E. coli* u ranim fazama oporavka bakterije nakon transformacije. Kako bi se suprimirala ekspresija gena *ile*S1 pod

ksiloznim promotorom u bakteriji *E. coli*, u ovom radu je na 5'–kraj uzvodne početnice nakon mjesta koje prepoznaje endonukleaza nadodan nukleotidni slijed GGAGGAGGAGGA koji kodira 4 uzastopna Gly koristeći kodone koji su slabo zastupljeni u bakteriji *E. coli* zbog čega bi se trebala usporiti (ili zaustaviti) translacija mRNA i na taj način inhibirati sinteza proteina IleRS1. Korišteni kodoni za tetraglicinski slijed puno su zastupljeniji u bakteriji *B. megaterium* u odnosu na bakteriju *E. coli* zbog čega uvođenje navedenog slijeda ne bi trebalo utjecati na sintezu proteina u bakteriji *B. megaterium*. Nizvodna početnica također je sadržavala nukleotidni slijed CATCATCACCATCATCAT koji kodira 6 uzastopnih His na C–kraju proteina u svrhu pročišćavanja rekombinantnog proteina afinitetnom kromatografijom na Ni–NTA koloni. Kodoni korišteni za heksahistidinski privjesak također su optimizirani s obzirom na zastupljenost izoakceptora $tRNA^{His}$ u bakteriji *B. megaterium*.

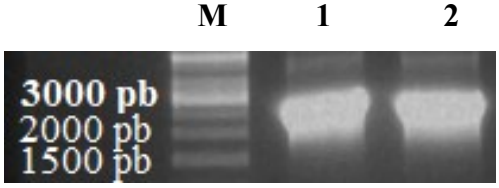
Testni PCR napravljen je u reakcijskoj smjesi volumena 25 μL koristeći *Taq*–DNA–polimerazu kako bi se provjerila ispravnost početnica, kalupa i ostalih komponenti reakcije, a preparativni PCR napravljen je koristeći *Q5*–PCR–polimerazu u ukupnom volumenu $V = 100$ μL te je kodirajući slijed umnažan iz genomske DNA bakterije *B. megaterium*. Produkti PCR–a analizirani su elektroforezom na agaroznom gelu (1 % *w*/*V*) i nakon što je utvrđena uspješnost reakcije, PCR produkti pročišćeni su korištenjem komercijalnog kompleta *QIAquick PCR Purification Kit* (*Qiagen*) te im je sprektrofotometrijski određena koncentracija. Teorijski izračunata veličina željenog PCR produkta je 2823 što je u skladu s eksperimentalno dobivenim rezultatom nakon analize (slika 4.1.).



Slika 4.1. Analiza PCR produkata elektroforezom na agaroznom gelu (1 % *w*/*V*). PCR–om je umnožen kodirajući slijed za protein IleRS1 iz bakterije *B. megaterium* koristeći: a) *Taq*–DNA–polimerazu i b) *Q5*–DNA–polimerazu. Korišten je marker *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (*Thermo Fischer Scientific*) (označen slovom M), a produkti reakcijske smjese označeni su brojem 1 na slikama A i B.

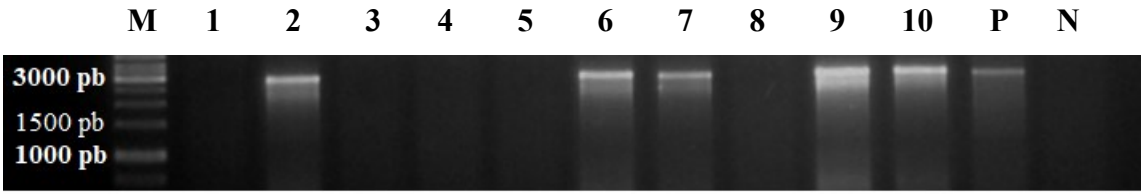
Nakon što je agaroznom gel–elektroforezom utvrđeno da je PCR bio uspješan, PCR produkt i plazmidni vektor pMGBm19 porezani su restrikcijskim endonukleazama *Bam*HI i *Spe*I te ligirani. Soj XL10–Gold bakterije *E. coli* elektrotransformiran je ligacijskom smjesom, te ligacijskom smjesom uz dodani plazmid pMMEc4. Plazmid pMMEc4 korišten je kako bi se dodatno suprimirala aktivnost ksiloznog promotora u bakteriji *E. coli*. U plazmidu pMMEc4 nalazi se kodirajući slijed za represor XylR pod kontrolom inducibilnog arabinoznog promotora (P_{BAD}) te se dodatkom arabinoze inducira ekspresija gena koji kodira represor XylR i tako posredno smanjuje bazalna ekspresija proteina pod kontrolom promotora P_{xylA}. Bakterije kotransformirane plazmidom pMMEc4 nasađene su na hranjivu podlogu koja je između ostalog sadržavala i arabinozu (0,2 % *w*/*V*) kako bi se inducirala ekspresija gena *xylR* te kloramfenikol zbog selekcije stanica koje su primile plazmid pMMEc4. Bakterijske kolonije narasle na hranjivoj podlozi analizirane su kolonijskim PCR–om u kojem je korištena *Taq*–DNA–polimeraza. Ukupno je analizirano 30 bakterijskih kolonija za koje je pokazano da niti jedna ne sadrži rekombinanti plazmid. Pozitivna kontrola, kodirajući slijed za IleRS1 dobiven PCR–om, dala je očekivani produkt što sugerira da su reakcijski uvjeti bili optimalni (nije prikazano). Budući da za niti jednu bakterijsku koloniju PCR–om nije utvrđeno da sadrži rekombinantni plazmid, ligacijskom smjesom kemijski je transformiran soj NEB Stable bakterije *E. coli*, dok su sojevi Rosetta i Nova Blue bakterije *E. coli* elektrotransformirani. Nije narasla niti jedna kolonija soja Rosetta, ali su narasle bakterijske kolonije preostala dva bakterijska soja pa je PCR–om analizirano 10 bakterijskih kolonija i zatim je utvrđeno da niti jedna analizirana kolonija ne sadrži rekombinanti plazmid. Potom je kemijski transformiran soj XL10–Gold bakterije *E. coli* i elektrotransformiran soj BL21(DE3) bakterije *E. coli* prethodno korištenom ligacijskom smjesom, a isto tako su napravljene i transformacije ligacijskom smjesom uz kotransformaciju plazmidnim vektorom pMMEc4 koji inhhibira aktivnost ksiloznog promotora te su bakterije rasle na 15 ˚C kako bi se smanjila sinteza potencijalno toksičnog proteina. Prethodno transformirane bakterijske stanice soja NEB Stable uzgajane su na 30 ˚C, a stanice sojeva Nova Blue i Rosetta na 37 ˚C. PCR–om na bakterijskim kolonijama analizirano je ukupno 15 kolonija te su napravljene pozitivna i negativna kontrola, no i ovaj put niti jedna od analiziranih bakterijskih kolonija nije sadržavala rekombinanti plazmid. Dakle, u ovom radu ekspresija gena *ile*S1 pod ksiloznim promotorom u bakteriji *E. coli* nije uspješno utišana niti korištenjem tetraglicinskog slijeda niti uz pomoć plazmida pMMEc4 te zbog toga gen *ile*S1 nije uspješno ukloniran pod ksilozni promotor.

Budući da kodirajući slijed za protein IleRS1 nije uspješno ukloniran u plazmidni vektor pMGBm19, slijedio je pokušaj ugrađivanja tog slijeda u vektor pP_{T7}. Plazmidni vektor pP_{T7} sadrži ishodišta replikacije koja mu omogućavaju umnažanje u bakterijama *E. coli* i *B. megaterium* te mjesto za višestruko kloniranje koje je pod kontrolom T7–promotora. U svrhu ugradnje gena *ileS1* u plazmidni vektor pP_{T7}, kodirajući slijed za protein IleRS1 ponovno je umnožen PCR–om koristeći istu nizvodnu početnicu kao i u prvom umnažanju dok se uzvodna početnica nešto razlikovala. Uzvodna početnica ovaj put nije sadržavala nukleotidni slijed koji kodira za tetraglicinski privjesak, te je umjesto nukleotidnog slijeda kojeg prepoznaje endonukleaza *Spe*I korišten nukleotidni slijed GCTAGC kojeg prepoznaje endonukleaza *Nhe*I. PCR za preparativno umnažanje kodirajućeg slijeda za protein IleRS1 napravljen je korištenjem *Q5*–DNA–polimeraze te je reakcija napravljena u dvije reakcijske smjese svake volumena 50 μL. Produkti PCR–a analizirani su elektroforezom na agaroznom gelu (1 % *w*/*V*) i nakon što je utvrđeno da je eksperimentalno dobiven rezultat (slika 4.2.) u skladu s teorijskim predviđanjem (veličina produkta 2822 pb), produkt je pročišćen kompletom *QIAquick PCR Purification Kit* (*Qiagen*) te mu je spektrofotometrijski određena koncentracija.



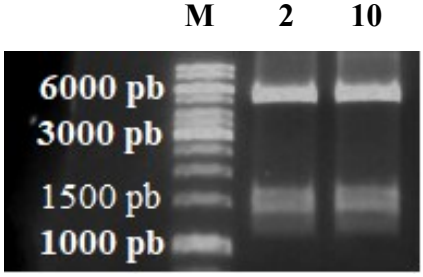
Slika 4.2. Kodirajući slijed za protein IleRS1 umnožen PCR–om koristeći *Q5*–DNA–polimerazu analiziran je elektroforezom na agaroznom gelu (1 % *w*/*V*). Korišten je marker *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (*Thermo Fischer Scientific*) (označen slovom M). Reakcija je napravljena u dvije reakcijske smjese (označene s 1 i 2).

Pročišćeni produkt PCR–a pocijepan je restrikcijskim endonukleazama *Nhe*I i *Bam*HI, a plazmid pP_{T7} endonukleazama *Spe*I i *Bam*HI koji je uz to i defosforiliran korištenjem enzima rSAP. Enzimi *Nhe*I i *Spe*I su izokaudomeri što znači da iako ne prepoznaju iste nukleotidne sljedove, njihovim djelovanjem nastaju komplementarni stršeći krajevi. Zatim su insert i plazmid ligirani te su stanice soja NEB Stable bakterije *E. coli* kemijski transformirane ligacijskom smjesom. Bakterijske kolonije narasle na hranjivoj podlozi analizirane su PCR–om te je utvrđeno da 5/10 kolonija sadrži rekombinanti plazmid (slika 4.3.), a uz to su korištene pozitivna (gen *ileS1* pocijepan enzimima *Nhe*I i *Bam*HI) i negativna kontrola (smjesa bez dodatka DNA).



Slika 4.3. Analiza produkata PCR–a na bakterijskim kolonijama elektroforezom na agaroznom gelu (1 % *w*/*V*). Utvrđeno je da 5/10 analiziranih bakterijskih kolonija sadrži rekombinanti plazmid pP_{T7}_ileS1. Za reakciju je korištena *Taq*–DNA–polimeraza i marker *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (*Thermo Fischer Scientific*) (označen slovom M). Analizirane kolonije označene su brojevima 1–10, pozitivna kontrola označena je slovom P, a negativna slovom N.

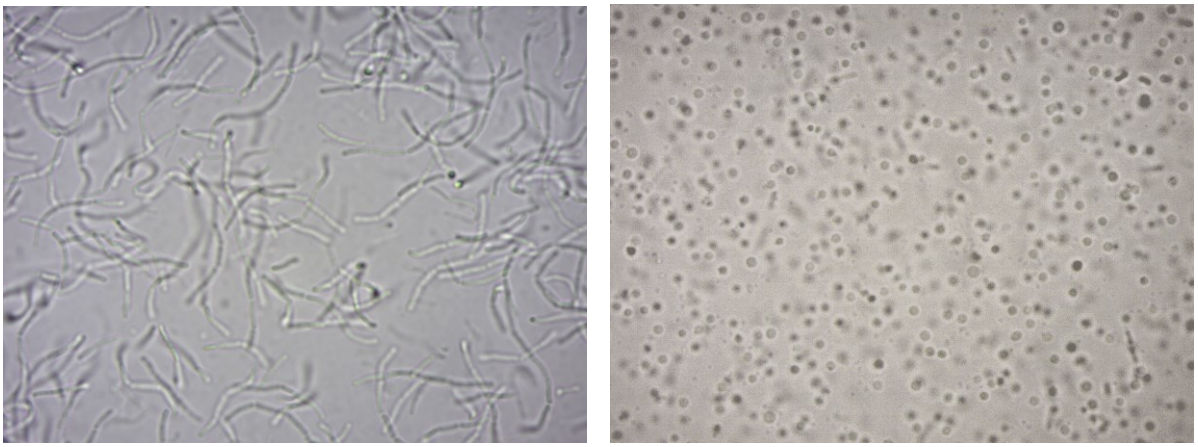
Pripremljena je prekonoćna kultura bakterijskih klonova 2 i 10 (sa slike 4.3.) za koje je PCR–om na bakterijskim kolonijama utvrđeno da sadrže rekombinanti plazmid pP_{T7}_ileS1. Bakterijske stanice su zatim oborene te je iz njih korištenjem kompleta *QIAprep Spin Miniprep Kit* (*Qiagen*) izolirana plazmidna DNA koja je potom analizirana restrikcijskom endonukleazom *Nco*I. Na temelju veličine fragmenata dobivenih restrikcijskom razgradnjom plazmidne DNA može se odrediti nalazi li se u stanici zaista rekombinantni plazmid. Razgradnjom plazmida pP_{T7} endonukleazom *Nco*I teorijski bi trebali nastati fragmenti veličine 1500 i 3692 pb, a razgradnjom rekombinantog plazmida pP_{T7}_ileS1 istim enzimom trebali bi nastati fragmenti veličine: 398, 913, 1551 i 5153 pb. Iako analizom na agaroznom gelu (1 % *w*/*V*) nisu vidljivi svi fragmenti (slika 4.4.), vidljiva je linija približne veličine 5000 pb koja sugerira da izolirani plazmid sadrži kodirajući slijed za protein IleRS1. Uspješnost kloniranja je potvrđena i sekvenciranjem kodirajućeg slijeda u plazmidnom vektoru koje je napravljeno u DNA servisu tvrtke *Macrogen*. Sekvenciranjem je isto tako pokazano da ne postoje mutacije u kodirajućem slijedu proteina.



Slika 4.4. Restrikcijska razgradnja plazmidne DNA izolirane iz bakterijskih klonova 2 i 10 za koje je utvrđeno PCR–om na bakterijskim kolonijama da sadrže rekombinanti plazmid pP_{T7}_ileS1 analizirana elektroforezom na agaroznom gelu (1 % *w*/*V*). Za restrikcijsku razgradnju je korištena endonukleaza *Nco*I.

4.2. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje proteina iz bakterije *B. megaterium*

Kako bi se proizveli homologno prekomjerno eksprimirani enzimi IleRS1 i IleRS2 u bakteriji *B. megaterium*, prvo je potrebno bakteriju transformirati odgovarajućim plazmidnim vektorima s ugrađenim kodirajućim sljedovima za spomenute enzime. Budući da bakterija *B. megaterium* pripada skupini Gram–pozitivnih bakterija čija je stanična stijenka građena od debelog sloja peptidoglikana, transformacija nije tako jednostavna kao kod bakterije *E. coli*. Da bi se bakterija *B. megaterium* mogla transformirati, potrebno je peptidoglikansku staničnu stijenku razgraditi i to je napravljeno korištenjem enzima lizozima. Razgradnjom stanične stijenke nastaju protoplasti. Stanična stijenka između ostalog daje čvrstoću i oblik bakterijskoj stanici pa će nakon razgradnje stanične stijenke inače izdužena bakterija *B. megaterium* postati okrugla što se može pratiti mikroskopom (prikazano na slici 4.5.).

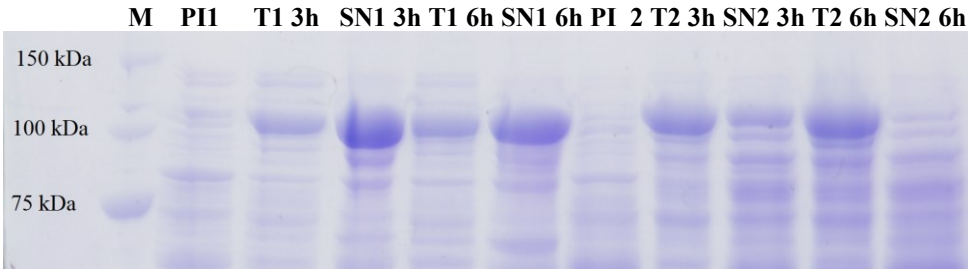


Slika 4.5. Mikroskopska slika bakterije *Bacillus megaterium* (lijevo) i protoplasta *Bacillus megaterium* (desno). Slike su snimljene pomoću svjetlosnog mikroskopa uz uvećanje od 1000 puta.

Protein IleRS1 prekomjerno je eksprimiran s rekombinantnog plazmida pP_{T7}_ileS1 uz korištenje plazmida pT7–RNAP, a protein IleRS2 s plazmida pMBGm19_P_{xylA}_ileS2 kojeg mi je ljubazno ustupio Vladimir Zanki, mag. biol. mol. Kodirajući slijed za protein IleRS2 ukloniran je u višestruko mjesto za kloniranje pod kontrolom inducibilnog ksiloznog promotora

(P_{xylA}) u plazmid pMGBm19, stoga je ekspresija gena inducirana ksilozom. Oba proteina su homologno prekomjerno eksprimirani u bakteriji *B. megaterium*.

Kako bi se optimizirali uvjeti prekomjerne ekspresije proteina IleRS1 i IleRS2 u bakteriji *B. megaterium*, analizirani su uzorci s dvama različitim trajanjima indukcije te su analizirani i talozi kako bi se vidjelo koliki udio prekomjerno eksprimiranog proteina završi u topljivoj frakciji, a koliki udio istaloži u obliku inkluzijskih tijela. Uzgojene su prekonoćne kulture bakterije *B. megaterium* transformirane rekombinantim plazmidom pMGBm19_P_{xylA}_ileS2 i prekonoćna kultura iste bakterije kotransfomirane plazmidima pP_{T7}_ileS1 i pT7–RNAP u LB mediju s dodanim odgovarajućim anitibioticima ukupnog volumena V = 5 mL na 30 ˚C i 150 rpm. Prekonoćne kulture razrijeđene su 50 × u LB mediju volumena V = 20 mL s dodanim odgovarajućim antibioticima te je nastavljen uzgoj bakterijskih kultura na 30 ˚C uz protresanje od 250 rpm. Bakterije su uzgajane do optičke vrijednosti OD_{578} = 0,4–0,6 nakon čega je inducirana ekspresija proteina dodatkom ksiloze (finalno 0,5 % *w*/*V*). Nakon 3 i 6 h od početka indukcije uzeti su alikvoti volumena V = 2 mL inducirane bakterijske kulture te su stanice oborene. Oborene bakterijske stanice su resuspendirane u puferu za lizu uz dodani lizozim kako bi se olakšala razgradnja debele peptidoglikanske stijenke Gram–pozitivne bakterije *B. megaterium* nakon čega su lizirane stanice centrifugirane u svrhu razdvajanja topljivih i netopljivih proteina. Topljiva frakcija je odvojena od taloga, zatim je talog resuspendiran te su elektroforezom na poliakriamidnom gelu u prisutstvu natrijevog dodecilsulfata zasebno analizirane topljiva frakcija i talog pojedine kulture nakon određenog trajanja indukcije (slika 4.6.). U svim uzorcima na gelu, proteinski ekstrakti potječu iz iste količine stanica, tj. uzorci su normirani.



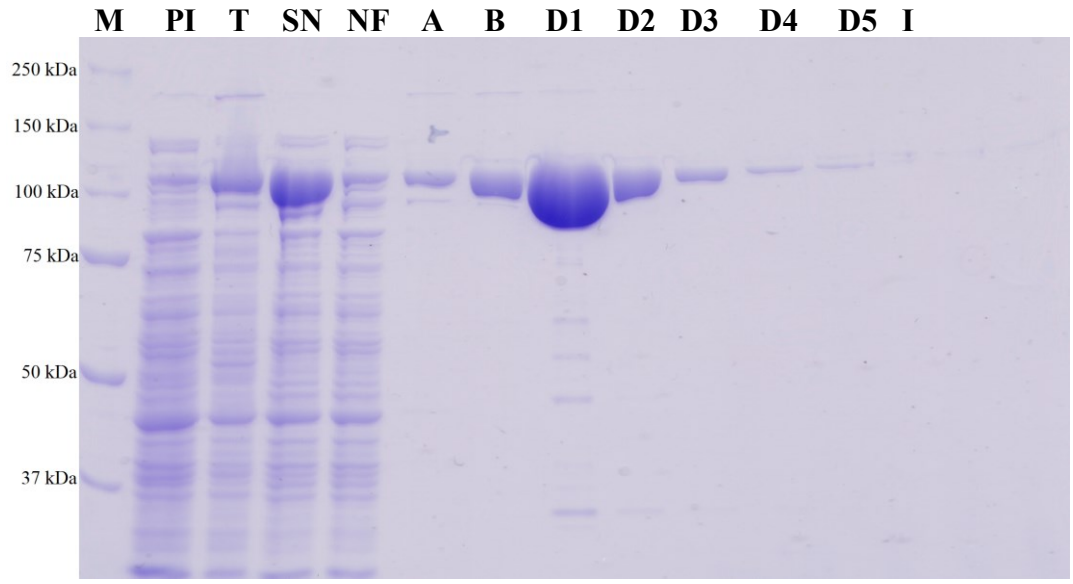
Slika 4.6. Analiza (SDS–PAGE) proteinskog ekstrakta neinducirane bakterijske kulture *B. megaterium* i kultura s prekomjerno eksprimiranim proteinima IleRS1, odnosno IleRS2. Kulture su inducirane dodatkom ksiloze (finalno 0,5 % *w*/*V*). Kultura prije indukcije označena je oznakom PI, talog dobiven nakon lize i centrifugiranja označen je slovom T, a supernatant je označen oznakom SN, 1 označava bakterijske kulture koje su sadržavale plazmid pP_{T7}_ileS1, a 2 označava kulture transformirane plazmidom pMBGm19_P_{xylA}_ileS2. U jažici označenoj slovom M nalazi se korišteni marker *Precision Plus Protein Standards Unstained* (*Bio–Rad*), a u jamicama s lijeva na desno redom se nalaze uzorci: ileS1 PI; ileS1 3h T, ileS1 3h SN; ileS1 6h T; ileS1 6h SN; ileS2 PI; ileS2 3h T; ileS2 3h SN; ileS2 6h T, ileS2 6h SN.

Na temelju ove analize zaključeno je da ne postoji prekomjerna ekspresija rekombinantnih proteina u neinduciranim bakterijskim kulturama (uzorak PI) što je i očekivan rezultat. U slučaju indukcije proteina IleRS1 značajni udio prekomjerno eksprimiranog proteina istaloži u obliku inkluzijskih tijela, ali ipak veći udio proteina ostaje u topljivoj frakciji. Uočeno je da u slučaju proteina IleRS1 nema značajne promjene u prinosu topljivog proteina nakon 3 i 6 h (slika 4.6., jamice SN1 3h i SN1 6h).

Protein IleRS2 skloniji je stvaranju inkluzijskih tijela od IleRS1 pa je tako veći udio prekomjerno eksprimiranog IleRS2 završio u talogu neovisno o trajanju indukcije (slika 4.6., posljednje četiri jamice). Nakon 6 h indukcije došlo je do smanjenja topljive frakcije IleRS2 u odnosu na 3 h što sugerira da je protein IleRS2 nestabilan pri korištenim uvjetima. Budući da u slučaju proteina IleRS2 veći dio prekomjerno eksprimiranog proteina na 30 ˚C završi u talogu, ispitana je indukcija i na 15 ˚C, a uzorci bakterijske kulture su analizirani nakon 3,5 i 18 h od početka indukcije. U slučaju indukcije na 15 ˚C istaložio je još veći udio prekomjerno eksprimiranog proteina, nego kad je indukcija napravljena na 30 ˚C (nije prikazano). S obzirom da je indukcija genske ekspresije rađena u divljem soju bakterije *B. megaterium* i da taj soj može metabolizirati ksilozu, s vremenom bi se mogao očekivati pad u razini ekspresije proteina, ali to ovdje nije opaženo, vjerojatno zbog realativno kratkog trajanja indukcije. Za preparativnu proizvodnju oba proteina indukcija je trajala 3 h na 30 °C, a volumen bakterijske kulture je iznosio 150 mL.

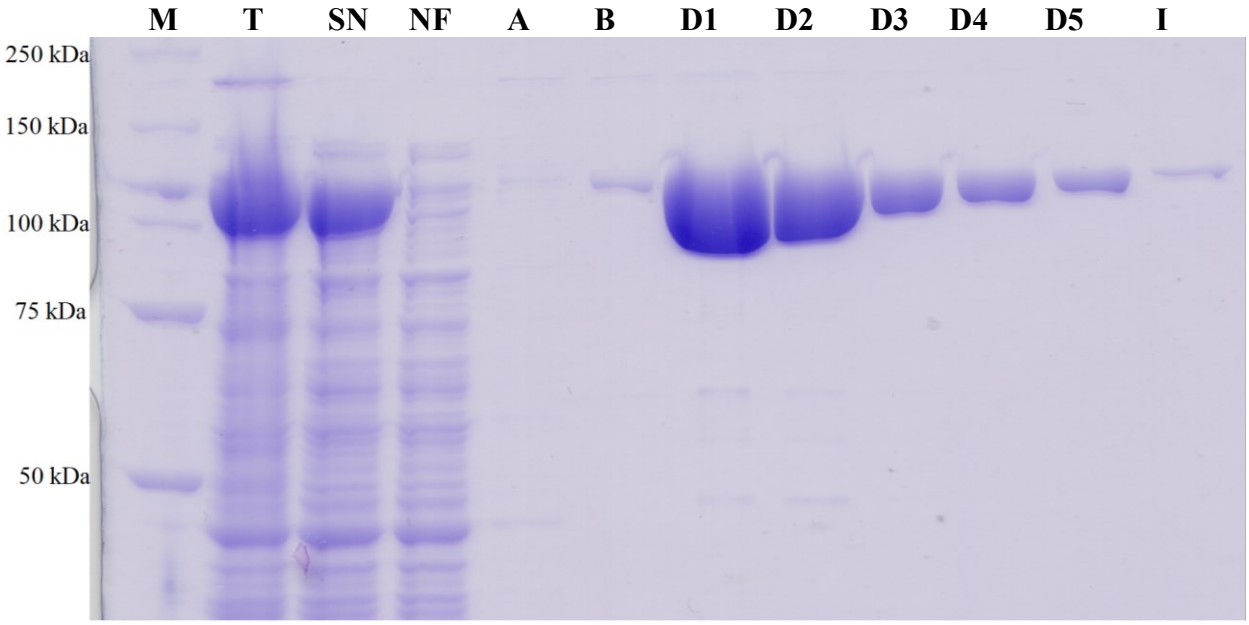
Prekomjerno eksprimirani proteini IleRS1 i IleRS2 pročišćeni su afinitetnom kromatografijom korištenjem Ni–NTA kolone što je bilo moguće jer je na C–kraj proteina

nadodan već spomenuti heksahistidinski privjesak. Pročišćavanje je napravljeno prema protokolu opisanom u odjeljku 3.2.3.3. U slučaju proteina IleRS1 nije vidljiva značajna količina ciljnog proteina u frakciji proteina koji se nisu vezali na kolonu (slika 4.7, jamica NF) što znači da je korištena dovoljna količina stacionarne faze da se veže gotovo sav prekomjerno eksprimirani protein. Određena, zanemariva količina proteina IleRS1 eluirana je s kolone puferima A (c (imidazol) = 10 mmol dm^{-3}) i B (c (imidazol) = 20 mmol dm^{-3}) (slika 4.7., jamice A i B). Najveća količina ciljnog proteina eluirana je u prvoj frakciji nastaloj korištenjem pufera D (c (imidazol) = 200 mmol dm^{-3}) (slika 4.7., jamica D1). Također je vidljivo da je protein vrlo visoke čistoće. Konačno, u frakciji eluata kad je korišten imidazol (c = 2 mol dm^{-3}) za ispiranje kolone, linija koja odgovara ciljnom proteinu je jedva vidljiva iz čega se može zaključiti da je protein gotovo u potpunosti eluiran korištenjem pufera D. U svim frakcijama linija prekomjerno eksprimiranog proteina se nalazi na poziciji koja je nešto više od pozicije koja odgovara 100 kDa što je u skladu s molarnom masom rekombinantnog proteina IleRS1 koja iznosi M = 106 330,32 g mol^{-1}.



Slika 4.7. Uspješnost pročišćavanja prekomjerno eksprimiranog rekombinantog proteina IleRS1 analizirana je poliakrilamidnom elektroforezom uz prisustvo natrijevog dodecilsulfata. Protein je prekomjerno eksprimiran s plazmidnog vektora pP$_{T7}$_ileS1 u bakteriji *B. megaterium*. Slovom M označen je korišteni marker *Precision Plus Protein Standards Unstained* (*Bio–Rad*) te ostale oznake stoje za: PI–stanični lizat prije indukcije, T–talog dobiven lizom stanica i centrifugiranjem, SN–frakcija topljivih proteina dobivenih nakon centrifugiranja liziranih stanica, NF–frakcija proteina koja se nije vezala na kolonu, A–frakcija proteina eluiranih s kolone ispiranjem puferom A (c (imidazol) = 10 mmol dm^{-3}), B–frakcija proteina eluiranih s kolone ispiranjem puferom B (c (imidazol) = 20 mmol dm^{-3}), D1–D5–frakcije proteina eluiranih s kolone puferom D (c (imidazol) = 200 mmol dm^{-3}), I–frakcija eluirana s kolone korištenjem otopine imidazola (c = 2 mol dm^{-3}).

U slučaju proteina IleRS2 isto tako je vidljivo da se gotovo sav IleRS2 vezao na kolonu (slika 4.8., jamica NF) i da nema gotovo nikakvih gubitaka koji bi bili posljedica korištenja nedovoljne količine stacionarne faze. Puferom A (c (imidazol) = 10 mmol dm^{-3}) eluirana je zanemariva količina ciljnog proteina, a puferom B (c (imidazol) = 20 mmol dm^{-3}) tek nešto veća količina. Najveći udio rekombinantog proteina eluiran je u frakcijama 1 i 2 kad je kolona eluirana puferom D (c (imidazol) = 200 mmol dm^{-3}) (slika 4.8., jamice D1 i D2) iako postoje značajne količine ciljnog proteina i u frakcijama D3–D5, a mala količina proteina je eluirana i otopinom visoke koncentracije imidazola (c = 2 mol dm^{-3}) koja se koristi za ispiranje kolone. Na slici 4.8. vidljivo je da čistoća pročišćenog ciljnog proteina vrlo visoka, čak viša nego što je to bio slučaj kod IleRS1 pa su tako linije koje odgovaraju drugim proteinima jedva vidljive čak i u frakcijama u kojima je najveća količina ciljnog proteina (D1 i D2). U svim frakcijama linija prekomjerno eksprimiranog proteina se nalazi na poziciji koja je nešto više od pozicije koja odgovara 100 kDa što je u skladu s molarnom masom rekombinantnog proteina IleRS2 koja iznosi M = 119 206,74 g mol^{-1}.



Slika 4.8. Uspješnost pročišćavanja prekomjerno eksprimiranog rekombinantog proteina IleRS2 analizirana poliakrilamidnom elektroforezom uz prisutstvo natrijevog dodecilsulfata. Protein je prekomjerno eksprimiran s plazmidnog vektora pMBGm19_P_{xylA}_ileS2 u bakteriji *B. megaterium*. Slovom M označen je korišteni marker *Precision Plus Protein Standards Unstained* (*Bio–Rad*) te ostale oznake stoje za: T–talog dobiven lizom stanica i centrifugiranjem, SN–frakcija topljivih proteina dobivenih nakon centrifugiranja liziranih stanica, NF–frakcija proteina koja se nije vezala na kolonu, A–frakcija proteina eluiranih s kolone ispiranjem puferom A (c (imidazol) = 10 mmol dm^{-3}), B–frakcija proteina eluiranih s kolone ispiranjem puferom B (c (imidazol) = 20 mmol dm^{-3}), D1–D5–frakcije proteina eluiranih s kolone ispiranjem puferom D (c (imidazol) = 200 mmol dm^{-3}), I–frakcija eluirana s kolone korištenjem otopine imidazola (c = 2 mol dm^{-3}).

Proteini pročišćeni afinitetnom kromatografijom ukoncentrirani su na centrikonu *Amicon Ultra Centrifugal Filters* (*Millipore*) koji ima pore kroz koje mogu proći sve molekule manje od 30 000 Da. Nakon ukoncentriravanja, korištenjem već navedenih vrijednosti molarnih masa i vrijednosti ekstinkcijskih koeficijenata ε (IleRS1) = 172120 dm^3 mol^{-1} cm^{-1}, odnosno ε (IleRS2) = 184040 dm^3 mol^{-1} cm^{-1} određena je koncentracija proteina na uređaju *NanoDrop* 1000. Iz 150 mL inducirane bakterijske kulture dobiveno je otprilike 1,5 mg proteina IleRS1 i 0,3 mg proteina IleRS2.

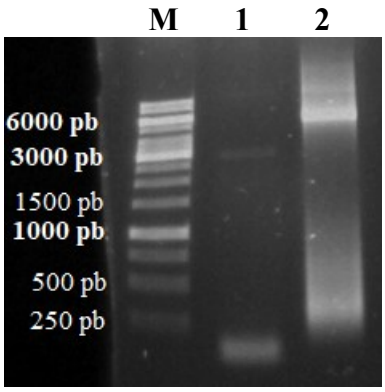
4.3. Homologna proizvodnja $tRNA^{Ile}$ u bakteriji *B. megaterium*

4.3.1. Ciljana mutageneza plazmida pP_{T7}

Za kinetičku karakterizaciju proteina IleRS1 i IleRS2 u ukupnoj reakciji aminoacilacije neophodna je molekula $tRNA^{Ile}$. Kako bi se proizvela dovoljna količina željene molekule

$tRNA^{Ile}$ u bakteriji *B. megaterium*, kodirajući slijed za navedenu molekulu potrebno je uklonirati u odgovarajući plazmidni vektor. Vektor pP_{T7} uobičajeno se koristi za prekomjernu ekspresiju proteina u bakteriji *B. megaterium*, a s obzirom da je ovdje cilj proizvesti molekulu $tRNA^{Ile}$ koja se ne translatira, potrebno je bilo iz vektora izbaciti vezno mjesto za ribosom (engl. *ribosome binding site*, RBS) koje prethodi mjestu za višestruko kloniranje (engl. *multiple cloning site*) u vektoru. Fragment vektora omeđen mjestima *Afl*II i *Spe*I sadrži i spomenuti RBS pa će se korištenjem tih restrikcijskih mjesta moći ukloniti kodirajući slijed za molekulu $tRNA^{Ile}$ i ujedno spriječiti translacija. Mjesto *Afl*II mutirano je u *Xho*I iz praktičnih razloga, kao što su dostupnost pojedinih restrikcijskih endonukleaza u laboratoriju i mogućnost kloniranja kodirajućeg slijeda za molekulu $tRNA^{Ile}$ iz bakterije *B. megaterium* u više različitih plazmidnih vektora. Restrikcijska endonukleaza *Afl*II prepoznaje nukleotidni slijed CTTAAG, a endonukleaza *Xho*I slijed CTCGAG, stoga su dva nukleotida TA mutirana u nukleotide CG (označeno žutom bojom).

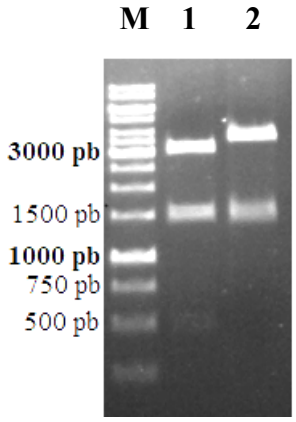
Ciljana mutageneza napravljena je PCR–om u kojem su korištene početnice koje su sadržavale željene mutacije (detaljno opisano u odjeljku 3.2.2.2.) te je korištena *Phusion*–DNA–polimeraza koja posjeduje 3' → 5' egzonukleaznu aktivnost kako bi se osigurala točnost sinteze mutirane plazmidne DNA, ali ne posjeduje 5' → 3' egzonukleazna aktivnost kako bi se onemogućilo cijepanje početnica koje sadrže željene mutacije. Tijekom optimizacije reakcijskih uvjeta, uz *Phusion*–DNA–polimerazu korištena je i *Q5*–DNA–polimeraza uz T_a = 55, 60 i 68 ˚C te uz T_a = 60 ˚C uz dodani reagens *Quik Solution* (*Agilent*), ali u tim reakcijama nije dobiven željeni produkt. *Phusion*–DNA–polimeraza dolazi uz dva komercijalna pufera, HF pufer u kojem je manja stopa pogreške polimeraze i GC pufer koji se koristi za umnažanje DNA molekula s visokim udjelom G i C nukleotida. PCR je napravljen u oba pufera, a samo je u reakciji s puferom HF dobiven produkt, ali u vrlo maloj količini pa je postupak optimizacije nastavljen. U sljedećem stupnju optimizacije, napravljen je PCR u dva koraka u kojem su koraci prianjanja početnica i elongacije spojeni u jedan korak napravljen na temperaturi T = 72 ˚C koristeći *Phusion*–DNA–polimerazu u puferu HF te su ispitane dvije različite koncentracije $MgCl_2$ (c = 2 i 2,5 mmol dm^{-3}). U PCR–u u dva koraka u kojem je korištena *Phusion*–DNA–polimeraza u HF puferu pri koncentraciji $MgCl_2$ (c = 2,5 mmol dm^{-3}) dobivena je zadovoljavajuća količina željenog produkta.



Slika 4.9. Produkti reakcija PCR napravljenih u svrhu zamjene restrikcijskog mjesta *Afl*II mjestom *Xho*I ciljanom mutagenezom. Produkti reakcije analizirani su elektroforezom na agaroznom gelu (1 % *w*/*V*). Korištena je *Phusion*–DNA–polimeraza u reakciji PCR pri čemu su koraci prianjanja početnica i elongacije napravljeni na temperaturi $T = 72$ ˚C, te su ispitane različite koncentracije $MgCl_2$: $c = 2$ mmol dm^{-3} (jamica 1) i c = 2,5 mmol dm^{-3} (jamica označena brojem 2).

Produkti PCR–a koji su napravljeni u svrhu ciljane mutageneze plazmida pP_{T7} analizirani su elektroforezom na agaroznom gelu (1 % *w*/*V*). Analizom produkata reakcije u kojoj je korišten $MgCl_2$ ($c = 2{,}5$ mmol dm^{-3}) utvrđeno je postojanje izražene linije koja se nalazi nešto ispod 6000 pb što sugerira da je plazmid pP_{T7} (veličine 5242 pb) uspješno umnožen. Prije transformacije bakterijskih stanica, smjesa je tretirana restrikcijskom endonukleazom *Dpn*I koja selektivno hidrolizira hemimetilirane i metilirane molekule DNA. Molekule DNA u bakterijskim se stanicama prirodno metiliraju, stoga je plazmid pP_{T7} izoliran iz bakterije *E. coli* metiliran, a mutirani plazmid sintetiziran PCR–om nije. Plazmidna DNA sintetizirana PCR–om nije cirkularizirana, već linearna dok je *in vivo* sintetizirana plazmidna DNA cirkularna i može se nalaziti u superzavijenoj formi. Superzavijena plazmidna DNA puno će jednostavnije transformirati bakterijsku stanicu od linearne molekule te je radi uklanjanja *in vivo* proizvedene plazmidne DNA korištena endonukleaza *Dpn*I. Potencijalno mutirani plazmid pP_{T7}_XhoI izoliran je komercijalnim kompletom *QIAprep Spin Miniprep Kit* (*Qiagen*) iz transformiranih bakterijskih stanica *E. coli*. Provjera uspješnosti uvođenja mutacije provjerena je restrikcijskom razgradnjom u kojoj su korištene endonukleaze *Nco*I i *Xho*I. Izvorni i mutirani plazmidni vektori mogu se razlikovati na temelju broja fragmenata i veličine fragmenata koji će nastati djelovanjem spomenutih restrikcijskih endonukleaza pa će tako u slučaju izvornog plazmida pP_{T7} restrikcijom nastati dva fragmenta veličina: 3692 i 1550 pb, a u slučaju mutiranog plazmida pP_{T7}_XhoI nastat će tri fragmenta veličina: 511, 1550 i 3181 pb.

Eksperimentalno dobiveni rezultati odgovaraju teorijski izračunatim što sugerira da je ciljana mutageneza bila uspješna (slika 4.10.)

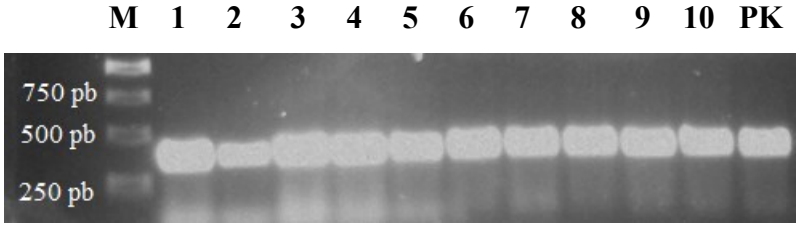


Slika 4.10. Restrikcijska razgradnja mutiranog i izvornog plazmida pP_{T7} enzimima *Nco*I i *Xho*I analizirana elektroforezom na agaroznom gelu (1 % *w*/*V*). Restrikcijsko mjesto *Afl*II u izvornom plazmidu ciljanom je mutagenezom mutirano u mjesto *Xho*I. Na slici je slovom M označen marker veličina *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (*Thermo Fischer Scientific*), brojem 1 označen je razgrađeni plazmid pP_{T7}_XhoI te brojem 2 razgrađeni plazmid pP_{T7}.

4.3.2. Konstrukcija rekombinantnih plazmida za homolognu nadeskpresiju $tRNA^{Ile}$ iz bakterije B. megaterium

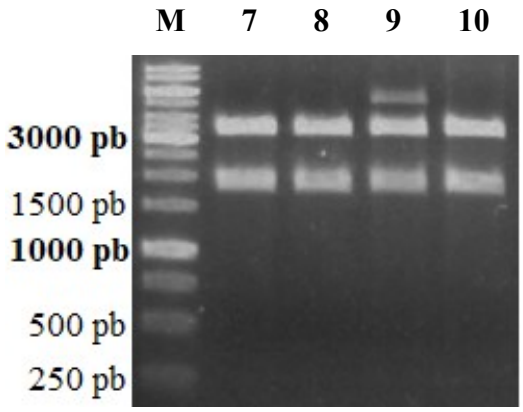
Nakon što je restrikcijskom razgradnjom utvđeno da je mjesto *Afl*II uspješno mutirano u mjesto *Xho*I (čime je nastao plazmid pP_{T7}_XhoI), omogućeni su uvjeti za konstrukciju rekombinantog plazmidnog vektora. Kodirajući slijed za izoakceptor $tRNA^{Ile}_{GAU}$ umnožen je PCR–om u kojem je kao kalup poslužio plazmidni vektor ΔpET3a s prethodno ukloniranim željenim kodirajućim slijedom. Isti izoakceptor je korišten u svim fazama istraživanja. Početnice su dizajnirane na način da se njihove T_m vrijednosti ne razlikuju za više od 5 ˚C pa je tako uzvodna početnica imala vrijednost T_m = 64 ˚C, a nizvodna T_m = 62 ˚C. Na 5'–kraj uzvodne početnice dodan je nukleotidni slijed CTCGAG kojeg prepoznaje endonukleaza *Xho*I, a neposredno prije njega slijed GAGAGAG kako bi se olakšalo vezanje restrikcijske endonukleaze. Na 5'–kraj nizvodne početnice dodan je nukleotidni slijed ACTATG kojeg prepoznaje endonukleaza *Spe*I, a neposredno prije njega također je dodan slijed GAGAGAG koji olakšava vezanje restrikcijske endonuklaze. U rekombinantom plazmidu ΔpET3a_$tRNA^{Ile}$, T7–promotor nalazi se neposredno prije slijeda koji kodira molekulu $tRNA^{Ile}$, a T7–terminator započinje 64 nukleotida poslije zadnjeg nukleotida molekule tRNA. PCR–om umnožena je regija koja uključuje T7–promotor i T7–terminator. Rekombinanti plazmid pP_{T7}_XhoI kao i umnoženi insert

pocijepani su endonukleazama *Xho*I i *Spe*I nakon čega su pročišćeni korištenjem komercijalnog kompleta *QIAquick PCR Purification Kit* (*Qiagen*) i ligirani korištenjem *T4*–DNA–ligaze. Budući da plazmid pP_{T7} na kraju mjesta za višestruko kloniranje također posjeduje T7–terminator, ukloniravanjem PCR produkta opisanog u prethodnim rečenicama nastao je konstrukt koji sadrži dva T7–terminatora međusobno udaljena 93 nukleotida (udaljenost između zadnjeg nukleotida jednog i prvog nukleotida drugog T7–terminatora). Bakterijske stanice *E. coli* (soj *NEB Stable*) transformirane su ligacijskom smjesom koja je sadržavala rekombinanti plazmid. Bakterijske kolonije narasle na hranjivoj podlozi analizirane su PCR–om na bakterijskim kolonijama uz korištenje inserta pocijepanog enzimima *Xho*I i *Spe*I kao pozitivne kontrole. Produkti PCR–a na bakterijskim kolonijama analizirani su elektroforezom na agaroznom gelu (1 % *w*/*V*) te je u svim uzorcima vidljiva linija veličine oko 300 pb (slika 4.11.) što je u skladu s teorijski izračunatom veličinom produkta od 335 pb iz čega se može zaključiti da sve analizirane bakterijske kolonije sadrže rekombinanti plazmid pP_{T7}_$tRNA^{Ile}$.



Slika 4.11. Produkti reakcija PCR na bakterijskim kolonijama analizirani elektroforezom na agaroznom gelu (1 % *w*/*V*). Slovom M označen je korišteni marker veličina *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (*Thermo Fischer Scientific*), brojevima 1–10 označeno je 10 analiziranih bakterijskih kolonija te PK označava korištenu pozitivnu kontrolu (insert pocijepan restrikcijskim enzimima *Xho*I i *Spe*I).

Uzete su 4 bakterijske kolonije (klonovi 7, 8, 9, 10 sa slike 4.11.) za koje je PCR–om utvrđeno da sadrže rekombinanti plazmid pP_{T7}_$tRNA^{Ile}$ te su pripremljene zasićene prekonoćne kulture iz kojih je zatim izolirana i pročišćena plazmidna DNA kojoj je zatim određena koncentracija. Kako bi se provjerilo sadrže li rekombinantni plazmidi željeni insert, napravljena je razgradnja plazmida restrikcijskom endonukleazom *Pvu*II jer kodirajući slijed za molekulu $tRNA^{Ile}$ sadrži mjesto *Pvu*II te su rezultati razgradnje zatim analizirani elektroforezom na agaroznom gelu (1 % *w*/*V*).

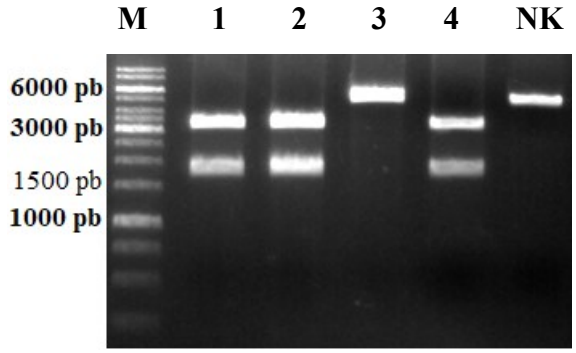


Slika 4.12. Fragmenti plazmida pP_{T7}_$tRNA^{Ile}$ nastali razgradnjom restrikcijskom endonukleazom *Pvu*II i analizirani elektroforezom na agaroznom gelu (1 % *w*/*V*). Slovom M označen je korišteni marker veličina *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (*Thermo Fischer Scientific*), brojevima 7–10 označeni su bakterijski klonovi iz kojih je izolirana plazmidna DNA, a za koje je PCR–om na bakterijskim kolonijama utvrđeno da sadrže rekombinanti plazmid.

Analizom fragmenata izoliranih plazmidnih vektora nastalih razgradnjom restrikcijskom endonukleazom *Pvu*II potvrđeno je da se radi o željenim rekombinantim plazmidima pP_{T7}_$tRNA^{Ile}$. Teorijski izračunate veličine fragmenata koji bi trebali nastati spomenutom razgradnjom su: 153, 1928 i 3383 pb. Fragment od 153 pb je premalen da bi se vidio na agaroznom gelu nakon provedene elektroforeze, ali su fragmenti od 1928 i 3383 pb jasno vidljivi (slika 4.12.). U slučaju klona 9 vidljiva je jedna dodatna linija veličine nešto manje od 6000 pb koja bi mogla odgovarati nerazgrađenom rekombinantnom plazmidu (veličina pP_{T7}_$tRNA^{Ile}$ je 5464 pb), ali zbog razlike u odnosu na analizirane plazmide izolirane iz ostalih bakterijskih klonova plazmid iz klona 9 nije korišten u daljnjem istraživanju. Na temelju koncentracija i čistoće pročišćenih plazmida, rekombinanti plazmidi izolirani iz bakterijskih klonova 7 i 10 sekvencirani su u DNA servisu tvrtke *Macrogen* te je sekvenciranjem utvrđeno da su plazmidi u redu i da ne sadrže nikakve mutacije.

Molekula $tRNA^{Ile}$ nije uspješno prekomjerno eksprimirana s rekombinantog plazmidnog vektora pP_{T7}_$tRNA^{Ile}$ u bakteriji *B. megaterium* (detaljnije u odjeljku 4.3.3.), stoga je dizajniran još jedan rekombinanti plazmid s kojeg je pokušana prekomjerna ekspresija $tRNA^{Ile}$ u bakteriji *B. megaterium*. Za stvaranje drugog rekombinantog plazmida kao insert je korišten sintetski oligonukleotid koji je sadržavao T7–promotor na koji se direktno nastavlja kodirajući slijed za molekulu $tRNA^{Ile}$ iz bakterije *B. megaterium* te se na 5'–kraju kodirajućeg lanca nalazi restrikcijsko mjesto *Sal*I (GTCGAC), a na 5'–kraju komplementarnog lanca restrikcijsko mjesto *Bam*HI (GGATCC). T7–promotor direktno se

nastavlja na *Sal*I restrikcijsko mjesto, a restrikcijsko mjesto *Bam*HI počinje odmah nakon zadnjeg nukleotida molekule tRNA. Lanci sintetskog oligionukleotida su prethodno hibridizirani i 5'–krajevi oba lanca DNA su fosforilirani. Insert je sintetiziran na način da ima stršeće krajeve identične onima koji bi nastali cijepanjem endonukleazama *Sal*I i *Bam*HI, a plazmidni vektor pP_{T7}_XhoI pocijepan je endonukleazama *Xho*I i *Bam*HI nakon čega su insert i plazmid ligirani. Enzimi *Sal*I i *Xho*I su izokaudomeri što znači da njihovim djelovanjem nastaju komplementarni stršeći krajevi iako su nukleotidni sljedovi koje ti enzimi prepoznaju različiti. Bakterijske stanice *E. coli* (soj XL10–Gold) kemijski su transformirane ligacijskom smjesom nakon čega su uzgojene prekonoćne kulture 4 bakterijska klona iz kojih je izolirana plazmidna DNA i analizirana restrikcijskom razgradnjom endonukleazom *Pvu*II. Novi rekombinanti plazmidni vektor pP_{T7}_$tRNA^{Ile}$_2 sadržavao je samo jedan T7–terminator udaljen 37 pb od zadnjeg nukleotida inserta.



Slika 4.13. Fragmenti plazmidne DNA dobiveni restrikcijskom razgradnjom enzimom *Pvu*II analizirani su elektroforezom na gelu agaroze (1 % *w*/*V*). Analiza restrikcijskom razgradnjom napravljena je kako bi se provjerilo koje bakterijske kolonije *B. megaterium* sadrže rekombinantni plazmid pP_{T7}_$tRNA^{Ile}$_2. Slovom M označen je korišteni marker veličina *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (*Thermo Fischer Scientific*), brojevima 1–4 bakterijski klonovi iz kojih je izolirana plazmidna DNA za analizu, oznakom NK označena je negativna kontrola (prazan pP_{T7}_XhoI plazmidni vektor).

Analizom produkata restrikcijske razgradnje endonukleazom *Pvu*II izolirane plazmidne DNA uočeni su fragmenti približne veličine 3500 pb i fragmenti nešto manji od 2000 pb u uzorcima 1, 2, 4 (slika 4.13.) dok je u uzorku 3 i negativnoj kontroli uočen jedan fragment približne veličine 5000 pb. Teorijski izračunate veličine fragmenata koji bi trebali nastati razgradnjom rekombinantog plazmida pP_{T7}_$tRNA^{Ile}$_2 endonukleazom *Pvu*II iznose: 153, 1973 i 3221 pb što odgovara eksperimentalno određenoj veličini fragmenata dobivenih u uzorcima 1, 2 i 4, osim fragmenta veličine 153 pb koji je premali da bi se mogao uočiti ovakvom analizom.

Teorijski je izračunato da bi razgradnjom praznog plazmida pP_{T7}_XhoI endonukleazom *Pvu*II trebala nastati dva fragmenta veličina: 153 i 5089 pb. Fragment dobiven u uzorku 3 otprilike i jest veličine 5000 pb što je u skladu s teorijskim rezultatom, ali i sa empirijskim rezultatom dobivenim u slučaju negativne kontrole gdje je korišten prazan plazmid pP_{T7}_XhoI. Na temelju obrazloženih rezultata analize, može se zaključiti da bakterijski klonovi 1, 2 i 4 sadrže rekombinantni plazmidni vektor pP_{T7}_$tRNA^{Ile}$_2 dok klon 3 sadrži prazan plazmid pP_{T7}_XhoI. Na temelju rezultata analize restrikcijskom razgradnjom, plazmidi izolirani iz bakterijskih klonova 1 i 2 poslani su na sekvenciranje u DNA servis tvrtke *Macrogen* čime je utvđeno da je klon 1 u redu, stoga je korišten u daljnjem istraživanju.

4.3.3. Prekomjerna ekspresija $tRNA^{Ile}$ u bakteriji B. megaterium

Prekomjerna ekspresija molekule $tRNA^{Ile}$ u bakteriji *B. megaterium* prvo je isprobana s plazmidnog vektora pP_{T7}_$tRNA^{Ile}$. Kodirajući slijed za molekulu $tRNA^{Ile}$ ukloniran je, u tom vektoru, pod T7–promotor, stoga su protoplasti *B. megaterium* uz transformaciju plazmidom pP_{T7}_$tRNA^{Ile}$ kotransformirani plazmidom pT7–RNAP koji sadrži gen za T7–RNA–polimerazu pod kontrolom inducibilnog ksiloznog promotora (P_{xylA}). Transformacija protoplasta *B. megaterium* i prekomjerna ekspresija molekule $tRNA^{Ile}$ u istoj bakteriji detaljnije su opisani u odjeljcima 3.2.1.4. i 3.2.4.1. Prekomjerna ekspresija molekule tRNA ispitana je pri mnogim eksperimentalnim uvjetima. Ekspresija molekule tRNA inducirana je dodatkom ksiloze (finalno 0,5 % *w*/*V*) u hranjivi LB medij te su uzorci analizirani nakon 6 i 18 h od početka indukcije. Indukcija je također pokušana variranjem finalne koncentracije ksiloze pa su tako korištene sljedeće koncentracije: 1, 2 i 5 % (*w*/*V*) u hranjivom LB mediju, ali je isto tako ispitana indukcija ksilozom (1 % *w*/*V*) u PM mediju te su analizirani uzorci nakon 4, 18, 24 i 40 h od početka indukcije. Navedeni pokušaji nisu dali rezultata, tj. analizom elektroforezom na poliakrilamidnom gelu uz prisutnost uree nije uočena nikakva prekomjerna ekspresija $tRNA^{Ile}$. Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu uz prisutnost uree korištena je za provjeru prekomjerne ekspresije molekule $tRNA^{Ile}$ i u svim kasnijim analizama. Zanimljivo da prekomjerna ekspresija molekule $tRNA^{Ile}$ nije bila uspješna, dok u je slučaju proteina IleRS1 bila uspješna iako se u oba slučaja koristio isti sustav za prekomjernu ekspresiju u bakteriji *B. megaterium*. Budući da je u slučaju proteina IleRS1 pokazano da je navedeni sustav za prekomjernu ekspresiju u redu, ponovljena je tranformacija novih protoplasta *B. megaterium* te su uzgojene prekonoćne bakterijske kulture *E. coli* klonova 7 i 10 iz kojih su zatim izolirani

plazmidi pP_{T7}_$tRNA^{Ile}$ za ponovnu transformaciju protoplasta *B. megaterium* kako bi se provjerilo da rezultat nije posljedica eksperimentalne pogreške. Transformirani protoplasti *B. megaterium* zatim su nasađeni na krutu hranjivu podlogu (postupak opisan u odjeljku 3.2.1.4.) i kad su bakterije narasle na podlozi, odabrana je jedna bakterijska kolonija transformirana plazmidom iz klona 7 i jedna iz klona 10 te su postavljene prekonoćne kulture kako bi se potom ispitala prekomjerna ekspresija $tRNA^{Ile}$ u tim uzorcima. Indukcija je pokušana različitim kombinacijama koncentracije ksiloze bez i uz dodani $MgCl_2$. Korištena je ksiloza finalnih koncentracija: 0,5 i 2 % (*w*/*V*) te $MgCl_2$ koncentracija: 1; 2,5; 5 mmol dm^{-3}, indukcija oba bakterijska klona ispitana je u hranjivom LB mediju koristeći sve moguće kombinacije navedenih koncentracija ksiloze i $MgCl_2$, ali su ispitani uzorci i bez dodatka $MgCl_2$ te je uz hranjivi LB korišten i minimalni medij za bakteriju *B. megaterium* u kojem je indukcija ekspresije ispitana uz finalne koncentracije ksiloze: 0,5 i 2 % (*w*/*V*) bez dodanog $MgCl_2$. Nažalost, niti ovaj put analizom nije uočena prekomjerna ekspresija molekule $tRNA^{Ile}$ u bakteriji *B. megaterium*. Kako bi se pokušalo otkriti je li nepostojanje prekomjerne ekspresije vezano uz plazmid pT7–RNAP i T7–RNA–polimerazu ili uz vektor pP_{T7}_$tRNA^{Ile}$, ispitana je prekomjerna ekspresija molekule $tRNA^{Ile}$ s plazmidnog vektora pP_{T7}_$tRNA^{Ile}$ u bakteriji *E. coli*. Budući da se željeni kodirajući slijed nalazi pod kontrolom inducibilnog T7–promotora, prekomjerna ekspresija je ispitana u soju BL21(DE3) koji sadrži kodirajući slijed za T7–RNA–polimerazu pod kontrolom inducibilnog promotora *lac*UV5 i koji se može inducirati IPTG–om. Stanice bakterije *E. coli* transformirane su plazmidom pP_{T7}_$tRNA^{Ile}$, nakon čega su uzgojene na krutom hranjivom LB mediju te su odabrana dva klona s krute hranjive podloge koji su korišteni za pripremu tekućih bakterijskih kultura. Ekspresija je inducirana IPTG–om (finalno c = 1 mmol dm^{-3}) na 30 °C. Ukupna tRNA iz stanice je izolirana postupkom opisanim u odjeljku 3.2.4.1. te analizirana elektroforezom na poliakrilamidnom gelu uz prisutnost uree (slika 4.14.) prema postupku opisanom u odjeljku 3.2.4.2. Uz tRNA ovim postupkom se izolira i genomska DNA koja se naknadno eliminira kroz taloženje s PEG-om.

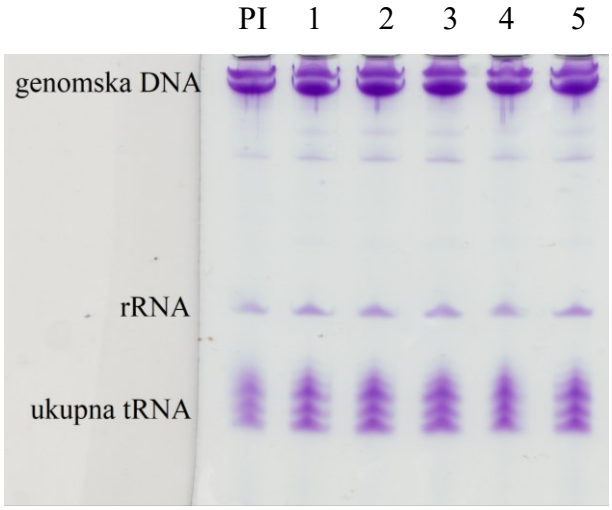


Slika 4.14. Analiza izoliranih nukleinskih kiselina iz inducirane bakterijske kulture *E. coli* elektroforezom na poliakrilamidnom gelu uz prisustvo uree. Oznakama 10.1 i 10.2 označeni su analizirani bakterijski klonovi.

Rezultati analize nukleinskih kiselina izoliranih iz bakterije *E. coli* pokazali su da ne postoji prekomjerna ekspresija molekule $tRNA^{Ile}$ jer na gelu nije vidljiva niti jedna linija koja bi se isticala puno jačim intenzitetom od ostalih (slika 4.14.). Ovim je potvrđeno da prekomjerna ekspresija molekule tRNA s rekombinantog plazmida pP_{T7}_$tRNA^{Ile}$ nije moguća.

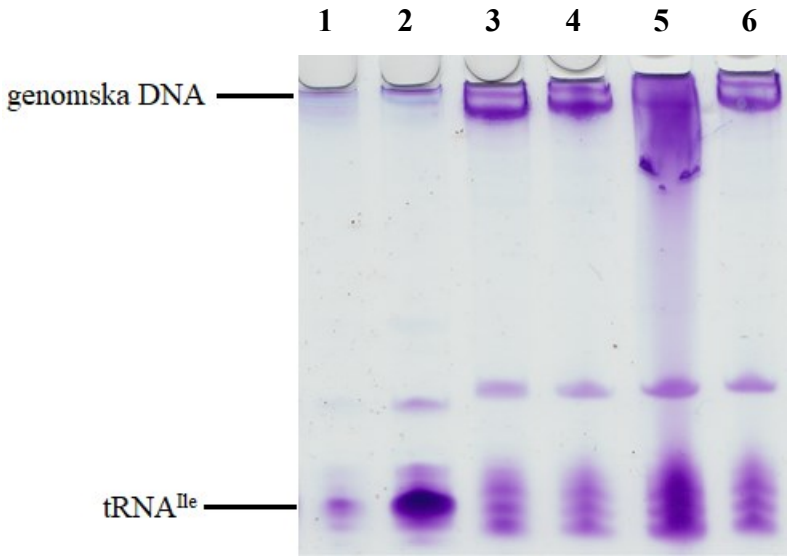
Budući da prekomjerna ekspresija molekule $tRNA^{Ile}$ s plazmidnog vektora pP_{T7}_$tRNA^{Ile}$ nije bila uspješna niti u bakteriji *B. megaterium* niti u bakteriji *E. coli*, pokušaji prekomjerne ekspresije $tRNA^{Ile}$ nastavljeni su uz korištenje vektora pP_{T7}_$tRNA^{Ile}$_2. Za analizu prekomjerne ekspresije u bakteriji *B. megaterium* odabrana su tri bakterijska klona narasla na hranjivoj podlozi. Ekspresija je inducirana dodatkom ksiloze finalne koncentracije 0,5 % (*w*/*V*) na 30 i 37 ˚C u hranjivom LB mediju te je jedan klon analiziran nakon 2; 3,5 i 15 h od početka indukcije, a ostala dva klona su analizirana nakon 15 h. Indukcija je isprobana i finalnom koncentracijom ksiloze 0,5 % (*w*/*V*) uz dodatak $MgCl_2$ (c = 1 mmol dm^{-3}) odnosno koncentracijom ksiloze 2 % (*w*/*V*). Indukcija prekomjerne ekspresije molekule $tRNA^{Ile}$ u bakteriji *B. megaterium* isprobana je ksilozom (finalno 0,5 % (*w*/*V*)) uz dodani izoleucina u hranjivi medij, korištene su finalne koncentracije Ile: 10, 100 i 1000 μmol dm^{-3} te je analiziran i uzorak u koji je uz Ile (c = 100 μmol dm^{-3}) sadržavao i $MgCl_2$ (c = 1 mmol dm^{-3}). Niti ovaj

put prekomjerna ekspresija molekule $tRNA^{Ile}$ u bakteriji *B. megaterium* nije bila uspješna (slika 4.15.).



Slika 4.15. Analiza izoliranih nukleinskih kiselina iz neinducirane i induciranih bakterijskih kultura *B. megaterium* transformiranih rekombinantim plazmidom pP_{T7}_$tRNA^{Ile}$_2 elektroforezom na poliakrilamidnom gelu uz prisutstvo uree. Oznakom PI označen je uzorak prije indukcije, a brojevima 1–5 sljedeći uzorci: 1 – ksiloza (0,5 % *w*/*V*); 2 – ksiloza (0,5 % *w*/*V*) + Ile (c = 10 μmol dm^{-3}); 3 – ksiloza (0,5 % *w*/*V*) + Ile (c = 100 μmol dm^{-3}); 4 – ksiloza (0,5 % w/V) + Ile (c = 100 μmol dm^{-3}) + MgCl2 (c = 1 mmol dm^{-3}); 5 – ksiloza (0,5 % *w*/*V*) + Ile (c = 1 mmol dm^{-3}).

Nakon neuspjele prekomjerne ekspresije $tRNA^{Ile}$ u bakteriji *B. megaterium*, ispravnost rekombinantog plazmida pP_{T7}_$tRNA^{Ile}$_2 isprobana je indukcijom prekomjerne ekspresije molekule $tRNA^{Ile}$ iz bakterije *B. megaterium* u bakteriji *E. coli* (soj BL21(DE3)).



Slika 4.16. Analiza izoliranih nukleinskih kiselina iz neinduciranih i induciranih bakterijskih kultura *E. coli* i *B. megaterium* transformiranih rekombinantim plazmidom pP_{T7}_tRNA^{Ile}_2 elektroforezom na poliakrilamidnom gelu uz prisustvo uree. Indukcija je trajala 12 h, a brojevima su označeni sljedeći uzorci: 1–*E. coli* prije indukcije (PI), 2–*E. coli* + IPTG (c = 1 mmol dm^{-3}), 3–*B. megaterium* PI, 4–*B. megaterium* + ksiloza (0,5 % *w*/*V*), 5–*B. megaterium* + ksiloza (0,5 % *w*/*V*) + $MgCl_2$ (c = 1 mmol dm^{-3}), 6–*B. megaterium* + ksiloza (2 % *w*/*V*).

Rezultati analize inducirane bakterijske kulture *E. coli* pokazali su da u toj bakteriji postoji prekomjerna ekspresija molekule tRNA^{Ile} iz bakterije *B. megaterium* s plazmida pP_{T7}_tRNA^{Ile}_2. U induciranoj bakterijskoj kulturi *E. coli* (uzorak 2, slika 4.16.) jasno je istaknuta linija koja odgovara prekomjerno eksprimiranoj molekuli tRNA^{Ile}, koja nije vidljiva niti u bakterijskoj kulturi *E. coli* prije indukcije (uzorak 1, slika 4.16.) kao niti u uzorcima bakterije *B. megaterium* prije ili poslije indukcije provedene pri raznim uvjetima (uzorci 3–6, slika 4.16.). Na temelju ovih rezultata zaključeno je da proizvodnja molekule tRNA^{Ile} u bakteriji *B. megaterium* nije moguća (potencijalni razlozi za to navedeni su u detaljnije su odjeljku 5.2.). S obzirom na nemogućnost homologne proizvodnje molekule tRNA^{Ile}, odlučeno je proizvesti željenu molekulu tRNA^{Ile} u bakteriji *E. coli* u kojoj je utvrđeno postojanje prekomjerne ekspresije molekule tRNA^{Ile}.

4.4. Heterologna proizvodnja $tRNA^{Ile}$ u bakteriji *E. coli*

4.4.1. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje heterologne $tRNA^{Ile}$ u bakteriji E. coli

S obzirom da homologna prekomjerna ekspresija molekule $tRNA^{Ile}$ u bakteriji *B. megaterium* nije bila uspješna, prekomjerna ekspresija napravljena je s rekombinantog plazmidnog vektora ΔpET3a_$tRNA^{Ile}$ u bakteriji *E. coli*. Iako je pokazano da je molekulu $tRNA^{Ile}$ moguće prekomjerno eksprimirati i s plazmida pP_{T7}_$tRNA^{Ile}$_2 u bakteriji *E. coli*, taj plazmid ipak nije korišten jer on ponajprije služi za kloniranje u bakteriji *E. coli* zbog čega je u toj bakteriji prisutan u većem broju kopija u stanici, dok je ΔpET3a ekspresijski vektor za bakteriju *E. coli* i u stanici je prisutan u manjem broj kopija (engl. *low copy*) zbog čega predstavlja manje metaboličko opterećenje za stanicu. Stanice bakterije *E. coli* (soj BL21(DE3)) koje su sadržavale plazmid ΔpET3a_$tRNA^{Ile}$ uzgojene su prvo na krutoj hranjivoj podlozi, a zatim i u tekućem hranjivom LB mediju uz odgovarajući antibiotik na 37 ˚C (detaljnije opisano u odjeljku 3.2.4.1.). Zasićena prekonoćna bakterijska kultura razrijeđena je 100 × u tekućem LB mediju uz dodani odgovarajući antibiotik, inducirana je ekspresija molekule $tRNA^{Ile}$ te su po završetku indukcije izolirane ukupne nukleinske kiseline iz stanice. Molekule DNA su od molekula tRNA odvojene korištenjem otopine PEG/NaCl–a nakon čega su molekule tRNA precipitirane i deacilirane te je u konačnici otopina molekula tRNA dijalizirana. Uspješnost uklanjanja molekula DNA analizirana je elektroforezom na poliakrilamidnom gelu u prisutstvu uree.



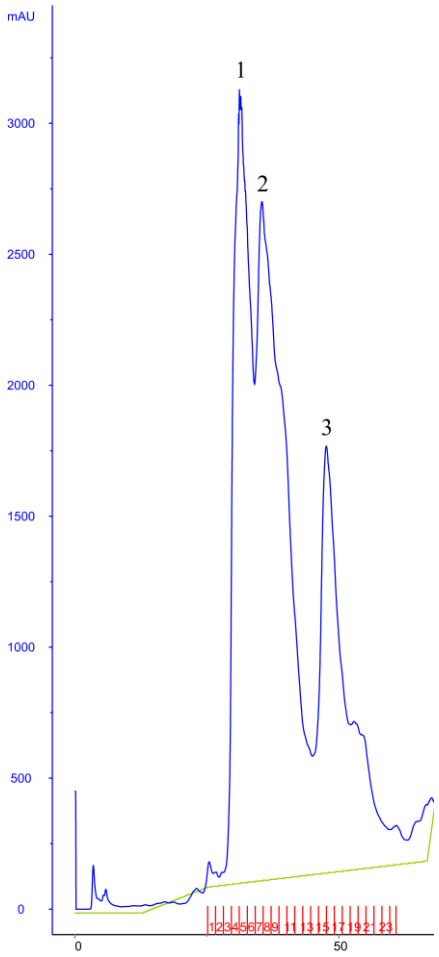
Slika 4.17. Uspješnost PEG–iranja otopine ukupno izolirane tRNA s prekomjerno eksprimiranim izoakceptorom $tRNA^{Ile}$ iz bakterije *B. megaterium* u bakteriji *E. coli*. Korištene oznake odgovaraju uzorcima: ukupne nukleinske kiseline (NK), talog dobiven PEG–iranjem i centrifugiranjem (T), supernatant dobiven PEG–iranjem i centrifugiranjem (SN).

Otopina izoliranih nukleinskih kiseline iz bakterije *E. coli*, te talog i supernatant dobiveni nakon postupka PEG–iranja analizirani su elektroforezom na poliakrilamidnom gelu uz prisutnost uree (slika 4.17.). U uzorku koji sadrži ukupne nukleinske kiseline vidljiva je na vrhu gela linija koja odgovara molekulama DNA (genomu) kao i linije koje odgovaraju molekulama tRNA uz jednu liniju koja se izrazito ističe, a odgovara prekomjerno eksprimiranoj molekuli $tRNA^{Ile}$. U uzorku supernatanta dobivenog PEG–iranjem i centrifugiranjem vidljive su linije koje odgovaraju molekulama tRNA, ali nisu vidljive linije koja odgovaraju molekulama DNA iz čega je može zaključiti da je uklanjanje molekula DNA bilo uspješno. Analizom uzorka taloga dobivenog PEG–iranjem i centrifugiranjem potvrđeno je da je ukupna DNA istaložena i to praktički bez gubitaka prekomjerno eksprimirane molekule $tRNA^{Ile}$. Iz svega navedenog, može se zaključiti da je pročišćavanje uzorka tRNA od molekula DNA bilo uspješno i da su gubitci molekule tRNA od interesa bili minimalni. Izmjerena je koncentracija uzoraka koji su sadržavali pročišćenu tRNA i zatim su pohranjeni na –20 ˚C.

4.4.2. Pročišćavanje heterologno nadeksprimirane $tRNA^{Ile}$ kromatografijom obrnutih faza

Akceptorska aktivnost izolirane ukupne tRNA iz bakterije *E. coli* koja sadrži prekomjerno eksprimiranu $tRNA^{Ile}$ iz bakterije *B. megaterium* iznosila je gotovo 86 % (postupak opisan u odjeljku 3.2.5.5.). Akceptorska aktivnost odgovara postotku molekula tRNA u uzorku koje se mogu aminoacilirati korištenjem odgovarajuće aaRS, u ovom slučaju IleRS. Zbog visokog udjela aktivne $tRNA^{Ile}$ u ukupnoj tRNA bilo je moguće ispitati aminoacilacijski profil uzorka tRNA što je i učinjeno koristeći enzime IleRS1 i IleRS2 uz radioaktivno obilježeni [^{14}C]–Ile (odjeljak 4.4.3.). U reakciji aminoacilacije s enzimima IleRS1 ili IleRS2 uočene su dvije kinetičke faze (slika 4.20.). Pretpostavljeno je da dvije kinetičke faze potječu od postojanja barem dvije različite forme izoakceptora $tRNA^{Ile}$ u uzorku, a koje se razlikuju u kinetičkim svojstvima. Postojanje različitih formi izoakceptora $tRNA^{Ile}$ u uzorku prvo je provjereno analizom kromatografijom obrnutih faza (engl. *reverse–phase chromatography*, RPC), a ista je metoda potom korištena za razdvajanje pojedinih formi.

Za kromatografiju obrnutih faza korišteni su uzorci tRNA volumena $V = 50$ μL različitih koncentracija (γ = 60–100 μg μL^{-1}) (detaljnije opisano u odjeljku 3.2.4.3.). Jednako dobro razdvajanje kromatografskih vrhova je postignuto pri svim korištenim koncentracijama tRNA. U kromatogramu su vidljiva tri kromatografska vrha (slika 4.18.) za koje je pretpostavljeno da odgovaraju različitim formama $tRNA^{Ile}_{GAU}$ od interesa i koje se zadržavaju različito vrijeme u koloni te su skupljene frakcije eluata koje odgovaraju pojedinom kromatografskom vrhu. Spojene su sve frakcije koje odgovaraju istom kromatografskom vrhu te im je izmjerena koncentracija na uređaju *NanoDrop* 1000 i izračunat je udio pojedine forme u uzorku nanošenom na kolonu pa je tako forma 1 činila otprilike 10 %, forma 2 otprilike 7 % i forma 3 otprilike 5% uzorka. Suma udjela sve tri forme $tRNA^{Ile}$ nakon pročišćavanja kromatografijom iznosi oko 22 % što je značajno manje od prvotno dobivene akceptorske aktivnosti (86 %), ali uzroci niske iskoristivosti procesa pročišćavanja nisu razjašnjeni. Svakoj od formi određena je akceptorska aktivnost i aminoacilacijski profil korištenjem radioaktivno obilježenog [^{14}C]–Ile (rezultati detaljno opisani u odjeljku 4.4.3.).



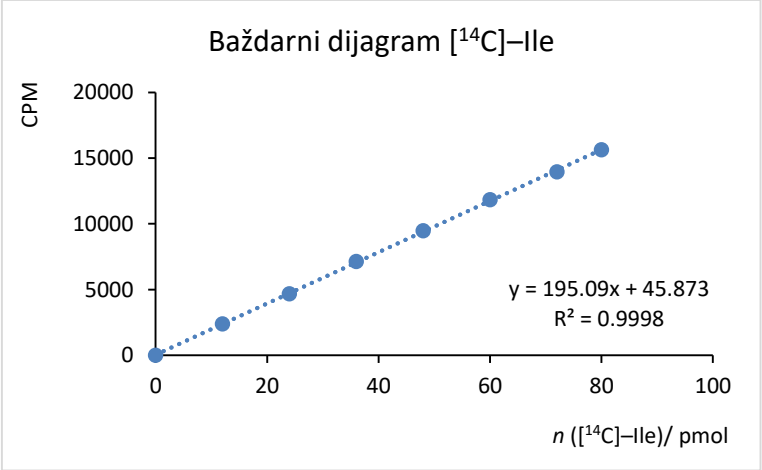
Slika 4.18. Reprezentativni kromatogram ukupne tRNA iz bakterije *E. coli* s prekomjerno eksprimiranim izoakceptorom $tRNA^{Ile}$ iz bakterije *B. megaterium*. Na slici su označeni kromatografski vrhovi 1–3 koji odgovaraju različitim formama izoakceptora $tRNA^{Ile}$ koji se različitim afinitetom vežu na stacionarnu fazu kolone pa se tako forma 1 veže najslabije, dok se forma 3 veže najjače. Zelenom bojom prikazano je gradijentno povećanje koncentracije EtOH u puferu za eluciju.

4.4.3. Određivanje akceptorske aktivnosti heterologno nadeksprimirane $tRNA^{Ile}$ i vremenski tijek aminoacilacije uz radioaktivno obilježeni [^{14}C]*–Ile*

Aminoacilacija uz [^{14}C]–izoleucin jedna je od metoda korištenih za određivanje aminoacilacijskog profila i akceptorske aktivnosti tRNA. Metoda se temelji na detekciji i određivanju količine radioaktivno obilježenih molekula ([^{14}C]–Ile–$tRNA^{Ile}$), produkta reakcije katalizirane enzimom IleRS. U reakciji se koristi [^{14}C]–Ile obilježen na α–C atomu zbog čega je produkt reakcije radioaktivno obilježen. Akceptorska aktivnost uzorka ukupne tRNA iz

bakterije *E. coli* s prekomjerno eksprimiranim izoakceptorom $tRNA^{Ile}$ iz bakterije *B. megaterium* određena je uz korištenje [^{14}C]–Ile.

Za određivanje količine nastale [^{14}C]–Ile–$tRNA^{Ile}$, potrebno je konstruirati baždarni dijagram. Baždarni dijagram (prikazan na slici 4.19.) napravljen je tako što su u scintilacijskom brojaču izmjereni otkucaji otopina koje sadrže [^{14}C]–Ile točno poznate koncentracije. S obzirom da je poznat volumen otopina, lako se izračuna množina [^{14}C]–Ile u pojedinom uzorku. Ovisnost broja otkucaja u minuti (engl. *count per minute*, CPM) o množini [^{14}C]–Ile predstavlja baždarni pravac, a linearnom regresijom dobiveni su nagib i odsječak (nagib pravca ovisi o specifičnoj radioaktivnosti, odnosno o udjelu radioaktivnog izoleucina u ukupnom uzorku izoleucina) pravca pomoću kojih se iz izmjerenih CPM–ova alikvota reakcijske smjese izračuna množina nastalog [^{14}C]–Ile–$tRNA^{Ile}$ u uzorku. Budući da je poznat volumen analiziranog alikvota reakcijske smjese, iz izračunate množine [^{14}C]–Ile–$tRNA^{Ile}$ izračunata je i koncentracija. Omjer izračunate množine [^{14}C]–Ile–$tRNA^{Ile}$ i ukupne množine tRNA korištene u reakciji predstavlja akceptorsku aktivnost.



Slika 4.19. Baždarni dijagram koji prikazuje ovisnost otkucaja u minuti o množini radioaktivno obilježenog [^{14}C]–Ile.

Kako bi se osigurala potpuna aminoacilacija izoakceptora $tRNA^{Ile}$ u uzorku, korištena je koncentracija enzima veća od koncentracije tRNA, c (IleRS1) = 5 μmol dm^{-3}, c (tRNA) = 2 μmol dm^{-3} te je reakcija provedena u vremenskom periodu koji osigurava maksimalnu moguću aminoacilaciju (zadnji alikvot reakcijske smjese analiziran je nakon 20 minuta od početka reakcije). Kinetičkom analizom prekomjerno eksprimirane $tRNA^{Ile}$ enzimima IleRS1 i IleRS2 (slika 4.20.) uočeno je postojanje nekoliko kinetičkih faza što

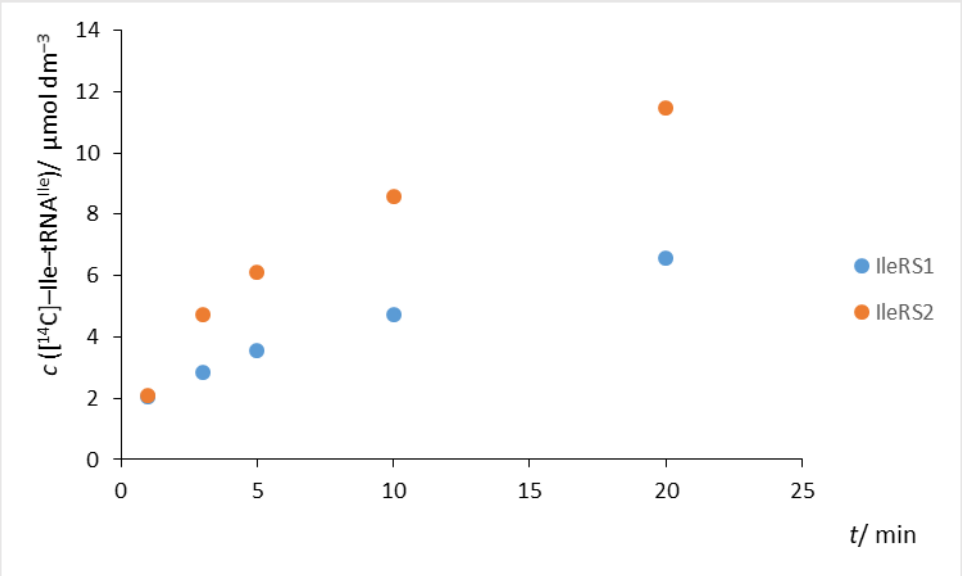
sugerira postojanje više različitih vrsta $tRNA^{Ile}$ u uzorku zbog čega je uzorak podvrgnut analizi kromatografijom obrnutih faza (detaljnije opisano u odjeljku 3.2.4.3.) U kromatogramu su uočena tri kromatografska vrha koja vjerojatno odgovaraju trima formama izoakceptora $tRNA^{Ile}$ (slika 4.18.). Poslije početne analize, napravljeno je preparativno pročišćavanje prekomjerno eksprimirane $tRNA^{Ile}$ te su prikupljene frakcije koje odgovaraju pojedinom kromatografskom vrhu i zatim pripremljene za kinetičku analizu. Svakoj od frakcija određeni su akceptorska aktivnost i aminoacilacijski profil koristeći enzime IleRS1 i IleRS2 uz radioaktivno obilježeni [^{14}C]–Ile.

Tablica 4.1. Akceptorska aktivnost frakcije uzorka tRNA koja pripada pojedinom kromatografskom vrhu dobivenog korištenjem kromatografije obrnutih faza i ukupne izolirane tRNA. Za određivanje akceptorske aktivnosti korišten je enzim koncentracije c = 5 μmol dm^{-3} pri čemu je koncentracija tRNA iznosila c = 2 μmol dm^{-3}.

Enzim	Frakcija tRNA	Akceptorska aktivnost
IleRS1	1	97,7 %
	2	96,8 %
	3	93,8 %
	ukupna tRNA	77,6 %
IleRS2	1	99,7 %
	2	96,8 %
	3	97,4 %
	ukupna tRNA	83,7 %

Akceptorska aktivnost svake od frakcija tRNA dobivenih kromatografijom obrnutih faza bila je vrlo visoka (viša od 95 %) čime je potvrđeno da svaka frakcija sadrži $tRNA^{Ile}$, ali da se frakcije razlikuju u prisutnoj formi tog izoakceptora. Na temelju različitog elucijskog vremena može se zaključiti da pojedine frakcije sadrže različite forme $tRNA^{Ile}_{GAU}$. Vidljivo je da između enzima IleRS1 i IleRS2 ne postoji značajna razlika u sposobnosti aminoacilacije pojedine frakcije tRNA.

Kao što je već spomenuto, kromatografiji obrnutih faza prethodilo je određivanje aminoacilacijskog profila nadeksprimirane $tRNA^{Ile}$ kinetikom ustaljenog stanja koristeći enzime IleRS1 te IleRS2. U ovom eksperimentu korištena je znatno manja koncentracija enzima u odnosu na tRNA kako bi se ostvarili uvjeti za provedbu kinetike ustaljenog stanja.



Slika 4.20. Aminoacilacija heterologno prekomjerno eksprimirane $tRNA^{Ile}$ iz bakterije *B. megaterium* u bakteriji *E. coli* enzimima IleRS1 i IleRS2 iz bakterije *B. megaterium*. Za praćenje reakcije korišten je radioaktivno obilježen [^{14}C]–Ile. Reakcija je napravljena na 30 °C, *c* (enzim) = 20 nmol dm^{-3}, *c* ([^{14}C]–Ile) = 50 mmol dm^{-3}, *c* (ATP) = 4 mmol dm^{-3}, *c* (tRNA) = 20 µmol dm^{-3}.

Uočeno je da u slučaju enzima IleRS2 vremenska ovisnost nastajanja produkta ([^{14}C]–Ile–$tRNA^{Ile}$) nije linearna, već postoje dvije faze (slika 4.20.). U slučaju enzima IleRS1 dvije faze nisu toliko izražene, ali postoje. Na temelju rezultata dobivenih uz korištenje [^{32}P]–tRNA (slika 4.25.) zaključeno je da se 10 % ukupne tRNA aminoacilira brzo kad se koristi enzim IleRS1, stoga u ovom eksperimentu nije uhvaćena prva kinetička faza (koncentracija [^{14}C]–Ile–$tRNA^{Ile}$ u prvoj vremenskoj točki je oko 2 µmol dm^{-3} što odgovara 10 % ukupne korištene tRNA). Prva kinetička faza u slučaju IleRS2 traje otprilike do 3. minute reakcije. Zanimljivo je da se u istom vremenskom intervalu (nakon 20 min reakcije) dvostruko više tRNA aminoaciliralo koristeći IleRS2 u odnosu na IleRS1. Postojanje više kinetičkih faza u uzorku tRNA sugerira da se u uzorku nalazi nekoliko vrsta (barem dvije) molekule $tRNA^{Ile}$. Zbog bifaznog aminoacilacijskog profila, uzorak tRNA analiziran je kromatografijom obrnutih faza, a zatim je napravljeno i preparativno pročišćavanje uzorka tRNA istom metodom (odjeljak 3.2.4.3.). U kromatogramu su uočena tri kromatografska vrha koja vjerojatno odgovaraju trima formama izoakceptora $tRNA^{Ile}$ (slika 4.18.). Frakcije koje odgovaraju pojedinom kromatografskom vrhu skupljene su i pripremljene za kinetičku analizu. Svakoj od frakcija je nakon određivanja akceptorske aktivnosti određen i aminoacilacijski profil koristeći enzime IleRS1 i IleRS2 uz radioaktivno obilježeni [^{14}C]–Ile.

Izmjereni koeficijenti brzine reakcije s pojedinim frakcijama tRNA dobivenim RPC–om i s uzorkom tRNA prije pročišćavanja navedene su u tablici 4.2. Važno je napomenuti da je koncentracija [^{14}C]–Ile u reakciji ograničena komercijalno dostupnim otopinama radioaktivno obilježenog izoleucina i da zbog korištene koncentracije u reakciji (c = 50 μmol dm^{-3}) najvjerojatnije nisu postignuti uvjeti potpunog zasićenja zbog čega izračunati koeficijenti brzine reakcije ne odgovaraju nužno k_{cat} vrijednostima. Enzim IleRS1 aminoacilira tRNA iz frakcije 1 i 2 gotovo istom brzinom, dok tRNA iz frakcije 3 aminoacilira brzinom nešto većom od 2 × u odnosu na frakcije 1 i 2. Brzina aminoacilacije uzorka tRNA prije pročišćavanja kromatografijom također je vrlo slična brzinama za frakcije 1 i 2 što je i očekivano s obzirom da one čine veći dio uzorka (vidljivo iz relativne veličine kromatografskih vrhova na kromatogramu prikazanom na slici 4.18.). Kad je u pitanju IleRS2, brzina aminoacilacije frakcije 2 tRNA nešto je brža u odnosu na frakciju 1 iako je ta razlika zanemariva, a tRNA iz frakcije 3 najbrže se aminoacilira. Ukupna tRNA prije pročišćavanja aminoacilira se brzinom koja se nalazi između brzina frakcija 1 i 2 što je očekivano iz već spomenutih razloga. Budući da se ne zna jesu li postignuti uvjeti potpunog zasićenja i odgovara li opažen koeficijent reakcije (k_{obs}) obrtnom broju (k_{cat}), ne mogu direktno uspoređivati brzine enzima IleRS1 i IleRS2, ali se kod oba enzima opaža isti trend, a to je vrlo slična brzina aminoaciliranja tRNA iz frakcija 1 i 2 te brža aminoacilacija u slučaju tRNA iz frakcije 3 s tim da je brzina aminoacilacije ukupne tRNA vrlo slična brzinama frakcije 1 i 2. Na temelju ovih rezultata zaključeno je da je tRNA iz frakcije 3 kinetički najkompetentnija.

Tablica 4.2. Brzina aminoacilacije pojedine frakcije uzorka tRNA koja pripada pojedinom kromatografskom vrhu dobivenom korištenjem kromatografije obrnutih faza i uzorka tRNA prije pročišćavanja kromatografijom. Brzina aminoacilacije određena je koristeći enzime IleRS1 i IleRS2 uz radioaktivno obilježeni [^{14}C]–Ile (c = 50 μmol dm^{-3}).

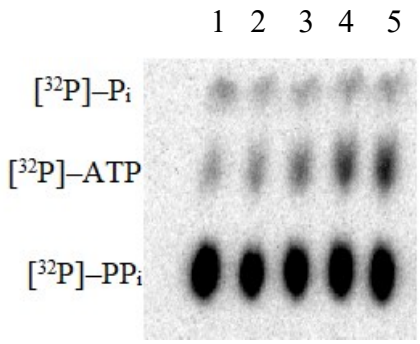
Enzim	tRNA	k_{obs}/ s^{-1}
IleRS1	frakcija 1	0,32
	frakcija 2	0,31
	frakcija 3	0,77
	ukupna tRNA	0,32
IleRS2	frakcija 1	0,72
	frakcija 2	0,85
	frakcija 3	1,22
	ukupna tRNA	0,84

4.5. Kinetička karakterizacija homologno proizvedenih proteina IleRS1 i IleRS2 iz bakterije *B. megaterium*

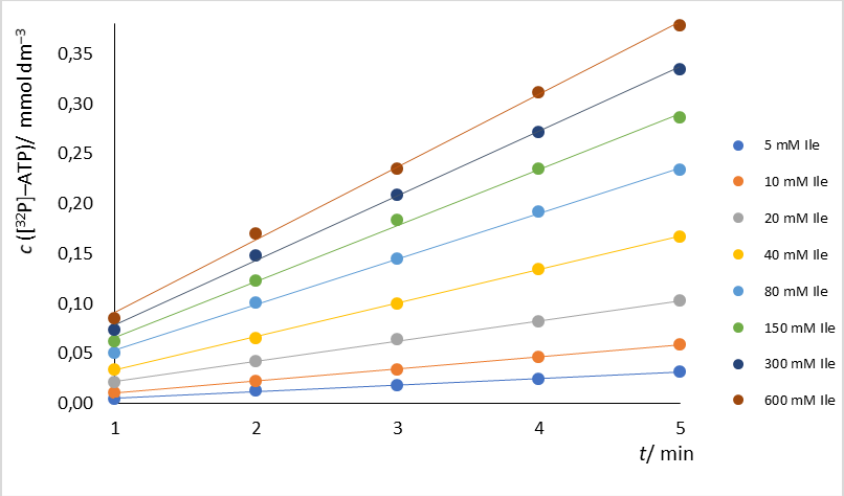
4.5.1. Aktivacija izoleucina

Aktivacija je prvi korak ukupne reakcije aminoacilacije u kojem enzimi aaRS kataliziraju nastajanje aminoacil–adenilata (aa–AMP) i PP_i iz aminokiseline i ATP–a. Aktivacija izoleucina praćena je standardnom metodom izmjene pirofosfata koristeći enzime IleRS1 i IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* (postupak opisan u odjeljku 3.2.5.1.). Brzina nastajanja Ile–AMP–a zapravo se prati indirektno mjerenjem brzine povratne reakcije (pirofosforolize) u kojoj radioaktivno obilježeni [^{32}P]–PP_i nukleofilno napada atom fosfora u anhidridnoj vezi Ile–AMP–a pri čemu nastaju radioaktivno obilježeni [^{32}P]–ATP i Ile. Preliminarni podaci su pokazali da enzimi IleRS1 i IleRS2 imaju različite vrijednosti K_M za ATP u reakciji aktivacije zbog čega je u reakcijama s IleRS1 korišten ATP (c = 4 mmol dm^{-3}), a u reakcijama s IleRS2 c (ATP) = 15 mmol dm^{-3}. Za oba enzima reakcija aktivacije napravljena je pri 8 različitih koncentracija Ile u približnom rasponu 0,1–10 × K_M vrijednosti u vremenskom periodu u kojem su zadovoljeni uvjeti ustaljenog stanja. Kako bi bilo moguće promatrati samo reakciju aktivacije, potrebno je onemogućiti odvijanje drugog koraka reakcije aminoacilacije (prijenos aminokiseline na molekulu tRNA) radi čega reakcijska smjesa nije sadržavala tRNA. Po završetku reakcije, u reakcijskoj smjesi nalaze se radioaktivni spojevi: [^{32}P]–ATP, [^{32}P]–PP_i i [^{32}P]–P_i koji su razdvojeni tankoslojnom kromatografijom (slika 4.21.) te su zatim kromatrografske pločice izložene na zaslonu s uskladištenim fosforom nakon čega je ploča s uskladištenim fosforom snimljena na uređaju *PhosphorImager Typhoon* 9410. Rezultati su kvantificirani pomoću programa *ImageQuant* 5.2 čime je dobiven intenzitet svakog pojedinog signala.

Omjer intenziteta signala radioaktivnog [^{32}P]–ATP i zbroja intenziteta signala [^{32}P]–ATP i [^{32}P]–PP_i odgovara množinskom udjelu nastalog [^{32}P]–ATP u reakciji pirofosforolize. Umnožak množinskog udjela [^{32}P]–ATP i početne koncentracije PP_i korištenog u reakciji (c = 1 mmol dm^{-3}) odgovara koncentraciji nastalog [^{32}P]–ATP. Iz ovisnosti koncentracije [^{32}P]–ATP–a o vremenu linearnom regresijom su izračunate početne brzine nastajanja [^{32}P]–ATP–a, tj. početne brzine aktivacije aminokiseline.



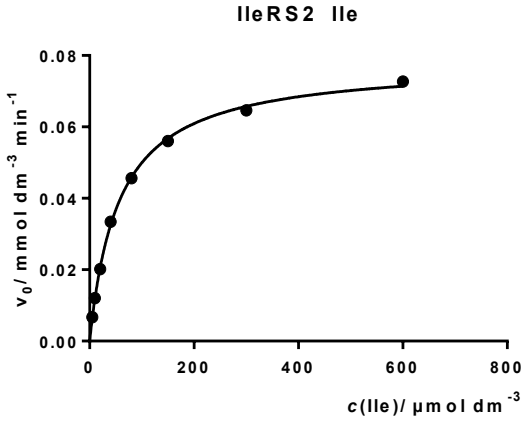
Slika 4.21. Reprezentativni kromatogram [^{32}P]–ATP, [^{32}P]–PP$_i$, [^{32}P]–P$_i$ razdvojenih tankoslojnom kromatografijom. Analizirani su alikvoti reakcije u vremenskim intervalima kako slijedi s lijeva na desno: 1, 2, 3, 4, 5 min.



Slika 4.22. Reprezentativni prikaz 8 vremenskih tijekova izmjene [^{32}P]–PP$_i$ i [^{32}P]–ATP–a u reakciji aktivacije. U reakciji je korišten enzim IleRS2 (c = 20 nmol dm^{-3}). Nagib pojedinog pravca odgovara početnoj brzini reakciji pri određenoj koncentraciji izoleucina, a korištene koncentracije izoleucina su: 5, 10, 20, 40, 80, 150, 300, 600 mmol dm^{-3}.

Na grafičkom prikazu na slici 4.22. prikazano je 8 vremenskih tijekova nastajanja radioaktivno obilježenog [^{32}P]–ATP–a kojim se prati reakcija aktivacije aminokiseline. Grafički je prikazan rezultat reakcije napravljene s enzimom IleRS2 (c = 20 nmol dm^{-3}) pri čemu je koncentracija PP$_i$ u reakcijskoj smjesi bila c = 1 mmol dm^{-3}. Vidljivo je da koncentracija radioaktivno obilježenog [^{32}P]–ATP–a linearno raste u vremenu iz čega se može zaključiti da su zadovoljeni uvjeti ustaljenog stanja. Isto tako na grafičkom prikazu vidi se porast nagiba pravaca koji odgovara početnim brzinama pojedinih reakcija, a to sugerira da su korištene koncentracije izoleucina u rasponu pogodnom za određivanje kinetičkih parametara k_{cat} i K_M.

Ovisnost početne brzine reakcije aktivacije o koncentraciji izoleucina utočnjena je u jednadžbu Michaelis–Menten koristeći računalni program *GraphPad Prism* 6.01 čime su dobiveni kinetički parametri k_{cat} i K_M za izoleucin. Reprezentativni grafički prikaz te ovisnosti prikazan je na slici 4.23.



Slika 4.23. Reprezentativni prikaz ovisnosti početne brzine reakcije o koncentraciji izoleucina s enzimom IleRS2. Podaci su utočnjeni u jednadžbu Michaelis–Menten.

Obrtni broj enzima (k_{cat}) odgovara broju molekula supstrata koje se prevedu u molekule produkta po molekuli enzima u jedinici vremena u uvjetima potpunog zasićenja enzima supstratom. Michaelisova konstanta (K_M) funkcija je koeficijenta brzine reakcije svih koraka reakcijskog mehanizma, a praktično odgovara onoj koncentraciji supstrata pri kojoj je početna brzina reakcije jednaka polovici maksimalne brzine.

Mjerenja za pojedini enzim napravljena su dva puta, a kinetički parametri izračunati iz podataka dobivenih u oba mjerenja navedeni su u tablici 4.3. pri čemu prikazana pogreška predstavlja standardnu grešku prosjeka. Vidljivo je da nema značajne razlike u k_{cat} vrijednosti ova dva enzima (razlika je oko 2 puta), ali zato postoji razlika u K_M (Ile) vrijednosti koja je nešto više od 25 puta veća za IleRS2. Budući da je K_M prividni afinitet enzima prema supstratu u reakciji koju pratimo (veći K_M znači veću potrebnu količinu supstrata da se postigne maksimalna brzina), iz dobivenih se rezultata može zaključiti da, u reakciji aktivacije koja je prvi korak ukupne aminoacilacije i mjeri se u odsutnosti tRNA, IleRS2 ima manji afinitet prema izoleucinu od IleRS1.

Tablica 4.3. Kinetički parametri za izoleucin u reakciji aktivacije za enzime IleRS i IleRS2 iz bakterije *B. megaterium*.

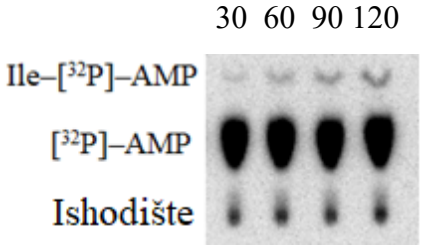
Enzim	k_{cat}/ s^{-1}	K_M (Ile)/ μmol dm^{-3}	k_{cat}/K_M (Ile) $\mu mol^{-1}\ dm^{-3}\ s^{-1}$
IleRS1	34,3 ± 0,6	2,0 ± 0,1	17,2
IleRS2	64,5 ± 0,6	53 ± 2	1,2

4.5.2. Aminoacilacija uz [^{32}P]*–tRNA*

Aminoacilacija uz [^{14}C]–Ile–$tRNA^{Ile}$ napravljena je s enzimima IleRS1 i IleRS2 te ukupnom tRNA izoliranom iz bakterije *E. coli* s heterologno prekomjerno eksprimiranom $tRNA^{Ile}$ iz bakterije *B. megaterium*. U reakciji aminoacilacije uočene su dvije kinetičke faze (odjeljak 4.4.3.). Kako bi se dodatno provjerilo potječe li bifaznost sustava samo od uzorka tRNA, a ne nečeg drugog u reakcijskoj smjesi (subsaturacije s Ile), napravljena je aminoacilacija i uz radioaktivno obilježenu [^{32}P]–tRNA. Izotopom [^{32}P] obilježena je ukupna tRNA izolirana iz *E. coli* s heterologno prekomjerno eksprimiranom $tRNA^{Ile}$ iz bakterije *B. megaterium* te je iskorištena za određivanje početnih brzina aminoacilacije, kinetičkih parametara k_{cat} i K_M za supstrate: izoleucin i ATP u reakciji aminoacilacije, te za određivanje akceptorske aktivnosti tRNA. Za preliminarno određivanje kinetičkih parametara enzima IleRS1 i IleRS2 korištena je izolirana ukupna tRNA jer je pročišćavanje tRNA kromatografijom obrnutih faza dugotrajan proces pa se frakcija 3 (koja se pokazala najboljom u aminoacilaciji uz [^{14}C]–Ile) nije htjela trošiti na preliminarne eksperimente. Iako je bilo u planu ponoviti eksperimente s tRNA koja je pročišćena kromatografijom obrnutih faza, zbog nedostatka vremena, vezano uz epidemiološku situaciju, to ipak nije napravljeno. S obzirom da je akceptorska aktivnost ukupne tRNA visoka i da najzastupljenije izoforme pokazuju visok stupanj aktivnosti, ovi rezultati su vjerodostojni. Za određivanje K_M vrijednosti za izoleucin i ATP u reakcijama je varirana koncentracija supstrata za koji se određivala K_M vrijednost u približnom rasponu 0,1–10 × K_M. U reakcijama rađenim za određivanje K_M vrijednosti za izoleucin koncentracija ATP–a iznosila je c = 4 mmol dm^{-3}, dok je za određivanje K_M vrijednosti za ATP koncentracija izoleucina iznosila c = 1 mmol dm^{-3}.

Nakon obilježavanja izolirane ukupne tRNA radioaktivnim izotopom [^{32}P] (postupak opisan u odjeljku 3.2.5.3.), akceptorska aktivnost tRNA se može smanjiti. Zbog toga je nakon

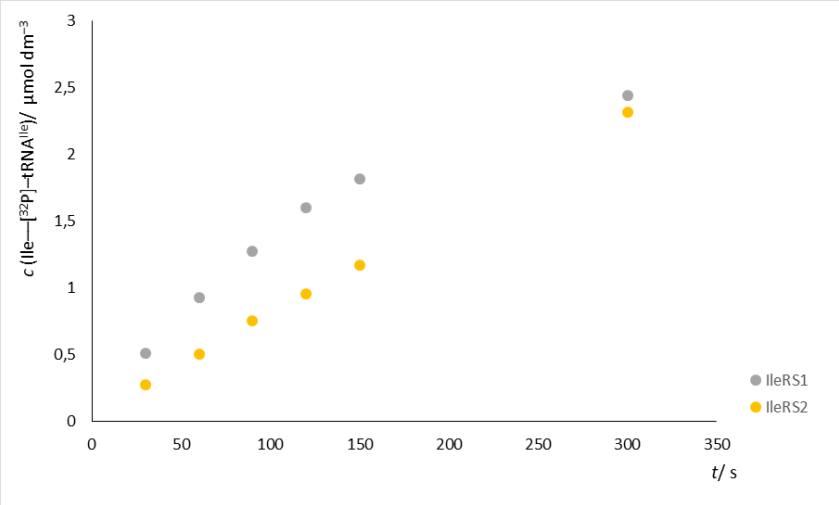
obilježavanja određena akceptorska aktivnost obilježene tRNA i iznosila je 75%. Svi rezultati korigirani su s obzirom na akceptorsku aktivnost [^{32}P]–tRNA. Reakcija aminoacilacije napravljena je pri reakcijskim uvjetima navedenim u odjeljku 3.2.5.4. Po završetku reakcije, molekule tRNA u reakcijskim alikvotima razgrađene su na pojedinačne nukleotide P1 nukleazom. Razgradnjom aminoacilirane [^{32}P]–tRNA nastaje Ile–[^{32}P]–AMP, a razgradnjom neaminoacilirane tRNA nastaje [^{32}P]–AMP te su ta dva produkta razdvojena tankoslojnom kromatografijom (reprezentativno prikazano na slici 4.24.). Razvijena kromatografska pločica izlagana je na zaslonu s uskladištenim fosforom nakon čega je zaslon s uskladištenim fosforom snimljen na uređaju *PhosphorImager Typhoon* 9410. Rezultati su kvantificirani pomoću programa *ImageQuant* 5.2, a zatim su kvantificirani podaci analizirani korištenjem programa *GraphPad Prism* 6.01 i MS Office *Excel*.



Slika 4.24. Reprezentativni kromatogram Ile–[^{32}P]–AMP i [^{32}P]–AMP razdvojenih tankoslojnom kromatografijom. Analizirani su alikvoti reakcije u vremenskim intervalima kako slijedi s lijeva na desno: 30, 60, 90, 120 s.

Obilježena [^{32}P]–tRNA korištena je za praćenje vremenskog tijeka aminoacilacije koristeći enzime IleRS1 i IleRS2 (c = 10 nmol dm^{-3}) uz koncentracije supstrata: c (tRNA) = 30 μmol dm^{-3}, c (Ile) = 1 mmol dm^{-3}, c (ATP) = 4 mmol dm^{-3} na 30 °C (grafički prikazano na slici 4.25.). Utvrđeno je da je ovisnost nastajanja Ile–tRNA^{Ile} o vremenu linearna tijekom cijelog praćenog perioda u slučaju IleRS2, ali da to nije slučaj kod enzima IleRS1 kod kojeg linearnost vrijedi do 120. sekunde. Spomenuta linearna vremenska ovisnost kod IleRS2 zapravo znači da se reakcija aminoacilacije tijekom cijelog vremenskog perioda odvijala jednakom brzinom dok se kod enzima IleRS1 prvi dio reakcije (prvih 120 s reakcije) odvijao brže od drugog dijela reakcije. Postojanje više kinetičkih faza u reakciji aminoacilacije prekomjerno eksprimirane tRNA^{Ile} enzimom IleRS1 u skladu je s rezultatima dobivenim u reakciji aminoacilacije uz [^{14}C]–Ile (odjeljak 4.4.3.) i rezultatima analize izolirane ukupne tRNA kromografijom obrnutih faza (odjeljak 4.4.2.). Iako je brzina aminoacilacije konstantna, to ne znači da ne postoje dvije faze u slučaju IleRS2 (koje su opažene uz [^{14}C]–Ile). Zbog

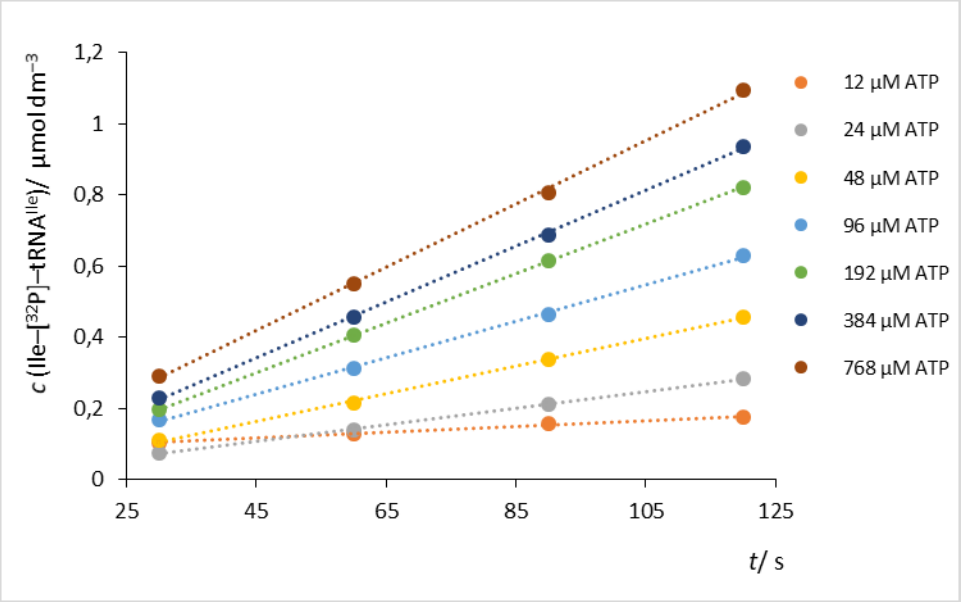
različitih koncentracija enzima i tRNA u reakcijama uz [^{32}P]–tRNA (c (enzim) = 10 nmol dm^{-3}, c (tRNA) = 30 μmol dm^{-3}) u odnosu na reakcije uz [^{14}C]–Ile (c (enzim) = 20 nmol dm^{-3}, c (tRNA) = 20 μmol dm^{-3}) i kraćeg vremenskog trajanja reakcije, vjerojatno je uz [^{32}P]–tRNA praćena samo prva (brža faza) reakcije.



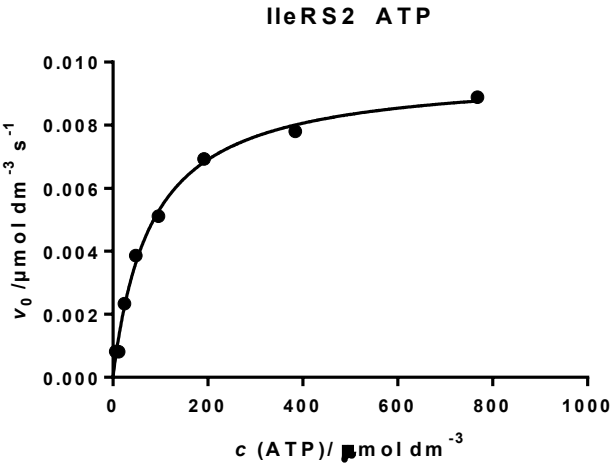
Slika 4.25. Aminoacilacija heterologno prekomjerno eksprimirane tRNA^{Ile} iz bakterije *B. megaterium* u bakteriji *E. coli* enzimima IleRS1 i IleRS2 iz bakterije *B. megaterium*. Za praćenje reakcije korištena je radioaktivno obilježena [^{32}P]–tRNA. Reakcija je napravljena na 30 ˚C uz koncentracije enzima i supstrata: c (enzim) = 10 nmol dm^{-3}, c (Ile) = 1 mmol dm^{-3}, c (ATP) = 4 mmol dm^{-3}, c (tRNA) = 30 μmol dm^{-3}.

Zbog već spomenutih razloga, u ovim je eksperimentima korištena ukupna tRNA izolirana iz bakterije *E. coli* s prekomjerno eksprimiranom tRNA^{Ile} iz bakterije *B. megaterium*. Za određivanje koeficijenata brzine reakcije korišteni su intervali koji osiguravaju praćenje samo prve, brže faze aminoacilacije tRNA^{Ile} iz uzorka ukupne tRNA pa je tako u slučaju IleRS1 korišteno prvih četiri, a u slučaju IleRS2 prvih pet vremenskih točaka s grafa prikazanog na slici 4.25. Izračunate vrijednosti koeficijenata brzine reakcije iznose: k_{obs} (IleRS1) = 1,20 s^{-1} te k_{obs} (IleRS2) = 0,75 s^{-1}. U reakcijama napravljenim u svrhu određivanja k_{cat} i K_M vrijednosti eksperimentalni uvjeti su prilagođeni tako da se osigura linearnost u slučaju oba enzima (reprezentativni vremenski tijek prikazan je na slici 4.26.) te su nelinearnom regresijom dobiveni podaci utočnjeni u jednadžbu Michaelis–Menten (grafički prikazano na slici 4.27.). Iako se eksperimentalno nikad ne može dostići maksimalna brzina reakcije koja se teorijski izračunava iz nelinearne regresije eksperimentalnih podataka prema jednadžbi

Michaelis–Menten, korištenjem koncentracija supstrata barem 10 × većih od pripadajućih K_M vrijednosti može se dobiti k_{obs} vrlo blizak teorijskoj k_{cat} vrijednosti. Budući da su korištene koncentracije supstrata znatno veće od pripadajućih K_M vrijednosti, osigurano je potpuno zasićenje enzima supstratima te bi izmjerene k_{obs} vrijednosti trebale biti bliske k_{cat} vrijednostima.



Slika 4.26. Reprezentativni prikaz 7 vremenskih tijekova nastajanja radioaktivno obilježenog Ile–[^{32}P]–tRNA u reakciji aminoacilacije. U reakciji je korišten enzim IleRS2 (c = 20 nmol dm^{-3}) i radioaktivno obilježena [^{32}P]–tRNA. Nagib pojedinog pravca odgovara početnoj brzini reakciji pri određenoj koncentraciji ATP–a, a korištene koncentracije ATP–a su: 12, 24, 48, 96, 192, 384, 768 µmol dm^{-3}.



Slika 4.27. Reprezentativni prikaz ovisnosti početne brzine reakcije o koncentraciji ATP–a s enzimom IleRS2. Podaci su utočnjeni u jednadžbu Michaelis–Menten.

Tablica 4.4. Kinetički parametri k_{cat} i K_M enzima IleRS1 i IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* za supstrate: izoleucin i ATP u ukupnoj reakciji aminoacilacije.

Enzim	k_{cat} (Ile)/ s^{-1}	k_{cat} (ATP)/ s^{-1}	K_M (Ile)/ µmol dm^{-3}	K_M (ATP)/ µmol dm^{-3}	k_{cat}/ s^{-1}
IleRS1	1,89 ± 0,04	1,78 ± 0,08	44 ± 4	283 ± 38	1,84 ± 0,06
IleRS2	0,81 ± 0,02	0,9 ± 0,3	5,1 ± 0,6	69 ± 7	0,85 ± 0,06

Kinetički parametri k_{cat} i K_M za oba supstrata (izoleucin i ATP) za enzime IleRS1 i IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* navedeni su u tablici 4.4. Određene k_{cat} vrijednosti vrlo su slične neovisno o tome je li vrijednost izračunata nelinearnom regresijom ovisnosti početne brzine reakcije aminoacilacije o koncentraciji izoleucina ili ATP–a što sugerira da su sve reakcije napravljene u uvjetima potpunog zasićenja supstratima. Iz podataka je vidljivo da između enzima IleRS1 i IleRS2 nema značajne razlike u maksimalnoj brzini aminoacilacije (2 ×), ali da postoji razlika u K_M vrijednostima za supstrate. Enzim IleRS1 ima nešto manje od 9 × veći K_M za Ile od enzima IleRS2, a oko 4 × veći K_M za ATP. Usporedbom kinetičkih parametara enzima IleRS1 i IleRS2 u ukupnoj reakciji aminoacilacije s parametrima u reakciji aktivacije (koji su navedeni u odjeljku 4.5.1.) vidi se da u ukupnoj aminoacilaciji dolazi do znatnog pada brzine reakcije. Nakon što su određene K_M vrijednosti za supstrate Ile i ATP u reakciji aminoacilacije uz radioaktivno obilježenu [^{32}P]–tRNA, puno su se bolje mogli protumačiti rezultati dobiveni u reakciji aminoacilacije napravljenoj uz radioaktivno obilježeni [^{14}C]–Ile. Kao što je rečeno u odjeljku 4.4.3., koncentracija [^{14}C]–Ile ograničena je komercijalno

dostupnim otopinama radioaktivno obilježenog izoleucina te je u reakciji iznosila c = 50 μmol dm^{-3}. Budući da u slučaju enzima IleRS2 K_M vrijednost za Ile u reakciji aminoacilacije iznosi K_M = 5,1 μmol dm^{-3} i da je znatno manja nego u reakciji aktivacije gdje je K_M = 53 μmol dm^{-3}, korištena koncentracija radioaktivno obilježenog [^{14}C]–Ile (c = 50 μmol dm^{-3}) osigurava potpuno zasićenje enzima IleRS2 izoleucinom. Izmjerena brzina reakcije aminoacilacije uz [^{14}C]–Ile iznosila je k_{obs} = 0,84 s^{-1} što je vrlo bliska vrijednost obrtnom broju izračunatom nelinearnom regresijom prema jednadžbi Michaelis–Menten za reakciju aminoacilacije uz [^{32}P]–tRNA (k_{cat} = 0,85 s^{-1}) i dodatna je potvrda da je korištena koncentracija [^{14}C]–Ile dovoljna da se postigne potpuno zasićenje enzima IleRS2. U slučaju enzima IleRS1 u reakciji aminoacilacije došlo je do povećanja K_M vrijednosti za Ile (K_M = 2,0 μmol dm^{-3} u reakciji aktivacije u odnosu na K_M = 44 μmol dm^{-3}) zbog čega u reakciji aminoacilacije uz [^{14}C]–Ile nije postignuto potpuno zasićenje enzima IleRS1 izoleucinom te opaženi koeficijent reakcije (k_{obs}) ne odgovara obrtnom broju (k_{cat}) enzima. Koristeći [^{14}C]–Ile izmjeren je k_{obs} = 0,32 s^{-1}, a obrtni broj izračunat nelinearnom regresijom prema jednadžbi Michaelis–Menten za reakciju aminoacilacije uz [^{32}P]–tRNA iznosio je k_{cat} = 1,80 s^{-1}. Zbog različitih koncentracija enzima i tRNA, odnosno vremena u kojem se pratila reakcija, moguće je da kinetički nije uhvaćena prva faza reakcije, pa da je izmjereni k_{obs} = 0,32 s^{-1} manji od očekivanog. Iz navedenih razloga k_{obs} vrijednosti izmjerene koristeći [^{14}C]–Ile ne mogu se direktno uspoređivati za enzime IleRS1 i IleRS2, ali se mogu uspoređivati k_{cat} vrijednosti izračunate iz rezultata reakcija u kojima je korištena [^{32}P]–tRNA jer je u tim reakcijama postignuto potpuno zasićenje enzima supstratima.

§ 5. RASPRAVA

5.1. Homologna prekomjerna ekspresija proteina IleRS1 i IleRS2

U svrhu kinetičke karakterizacije proteina IleRS1 i IleRS2 iz bakterije *B. megaterium*, proteini su homologno prekomjerno eksprimirani, izolirani i pročišćeni (rezultati prikazan u odjeljku 4.2.). Protein IleRS1 prekomjerno je eksprimiran s plazmidnog vektora pP_{T7}, a protein IleRS2 s plazmidnog vektora pMGBm19. Kodirajući slijed za protein IleRS2 s nadodanim heksahistidinskim privjeskom na C–kraju proteina ukloniran je pod inducibilni ksilozni promotor P_{xylA}. Promotor P_{xylA} nalazi se u divljem tipu bakterije *B. megaterium* kao dio operona u kojem se nalaze geni koji kodiraju proteine uključene u metabolizam ksiloze, a to su: ksiloza izomeraza (XylA), ksilulokinaza (XylB) i ksiloza permeaza (XylT). Protein XylA katalizira pretvorbu D–ksiloze u D–ksilulozu, protein XylB katalizira reakciju fosforilacije D–ksiluloze pri čemu nastaje D–ksiluloza–5–fosfat, dok je transportni protein XylT zadužen za unos ksiloze aktivnim transportom u bakterijsku stanicu *B. megaterium*.[12] U odsutnosti ksiloze, ne dolazi do transkripcije gena u spomenutom ksiloznom operonu jer je protein XylR vezan na operator *xylA* čime je onemogućena transkripcija gena u operonu. Ulaskom ksiloze u stanicu i vezanjem na protein XylR dolazi do konformacijske promjene proteina XylR i posljedično njegove disocijacije s operatora *xylA* čime je omogućeno nesmetano djelovanje bakterijske RNA–polimeraze i transkripcija gena pod kontrolom promotra P_{xylA}.[47,48] Potencijal inducibilnog ksiloznog promotora P_{xylA} u genetičkom inženjerstvu prepoznat je te je 1991. godine objavljeno istraživanje u kojem je uspješno prekomjerno eksprimirano nekoliko proteina u bakteriji *B. megaterium* koristeći inducibilni promotor P_{xylA} i ksilozu kao induktor.[46] U ovom istraživanju je za prekomjernu ekspresiju proteina IleRS2 korišten divlji tip bakterije *B. megaterium* koji može metabolizirati ksilozu. Budući da bakterija može metabolizirati ksilozu, s vremenom će se smanjivati koncentracija ksiloze koja služi kao induktor ekspresije gena pod kontrolom promotora P_{xylA} i za očekivati je da će doći do pada koncentracije proteina od interesa. Tijekom optimizacije prekomjerne ekspresije proteina IleRS2 elektroforezom na poliakrilamidnom gelu u prisutstvu SDS–a nije opažen pad u količini ukupnog prekomjerno eksprimiranog IleRS2, ali je nakon 6 h indukcije bilo manje topljivog proteina nego nakon 3 h (slika 4.6.) zbog čega je indukcija u preparativnoj proizvodnji IleRS2 trajala 3 h. U biokemijskim istraživanjima zbog

dugotrajnog procesa *in vivo* proizvodnje te pročišćavanja proteina i najmanji pomaci prema većoj količina prekomjerno eksprimiranog proteina su značajni. Rygus i Hillen 1992. godine publicirali su istraživanje u okviru kojeg su napravili soj WH323 bakterije *B. megaterium* koji ne može metabolizirati ksilozu jer mu je izbačen gen *xylA* (engl. *knock out*) koji kodira protein xylA, što ga čini boljim za indukciju ksilozom od divljeg tipa bakterije. [60] Soj WH323 korišten je u istraživanju u kojem je fluorescentnom mikroskopijom kvantificirana količina prekomjerno eksprimiranog GFP–a pod kontrolom inducibilnog promotora P_{xylA} i uspoređena s količinom istog prekomjerno eksprimiranog proteina s istog plazmidnog vektora u soju MS941 bakterije *B. megaterium* kojem je uklonjen gen za glavnu ekstracelularnu proteazu NprM, ali ima aktivni operon za metaboliziranje ksiloze. U soju MS941 maksimalna koncentracija GFP–a iznosila je 3,2 mg po gramu suhih bakterijskih stanica (engl. *cell dry weight*, CDW), odnosno 5,9 mg po litri tekuće inducirane bakterijske kulture. Maksimalna količina GFP–a u soju WH323 iznosila je 6,6 mg g_{CDW}^{-1}, odnosno 11,3 mg po litri tekuće inducirane bakterijske kulture.[61] U ovom je istraživanju korištenjem promotora P_{xylA} i ksiloze kao induktora (finalno 0,5 % *w*/*V*) dobiveno 2 mg proteina IleRS2 po litri tekuće inducirane bakterijske kulture što je manja količina nego u prethodno spomenutom istraživanju s GFP–om, ali GFP je građen od samo 238[62] aminokiselina što je puno manje od IleRS1 (921 ak) i IleRS2 (1032 ak) i kao takav predstavlja puno manje metaboličko opterećenje za stanicu. Prekomjerna ekspresija IleRS2 je uspješno provedena te je unatoč veličini i slabijoj topljivosti IleRS2, dobivena zadovoljavajuća količina ciljnog proteina.

U ovom istraživanju bilo je isprobano napraviti rekombinanti plazmid pMBGm19 koji bi sadržavao kodirajući slijed za protein IleRS1 s heksahistidinskim privjeskom na C–kraju i tetraglicinskim privjeskom na N–kraju proteina pod ksiloznim promotorom P_{xylA}. Za uspješnu transformaciju bakterije *B. megaterium* potrebna je puno veća količina plazmidnog vektora, nego što je potrebna za transformaciju bakterije *E. coli*. Kako bi se dobila dovoljna količina željenog plazmida za transformaciju bakterije *B. megaterium*, taj se plazmid *in vivo* umnaža u bakteriji *E. coli*. Bakterijske stanice *E. coli* transformiraju se željenim plazmidom, uzgoji se zasićena bakterijska kultura iz koje se potom izolira željeni plazmid u dovoljnoj količini za transformaciju bakterije *B. megaterium*. Kako bi umnažanje bilo moguće u objema bakterijama, plazmidi sadrže dva različita ishodišta replikacije, po jedno za svaku bakteriju. Zbog ovakvog protokola, važna su svojstva promotora P_{xylA} ne samo u bakteriji *B. megaterium,* već i u bakteriji *E. coli*. Različiti sojevi bakterije *E. coli* su bili transformirani ligacijskom smjesom i različiti

uvjeti uzgoja bakterija su isprobani (detaljnije u odjeljku 4.1.), međutim nije uspješno pronađena bakterijska kolonija koja bi sadržavala željeni rekombinanti plazmid. Poznato je da je promotor P_{xylA} cureći u bakteriji *E. coli*.[61,63] S obzirom da postoji bazalna razina ekspresije gena *ileS1* pod kontrolom promotora P_{xylA} i da nije pronađena niti jedna bakterijska kultura koja sadrži rekombinanti plazmid, može se zaključiti da je prekomjerna ekspresija protein IleRS1 vjerojatno letalna za bakteriju *E. coli* u ranim fazama oporavka nakon transformacije. Na temelju prethodnih, još neobjavljenih istraživanja iz laboratorija, pretpostavljena je letalnost proteina IleRS1 iz bakterije *B. megaterium* za bakteriju *E. coli* zbog čega je u ovom istraživanju ispitano nekoliko načina kojima bi se mogla smanjiti količina sintetiziranog proteina IleRS1 u neinduciranoj bakterijskoj kulturi *E. coli*. Ispitana su dva načina, jedan kojim se suprimira transkripcija gena *ileS1* i drugi kojim se suprimira translacija molekule mRNA nastale transkripcijom gena *ileS1*. Genetički kod je degeneriran što znači da jedna aminokiselina može biti kodirana s više od jednog kodona. Međutim, u genima prokariota, ali i eukariota opaženo je nenasumično pojavljivanje kodona za određenu aminokiselinu. Za određenu se aminokiselinu u kodirajućim sljedovima vrlo često nalazi jedan ili dva kodona od svih mogućih koji kodiraju određenu aminokiselinu. Učestalost pojavljivanja određenog kodona za pojedinu aminokiselinu u kodirajućim sljedovima korelira sa zastupljenosti odgovarajućeg izoakceptora tRNA u stanici pojedinog organizma.[64] Poznato je da nekoliko rijetkih kodona za redom, naročito ako se nalaze blizu 5'–kraja molekule mRNA, mogu onemogućiti efikasnu translaciju.[65] Kako bi se onesposobila biosinteza proteina IleRS1 u bakteriji *E. coli* na N–kraj proteina nadodana su 4 uzastopna glicina kodirana kodonima GGA. Spomenuti kodon GGA najzastupljeniji je kodon za glicin u bakteriji *B. megaterium* dok je u bakteriji *E. coli* znatno manje zastupljen zbog čega bi translacija u bakteriji *E. coli* trebala biti otežana, a u bakteriji *B. megaterium* bi se trebala odvijati bez poteškoća.[33,66] Nažalost, ni uz korištenje rijetkih kodona za glicin, gen *ileS1* nije uspješno ukloniran pod promotor P_{xylA}. Tvrdnju da je protein IleRS1 iz bakterije *B. megaterium* letalan u ranim fazama oporavka za bakteriju *E. coli* dodatno potkrijepljuje činjenica da nije narasla niti jedna bakterijska kolonija soja Rosetta transformirana rekombinantim plazmidom pMGBm19_P_{xylA}_4G_ileS1 s tim da taj soj nosi plazmid koji kodira molekule tRNA koje su slabo zastupljene u bakteriji *E. coli*, uključujući i antikodon za rijetki kodon GGA pa tetraglicinski privjesak nema utjecaja na translaciju.[50]

Budući da biosinteza proteina IleRS1 nije uspješno zaustavljena na razini translacije, pomoću plazmida pMMEc4 pokušano je zaustaviti ju na razini transkripcije. Bakterijske stanice

E. coli transformirane su ligacijskom smjesom i kotransformirane plazmidom pMMEc4 kako bi se dodatno suprimirala aktivnost ksiloznog promotora u bakteriji *E. coli*. U plazmidu pMMEc4 nalazi se kodirajući slijed za represor XylR pod kontrolom inducibilnog arabinoznog promotora (P_{BAD}) te se dodatkom arabinoze inducira ekspresija gena koji kodira represor XylR i tako posredno smanjuje bazalna ekspresiju proteina pod kontrolom promotora P_{xylA}.[55] Bakterije kotransformirane plazmidom pMMEc4 bile su nasađene na hranjivu podlogu koja je između ostalog sadržavala i arabinozu (0,2 % *w*/*V*) kako bi se inducirala ekspresija gena *xylA*, međutim niti uz korištenje plazmida pMMEc4 kloniranje nije bilo uspješno, vjerojatno zbog nedovoljno suprimirane aktivnosti promotora P_{xylA}.

Kako gen *ileS1* nije uspješno ukloniran pod inducibilni ksilozni promotor P_{xylA}, ukloniran je u plazmid pP_{T7} gdje se nalazi pod kontrolom T7–promotora (slika 4.4.). Uz plazmid pP_{T7} za prekomjernu ekspresiju gena od interesa u bakteriji *B. megaterium* potreban je i plazmid pT7–RNAP. Bakterijska RNA–polimeraza ne može prepoznati T7–promotor, stoga se koristi plazmid pT7–RNAP koji nosi gen za T7–RNA–polimerazu pod kontrolom promotora P_{xylA}.[11] Za razliku od promotora P_{xylA}, T7–promotor je u bakteriji *E. coli* potpuno utišan jer bakterijski klonovi koji se koriste za kloniranje ne sadrže T7–RNA–polimerazu, stoga nema nikakve bazalne ekspresije gena *ileS1* što je omogućilo uspješno ukloniravanje gena *ileS1* u plazmid pPT7. U istraživanju u okviru kojeg je i osmišljen sustav koji koristi T7–RNA–polimerazu za prekomjernu ekspresiju gena u bakteriji *B. megaterium*, GFP je korišten za određivanje količine proteina koja se može dobiti koristeći ovaj sustav na 37 ˚C. Maksimalna koncentracija T7–RNA–polimeraze u stanici je opažena nakon 1,5 h od početka indukcije ksilozom (finalno 0,5 % *w*/*V*), a GFP–a nakon 3 h od početka indukcije nakon čega je koncentracija počela padati. T7–RNA–polimeraza podložna je djelovanju prirodnih bakterijskih proteza zbog čega dolazi do smanjenja njene količine nakon nekog vremena. Stabilnost prekomjerno eksprimirane T7–RNA–polimeraze može se osigurati antibiotikom rifampicinom koji je inhibitor bakterijske RNA–polimeraze, ali nema utjecaja na T7–RNA–polimerazu pa se tako može suprimirati biosinteza bakterijskih proteaza. Međutim, inhibicija bakterijske RNA–polimeraze ima znatan utjecaj na cijeli metabolizam bakterije zbog čega se znatno usporava bakterijski rast te je količina dobivenog proteina po volumenu bakterijske kulture manja uz korištenje rifampicina (38,3 mg dm^{-3} uz rifampicin, odnosno 49,7 mg dm^{-3} bez rifampicina). Nadalje, u istoj je publikaciji uspoređena količina GFP–a dobivenog pomoću sustava koji koristi T7–RNA–polimerazu i uz korištenje ksilozno inducibilnog promotora P_{xylA}. Korištenjem

T7–RNA–polimeraze dobiveno je 7 × više proteina u ekspresiji bez rifampicina, odnosno 5,3 × više proteina uz rifampicin u odnosu na količinu dobivenu korištenjem promotora P_{xylA}.[11] U ovom je istraživanju korištenjem istog sustava dobiveno 10 mg proteina IleRS1 po litri inducirane bakterijske kulture, pri čemu je indukcija rađena pri 30 °C, a ne 37 ˚C. Iako se korištenjem pP_{T7} sustava dobije veća količina proteina, nego korištenjem plazmidnog vektora pMGBm19, ipak se prvotno željelo ugraditi kodirajući slijed za IleRS1 u vektor pMGBm19 kako bi se nalazio u istom vektoru kao i kodirajući slijed za IleRS2, što bi bilo dobro za neke druge eksperimente u laboratoriju koji nisu dio ovog rada.

5.2. Proizvodnja $tRNA^{Ile}$ iz bakterije *B. megaterium*

Za kinetičku karakterizaciju proteina IleRS1 i IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* u ukupnoj reakciji aminoacilacije potrebna je molekula $tRNA^{Ile}$. Kako bi se dobila dovoljna količina molekule $tRNA^{Ile}$ za kinetička ispitivanja, prvo je isprobana homologna prekomjerna ekspresija u bakteriji *B. megaterium*. U tu svrhu konstruiran je rekombinanti plazmid koji je sadržavao kodirajući slijed za izoakceptor $tRNA^{Ile}_{GAU}$ pod kontrolom T7–promotora. U plazmidni vektor pP_{T7} ugrađen je sintetski oligonukleotid koji je sadržavao T7–promotor, kodirajući slijed za molekulu $tRNA^{Ile}$ i T7–terminator. Budući da je spomenuti oligonukleotid umetnut u mjesto za višestruko kloniranje u plazmidu pP_{T7} te da je u plazmidu već sadržan T7–terminator, novonastali konstrukt je sadržavao dva T7–terminatora međusobno udaljena 92 pb (udaljenost između zadnjeg nukleotida prvog terminatora i prvog nukleotida drugog terminatora). Prekomjerna ekspresija $tRNA^{Ile}$ s tog vektora nije dobivena u bakteriji *B. megaterium*. Zatim je prekomjerna ekspresija tRNAIle s istog vektora ispitana u bakteriji *E. coli* (soj BL21(DE3)), ali niti u toj bakteriji nije bilo ekspresije (slika 4.14.) te je na temelju toga zaključeno da vektor nije ispravan. Prethodna istraživanja iz laboratorija pokazala su da je molekulu $tRNA^{Ile}$ iz bakterije *E. coli* moguće uspješno prekomjerno eksprimirati korištenjem T7–sustava u bakteriji *E. coli*.[13] S pretpostavkom da možda dva bliska T7–terminatora onemogućavaju prekomjernu ekspresiju, napravljen je novi rekombinatni plazmid koji je sadržavao samo jedan T7–terminator. Protoplasti *B. megaterium* transformirani su novim rekombinantim plazmidom i kontransformirani plazmidom pT7–RNAP, ali uz sve isprobane reakcijske uvjete (detaljnije u odjeljku 4.3.3.), nije uspješno dobivena prekomjerno eksprimirana $tRNA^{Ile}$. Ispravnost drugog konstrukta također je isprobana u bakteriji *E. coli* (soj BL21(DE3)) te je utvrđeno da je

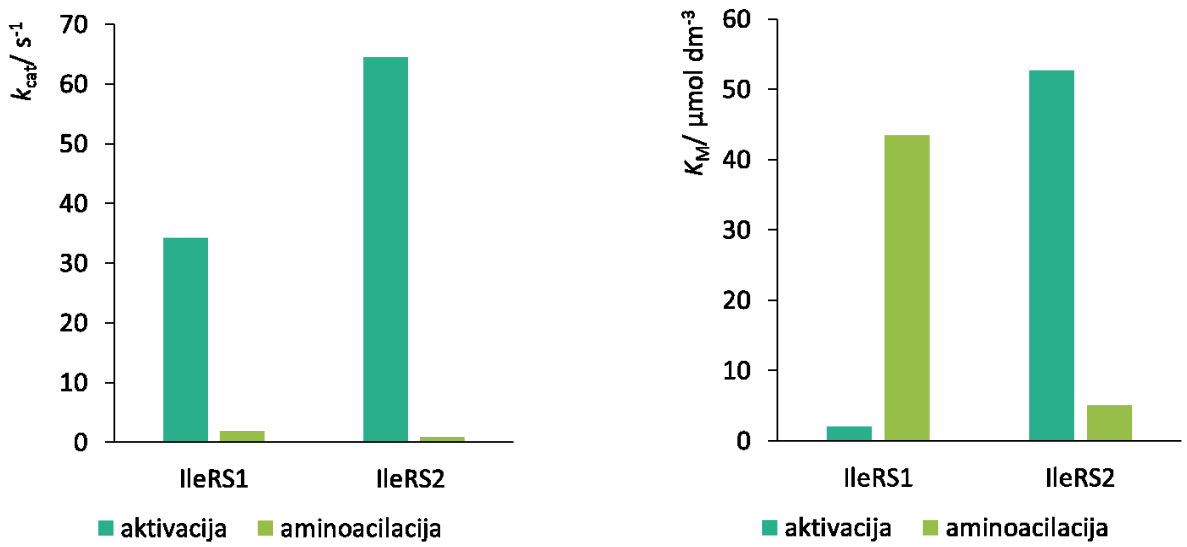
konstrukt u redu jer je u bakteriji *E. coli* uspješno prekomjerno eksprimirana $tRNA^{Ile}$ iz bakterije *B. megaterium* (slika 4.16.).

Nemogućnost homologne prekomjerne ekspresije $tRNA^{Ile}$ u bakteriji *B. megaterium* možda i nije toliko neočekivana. Poznato je da je u bakteriji *B. subtilis* i mnogim drugim Gram–pozitivnim bakterijama regulacija ekspresije gena koji kodiraju za aaRS, ali i mnoge druge proteine vezane uz metabolizam aminokiselina regulirana *T–box* regulatornim mehanizmom. Pomoću *T–box* sustava, genska ekspresija je kontrolirana omjerom aminoacilirane i neaminoacilirane odgovarajuće tRNA na razini transkripcije iako je moguća i regulacija na razini translacije. Na 5'–kraju novonastalog transkripta nalazi se petlja bogata gvanidinima i citidinima koja djeluje kao intrinzični transkripcijski terminator a iza koje se nalazi dio bogat uridinima. Međutim, 5'–kraj spomenute terminatorske petlje može tvoriti i drugu, manje stabilnu, antiterminatorsku petlju. Antiterminatorska petlja stabilizirana je neaminoaciliranom molekulom tRNA i posljedično se omogućava potpuna sinteza molekule mRNA. Aminoacilirana molekula tRNA posredno potiče terminaciju transkripcije tako što onemogućava vezanje neaminoacilirane molekule tRNA.[67] Neobjavljena istraživanja iz laboratorija ukazuju da regulacija genske ekspresije *T–box* sustavom postoji i u bakteriji *B. megaterium*. Bakterija *B. megaterium* prirodno kodira dvije različite IleRS (IleRS1 i IleRS2). Protein IleRS2 znatno je otporniji na inhibiciju mupirocinom od proteina IleRS1, K_i vrijednosti proteina IleRS2 je u mikromolarnom području koncentracije mupirocina, a protein IleRS1 inhibiran je već i nanomolarnim koncentracijama mupirocina (neobjavljeni rezultati). Dosadašnji rezultati iz laboratorija sugeriraju da protein IleRS2 nije konstitutivno eksprimiran, već da se eksprimira u prisutnosti mupirocina. U prisutnosti mupirocina dolazi do inhibicije proteina IleRS1 zbog čega IleRS1 nije katalitički aktivan te raste omjer neaminoacilirane i aminoacilirane $tRNA^{Ile}$. Ukoliko je ekspresija gena *ileS2* regulirana *T–box* sustavom, neaminoacilirana tRNA stabilizira antiterminatorsku petlju čime se omogućava biosinteza proteina IleRS2. Iako još nije dovoljno istraženo, postoji biološki smisao za strogom kontrolom količine molekule $tRNA^{Ile}$ u bakteriji *B. megaterium* s obzirom da je molekula $tRNA^{Ile}$ uključena u regulaciju genske ekspresije i ako je to uistinu tako, time se može objasniti nemogućnost prekomjerne ekspresije molekule $tRNA^{Ile}$ u bakteriji *B. megaterium*. S druge strane, u bakteriji *E. coli* regulacija genske ekspresije *T–box* sustavom nije poznata zbog čega je za očekivati da ta bakterija nema toliko razvijene mehanizme za kontrolu količine tRNA u stanici čemu u prilog ide i činjenica da je molekula $tRNA^{Ile}$ iz bakterije *B. megaterium* uspješno

prekomjerno eksprimirana u bakteriji *E. coli*, dok to nije bilo moguće napravitiu bakteriji *B. megaterium*. Ono što bih htio istaknuti je da nemogućnost prekomjerne ekspresije $tRNA^{Ile}$ u bakteriji *B. megaterium* (pokazano u ovom istraživanju) ne vrijedi općenito jer u literaturi postoje istraživanja u kojima su neki izoakceptori uspješno prekomjerno eksprimirani u bakteriji *B. megaterium*, ali su te vrste tRNA vjerojatno podložne drugačijoj regulaciji genske ekspresije i regulaciji količine u stanici s obzirom na njihovu posebnu organizaciju unutar genoma.[68]

5.3. Kinetičke karakteristike proteina IleRS1 i IleRS2 iz bakterije *B. megaterium*

U okviru ovog istraživanja uspješno su homologno prekomjerno eksprimirani proteini IleRS1 i IleRS2 iz bakterije *B. megaterium*, uspješno je heterologno prekomjerno eksprimirana molekula $tRNA^{Ile}_{GAU}$ iz bakterije *B. megaterium* u bakteriji *E. coli* te su navedeni proteini kinetički okarakterizirani u reakciji aktivacije te u ukupnoj reakciji aminoacilacije. U reakciji aktivacije, protein IleRS2 1,9 × brže aktivira izoleucin u odnosu na protein IleRS1, k_{cat} (IleRS2) = 64,5 s^{-1}, odnosno k_{cat} (IleRS1) = 34,3 s^{-1}. Značajnija razlika među spomenutim enzimima u reakciji aktivacije vidljiva je u K_M vrijednosti za izoleucin, IleRS2 ima 26,3 × višu K_M (Ile) vrijednost od IleRS1. Različiti kinetički parametri između enzima IleRS1 i IleRS2 kao i razlike u aktivaciji u odnosu na ukupnu reakciju aminoacilacije za pojedini enzim prikazane su grafički na slici 5.1.



Slika 5.1. Grafički prikaz kinetičkih parametara k_{cat} i K_M (Ile) za enzime IleRS1 i IleRS2 iz bakterije *B. megaterium* u reakcijama aktivacije i ukupne aminoacilacije.

Vrijednosti K_M (Ile) u reakciji aktivacije za proteine IleRS1 i IleRS2 te za proteine IleRS iz nekih drugih organizama prikazani su u tablici 5.1 (podaci preuzeti iz ref. 8 i 69). Na temelju navedenih podataka, može se zaključiti da IleRS tipa 2 imaju više K_M vrijednosti za Ile od IleRS tipa 1 iako se te vrijednosti ne razlikuju značajno. Tako je na primjer K_M (Ile) vrijednost za ScIleRS viša samo 1,7 × u odnosu na EcIleRS iako su različitog tipa ScIleRS, dok je razlika između BmIleRS2 i ScIleRS 6,9 ×, a oba enzima su IleRS tipa 2. Budući da se K_M vrijednost može promatrati kao mjera afiniteta enzima prema supstratu u reakciji koju pratimo, spomenuti rezultati sugeriraju da IleRS tipa 2 općenito imaju nešto manji afinitet prema pripadnom supstratu, izoleucinu, u odnosu na IleRS tipa 1 u prvom koraku aminoacilacije mjerenom bez prisutnosti tRNA.

Tablica 5.1. Kinetičke karakteristike proteina IleRS iz različitih organizama u reakciji aktivacije. Podaci su preuzeti iz ref. 8 i 69.

Organizam	Tip IleRS	K_M (Ile)/ μmol dm^{-3}
Bacillus megaterium	1	2,0
Bacillus megaterium	2	52,7
Saccharomyces cerevisiae	2	7,6
Streptomyces griseus	2	17,4
Escherichia coli	1	4,6

Manji afinitet IleRS2 za izoleucin možda je povezan s višom rezistencijom na antibiotik mupirocin. U reakciji aktivacije, enzim EcIleRS najosjetljiviji je na inhibiciju mupirocinom (K_i = 6 nmol dm^{-3}), ScIleRS (K_i = 28 μmol dm^{-3}) ima K_i za mupirocin čak 4,7 × 10^4 puta veći od EcIleRS, dok SgIleRS (K_i = 10 mmol dm^{-3}) ima K_i za mupirocin 300 puta veći od ScIleRS te u skladu s porastom u K_i vrijednosti, raste i K_M (Ile) vrijednost.[8,70] Mupirocin je kompetitivni inhibitor IleRS s obzirom na izoleucin i na ATP zbog čega se njegova inhibicijska aktivnost očituje i u samoj aktivaciji, a zbog utjecaja na aktivaciju također će inhibirati ukupnu aminoacilaciju. Inhibicijska aktivnost mupirocina posljedica je njegove strukture koja je analogna Ile–AMP–u.[8,70,71] Iako nije značajna, postoji razlika u K_i vrijednosti u ukupnoj reakciji aminoacilacije u odnosu na aktivaciju pa je tako K_i vrijednosti u ukupnoj aminoacilaciji za ScIleRS = 15 μmol dm^{-3}, odnosno za EcIleRS = 2,5 nmol dm^{-3} (ref. 70,72). Zanimljivo je da u ukupnoj reakciji aminoacilacije dolazi i do promjene K_M vrijednosti za izoleucin u odnosu na samu aktivaciju. U ukupnoj aminoacilaciji raste K_M vrijednost za izoleucin za BmIleRS1 (K_M (Ile) = 44 μmol dm^{-3}) te pada za BmIleRS2 u (K_M (Ile) = 5,1 μmol dm^{-3}) odnosu na aktivaciju. Ne samo da dolazi do promjene K_M vrijednosti za pojedini enzim, već se mijenja i relativni odnos, pa tako u ukupnoj aminoacilaciji IleRS2 ima manju K_M (Ile) vrijednost od IleRS1 iako je u aktivaciji situacija obrnuta. U ukupnoj je aminoacilaciji K_M (Ile) za IleRS1 8,5 × veća nego za IleRS2, odnosno 21,8 × veća u odnosu na reakciju aktivacije, dok je u slučaju IleRS2 K_M (Ile) 10,3 × manji u ukupnoj aminoacilaciji u odnosu na aktivaciju. Iako nije toliko velika kao za Ile, u ukupnoj reakciji aminoacilacije postoji razlika u K_M (ATP) vrijednosti između enzima IleRS1 (K_M (ATP) = 284 μmol dm^{-3}) i IleRS2 (K_M (ATP) = 69 μmol dm^{-3}). S obzirom da dolazi do promjene K_M (Ile) vrijednosti za oba proteina (IleRS1 i IleRS2) u ukupnoj aminoacilaciji u odnosu na aktivaciju, može se pretpostaviti da molekula tRNA modulira

afinitet enzima prema supstratima. Alternativno, moguće je da u prisustvu molekule tRNA dolazi do promjene nekog koraka reakcijskog mehanizma što također rezultira drugačijom K_M vrijednosti. Utjecaj tRNA na K_M u aktivaciji mogao bi se se provjeriti ukoliko bi se odredili kinetički parametri u aktivaciji u prisutnosti molekule tRNA, ali da se onemogući prijenos aminokiseline na molekulu tRNA. U tu svrhu može se koristiti oksidirana tRNA u kojoj su OH– skupine na terminalnom nukleotidu zamijenjene atomima vodika. Pri tom treba imati na umu da takva intervencija može utjecati na neka svojstva enzima.

Enzimi IleRS pripadaju razredu Ia aaRS kojem također pripadaju: ValRS, LeuRS te MetRS. Osim što ti enzimi imaju očuvanu katalitičku domenu, imaju i sličnu antikodonsku domenu. Na temelju slične veličine, sličnog aminokiselinskog sastava i istaknute aktivnosti CP1 domene, IleRS, ValRS i LeuRS mogu se povezati u jednu još manju podgrupu. Uz sličnosti samih enzima i njihove pripadajuće aminokiseline imaju vrlo slične kemijske strukture, sve imaju razgranate alifatske bočne ogranke.[73] Zbog spomenutih sličnosti, smisleno je usporediti kinetička svojstva tih triju aaRS. LeuRS iz bakterije *E. coli* u reakciji aktivacije ima K_M (Leu) = 50 μmol dm^{-3} te k_{cat} = 66 s^{-1} (ref. 74). ValRS iz bakterije *E. coli* u reakciji aktivacije ima K_M (Val) = 47 μmol dm^{-3} te k_{cat} = 55 s^{-1} (ref. 69). Kinetičke karakteristike enzima ValRS i LeuRS puno su sličnije enzimu IleRS2, nego IleRS1 iz bakterije *B. megaterium* kako po k_{cat} vrijednosti tako i po K_M vrijednosti za pripadnu aminokiselinu. Na temelju filogenetskih analiza pretpostavljeno je da su geni *ileS1* i *ileS2* nastali duplikacijom davno u evoluciji, čak prije podjele bakterija i arheja. Također je pretpostavljeno da je rezistentniji IleRS2 opstao zbog potrebe za mupirocinskom rezistencijom u bakterijama koje dijele stanište s bakterijom *P. fluorescens* koja prirodno proizvodi mupirocin, a jedna od takvih bakterija je *S. griseus*.[8]

Za kraj, htio bih se osvrnuti na određena svojstva heterologno prekomjerno eksprimirane tRNA^{Ile} iz bakterije *B. megaterium* u bakteriji *E. coli*. Prekomjerno eksprimiranoj i pročišćenoj tRNA^{Ile} određen je aminoacilacijski profil uz radioaktivno obilježen [^{14}C]–Ile te je uočena kinetička bifaznost sustava (slika 4.20.). Na temelju opažene kinetičke bifaznosti, pretpostavljeno je postojanje različito modificiranih molekula tRNA^{Ile} u sustavu. Kako bi se provjerilo nalazi li se uistinu u sustavu više različito modificiranih molekula tRNA^{Ile}, uzorak ukupne tRNA iz bakterije *E. coli* s prekomjerno eksprimiranom tRNA^{Ile} iz bakterije *B. megaterium* analiziran je kromatografijom orbnutih faza te su uočena tri kromatografska vrha (slika 4.18.) koja bi mogla odgovarati različito modificiranim molekulama tRNA^{Ile}. Kako bi se provjerilo odgovaraju li tri kromatografska vrha trima različito modificiranim molekulama

$tRNA^{Ile}$, a ne nečem drugom, određena je akceptorska aktivnost uzoraka svakog pojedinog kromatografskog vrha uz radioaktivno obilježeni [^{14}C]–Ile. Bez obzira je li akceptorska aktivnost određena enzimom BmIleRS1 ili BmIleRS2, akceptorska aktivnost svih uzoraka bila je viša od 95 % iz čega se može zaključiti da se uistinu svi kromatografski vrhovi odgovaraju molekulama $tRNA^{Ile}$. Zatim je svima trima uzorcima određena određena aminoacilacije tRNA u ustaljenom stanju uz radioaktivno obilježeni [^{14}C]–Ile. Kad se koristi protein IleRS1 frakcija 3 $tRNA^{Ile}$ aminoacilira se 2,4 × brže od frakcija 1 i 2 koje se aminoaciliraju gotovo jednakom brzinom. Kad se koristi protein IleRS2 frakcija 3 se također najbrže aminoacilira, ali je manja razlika u odnosu na brzinu aminoacilacije frakcija 1 i 2 (1,7 × i 1,4 ×) nego što je to slučaj kod IleRS1. Na temelju tih podataka je zaključeno da je frakcija 3 kinetički najaktivnija. Iako je kromatografski i određivanjem akceptorske aktivnosti ustanovljeno postojanje triju različitih vrsta $tRNA^{Ile}$, u kinetičkim su eksperimentima vidljive samo dvije faze jer se frakcije 1 i 2 aminoaciliraju vrlo sličnom brzinom, stoga se razlika između te dvije frakcije ne vidi u toj vrsti eksperimenata. U prethodnim istraživanjima u laboratoriju slična je pojava opažena kod homologno prekomjerno eksprimirane $tRNA^{Ile}_{GAU}$ iz bakterije *E. coli*, osim što je tad na RPC–u uočeno postojanje 2 (ref. 13), a ne 3 kromatografska vrha kao u slučaju prekomjerno eksprimirane $tRNA^{Ile}_{GAU}$ iz bakterije *B. megaterium.* U spomenutom je istraživanju postojanje dvaju kromatografskih vrhova argumentirano postojanjem nepotpuno modificirane prekomjerno eksprimirane tRNA zbog nemogućnosti određenih enzima da modificiraju toliku količinu tRNA.[13] Budući da se u ovom istraživanju radi o heterolognoj nadekspresiji tRNA, različito modificiranim vrstama $tRNA^{Ile}$ mogu nedostajati određene prirodne modifikacije koje bakterije *E. coli* ne može proizvesti, ili te različite vrste tRNA mogu sadržavati dodatne modifikacije koje uvodi bakterija *E. coli*, ali ih prirodno ne koristi bakterija *B. megaterium*.

§ 6. ZAKLJUČAK

- Uspješno je pripremljen rekombinantni plazmidni vektor za nadekspresiju proteina IleRS tipa 1 iz bakterije *B. megaterium* te je protein IleRS1 uspješno homologno nadeksprimiran koristeći T7–promotor, dok je protein IleRS2 iz iste bakterije uspješno homologno nadeksprimiran koristeći inducibilni ksilozni promotor P_{xylA}.
- Gen za $tRNA^{Ile}$ uspješno je ukloniran pod T7–promotor, ali ekspresija tRNA nije postignuta uslijed dodatka induktora u bakteriji *B. megaterium*.
- Molekula $tRNA^{Ile}$ iz bakterije *B. megaterium* uspješno je nadeksprimirana u bakteriji *E. coli* te je kromatografijom obrnutih faza utvrđeno postojanje tri kromatografska vrha koji vjerojatno odgovaraju trima različito modificiranim molekulama $tRNA^{Ile}$.
- Određivanjem akceptorske aktivnosti i profila aminoacilacije pokazano je da je frakcija 3 kinetički najbolja frakcija $tRNA^{Ile}$ (k_{obs} (IleRS1) = 0,77 s^{-1}, k_{obs} (IleRS2) = 1,22 s^{-1}).
- U reakciji aktivacije proteini IleRS1 i IleRS2 pokazuju različita kinetička svojstva. Protein IleRS2 je nešto brži od IleRS1 (1,9 ×), a značajnija razlika postoji u Michaelisovoj konstanti (K_M) prema izoleucinu pa tako IleRS2 ima 26,3 × veću K_M (Ile) vrijednost od IleRS1.
- U reakciji aminoacilacije dolazi do promjene kinetičkih svojstava u odnosu na reakciju aktivacije. Obrtni broj proteina IleRS1 manji je 18,6 × u odnosu na reakciju aktivacije, a proteina IleRS2 75,9 puta. Protein IleRS1 ima 21,8 × veću K_M (Ile) vrijednost u aminoacilaciji u odnosu na aktivaciju, a protein IleRS2 10,3 × manju. U reakciji aminoacilacije protein IleRS1 ima K_M (Ile) vrijednost 8,5 × veću od proteina IleRS2.
- U reakciji aminoacilacije među proteinima IleRS1 i IleRS2 postoji razlika i u K_M vrijednosti prema ATP–u, ali nije toliko izražena kao K_M (Ile) vrijednosti. Protein IleRS1 ima 4 × veću K_M (ATP) vrijednost od proteina IleRS2.

§ 7. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

aa	aminokiselina
aa–AMP	aminoacil–adenilat
aa–tRNA^{aa}	aminoacilirana pripadna molekula tRNA
aaRS	aminoacil–tRNA–sintetaza
AMP	adenozin–5'–monofosfat
APS	amonijev peroksodisulfat
ATP	adenozin–5'–trifosfat
α–[^{32}P]–ATP	ATP koji na α položaju ima radioaktivni izotop ^{32}P
BSA	albumin iz goveđeg seruma
[^{14}C]–Ile	izoleucin koji ima obilježen α–C atom radioaktivnim izotopom ^{14}C
CP1	engl. *connective peptide* 1, povezujući peptid 1
cpm	engl. *count per minute*, broj otkucaja u minuti pri scintilacijskom mjerenju radioaktivnosti
D	dihidrouridin
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
dNTP	deoksinukleozid–5'–trifosfat
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
EF–Tu	elongacijski faktor Tu
fMet	N–formilmetionin
GFP	engl. *green fluorescent protein*, zeleni fluorescentni protein
GTP	gvanozin–5'–trifosfat
Hepes	*N*–(2–hidroksietil)piperazin–*N'*–2–etansulfonska kiselina
I	inozin
IF	inicijacijski faktor
IleRS1	izoleucil–tRNA–sintetaza tip 1
IleRS2	izoleucil–tRNA–sintetaza tip 2
IPTG	izopropil–β–D–tiogalaktopiranozid
k_{cat}	obrtni broj

K_M	Michaelisova konstanta
LB	Luria–Bertani
m^1A	1–metiladenozin
mRNA	engl. *messenger* RNA, glasnička RNA
Ni–NTA	nikal–nitrilotrioctena kiselina
OD_{578}	optička gustoća pri valnoj duljini od 578 nm
OD_{600}	optička gustoća pri valnoj duljini od 600 nm
PCR	lančana reakcija polimerazom
PEG–4000	polietilenglikol 4000
PEG–8000	polietilenglikol 8000
PMSF	fenilmetilsulfonil–fluorid
POPOP	1,4–bis(2–(4–metil–5–fenil)oksazolil)benzen
$[^{32}P]$–PP_i	pirofosfat obilježen radioaktivnim izotopom ^{32}P
PP_i	pirofosfat
PPO	2,5–difenil oksazol
RNA	ribonukleinska kiselina
RNAP	RNA–polimeraza
RPC	engl. *reverse–phase chromatography*, kromatografija obrnutih faza
SDS	natrijev dodecilsulfat
SDS–PAGE	elektroforeza na poliakrilamidnom gelu uz prisutnost natrijevog dodecilsulfata
T	ribotimidin
T_a	temperatura sljepljivanja
T_m	temperatura mekšanja
TCA	trikloroctena kiselina
TEMED	*N,N,N′,N′*–tetrametiletilendiamin
TFA	trifluoroctena kiselina
TIPP	termostabilna anorganska pirofosfataza
v_0	početna brzina reakcije
V_{max}	maksimalna brzina enzimski katalizirane reakcije
XCFF	ksilencijanol–fluorofosfat
ψ	pseudouridin

Tablica 7.1. Popis proteinogenih aminokiselina s pripadajućim troslovnim i jednoslovnim kraticama.

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

§ 8. LITERATURNI IZVORI

1. J. J. Perona, I. Gruic–Sovulj, *Top. Curr. Chem.* **344** (2013) 1–41.
2. M. Ibba, D. Soll, *Annu. Rev. Biochem.* **69** (2000) 617–650.
3. R. B. Loftfield, D. Vanderjagt, *Biochem. J.* **128** (1972) 1353–1356.
4. S. S. Yadavalli, M. Ibba, *Adv. Protein. Chem. Struct. Biol.* **86** (2012) 1–43.
5. E. Glasfeld, J. A. Landro, P. Schimmel, *Biochem.* **35** (1996) 4139–4145.
6. T. Fuller, G. Mellows, M. Woolford, G. T. Banks, K. D. Barrow, E. B. Chain, *Nature* **234** (1971) 416–417.
7. J. Hughes, G. Mellows, *Biochem. J.* **191** (1980) 209–219.
8. N. Cvetesic, M. Dulic, M. Bilus, N. Sostaric, B. Lenhard, I. Gruic–Sovulj, *J. Biol. Chem.* **291** (2016) 8618–8631.
9. R. Sutherland, R. J. Boon, K. E. Griffin, P. J. Masters, B. Slocombe, A. R. White, *Antimicrob. Agents. Chemother.* **27** (1985) 495–498.
10. P. S. Vary, R. Biedendieck, T. Fuerch, F. Meinhardt, M. Rhode, W. D. Deckwer, D. Jahn, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76** (2007) 957–967.
11. M. Gamer, D. Frőde, R. Biedendieck, S. Stammen, D. Jahn, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **82** (2009) 1195–1203.
12. R. Biedendieck, C. Borgmeier, B. Bunk, S. Stammen, C. Scherling, F. Meinhardt, C. Wittmann, D. Jahn, *Methods. Enzymol.* **500** (2011) 165–195.
13. N. Cvetešić, Kloniranje, prekomjerna ekspresija te pročišćavanje molekula $tRNA^{Ile}$ i $tRNA^{Val}$ iz bakterije *Escherichia coli*, Diplomski rad, Prirodoslovno–matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2010, str. 56–58.
14. D. L. Nelson, M. M Cox, *Lehningher Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman and Company, New York, 2008, str. 975, 1021–1025, 1065, 1079–1081, 1088–1098
15. K. B. Decker, D. M. Hinton, *Annu. Rev. Microbiol.* **67** (2013) 113–139.
16. T. M. Schmeing, V. Ramakrishnan, *Nature* **461** (2009) 1234–1242.
17. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, G. J. Gatto Jr., L. Stryer, *Biochemistry*, W. H. Freeman and Company, New York, 2015, str. 893
18. F. Crick, *Symp. Soc. Exp. Biol.* **12** (1958) 138–163.

19. R. W. Holley, J. Apgar, , G. A. Everett, J. T. Madison, M. Marquisse, S. H. Merril, J. R. Penswick, A. Zamir, *Science* **147** (1965) 1462–1465.

20. D. Voet, J. G. Voet, *Biochemistry,* John Wiley & Sons, New York, 2011, str. 1345–1347

21. M. Sprinzl, F. Cramer, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **22** (1979) 1–69.

22. M. Aebi, G. Kirchner, J. Y. Chen, U. Vijayragahavan, A. Jacobson, N. C. Martin, J. Abelson, *J. Biol. Chem.* **265** (1990) 16216–16220.

23. S. H. Kim, F. L. Suddath, G. J. Quigley, A. McPherson, J. L. Sussman, A. H. Wang, N. C. Seeman, A. Rich, *Science*, **185** (1974) 435–440.

24. A. K. Hopper, E. M. Phizicky, *Genes Dev.* **17** (2003) 162–180.

25. A. V. Kazantsev, N. R. Pace, Nat. Rev. *Microbiol*. **4** (2006) 729–740.

26. C. Guerrier–Takada, K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace, S. Altman, *Cell* **35** (1983) 849–857.

27. J. A. Pannucci, E. S. Haas, T. A. Hall, J. K. Harris, J. W. Brown, *PNAS* **96** (1999) 7803–7808.

28. J. Holzmann, P. Frank, E. Löffler, K. L. Bennett, C. Gerner, W. Rossmanith, *Cell* **135** (2008) 462–474.

29. C. Marck, H. Grosjean, *RNA* **8** (2002) 1189–1232.

30. Z. Li, M. P. Deutscher, *Cell* **86** (1996) 503–512.

31. Z. Li, M. P. Deutscher, *RNA* **8** (2002) 97–109.

32. O. Pellegrini, J. Nezzar, A. Marchfelder, H. Putzer, C. Condon, *EMBO J.* **22** (2003) 4534–4543.

33. M. Gamer, Directed Development of Bacillus megaterium for Applications in Recombinant Protein Production, Doktorski rad, Fakultät für Lebenswissenschaften, Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, 2010, str. 62–64.

34. T. M. Lowe, S. R. Eddy, *Nucleic Acids Res.* **25** (1997) 955–964.

35. W. A. Cantara, P. F. Crain, J. Rozenski, J. A. McCloskey, K. A. Harris, X. Zhang, F. A. P. Vendeix, D. Fabris, P. F. Agris, *Nucleic Acids Res.* **39** (2011) D195–D201.

36. C. Lorenz, C. E. Lünse, M. Mörl, *Biomolecules* **7** (2017) 35.

37. J. R. Sampson, O. C. Uhlenbeck, *PNAS* **85** (1988) 1033–1037.

38. M. A. Machnicka, A. Olchowik, H. Grosjean, J. M. Bujnicki, *RNA Biol.* **11** (2014) 1619–1629.

39. R. Giege, M. Sissler, C. Florentz, *Nucleic Acids Res.* **26** (1998) 5017–5035.

40. J. J. Perona, A. Hadd, *Biochemistry* **51** (2012) 8705–8729.

41. B. E. Griffin, M. Jarman, C. B. Reese, J. E. Sulston, D. R. Trentham, *Biochemistry* **5** (1966) 3638–3649.

42. J. S. Weinger, S. A. Strobel, *Biochemistry* **45** (2006) 5939–5948.

43. C. M. Zhang, J. J. Perona, K. Ryu, C. Francklyn, Y. M. Hou, *J. Mol. Biol.* **361** (2006) 300—311.

44. M. Ibba, D. Söll, EMBO *reports* **2** (2001) 382–387.

45. N. Cvetesic, M. Bilus, I. Gruic–Sovulj, *J. Biol. Chem.* **290** (2015) 13981–13991.

46. T. Rygus, W. Hillen, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35** (1991) 594–599.

47. D. Gärtner, M. Geissendörfer, W. Hillen, *J. Bacteriol.* **170** (1988) 3102–3109.

48. M. K. Dahl, J. Degenkolb, W. Hillen, *J. Mol. Biol.* **243** (1994) 413–424.

49. R. Biedendieck, M. Gamer, L. Jaensch, S. Meyer, M. Rohde, W. D. Deckwer, D. Jahn, *J. Biotechnol.* **132** (2007) 426–430.

50. pET System Manual, 11. izd., Novagen, 2005.

51. https://international.neb.com/products/c3040-neb-stable-competent-e-coli-high-efficiency#Product%20Information (datum pristupanja 30.3.2020.)

52. Competent cells, Stratagene, 2016.

53. T7 RNA polymerase expression system for *Bacillus megaterium* hanbook, MoBiTec, 2012.

54. hp–Vector Expression System for *Bacillus megaterium* handbook, MoBiTec, 2016.

55. pMMEc4 product information sheet, MoBiTec, 2016.

56. E. Hochuli, H. Döbeli, A. Schacher, *J. Chromatogr. A.* **411** (1987) 177–184.

57. H. Block, B. Maertens, A. Spriesterabch, N. Brinker, J. Kubicek, R. Fabis, J. Labahn, F. Schafer, *Methods. Enzymol.* **463** (2009) 439–473.

58. Ni–NTA Purification System Manual, Novex by Life Technologies, 2012.

59. S. Ledoux, O. C. Uhlenbeck, *Methods.* **44** (2008) 74–80.

60. T. Rygus, W. Hillen, *J. Bacteriol.* **174** (1992) 3049–3055.

61. R. K. J. Biedendieck, *Bacillus megaterium: Versatile Tools for Production, Secretion and Purification of Recombinant Proteins*, Doktorski rad, Fakultät für Lebenswissenschaften, Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, 2007, str. 83–85.

62. M. Ormö, A. B. Cubitt, K. Kallio, L. A. Gross, R. Y. Tsien, S. J. Remington, *Science* **273** (1996) 1392–1395

63. E. Jordan, M. Hust, A. Roth, R. Biedendieck, T. Schirrmann, D. Jahn, S. Dübel, *Microb. Cell. Fact.* **6**, 2 (2007)

64. S. C. Makrides, *Microbiol. Rev.* **60** (1996.) 512–538.

65. A. H. Rosenberg, E. Goldman, J. J. Dunn, F. W. Studier, G. Zubay, *J. Bacteriol.* **175** (1993) 716–722.

66. Y. Yang, M. Malten, A. Grote, D. Jahn, W. D. Deckwer, *Biotechnol. Bioeng.* **96** (2007) 780–794.

67. N. J. Green, F. J. Grundy, T. M. Henkin, *FEBS Lett.* **584** (2010) 318–324.

68. C. Finger, M. Gamer, S. Klunkelfuß, B. Bunk, R. Biedendieck, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99** (2015) 8999–9010.

69. M. Dulic, J. J. Perona, I. Gruic–Sovulj, *Biochemistry* **53** (2014) 6189–6198.

70. J. Huges, G. Mellows, *Biochem. J.* **191** (1980) 209–219.

71. T. Yanagisawa, J. T. Lee, H. C. Wu, M. Kawakami, *J. Biol. Chem.* ***269*** (1994) 24304–24309.

72. K. I. Racher, G. B. Kalmar, T. J. Borgford, *J. Biol. Chem.* **266** (1991) 17158–17164.

73. M. Ibba, C. Francklyn, S. Cusack, The Aminoacyl–tRNA Synthetases, Landes Bioscience, Georgetown, Texas, 2005, str. 24. 26–27.

74. N. Cvetesic, A. Palencia, I. Halasz, S. Cusack, I. Gruic–Sovulj, *EMBO J.* **33** (2014) 1639–1653.

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Bartol Božić

Datum rođenja: 11. prosinca 1996.

Mjesto rođenja: Zagreb, Republika Hrvatska

Obrazovanje

2003.–2011.	Osnovna škola Ivana Gundulića, Zagreb
2011.–2015.	VII. gimnazija, Zagreb
2015.–2018.	Preddiplomski sveučilišni studij kemije, Prirodoslovno–matematički fakultet, Zagreb
2018.–2020.	Diplomski sveučilišni studij kemije, istraživački smjer, grane: biokemija i fizikalna kemija, Prirodoslovno–matematički fakultet, Zagreb

Nagrade i priznanja

2017./2018.	STEM stipendija Ministarstva znanosti i obrazovanja Republike Hrvatske
2019./2020.	Stipendija Grada Zagreba za izvrsnost

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti i simpozijima

2018., 2019.	Dan i noć na PMF–u

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. T. Klačić, B. Božić, D. Kovačević, *PAH/PAA polyelectrolyte multilayers on silica surface*, 26. hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, Šibenik, 9.–12. 4. 2019.

Ostalo

2018.	5. Simpozij studenata kemičara, Prirodoslovno−matematički fakultet, Zagreb
2019.	Nobel Days, Medicinski fakultet, Split
2019.	6. Simpozij studenata kemičara, Prirodoslovno−matematički fakultet, Zagreb
2019.	2. Dan karijera na PMF−u (WISe) − organizacija
2019./2020.	studentski predstavnik u Vijeću Kemijskog odsjeka, Prirodoslovno−matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu