

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Ana Madunić

Potencijalni proteinski interaktori atipične arginil-tRNA-sintetaze
predatorne bakterije *Herpetosiphon aurantiacus*

U Zagrebu, 2024.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za biokemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Ite Gruić Sovulj i komentorstvom višeg asistenta dr. sc. Igora Živkovića. Predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2023./2024.

Popis kratica, oznaka i simbola

A76: terminalni adenzin molekule tRNA

aa: aminokiselina

aa-AMP: aminoacil-adenilat

aaRS: aminoacil-tRNA-sintetaza, kratica određene aaRS umjesto „aa“ sadrži troslovnu ili jednoslavnu kraticu pripadne joj aminokiseline

aa-tRNA^{aa}: aminoacilirana molekula tRNA

ACN: acetonitril

AMP: adenzin monofosfat

APS: amonijev persulfat

Arg (R): arginin

ATP: adenzin-5'-trifosfat

BSA: albumin iz goveđeg seruma, engl. *bovine serum albumine*

D: dihidrouridin

DNA: deoksiribonukleinska kiselina

DTT: ditiotreitrol

EcArgRS: arginil-tRNA-sintetaza iz bakterije *E. coli*

EcIleRS: izoleucil-tRNA-sintetaza iz bakterije *E. coli*

EDTA: etilendiamintetraoctena kiselina

FA: mravlja kiselina, engl. *formic acid*

fMet: *N*-formilmetionin

HaArgRS1: tipična arginil-tRNA-sintetaza iz predatorne bakterije *H. aurantiacus*

HaArgRS2: atipična arginil-tRNA-sintetaza iz bakterije *H. aurantiacus*

HABA: 4'-hidroksiazobenzen-2-karboksilna kiselina

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

His-HaArgRS2: rekombinantna atipična arginil-tRNA-sintetaza iz bakterije *H. aurantiacus* samo s HisTag-om

HisTag: fuzijski privjesak sastavljen od slijeda šest histidina

HUP: evolucijska linija proteina; akronim od proteina s HxGH motivom, UspA i PP-ATPaza

HP74: tekući medij za uzgoj *H. aurantiacus*

HxGH: motiv od četiri aminokiseline; histidil-x-glicil-histidin, gdje x predstavlja neku hidrofobnu aminokiselinu

IAA: jodoacetamid

ipTM: koeficijent pouzdanosti predikcije molekularnih interakcija AlphaFold 3 Servera; govori o preciznosti predviđanja interakcija aminokiselina na samom sučelju interakcije

IPTG: izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid

Ile (I): izoleucin

LB: Luria-Bertani medij

LC-MS/MS: tekućinska kromatografija s tandemnom spektrometrijom masa, engl. *liquid chromatography with tandem mass spectrometry*

mRNA: glasnička ribonukleinska kiselina, engl. *messenger RNA*

MST: Mikroskopska termoforeza, engl. *microscale thermophoresis*

NACHT: domena specifična za istoimenu proteinsku obitelj koja spada u veću obitelj NTPaza, odnosno enzima što hidroliziraju nukleotide

Ni-NTA: nikal-nitrilotriocetna kiselina

OD₆₀₀: gustoća mikrobioloških kultura, mjerena spektrofotometrijski pri $\lambda = 600$ nm

PCR: lančana reakcija polimeraze, engl. *polymerase chain reaction*

PMSF: fenilmetilsulfonil-fluorid

PNK: polinukleotid-kinaza

PP-ATPaze: proteinska obitelj ATPaza, odnosno enzima koji hidroliziraju ATP s PP petljom

pTM: koeficijent pouzdanosti predikcije molekulskih interakcija AlphaFold 3 Servera; govori o točnosti cijele predviđene strukture u odnosu na poznate baze podataka

RNA: ribonukleinska kiselina

rRNA: ribosomska RNA

RVDH: motiv od četiri aminokiseline; arginil-valil-aspartil-histidin

SDS: natrijev dodecilsulfat

SDS-PAGE: poliakrilamidna gel elektroforeza s natrijevim dodecil-sulfatom

StrepTactin™: komercijalno punilo kolone za metodu supročišćvanja afinitetnom kromatografijom pomoću StrepTagII

StrepTagII: fuzijski privjesak sastavljen od slijeda osam aminokiselina, triptofanil-seril-histidil-prolil-glutaminil-fenilalanil-glutamil-lizin, WSHPQFEK

Strep-His-HaArgRS1: rekombinantna tipična arginil-tRNA-sintetaza iz predatorne bakterije *H. aurantiacus* s dva fuzijska privjeska: HisTag i StrepTagII

Strep-His-HaArgRS2: rekombinantna atipična arginil-tRNA-sintetaza iz predatorne bakterije *H. aurantiacus* s dva fuzijska privjeska: HisTag i StrepTagII

Strep-His-EcIleRS: rekombinantna izoleucil-tRNA-sintetaza iz bakterije *E. coli* s dva fuzijska privjeska: HisTag i StrepTagII

TALON: punilo kolone za metodu supročišćvanja afinitetnom kromatografijom pomoću HisTag-a

TCA: trikloroetna kiselina

TFA: trifluoroetna kiselina

tRNA: transfer RNA

tRNA^{aa}: tRNA specifična za određenu aminokiselinu

UspA: proteinska obitelj ortologa univerzalnog proteina stresa A

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1 <i>Herpetosiphon aurantiacus</i>	1
1.2. Biosinteza proteina	1
1.3. Aminoacil-tRNA-sintetaze	6
1.3.1. Razred I	8
1.3.2. Arginil-tRNA-sintetaza	9
1.3.3. Prirodne varijacije HxGH motiva.....	11
2. HIPOTEZA	14
3. MATERIJALI I METODE	15
3.1 MATERIJALI.....	15
3.1.1. Standardne kemikalije	15
3.1.2. Boje	15
3.1.3. Enzimi i njima pripadni puferi	15
3.1.4. Markeri	16
3.1.5. Mediji	16
3.1.6. Bakterije i plazmidi	16
3.1.7. Kromatografski pribor.....	16
3.1.8. Komercijalni kompleti kemikalija.....	17
3.1.9. Standardni pribor za lančanu reakciju polimeraze	17
3.1.10. Ostali materijali	17
3.2. METODE	17
3.2.1. Metode rada s nukleinskim kiselinama	17
3.2.1.1. Izolacija plazmidne DNA.....	17
3.2.1.2. Kloniranje plazmida lančanom reakcijom polimeraze	17
3.2.1.3. Pročišćavanje i ligacija plazmidne DNA	19
3.2.1.4. Agarozna gel-elektroforeza	20
3.2.1.5. Transformacija bakterija.....	20
3.2.1.6. Probiranje transformanata metodom <i>colony PCR</i>	20
3.2.1.7. Sekvenciranje Sangerovom metodom	21
3.2.1.8. Mjerenje koncentracije DNA	21
3.2.2. Metode rada s proteinima	22
3.2.2.1. Prekomjerna ekspresija proteina <i>in vivo</i>	22
3.2.2.2. Izolacija proteina	22
3.2.2.3. Pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom	23

3.2.2.4. Analiza proteina gel-filtracijskom kromatografijom.....	24
3.2.2.5. Mjerenje koncentracije proteina.....	24
3.2.2.6. Poliakrilamidna gel elektroforeza s natrijevim dodecil-sulfatom	24
3.2.3. Priprema proteinskog ekstrakta <i>H. aurantiacus</i>	25
3.2.4. Metoda supročišćavanja afinitetnom kromatografijom pomoću histidinskog privjeska	26
3.2.5. Metoda supročišćavanja afinitetnom kromatografijom pomoću streptavidinskog privjeska	28
3.2.6. Bojanje elektroforetskih gelova srebrom	29
3.2.7. Spektrometrija masa ¹	30
3.2.7.1. Digestija proteina	30
3.2.7.2. Pročišćavanje peptida dobivenih digestijom proteina.....	30
3.2.7.3. Razdvajanje i analiza peptida pomoću LC-MS/MS uređaja	31
3.2.7.4. Analiza dobivenih spektara masa	31
3.2.8. Predikcija molekulskih interakcija	31
4. REZULTATI	33
4.1. Kloniranje streptavidinskog privjeska.....	33
4.2. Proizvodnja i pročišćavanje proteina	36
4.3. Metoda supročišćavanja afinitetnom kromatografijom pomoću histidinskog privjeska	43
4.4. Metoda supročišćavanja afinitetnom kromatografijom pomoću streptavidinskog privjeska	44
4.5. Spektrometrija masa.....	49
4.6. Predikcija protein-protein interakcija.....	51
5. RASPRAVA.....	54
6. ZAKLJUČCI.....	57
7. ZAHVALE.....	58
8. POPIS LITERATURE.....	59
9. SAŽETAK.....	65
10. ABSTRACT	66

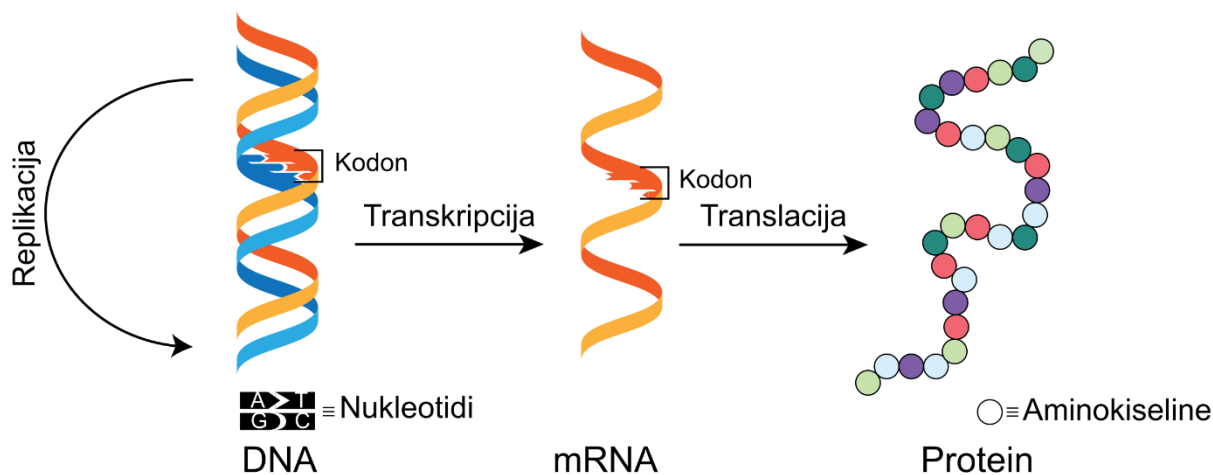
1. UVOD

1.1 *Herpetosiphon aurantiacus*

Bakterije *Herpetosiphon aurantiacus* prvi su put opisane 1968. godine od strane Holta i Lewina te spadaju u razred *Chloroflexota* (Freches i Fradinho, 2024). To su filamentozne bakterije koje žive u aerobnim uvjetima, prehranjuju se kemoorganotrofno, kreću se klizanjem, a naseljavaju širok raspon staništa: tlo, mulj, vodena staništa, kanalizacijska postrojenja itd. Filamenti koje tvore su višestanični i mogu dosežati preko 1,2 mm duljine. Po Gramu se boje negativno, ali nemaju tipičnu staničnu stijenku Gram-negativnih bakterija jer im nedostaje vanjska membrana. Stijenka im je strukturirana od unutrašnje membrane, mureinskog sloja od 4-6 nm debljine, te od dodatnog heteropolisaharidnog sloja debljine 21-25 nm, koji je otporniji na raspadanje od tipične lipopolisaharidne membrane (Lee i Reichenbach, 2006). *H. aurantiacus* bakterije imaju sposobnost predacije nad drugim mikrororganizmima jer luče hidrolitičke enzime (Livingstone i sur., 2018) i sintetiziraju antimikrobne tvari kao što su sifonazol (Nett, 2006) i aurikulamid (Schieferdecker i sur., 2015). Stil predacije *H. aurantiacus* naziva se „strategija vučjeg čopora”, što znači da velik broj bakterija zajedničkim snagama napada plijen te se pretpostavlja da postoji specifičan način komunikacije koji to omogućava (Linares-Otoya i sur., 2017).

1.2. Biosinteza proteina

Proteini su makromolekule sastavljene od jednog ili više lanaca aminokiselina koji obavljaju različite zadatke, kao što su: strukturna, transportna, regulatorna, hormonska, zaštitna te katalitička funkcija. Centralna dogma molekularne biologije nalaže da se proteini biosintetiziraju procesima transkripcije i translacije prema uputi sadržanoj u dvolančanoj molekuli DNA, odnosno u genima (slika 1.1). Genetička informacija u DNA dolazi u vidu slijeda četiriju deoksinukleotida (deoksiadenozin, deoksigvanozin, deoksicitozin, deoksitimidin) koje se komplementarno sparuju u dvolančanoj DNA molekuli (adenin s timinom, gvanin s citozinom). Procesom transkripcije informacija se prepisuje u molekulu glasničke RNA (engl. *messenger RNA*, mRNA), pomoću enzima DNA-ovisne RNA polimeraze (Nelson i Cox, 2017).



Slika 1.1 Centralna dogma molekularne biologije. Preuzeto iz (Živković, 2021).

Translacija je proces prevođenja slijeda nukleotida iz molekule mRNA u slijed aminokiselina koje sačinjavaju polipeptide, odnosno proteine. Jednu aminokiselinu kodiraju tri uzastopna nukleotida u mRNA, zvana kodon. Postoji šezdeset i jedan različiti kodon koji kodiraju 20 proteinogenih aminokiselina, što znači da više različitih kodona kodira istu aminokiselinu (degeneracija genetskog koda, tablica 1.1). Tri kodona ne kodiraju nijednu aminokiselinu, već služe za terminaciju translacije, a kodon za metionin još služi i kao signal za inicijaciju translacije (tzv. START kodon).

Tablica 1.1 Genetički kod.

		Druga baza						
		U	C	A	G	Treća baza		
Prva baza		U	C	A	G			
U	UUU	Phe	UCU	UAU	UGU	U		
	UUC		Ser	UAC	UGC		C	
	UUA	UCA		UAA STOP	UGA STOP	A		
	UUG	UCG		UAG STOP	UGG Trp	G		
C	CUU	Leu	CCU	CAU	CGU	U		
	CUC		Pro	CAC	CGC		C	
	CUA			CAA	CGA		A	
	CUG			CCG	CAG		CGG	G
A	AUU	Ile	ACU	AAU	AGU	U		
	AUC		Thr	ACC	AAC		AGC	C
	AUA			ACA	AAA		AGA	A
	AUG Met			ACG	AAG		AGG	G
G	GUU	Val	GCU	GAU	GGU	U		
	GUC		Ala	GCC	GAC		GGC	C
	GUA			GCA	GAA		GGA	A
	GUG			GCG	GAG		GGG	G

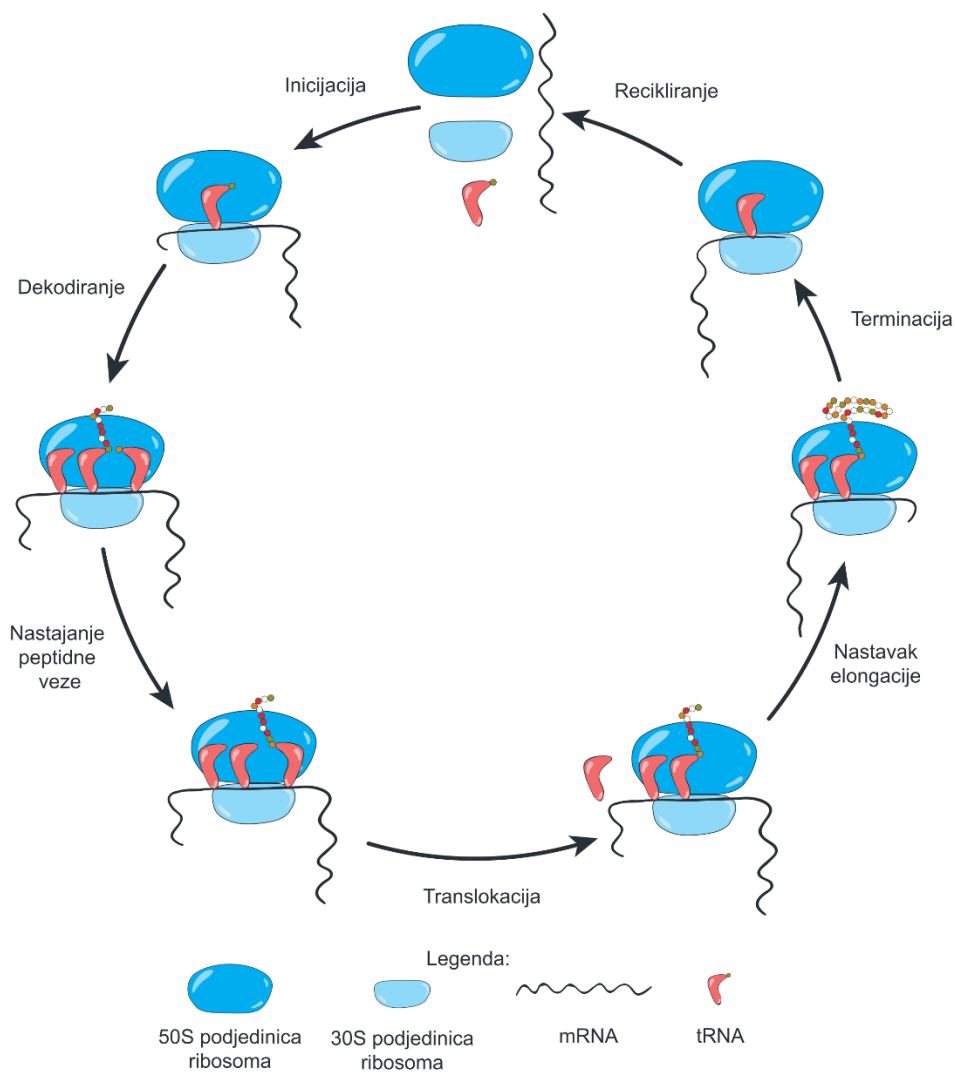
Translacija se odvija na ribosomima, izrazito evolucijski očuvanima ribonukleoproteinskim kompleksima. S obzirom na to da se ovaj rad bavi isključivo prokariotima, bit će ukratko opisana prokariotska translacija, dok je eukariotska kompleksnija i slabije istražena, ali temeljena na istoj logici. Prokariotski ribosom (70S, S (svedberg) je mjerna jedinica koja predstavlja brzinu sedimentacije) sastoji se od male 30S podjedinice te velike 50S podjedinice. Cijeli proces može se podijeliti na tri dijela: inicijacija, elongacija i terminacija translacije (slika 1.2).

Da bi mogla započeti sinteza polipeptida, bakterija mora osigurati 30S i 50S podjedinice ribosoma, molekulu mRNA koja će se translirati i inicijacijsku molekulu transportne RNA (engl. *transfer RNA*, *tRNA*), specifično fMet-tRNA^{fMet}. Aminoacilirane tRNA (aa-tRNA^{aa}) su molekule tRNA s kovalentno povezanim aminokiselinama te nastaju pomoću enzima

aminoacil-tRNA-sintetaza (aaRS). Služe pripajanju odgovarajuće aminokiseline kodonu mRNA u skladu s genetičkim kodom (tablica 1.1). Inicijacijska fMet-tRNA^{fMet} prepoznaje samo START kodon. Na ribosomu se nalaze tri specifična mjesta vezanja tRNA molekula: A mjesto gdje se veže aminoacilirana tRNA, P mjesto gdje se veže tRNA koja nosi rastući polipeptid i E mjesto gdje se veže tRNA koja je obavila svoju funkciju i spremna je za disocijaciju s ribosoma. Najprije se za 30S podjedinicu veže mRNA i pravilno pozicionira START kodon u P mjesto ribosoma gdje se može direktno vezati inicijacijska fMet-tRNA^{fMet}. Čim se veže inicijacijska fMet-tRNA^{fMet}, asocira se 50S podjedinica ribosoma.

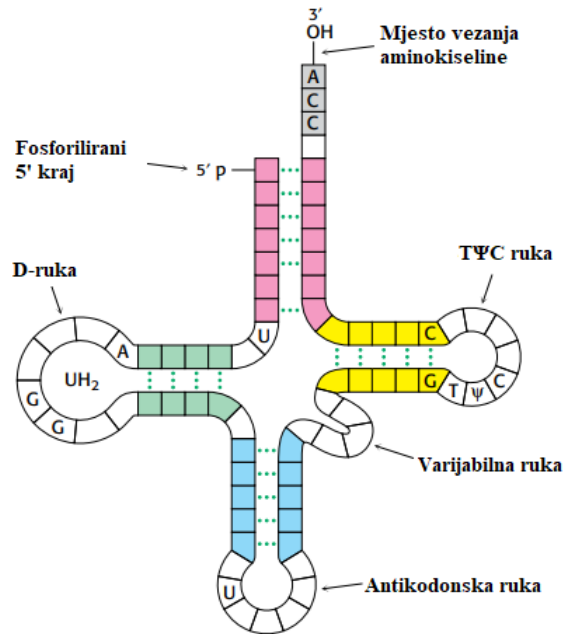
Sljedeća faza je elongacijska faza translacije te je za njezino uspješno odvijanje potreban inicijacijski kompleks i aminoacilirane tRNA molekule. Ova se faza ponavlja onoliko puta koliko ima kodona u mRNA prije STOP kodona. Najprije se aa-tRNA^{aa} pozicionira u A mjesto ribosoma gdje se komplementarno sparuju kodon i antikodon. U aktivnom mjestu događa se peptidil-transferazna reakcija te polipeptid ostane privezan za tRNA koja je vezana u A mjestu. Naposljetku, događa se translokacija peptidil-tRNA iz A u P mjesto što simultano potiče kretanje ribosoma prema 3' kraju mRNA te se novi ciklus elongacije može odvijati za sljedeći kodon u nizu.

Posljednja faza jest faza terminacije translacije za koju su potrebna terminacijski faktori. Translacija ulazi u tu fazu čim se jedan od tri STOP kodona pozicionira u A mjesto ribosoma. Tada jedan od terminacijskih faktora prepoznaje STOP kodon što omogućuje produktivno pozicioniranje molekule vode u peptidil-transferaznom centru ribosoma, uslijed čega dolazi do hidrolize esterske veze između tRNA i polipeptida koji potom disocira s ribosoma (Nelson i Cox 2017).



Slika 1.2 Pregled procesa translacije u prokariota. Preuzeto iz (Živković, 2021).

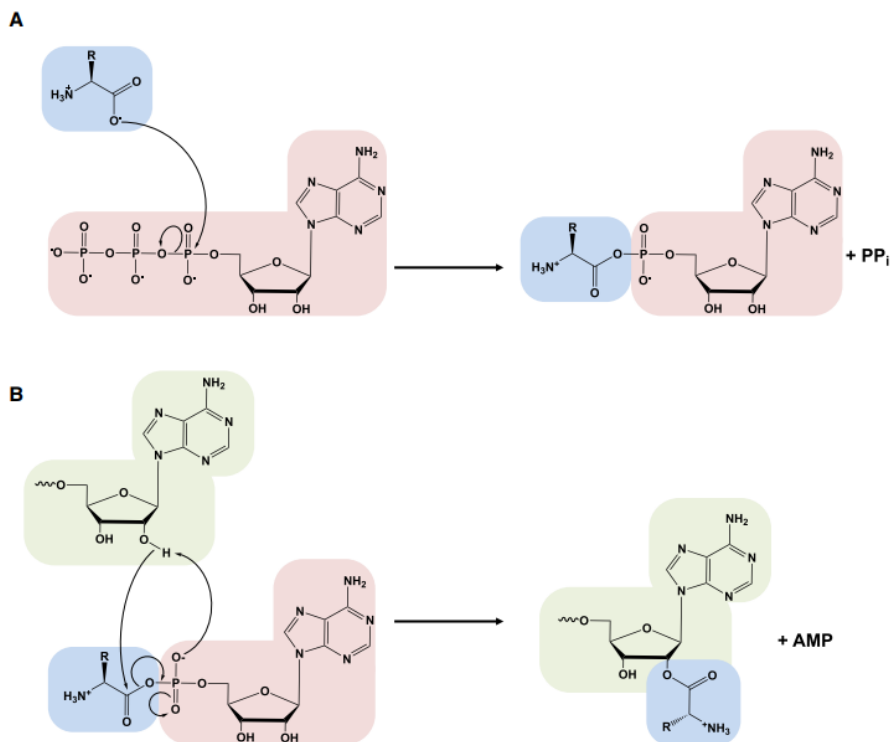
Samu zadaću iščitavanja genetičkog koda obavljaju enzimi aminoacil-tRNA-sintetaze koje pripajaju pripadni par aminokiseline i tRNA. Molekule tRNA imaju antikodonski triplet što se komplementarno sparuje s kodonom ukoliko su aminoacilirane, odnosno nose odgovarajuću aminokiselinu kovalentno povezanu za svoj 3' kraj. Inače, tRNA molekule imaju prosječno 76 nukleotida i vrlo očuvanu sekundarnu strukturu koju čine akceptorska peteljka, D-ruka, antikodonska ruka, TΨC ruka i varijabilna ruka koja može biti različite duljine (prema tome se tRNA dijele u tip I s kraćim i tip II s duljim varijabilnim rukama (Brennan T. i Sunderalingam M., 1976)). Osim toga, vrlo je važna i diskriminatorska baza (A73) koja je čest element prepoznavanja odgovarajuće tRNA molekule od strane aminoacil-tRNA-sintetaza (slika 1.3) (C. P. Lee i sur., 1993).



Slika 1.3 Struktura molekule tRNA. Preuzeto i prilagođeno iz (Berg, Tymoczko, Stryer, 2015).

1.3. Aminoacil-tRNA-sintetaze

Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) su enzimi-prevoditelji genetičkog koda koji su od esencijalne važnosti u biosintezi proteina. Postoje indicacije da su jedna od evolucijski najstarijih proteinskih obitelji jer su očuvani u sve tri domene života te postoje brojni dokazi o horizontalnom prijenosu gena koji kodiraju za aaRS između eukariota, arheja i bakterija (Giegé i Springer, 2012; Brown i Doolittle, 1995). Osim spomenute funkcije pronađeno je da imaju i brojne druge funkcije, primjerice: transkripcijska regulacija (npr. vezanje DNA), translacijska regulacija (npr. uloga u biosintezi histidina), uloga u mitohondrijskom prekrajanju RNA itd. (Martinis i sur., 1999). U većini organizama ima 20 aaRS, a svaka je specijalizirana za aminoaciliranje jedne ili više izoakceptorskih tRNA (različite molekule tRNA koje su supstrat iste aaRS) samo jednom aminokiselinom (Moras i Cavarelli, 2000). AaRS kataliziraju aminoacilaciju tRNA u dva koraka. U prvom koraku aktivira se aminokiselina nukleofilnim napadom kisika α -karboksilne skupine na α -fosfat ATP-a te nastaje aminoacil-adenilat (aa-AMP) uz otpuštanje pirofosfata (slika 1.4., A). U drugom koraku 3' ili 2' OH skupina na terminalnom adenzinu (A76) tRNA molekule nukleofilno napada aktiviranu aminokiselinu te nastaje aminoacil-tRNA uz otpuštanje AMP-a (slika 1.4., B).



Slika 1.4 Opća reakcija aminoaciliranja tRNA molekule posredovana odgovarajućom aminoacil-tRNA sintetazom. **A)** U prvom koraku dolazi do aktivacije aminokiseline (plavo) adenilatom (ružičasto), **B)** U drugom koraku dolazi do aminoacilacije tRNA molekule (zeleno). Preuzeto iz (Rubio Gomez i Ibba, 2020).

Aminoacil-tRNA-sintetaze dijele se u dva razreda, razred I i razred II te osam podrazreda u skladu sa strukturnim i mehanističkim razlikama (tablica 1.2). Većina aaRS razreda I su monomeri, a razreda II su homodimeri (Perona i Hadd, 2012). Što se tiče mehanističkih razlika, u razredu I aaRS 2' OH skupina tRNA vrši napad na aminokiselinu nakon čega 3' OH skupina tRNA transesterificira aminokiselinu na sebe, dok se u razredu II aaRS aminoacilacija tRNA događa izravno na 3' OH kraj tRNA (iznimka je fenilalanin-tRNA-sintetaza). Ta razlika posljedica je različite arhitekture aktivnog mjesta (Gilbert Eriani i sur., 1990; Rubio Gomez i Ibba, 2020). Dva razreda razlikuju se i u najsprijem koraku reakcije, koji je kod aaRS razreda I korak otpuštanja aminoacil-tRNA (Zhang i sur., 2006), a kod aaRS razreda II korak aktivacije aminokiseline (Dibbelt i sur., 1980; Dibbelt i Zachau, 1981; Minajigi i Francklyn, 2008). Ovaj rad bavit će se arginil-tRNA sintetazom koja pripada razredu I, stoga će taj razred biti podrobnije opisan u narednom poglavlju.

Tablica 1.2 Podjela aminoacil-tRNA-sintetaza prema mehanističkim i strukturnim kriterijima. Preuzeto iz (Perona i Gruic-Sovulj, 2014).

Razred I		Razred II	
Podrazred	aaRS	Podrazred	aaRS
1A	MetRS	2A	GlyRS**
	ValRS		HisRS
	IleRS		ProRS
	LeuRS		SerRS
1B	CysRS		ThrRS
	GlnRS	2B	AsnRS
	GluRS		AspRS
1C	TrpRS	2C	LysRS*
	TyrRS		AlaRS
1D	ArgRS		GlyRS**
1E	LysRS*	PheRS	

*LysRS se može nalaziti u razredu I ili II.

**GlyRS se može nalaziti u različitim podrazredima razreda II.

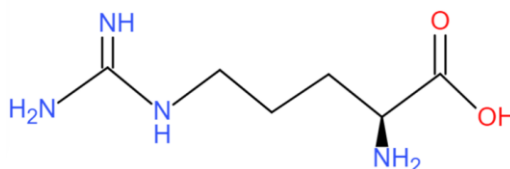
1.3.1. Razred I

Aminoacil-tRNA-sintetaze razreda I imaju sintetsku domenu koja pripada evolucijskoj liniji HUP (akronim od: proteini s HxGH motivom, UspA i PP-ATPaze). Ta se linija inače sastoji od enzima što koriste nukleotid trifosfate za supstrate, imaju ligaznu aktivnost i jedan od produkata im je pirofosfat (Gruic-Sovulj i sur., 2022). Za sintetsku domenu ovih enzima se, u smislu sekundarne strukture, definira Rossmannov nabor na N-kraju, kojeg sačinjava pet β -ploča povezanih α -zavojnica. AaRS razreda I imaju izrazito očuvane motive histidil-x-glicil-histidin (HxGH, gdje x označava bilo koju hidrofobnu aminokiselinu, najčešće izoleucin) i lizil-metionil-seril-lizil-serin (KMSKS) u aktivnom mjestu sintetske domene. Navedeni motivi važni su zbog specifičnog vezanja molekule ATP-a u aktivnom mjestu u prijelaznom stanju u reakciji aktivacije, glicin iz HxGH motiva pozicionira adeninski prsten, aminokiselina na drugoj poziciji pridonosi hidrofobnim interakcijama, a histidini vodikovim vezama vežu fosfate

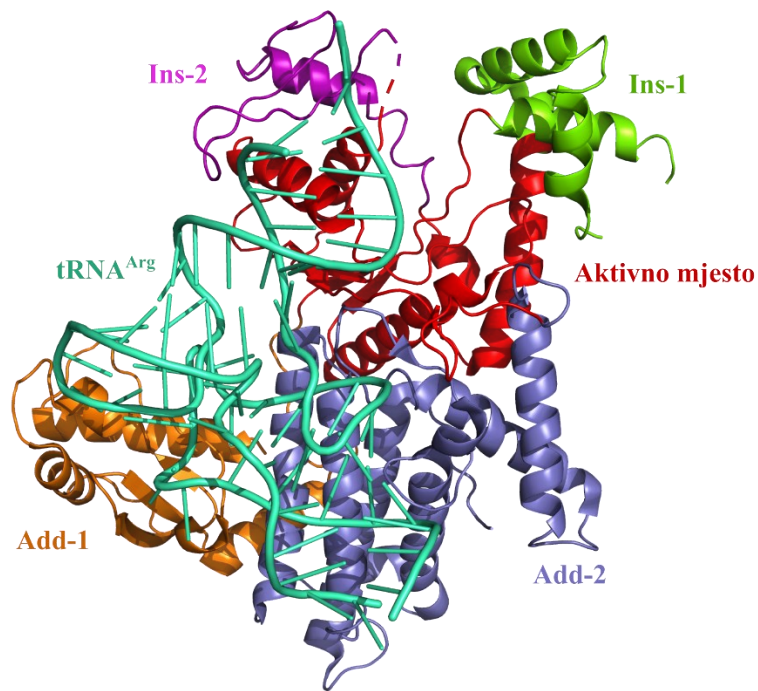
ATP-a. Lizini iz KMSKS motiva su važni u pozicioniranju fosfata ATP-a (Perona i Gruic-Sovulj, 2014).

1.3.2. Arginil-tRNA-sintetaza

Arginil-tRNA-sintetaza (ArgRS) je aminoacil-tRNA-sintetaza specijalizirana za aminoaciliranje tRNA^{Arg} L-argininom (slika 1.5). Za ArgRS iz bakterije *Escherichia coli* (EcArgRS) riješena je struktura u kompleksu s tRNA^{Arg} što je čini dobrim primjerom za generalni opis strukture arginil-tRNA-sintetaza. EcArgRS je monomer od 577 aminokiselina te pripada razredu ID aaRS (slika 1.6; tablica 1.2), stoga ima tipični HVGH motiv te FKT motiv, koji je jako degenerirana verzija KMSKS motiva (Stephen i sur., 2018). U *E. coli* postoje četiri izoakceptorske tRNA^{Arg} molekule s antikodonima: ACG, CCG, CCT i TCT koje su supstrati njezine ArgRS (Chan i Lowe, 2016). Struktura ArgRS može se podijeliti na pet funkcionalnih domena: tipičnu sintetsku, dvije dodatne Add1 i Add2 koje su, redom, vezane za N- i C-terminalne krajeve sintetske domene i domene umetnute u katalitičku srž enzima, Ins-1 i Ins-2 (Cavarelli i sur., 1998). Specifično prepoznavanje tRNA^{Arg} od strane ArgRS osigurano je interakcijama sintetaze s dva očuvana nukleotida: A20 (specifična baza D ruke) i C35 (druga pozicija antikodona svih izoakceptorskih tRNA^{Arg}) (Shimada i sur., 2001).

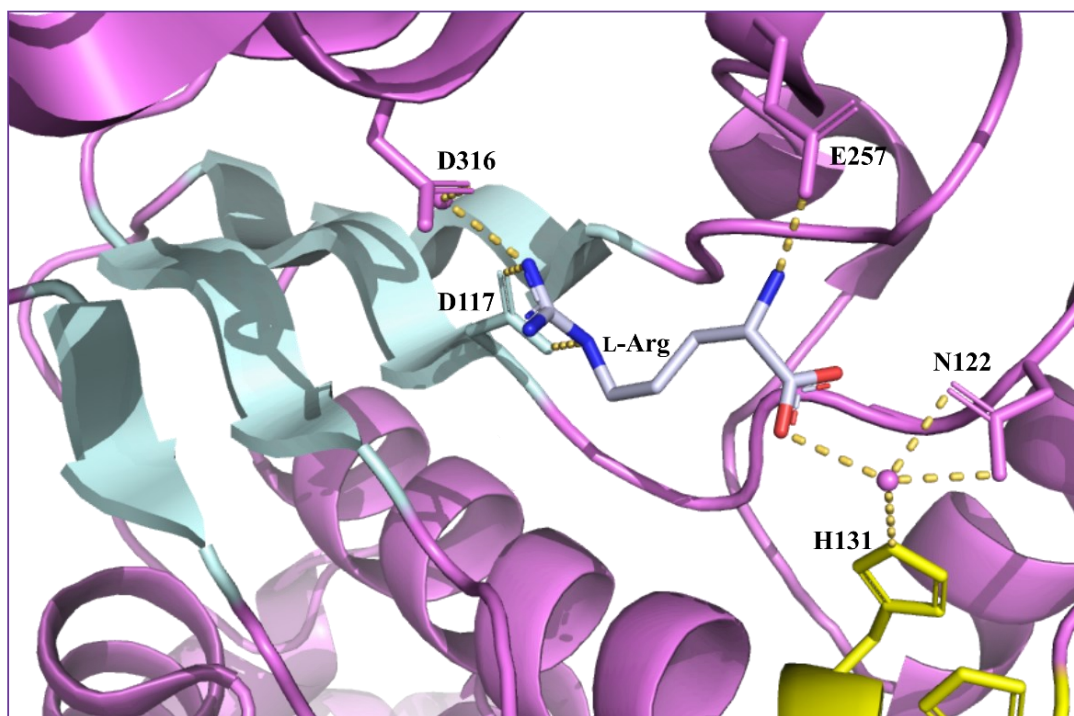


Slika 1.5 Struktura L-arginina. Izrađeno u online programu: <https://web.chemdoodle.com/demos/2d-sketcher>



Slika 1.6 Kristalna struktura EcArgRS kompleksa s tRNA^{Arg} (PDB ID: 5YYN). Domene enzima i tRNA^{Arg} naznačene su na slici različitim bojama (Cavarelli i sur, 1998).

Specifično za ArgRS (i još neke aaRS) jest da je aktivacija arginina tRNA^{Arg}-ovisna, tako što vezanje tRNA^{Arg} inducira konformacijsku promjenu enzima u katalitički aktivnu formu. (Guigou i Mirande, 2005). Uz to, pravilno pozicioniranje 3' kraja tRNA^{Arg} u aktivno mjesto se događa samo ukoliko je prethodno vezan L-arginin (Moras i Cavarelli, 2000), koji se veže na C-terminalnom kraju pete niti paralelne β-ploče tipičnog Rossmannovog nabora (slika 1.7) (Cavarelli i sur., 1998).



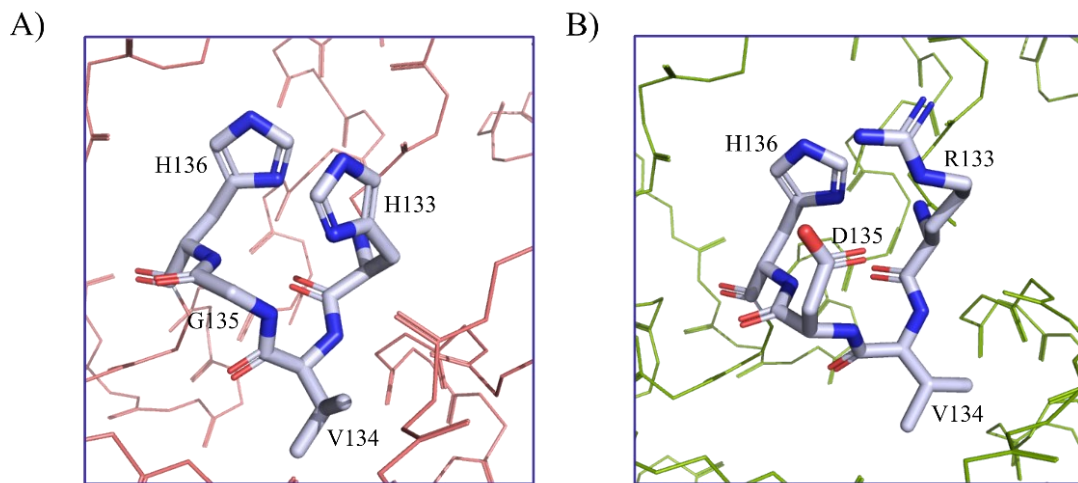
Slika 1.7 Smještaj L-arginina u aktivnom mjestu EcArgRS. Naznačeni su bočni ogranci aminokiseline koje ga pravilno pozicioniraju. β -ploča prikazana svijetloplavim strelicama pripada Rossmanovom naboru. Isprekidane crtice predstavljaju vodikove veze. H131 je drugi histidin HIGH motiva obojen žutom bojom.

1.3.3. Prirodne varijacije HxGH motiva

Iako je HxGH motiv vrlo evolucijski očuvan, utvrđeno je da postoje odstupanja od njega. Primjerice, pronađeno je da u bakterijama postoje dvije različite varijante izoleucil-tRNA-sintetaze: IleRS1 i IleRS2. Generalna značajka IleRS2 jest rezistencija na prirodni antibiotik mupirocin iz bakterije *Pseudomonas fluorescens* koji kompetira s ATP-om i izoleucinom za vezanje u aktivno mjesto IleRS. U slučajevima kada IleRS2 varijanta ima izmijenjen HxGH motiv u GIHH motiv, ona ispoljava hiperrezistenciju na mupirocin, dok joj aminoacilacijska aktivnost time nije značajno promijenjena (Brkic i sur., 2023).

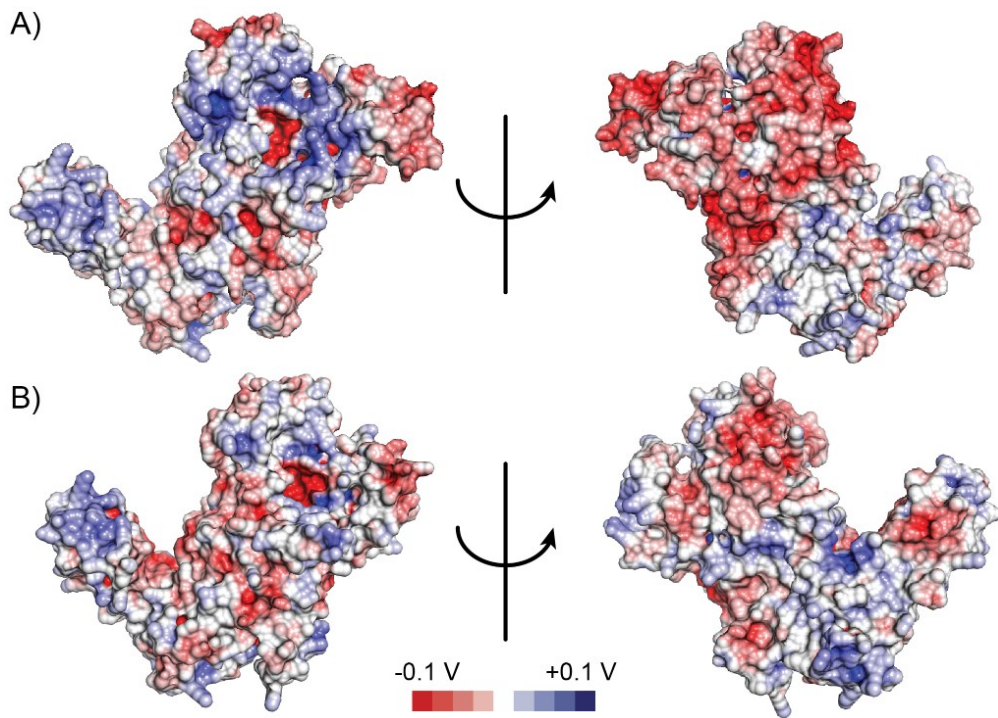
Istraživanja grupe Gruić pokazala su da u predatornoj bakteriji *Herpetosiphon aurantiacus* postoje dva homologna gena za arginil-tRNA-sintetazu. Jedna od njih ima znatno izmijenjen HxGH motiv u arginil-valil-aspartil-histidin (RVDH) motiv (slika 1.8, B) (HaArgRS2). Druga ima klasični HVGH motiv (slika 1.8, A) (HaArgRS1). Ove činjenice potencijalno upućuju na to da atipična HaArgRS2 ima nekanonsku ulogu ili novo svojstvo koje joj pruža selektivnu prednost. Zaista, u dosadašnjim ispitivanjima grupe Gruić atipična ArgRS nije pokazala standardnu aminoacilacijsku aktivnost. Utvrđeno je da veže tRNA^{Arg} i L-arginin,

ali ne i ATP. Također, primijećeno je da je znatno manje eksprimirana u odnosu na tipičnu HaArgRS1 u normalnim uvjetima rasta.



Slika 1.8 Predikcije trodimenzionalnih struktura aktivnih mjesta arginil-tRNA-sintetaza *H. aurantiacus* preuzete s AlphaFold Protein Structure Database (Jumper i sur., 2021; Varadi i sur., 2024). **A)** aktivno mjesto HaArgRS1 s HVGH motivom, **B)** aktivno mjesto HaArgRS2 s RVDH motivom.

Analizom struktura dobivenih u sučelju AlphaFold (Jumper i sur., 2021; Varadi i sur., 2024), dvije arginil-tRNA-sintetaze razlikuju se i po elektrostatskom profilu površine proteina, gdje tipična HaArgRS1 ima pozitivnije nabijenu površinu oko aktivnog mjesta i negativnije nabijenu površinu onkraj aktivnog mjesta od atipične HaArgRS2 (slika 1.9). Razlika u raspodjeli naboja po površini proteina može dovesti do smanjene stabilnosti, odnosno povećane sklonosti agregiranju (Chiti i sur., 2003; Strickler i sur., 2006), a očekivano i do promjena u interakcijama koje protein ostvaruje sa supstratima i/ili interaktorima. Izoelektrična točka im se poprilično razlikuje, za tipičnu HaArgRS1 iznosi oko 5,25, dok za atipičnu HaArgRS2 iznosi oko 7,02 (Isoelectric Point Calculator (Kozłowski, 2016)). Drugim riječima, atipična varijanta je neutralnija u odnosu na tipičnu. Poznato je da su proteini nestabilni u otopinama čija je pH vrijednost bliska njihovoj izoelektričnoj točki (Arakawa i Timasheff, 1985) te postoje indicije da pH pri kojem je protein najstabilniji korelira s pH vrijednosti okruženja u kojem je aktivan (P. Chan i Warwicker, 2009). Može se očekivati da je HaArgRS2 potencijalno aktivna u specifičnim uvjetima pH citosola.



Slika 1.9 Elektrostatski profil površine enzima arginil-tRNA-sintetaza iz *H. aurantiacus*. **A)** HaArgRS1, **B)** HaArgRS2. Predikcije preuzete s AlphaFold Protein Structure Database (Jumper i sur., 2021; Varadi i sur., 2024).

2. HIPOTEZA

S obzirom na to da atipičnoj arginil-tRNA-sintetazi (s RVDH motivom) dosadašnjim preliminarnim pokusima nije potvrđena kanonska funkcija aminociliranja tRNA^{Arg} argininom, postavlja se pitanje koja je uopće njegova uloga? Čest pristup u potrazi za funkcijom proteina kojima ona nije poznata jest traženje njihovih proteinskih interaktora u proteomu organizma iz kojeg potječu, jer interaktori mogu dati vrijedne informacije o biokemijskim putevima u kojima taj protein sudjeluje (Deng i sur., 2003). Stoga je hipoteza koju ovaj rad testira da postoje proteinski interaktori HaArgRS2 enzima u proteomu *H. aurantiacus* koji su nužni da bi on obavljao svoju funkciju.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 MATERIJALI

3.1.1. Standardne kemikalije

Aceton (*Carlo Erba*), acetonitril (ACN) (*Carlo Erba*), agar (*Sigma*), agarozna (*Carl Roth*), akrilamid (*Sigma*), amonijev bikarbonat (*Sigma Aldrich*), amonijev hidrogenkarbonat (NH_4HCO_3) (*Sigma Aldrich*), amonijev peroksodisulfat (APS) (*Serva*), ATP (*Sigma*), destiobiotin (*IBA Lifesciences*) ditiotreitol (DTT) (*Sigma*), etanol (*Kemika*), etilendiamintetraoctena kiselina, EDTA (*Sigma*), fenilmetilsulfonil-fluorid (PMSF) (*Sigma*), formaldehid (*T.T.T.*), glicerol (*Kemika*), glicin (*USB Corporation*), glukoza (*Sigma*), 4'-hidroksiazobenzen-2-karboksilna kiselina (HABA) (*Thermo Fisher Scientific*), mravlja kiselina (FA) (*Honeywell Fluka*), imidazol (*Sigma*), izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG) (*Sigma*), jodoacetamid (IAA) (*Sigma*), kalijev bikromat ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) (*Kemika*), kanamicin (*Sigma*), kloridna kiselina (HCl) (*Kemika*), kvaščev ekstrakt (*BD Difco*), magnezijev klorid (MgCl_2) (*Fluka*), magnezijev sulfat heptahidrat ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) (*Kemika*), β -merkaptioetanol (*Serva*), metanol (*Gram-mol*), *N,N'*-metilenbisakrilamid (*Merck*), natrijev dodecilsulfat (SDS) (*Merck*), natrijev glutamat (*Sigma*), natrijev karbonat (Na_2CO_3) (*Sigma*), natrijev klorid (NaCl) (*Kemika*), octena kiselina (CH_3COOH) (*Kemika*), srebrov nitrat (AgNO_3) (*Sigma*), *N,N,N,N'*-tetrametiletilendiamin (TEMED) (*Serva*), tioureja (*Sigma Aldrich*), trifluoroctena kiselina (TFA) (*Sigma*), trikloroctena kiselina (TCA) (*Kemika*), tripton (*BD Difco*), Tris(hidroksimetil)-aminometan (Tris) (*Sigma*), ureja (*Kemika*).

3.1.2. Boje

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

3.1.3. Enzimi i njima pripadni puferi

Albumin iz govedjeg seruma (engl. *bovine serum albumin*, BSA) (*NEB*), DNaza I (*NEB*), DpnI (*NEB*), lizozim (*Carl Roth*), rCutSmart pufer (*NEB*), T4 polinukleotid-kinaza (PNK) (*Thermo Fisher Scientific*), T4 PNK pripadni pufer (*Thermo Fisher Scientific*), T4 ligaza (*Thermo Fisher Scientific*), T4 ligazi pripadni pufer (*Thermo Fisher Scientific*), tripsin (*Promega*), tripsinu pripadni pufer (*Promega*), XhoI (*NEB*).

3.1.4. Markeri

GeneRuler 1kb DNA Ladder (*Thermo Fischer Scientific*), Precision Plus Protein Standards, Unstained (*Bio-Rad*).

3.1.5. Mediji

Tekući hranjivi medij Luria-Bertani (LB) za uzgoj *E. coli* sojeva: kvašćev ekstrakt ($\gamma = 5 \text{ g/dm}^3$), tripton ($\gamma = 10 \text{ g/dm}^3$), NaCl ($\gamma = 10 \text{ g/dm}^3$).

Kruta hranjiva podloga LB za uzgoj *E. coli* sojeva: kvašćev ekstrakt ($\gamma = 5 \text{ g/dm}^3$), tripton ($\gamma = 10 \text{ g/dm}^3$), NaCl ($\gamma = 10 \text{ g/dm}^3$), agar ($\gamma = 15 \text{ g/dm}^3$).

Tekući hranjivi medij HP74 za uzgoj *H. aurantiacus*: natrijev glutamat ($\gamma = 10 \text{ g/dm}^3$), kvašćev ekstrakt ($\gamma = 2 \text{ g/dm}^3$), magnezijev sulfat heptahidrat ($\gamma = 2 \text{ g/dm}^3$), D-glukoza ($\gamma = 10 \text{ g/dm}^3$), fosfatni pufer ($c = 50 \text{ mmol/dm}^3$ pH 6,5).

3.1.6. Bakterije i plazmidi

E. coli soj BL21(DE3) ($F^- ompT hsdS_B (r_B^- m_B^-) gal dcm$ (DE3), *Novagen*). Soj je korišten za prekomjernu ekspresiju gena unesenih na plazmidu pET28b. Soj ima inserciju gena za T7 polimerazu u kromosomu pod inducibilnim promotorom *lacUV5* (inducira se dodatkom izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid, IPTG) te ima utišane gene za proteaze *lon* i *ompT*.

E. coli soj SoluBL21(DE3) ($F^- ompT hsdS_B (r_B^- m_B^-) gal dcm$ (DE3) *Genlantis*). Soj sadrži mutacije koje nisu okarakterizirane, a omogućavaju prekomjernu ekspresiju gena koji kodiraju slabo topljive proteine. Soj ima inserciju gena za T7 polimerazu u kromosomu pod inducibilnim promotorom *lacUV5* (inducira se dodatkom izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid, IPTG) te ima utišane gene za proteaze *lon* i *ompT*.

H.aurantiacus soj 114-95^T (DSM 785) – divlji tip (DSMZ).

pET28b plazmid iz serije vektora pET koji je korišten za prekomjernu ekspresiju gena pod regulacijom inducibilnog *T7lac* promotora. Plazmid nosi kazetu rezistencije na kanamicin. Ovaj plazmid se koristi za ekspresiju proteina s histidinskim fuzijskim privjeskom na N- ili C-kraju da bi se mogli pročišćavati afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA.

3.1.7. Kromatografski pribor

C18 ekstrakcijski diskovi (*Empore*), HisTrap HP (*Cytiva*), Ni-NTA agarozna (*Qiagen*), Pierce Micro-Spin kolone (*Thermo Fischer Scientific*), Poly-Prep kromatografske kolone (*Bio-Rad*), StrepTactin smola (*IBA Lifesciences*), Superdex 200 Increase 10/300 (*Cytiva*), TALON smola (*Takara*).

3.1.8. Komercijalni kompleti kemikalija

Komplet za pročišćavanje produkata PCR reakcije QIAquick PCR Purification Kit (*Qiagen*), komplet za izolaciju plazmidne DNA QIAprep Spin Miniprep Kit (*Qiagen*), komplet za bojanje elektroforetskih gelova srebrom SERVA Silver Staining Kit Native PAGE (*Serva*).

3.1.9. Standardni pribor za lančanu reakciju polimeraze

dNTP mješavina (*NEB*), MgCl₂ (*NEB*), Q5 DNA-polimeraza (*NEB*), 5 × Q5 pufer (*NEB*), Taq DNA-polimeraza (*NEB*), 10 × Taq pufer + (NH₄)₂SO₄ – MgCl₂(*NEB*).

3.1.10. Ostali materijali

Filtracijski sustav i sterilni filter papiri od celuloznog acetata s promjerom pora 0,22 μm (*Sartorius*).

3.2. METODE

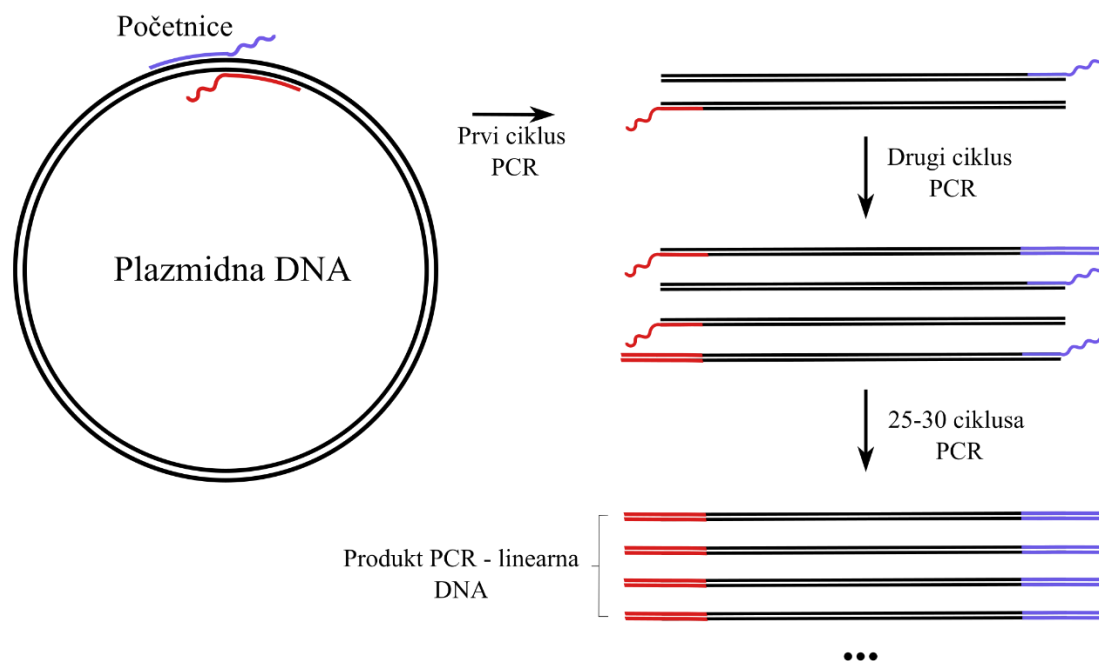
3.2.1. Metode rada s nukleinskim kiselinama

3.2.1.1. Izolacija plazmidne DNA

Plazmidnu DNA treba izolirati iz stanica bakterija u koje je transformirana da bi se mogla klonirati ili sekvencirati. Korišten je komercijalni komplet za izolaciju plazmidne DNA QIAprep Spin Miniprep Kit za izolaciju plazmidne DNA (*Qiagen*). Protokol je proveden prema uputama proizvođača. Ukratko, bakterijske stanice su lizirane da se oslobodi plazmidna DNA, koja se veže za silika membranu u uvjetima visoke ionske jakosti. Nečistoće su isprane puferom koji sadrži etanol te je naposljetku DNA eluirana puferom niske ionske jakosti.

3.2.1.2. Kloniranje plazmida lančanom reakcijom polimeraze

Da bi se uklonirao fuzijski privjesak StrepTagII na N-terminalni kraj gena od interesa provedena je lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) s početnicama koje se samo djelomično hibridiziraju na kalup DNA, a drugim dijelom ne (slika 3.1). Taj dio nosi nukleotidni slijed koji kodira privjesak. Kalup DNA bio je *in vivo* proizvedeni plazmid pET28b s genom od interesa.



Slika 3.1 Shema PCR reakcije kloniranja inserta koji kodira za fuzijski privjesak u plazmidnu DNA.

Sastav reakcijske smjese bio je: 0,04 ng/ μ L kalupa DNA, 0,5 μ mol/dm³ početnica, 0,2 mmol/dm³ dNTP mješavine, 0,02 U/ μ L Q5 DNA-polimeraze te Q5 pripadnog pufera finalne koncentracije 1 \times . Korištene početnice navedene su u tablici 3.1. Dizajnirane su ručno tako da svaka od dvije početnice nosi polovinu inserta StrepTagII fuzijskog privjeska te su naručene od tvrtke *Macrogen*. Metoda lančane reakcije polimerazom provedena je u uređaju Thermal Cycler T100TM (*Bio-Rad*) po protokolu navedenom u tablici 3.2.

Tablica 3.1 Početnice korištene u reakcijama PCR. Crveno obojeni nukleotidi ne hibridiziraju s kalupom već služe za inserciju fuzijskog privjeska na N-terminalni kraj proteina. Zeleno su označene početnice korištene u PCR kloniranju, a plavo početnice korištene u *colony PCR*.

Naziv početnice	Slijed početnice
StrepTagII_pET28b_F	5'- CGCAGTTCGAAAAAGGCAGCAGCCATCATCATCATCAC -3'
StrepTagII_pET28b_R	5'- GGTGGCTCCACATGGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAAC -3'
Strep_kontrola_F	5'- CCCTGAATTGACTCTCTTCCGGG -3'
Strep_kontrola_R	5'- CTGCGGGTGGCTCCACAT -3'

Tablica 3.2 Protokol reakcije PCR.

Faza ciklusa	$\theta / ^\circ\text{C}$	t / s	N_{ciklusa}
Početna denaturacija	98	60	1
Denaturacija	98	10	25-30
Sljepljivanje	62	30	25-30
Produljenje	72	350	25-30
Završno produljenje	72	120	1

Rezultati PCR kloniranja analizirani su agaroznom gel-elektroforezom prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.1.3.

3.2.1.3. Pročišćavanje i ligacija plazmidne DNA

Nakon umnažanja plazmidne DNA PCR-om, potrebno je ukloniti DNA kalupa, tako da ostane samo umnožena DNA u smjesi. S obzirom na to da je DNA kalupa dobivena *in vivo*, ona je hemimetilirana na specifičnim sljedovima, dok nosintetizirana DNA dobivena PCR-om *in vitro* ne može biti metilirana. Zbog toga se koristi endonukleaza DpnI koja cijepa samo hemimetiliranu DNA, dakle samo DNA kalupa u ovom slučaju.

U PCR smjesu je dodan DpnI do finalne koncentracije 0,18 U/ μL i rCutSmart pufer do finalne koncentracije $1 \times$ te je nukleazna reakcija provedena 1 h na 37 °C.

Potom valja pročititi plazmidnu DNA iz reakcijske smjese, što je napravljeno pomoću QIAquick PCR Purification Kit kompleta prema uputama proizvođača (*Qiagen*).

Produkti PCR-a su linearne molekule DNA, stoga ih valja cirkularizirati prije transformacije stanica. To je napravljeno pomoću T4 polinukleotid-kinaze (PNK) koja fosforilira 5' krajeve polinukleotida te ih tako aktivira za lijepljenje pomoću T4 ligaze. Prvo je inkubirana plazmidna DNA s 0,25 U/ μL T4 PNK, PNK pripadnog pufera finalne koncentracije $1 \times$ i 1 mmol/dm³ ATP, 1 h na 37 °C, a potom je izvršena inaktivacija enzima 20 min na 65 °C. Ponovno je pročišćena reakcijska smjesa istim već spomenutim komercijalnim kompletom. Zatim je plazmidna DNA inkubirana 1 h s 17,5 U/ μL T4 ligaze i ligazi pripadnog pufera finalne koncentracije $1 \times$ na sobnoj temperaturi, a potom je izvršena inaktivacija enzima 1 h na 70 °C. Ponovno je pročišćena reakcijska smjesa istim već spomenutim komercijalnim kompletom.

3.2.1.4. Agarozna gel-elektroforeza

Agarozna gel-elektroforeza jest metoda razdvajanja nukleinskih kiselina kroz gel agaroze koji predstavlja molekularno sito kroz koje negativno nabijeni polinukleotidi putuju prema pozitivno nabijenoj anodi. Različiti polinukleotidi putuju različitim brzinama, ovisno o masi i stupnju superzavijenosti, gdje manje i superzavijenije molekule putuju brže. Za agaroznu gel-elektroforezu korišteni su gelovi agaroze spravljeni od 1 g/L agaroze u TAE puferu (sastava: $c(\text{Tris}) = 40 \text{ mmol/dm}^3$, $c(\text{EDTA}) = 1 \text{ mmol/dm}^3$, titrirano s CH_3COOH do pH 8,0). U uzorke je prije nanošenja u jažice gela dodan pufer za nanošenje sastava: glicerol ($\varphi = 50 \%$), ksilencijanolfuorofosfat ($w = 0,4 \%$), bromfenol plavo ($w = 0,4 \%$) i komercijalna boja GelRed (*Sigma*). Korišten je marker veličina GeneRuler 1kb DNA Ladder (*Thermo Fischer Scientific*). Elektroforeza je provedena je u TAE puferu pri 120 V pri sobnoj temperaturi u aparaturi za horizontalnu elektroforezu EPS 600 (*Pharmacia Biotech*). Gelovi su snimljeni kamerom ChemiDoc MP Imaging System (*Bio-Rad*).

3.2.1.5. Transformacija bakterija

Transformacija bakterija podrazumijeva unošenje plazmida u bakteriju. Odabrana metoda transformacije bila je elektroporacija u kojoj se propusnost stanične stijenke povećava primjenom električnog pulsa. Korištene su Mach1 elektrokompetente stanice *E. coli*. U 50 μL glicerolske kulture navedenih bakterija dodan je 1 ng plazmidne DNA te se smjesa prebaci u hladnu kivetu za elektroporaciju koju se stavi u uređaj za elektroporaciju MicroPulser (*Bio-Rad*) gdje se izloži električnom pulsom od 2,5 kV/cm u trajanju od 4-6 ms. Potom se transformirane bakterije žurno resuspendiraju u 950 μL tekućeg LB medija te inkubiraju 1 h na 37 °C. Naposljetku se razmazuju na krutu LB podlogu s dodatkom odgovarajućeg antibiotika (u ovom slučaju kanamicina jer se radilo s plazmidom serije pET koji sadrži kazetu rezistencije na kanamicin).

3.2.1.6. Probiranje transformanata metodom *colony PCR*

Kako bi se provjerilo jesu li bakterije koje su narasle na selektivnoj podlozi LB s dodatkom kanamicina nakon transformacije zaista uspješno transformirane plazmidom od interesa, provedena je metoda *colony PCR*, odnosno inačica PCR metode gdje se umjesto pročišćenog kalupa DNA u reakcijsku smjesu stavlja lizat ispitivane kolonije. Lizat je pripremljen tako da je sterilnim nastavkom za automatske pipete dotaknuta odabrana kolonija i resuspendirana u 8 μL ultračiste vode.

Sastav reakcijske smjese bio je: lizat kolonije kojeg je dodano $12,5 \times$ manje od volumena reakcijske smjese, Taq DNA-polimeraza $0,025 \text{ U}/\mu\text{L}$, pripadni pufer Taq DNA-polimeraze finalne koncentracije $1 \times$, MgCl_2 $2 \text{ mmol}/\text{dm}^3$, dNTP mješavina $0,2 \text{ mmol}/\text{dm}^3$ te početnice (navedene u tablici 3.1) $1 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Reakcija je provedena po protokolu navedenom u tablici 3.3. Korištene početnice su takve da jedna od njih hibridizira sa slijedom koji kodira uklonirani StrepTagII, a druga usred gena otprilike 300 parova baza nizvodno.

Tablica 3.3 Protokol reakcije *colony PCR*.

Faza ciklusa	$\theta / ^\circ\text{C}$	t / s	N_{ciklusa}
Početna denaturacija	9	30	1
Denaturacija	95	20	25
Sljepljivanje	58	20	25
Produljenje	68	45	25
Završno produljenje	68	300	1

Rezultati *colony PCR* reakcije analiziraju se agaroznom gel-elektroforezom prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.1.4.

3.2.1.7. Sekvenciranje Sangerovom metodom

Modificirani plazmidi izolirani su prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.1.1. i poslani na sekvenciranje Sangerovom metodom tvrtki *Macrogen* te je dobivenim kromatogramima ručno evaluirana pouzdanost. Sekvence su sravnjene s teorijski očekivanim sekvencama u alatu EMBOSS Needle Pairwise Sequence Alignment.

3.2.1.8. Mjerenje koncentracije DNA

Koncentracija plazmidne DNA određena je spektrofotometrijski uređajem NanoDrop One (*Thermo Fischer Scientific*). Uređaj mjeri apsorbanciju uzorka u rasponu valnih duljina 190-850 nm, a za mjerenje koncentracije DNA ključna je apsorbancija pri 260 nm. NanoDrop One sam računa koncentraciju DNA u kapljici volumena 1-2 μL nanesejoj na postolje na temelju podatka da 50 ng čiste DNA ima vrijednost apsorbancije $A_{260} = 1$. Osim same koncentracije, uređaj daje podatke o čistoći nanesejoj uzorka u vidu dvaju omjera, A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230} , koji za DNA idealno trebaju iznositi 1,8 te 2,0-2,2, redom.

3.2.2. Metode rada s proteinima

3.2.2.1. Prekomjerna ekspresija proteina *in vivo*

Da bi se proteini prekomjerno ekspimirali *in vivo*, korišten je ekspresijski soj *E. coli* BL21(DE3) transformiran plazmidom pET28b u koji je ukloniran gen koji kodira EcIleRS ili HaArgRS1. Jedino je za ekspresiju HaArgRS2 gena korišten posebni soj SoluBL21(DE3) koji je namijenjen prekomjernoj ekspresiji slabo topljivih proteina. Najprije je pripravljena prekonocna kultura navedenih bakterija u tekućem LB mediju s dodatkom 100 µg/mL kanamicina, koje su rasle preko noći na 37 °C i 250 rpm u termostatiranoj tresilici. Zasićena prekonocna kultura razrijeđena je 100 puta u tekućem LB mediju s dodatkom 100 µg/mL kanamicina te ostavljena u termostatiranoj tresilici na 37 °C i 250 rpm da bakterije rastu. Rasle su dok nije bila postignuta optička gustoća OD₆₀₀ (mjerenu spektrofotometrom Ultrospec 10 Cell Density Meter (*Biochrom*) na 600 nm) od 0,5-0,8 koja signalizira da su bakterije gotovo na polovini eksponencijalne faze rasta, koja je optimalna za prekomjernu ekspresiju proteina. U tom trenutku je obustavljen rast bakterija hlađenjem na 4 °C (30-60 min) nakon čega im je dodan IPTG ($c = 0,25 \text{ mmol/dm}^3$) koji inducira prekomjernu ekspresiju gena od interesa. Ostavljene su na 15 °C i 250 rpm 15-18 h u termostatiranoj tresilici, nakon čega su centrifugirane 15 minuta pri $10\,000 \times g$ i 4 °C te je odliven supernatant, a talog zadržan do daljnje uporabe.

3.2.2.2. Izolacija proteina

Talozi bakterijskih stanica nastali iz 1 L uzgoja resuspendirani su u 45 mL pufera za lizu sastava: c (Tris-HCl 8.0 @ 25°C) = 50 mmol/dm³, c (NaCl) = 500 mmol/dm³, c (imidazol) = 10 mmol/dm³, c (β-merkaptoetanol) = 5 mmol/dm³ i c (MgCl₂) = 2 mmol/dm³. U prvim eksperimentima nije korišten magnezijev klorid, međutim optimizacija je pokazala da pomaže HaArgRS2 da bude stabilniji pa je prihvaćen kao stalna komponenta svih korištenih kromatografskih pufera. Potom su smjesi dodani: DNaza I ($c = 3 \text{ ng/}\mu\text{L}$) koja cijepa genomsku DNA (gDNA) i lizozim ($c = 50 \text{ }\mu\text{g/mL}$) koji razgrađuje peptidoglikanski sloj stanične stijenke. Stanice su razbijene ultrazvučno pomoću Continuous Flow Cell Disrupter uređaja pri tlaku od 1350 bar. Naknadno je lizatu dodan glicerol ($\varphi = 10 \%$) koji održava proteine stabilnima i PMSF ($c = 1 \text{ mmol/dm}^3$) koji je inhibitor serinskih proteaza. Potom je lizat centrifugiran 1 h pri $20\,000 \times g$ i 4 °C, nakon čega je supernatant zadržan i filtriran kroz sterilni filter pora promjera 0,22 µm te je takav spreman za daljnje kromatografsko pročišćavanje.

3.2.2.3. Pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom

Proteini se uobičajeno pročišćavaju afinitetnom kromatografijom jer je to tip kromatografije koji u pravilu pruža najveću specifičnost prema odabranom proteinu. U ovom slučaju korištena metoda je afinitetna kromatografija na Ni-NTA agarozu gdje se pročišćavanje bazira na reverzibilnom vezanju histidinskog fuzijskog privjeska rekombinantnih proteina za niklov (II) ion (Ni^{2+}) tako da atomi dušika imidazolskih prstenova histidina popune preostala dva koordinacijska mjesta. Nikal (II) je četirima koordinacijskim mjestima vezan za nitrilotriocetenu kiselinu (NTA) koja je pak kovalentno povezana za sefaroza zrnca, što sve zajedno čini stacionarnu fazu ovog kromatografskog sustava.

Navedena kromatografija izvedena je pomoću kolone HisTrap HP 1 mL (*Cytiva*) na kromatografskom sustavu Äkta Pure™ 25 (*GE Healthcare*). Korištene su mobilna faza A ($c(\text{Tris-HCl } 8.0 @ 25^\circ\text{C}) = 50 \text{ mmol/dm}^3$, $c(\text{NaCl}) = 500 \text{ mmol/dm}^3$, $c(\text{imidazol}) = 10 \text{ mmol/dm}^3$, $c(\beta\text{-merkaptetanol}) = 5 \text{ mmol/dm}^3$, $c(\text{MgCl}_2) = 2 \text{ mmol/dm}^3$ i glicerol ($\varphi = 10 \%$)) i mobilna faza B ($c(\text{Tris-HCl } 8.0 @ 25^\circ\text{C}) = 50 \text{ mmol/dm}^3$, $c(\text{NaCl}) = 500 \text{ mmol/dm}^3$, $c(\text{imidazol}) = 300 \text{ mmol/dm}^3$, $c(\beta\text{-merkaptetanol}) = 5 \text{ mmol/dm}^3$, $c(\text{MgCl}_2) = 2 \text{ mmol/dm}^3$ i glicerol ($\varphi = 10 \%$)). U prvim pokusima mobilna faza B imala je 200 mmol/dm^3 imidazola te nije uopće korišten magnezijev klorid, ali je optimizacijom utvrđeno da su rezultati bolji uz veću koncentraciju imidazola i magnezijev klorid. Sve mobilne faze korištene za afinitetnu kromatografiju su prethodno filtrirane pomoću filtracijske aparature sa sterilnim filterima promjera pora $0,22 \mu\text{m}$ (*Sartorius*) i ultrazvučno degazirane u kupelji Elmasonic S 40 H (*Elma*). Imidazol kompetira s histidinima iz fuzijskog privjeska rekombinantnih proteina za vezanje na niklov ion te zbog toga služi za ispiranje nespecifično vezanih proteina (u manjim koncentracijama) te za eluciju proteina od interesa s kolone (u većim koncentracijama). Kromatografija se provodila na 8°C i s protokom 1 mL/min . Kolona je najprije uravnotežena s 10 volumena kolone (engl. *column volume*, CV) mobilne faze A s 10 mmol/dm^3 koncentracijom imidazola, a potom je nanesen uzorak izravnim injektiranjem ili pomoću Superloop™ 50 mL (*Cytiva*). Potom je izvršeno ispiranje s 15 CV mobilne faze A (10 mmol/dm^3) za ispiranje nevezanih proteina s kolone pa onda ispiranje s 10 CV mješavine od 21 % mobilne faze B i 79 % mobilne faze A, što je efektivno mobilna faza sa 70 mmol/dm^3 imidazolom, da bi se isprali nespecifično vezani proteini s kolone. Naposljetku je izvršena elucija sa 10 CV 100% mobilne faze B (koncentracija imidazola 300 mmol/dm^3). Frakcije su skupljane za korake ispiranja po $1,5 \text{ mL}$, a za korak elucije 1 mL .

3.2.2.4. Analiza proteina gel-filtracijskom kromatografijom

Gel-filtracijskom kromatografijom provjeren je stupanj agregacije proteina pročišćenih afinitetnom kromatografijom. Agregati proteina su veće molekulske mase od monomera, stoga se ranije eluiraju s gel-filtracijske kolone. Na dobivenom kromatogramu se jasno vide dva razdvojena maksimuma koji odgovaraju agregatima i monomerima. Usporedbom površina navedenih maksimuma moguće je aproksimirati udio agregiranih proteina. Pročišćavanje je izvedeno na koloni Superdex 200 Increase 10/300 (*Cytiva*) i kromatografskom sustavu Äkta Pure™ 25 (*Cytiva*). Kromatografija je provedena na 8 °C s protokom 0,5-0,9 mL/min. Prvo je kolona uravnotežena s 2 CV pufera B korištenog u afinitetnoj kromatografiji. Zatim je nanoseno 100 µL uzorka iz frakcija elucije s afinitetne kromatografije koje su prethodno centrifugirane 10 min pri $17\,000 \times g$ i 4 °C kako bi se uklonile nečistoće. Na kraju je izvršena elucija s 1,5 CV pufera B.

3.2.2.5. Mjerenje koncentracije proteina

Pročišćenim proteinima određena je koncentracija metodom po Bradfordu koja se temelji na interakciji bazičnih i aromatskih aminokiselina s bojom Coomassie Brilliant Blue G-250 što uzrokuje pomicanje apsorpcijskog maksimuma s valne duljine 465 na 595 nm. Ključno je pripremiti baždarnu krivulju za što se obično koristi albumin iz goveđeg seruma (BSA) koji je pripremljen u rasponu koncentracija od 0,015 mg/mL do 0,18 mg/mL. Uzorci proteina od interesa i uzorci BSA, pripremljeni kao razrjeđenja u ukupno 100 µL, pomiješani su s 1 mL Bradfordovog reagensa (γ (Coomassie Brilliant Blue G-250) = 0,1 g/dm³, φ (EtOH) = 5 %, φ (H₃PO₄) = 8,5 %) te ostavljeni da se inkubiraju u mraku na sobnoj temperaturi 10 minuta. Potom im je spektrofotometrijski mjerena apsorbanacija pri valnoj duljini 595 nm na uređaju Evolution 60S (*Thermo Fischer Scientific*).

3.2.2.6. Poliakrilamidna gel elektroforeza s natrijevim dodecil-sulfatom

Poliakrilamidna gel elektroforeza s natrijevim dodecil-sulfatom (engl. *sodium dodecyl-sulphate polyacrilamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) je metoda razdvajanja proteina u denaturirajućim uvjetima u poliakrilamidnom gelu koji služi kao molekulska sito. Denaturirane proteine obavijaju negativno nabijene molekule SDS (koje maskiraju proteinski intrinzični naboj) zbog čega proteini putuju prema pozitivno nabijenoj anodi te se tako razdvajaju na

temelju molekulske mase. Proteini manje molekulske mase brže putuju kroz gel, dok proteini veće molekulske mase putuju sporije.

Korištena aparatura za izlivanje gelova i samu elektroforezu je Mini Protean Tetra (*Bio-Rad*). Gelovi su dvodijelni, sastavljeni od gela za razdvajanje (γ (akrilamid:bisakrilamid 29:1) = 90 mg/mL, c (Tris) = 0,385 mol/dm³ pH = 8,8 i γ (SDS) = 1 mg/mL), u kojem se događa razdvajanje proteina po masi, nadslojenog gelom za sabijanje (γ (akrilamid:bisakrilamid 29:1) = 40 mg/mL, c (Tris) = 0,125 mol/dm³ pH = 6,8 i γ (SDS) = 1 mg/mL), u kojem svi proteini jednako brzo putuju i ravnomjerno se sabiju na granici gelova. Uzorci proteina se prije nanošenja u jažice gela miješaju sa smjesom za denaturaciju finalnog sastava: c (Tris) = 62,5 mmol/dm³ pH = 6,8, c (β -merkaptioetanol) = 12,5 mmol/dm³, φ (glicerol) = 6,25 %, γ (SDS) = 1,25 mg/mL i γ (bromfenolplavo) = 0,02 mg/mL. Potom su uzorci denaturirani zagrijavanjem 3 min na 95 °C, nakon čega su spremni za nanošenje na gel. Elektroforeza je provedena u SDS puferu (γ (glicin) = 14,4 mg/mL, γ (Tris) = 3,03 mg/mL pH = 8,3 i γ (SDS) = 1 mg/mL) 15 min pri 120 V te još 35-45 min pri 180 V. Naposljetku valja obojati gelove da se vizualiziraju razdvojeni proteini što je učinjeno na dva načina, ovisno o potrebnoj osjetljivosti detekcije vrpce na gelovima. Za analizu pročišćenosti proteina nakon afinitetne kromatografije dovoljno je precizno bojanje 15 min otopinom sastava: γ (Coomassie Brilliant Blue R-250) = 2,5 mg/mL, φ (CH₃COOH) = 10 % i φ (C₂H₅OH) = 50 %, praćeno odbojavanjem u vreloj vodi do jasne vizualizacije vrpce proteina na gelu. Za analizu rezultata metode supročišćavanja afinitetnom kromatografijom, gelovi su bojani srebrom, što je detaljno opisano u poglavlju 3.2.6.

3.2.3. Priprema proteinskog ekstrakta *H. aurantiacus*

Da bi se priredio proteinski ekstrakt koji će biti nanošen na kolone pri metodi supročišćavanja afinitetnom kromatografijom (vidi poglavlja 3.2.4. i 3.2.5.) korištena je metoda sonikacije bakterijskih stanica. Bakterije *H. aurantiacus* su rasle u 5 mL tekućeg HP74 medija 9 dana pa su centrifugirane minimalno 15 min pri 5000 \times g, nakon čega im je odliven supernatant, a talog zaleđen na -80 °C do uporabe. Neposredno prije korištenja talog je odleđen, resuspendiran u 1 mL pufera A (c (Tris-HCl 8,0 @ 21 °C) = 50 mmol/dm³, c (imidazol) = 10 mmol/dm³, c (MgCl₂) = 10 mmol/dm³, c (β -merkaptioetanol) = 10 mmol/dm³, c (NaCl) = 100 mmol/dm³, osim za HaArgRS2 gdje je c (NaCl) = 500 mmol/dm³ i φ (glicerol) = 20 %) kada je korištena metoda supročišćavanja afinitetnom kromatografijom pomoću histidinskog privjeska, odnosno 1 mL pufera W (c (Tris-HCl 8.0 @ 21°C) = 150 mmol/dm³, c (NaCl) = 150 mmol/dm³, c (β -merkaptioetanol) = 5 mmol/dm³) kada je korištena metoda supročišćavanja afinitetnom

kromatografijom pomoću streptavidinskog privjeska (vidi kasnije). Dodani su DNaza I ($c = 5 \text{ ng}/\mu\text{L}$) koja cijepa genomsku DNA (gDNA) i lizozim ($c = 50 \text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$) koji razgrađuje peptidoglikanski sloj stanične stijenke. Potom je smjesa sonicirana tri do četiri puta po 5 s uz pauze od 10 s, pri čemu je smjesa cijelo vrijeme držana na ledu. Nakon sonikacije smjesa je centrifugirana 30 min pri $17\,000 \times g$ i $4 \text{ }^\circ\text{C}$ nakon čega je odliven supernatant koji je spreman za nanošenje na kolonu.

3.2.4. Metoda supročišćavanja afinitetnom kromatografijom pomoću histidinskog privjeska

Metoda supročišćavanja afinitetnom kromatografijom (engl. *pull-down assay*) jest kromatografska metoda kojom se traže protein-protein interakcije. Funkcionira na način da se rekombinantni protein s fuzijskim privjeskom imobilizira za kolonu pa se kroz istu provuče proteinski ekstrakt bakterija. Ukoliko protein od interesa ima interaktore u proteomu tih bakterija, oni bi se trebali zadržati u kompleksu s njim dok se ostatak ekstrakta ispere s kolone. Naposljetku, u koraku elucije bi idealno trebali sići samo protein od interesa i njegovi interaktori.

Napravljene su *pull-down* metode s dva različita sustava afinitetne kromatografije: histidinska koja će ovdje biti opisana i temelji se na korištenju histidinskog fuzijskog privjeska te streptavidinska koja se temelji na korištenju streptavidinskog fuzijskog privjeska (vidi kasnije). Ova dva sustava afinitetne kromatografije razlikuju se u tome što histidinski sustav ima bitno manju specifičnost od streptavidinskog, odnosno očekuje se više nespecifično vezanih proteina na kolonu. Histidinski fuzijski privjesak (HisTag, sastoji se od šest uzastopnih histidina) specifično se veže za Ni-NTA ili TALON agarozu. Ni-NTA agarozu je građena od sefaroze za koju je kovalentno vezana nitriltriocetna kiselina koja koordinira četiri od šest mjesta nikla (II). Preostala dva mjesta koordinira sami HisTag. Jedina razlika između Ni-NTA i TALON agaroze je što potonja ima kobalt (II) umjesto nikla (II).

Sve *pull-down* metode ručno su izvođene u Poly-Prep kromatografskim kolonama volumena $50\text{-}100 \text{ }\mu\text{L}$ s gravitacijskim protokom pri temperaturi $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Sastav pufera korištenih za *pull-down* prikazan je u tablici 3.4. *Pull-down* protokol vidljiv je u tablici 3.5.

Tablica 3.4 Sastav pufera za *pull-down* pomoću histidinskog privjeska.

Pufer	<i>c</i> (Tris-HCl 8,0 @ 21 °C) / mmol dm ⁻³	<i>c</i> (NaCl) / mmol dm ⁻³	<i>c</i> (β- merkaptioetanol) / mmol dm ⁻³	<i>c</i> (imidazol) / mmol dm ⁻³	<i>c</i> (MgCl ₂) / mmol dm ⁻³	φ (glicerol) / %
A1	50	100	10**	10	10	/
A2*	50	500	10**	10	10	20
B1	50	100	10**	20	10	/
B2	50	100	10**	50	10	/
C	50	100	10**	200	10	/

*Služi samo za ekvibraciju HaArgRS2 kolone jer se on nalazi u različitim puferu od ostalih proteina.

**Ova komponenta smjese je potpuno izostavljena kod rada s TALON agarozom jer reducira kobalt (II) i onemogućava daljnji rad.

Tablica 3.5 Opći protokol *pull-down* kromatografije s HisTag privjeskom.

Redni broj koraka	Otopina	Inkubacija	Dodani volumen	Skupljanje
1.	Ultračista voda Milli-Q	Ne	4 CV	Ne
2.	Pufer A1 (A2*) (ekvilibracija)	Ne	4 CV	Ne
3.	Uzorak proteina-mamca	Da, 10 min uz jedno resuspendiranje smole	4 CV	Da
4.*	Pufer A1 (izmjena pufera)	Ne	4 CV	Da
5.	Proteinski ekstrakt <i>H. aurantiacus</i>	Da, 45 min uz dva resuspendiranja smole	4 CV	Da
6.	Pufer A1 (ispiranje)	Ne	4 CV	Da
7.	Pufer B1 (ispiranje)	Ne	4 CV	Da
8.	Pufer B2 (ispiranje)	Ne	4 CV	Da
9.	Pufer C (elucija)	Da, 10 min	2 × 0,5 CV	Da, zasebno
10.	Imidazol 2 mol/dm ³	Ne	4 CV	Ne
11.	Ultračista voda Milli-Q	Ne	2 × 4 CV	Ne
12.	Etanol 20%	Ne	3 × 4 CV	Ne

*Korišteno samo za kolonu s HaArgRS2.

Rezultati su analizirani SDS-PAGE elektroforezom opisanom u poglavlju 3.2.2.6, nakon čega su gelovi bojani srebrom po protokolu iz poglavlja 3.2.6.

3.2.5. Metoda supročišćavanja afinitetnom kromatografijom pomoću streptavidinskog privjeska

Metoda supročišćavanja afinitetnom kromatografijom (engl. *pull-down assay*) pomoću streptavidinskog privjeska logički je istovjetna onoj navedenoj u poglavlju 3.2.4., osim što se koristi drugačiji fuzijski privjesak imenovan StrepTagII (slijed aminokiselina: triptofanil-seril-histidil-prolil-glutaminil-fenilalanil-glutamil-lizin, WSHPQFEK) koji se imobilizira za StrepTactinTM smolu (*IBA Lifesciences*). Ta interakcija temeljena je na najjačoj poznatoj nekovalentnoj vezi u prirodi - vezi biotina i streptavidina. Sve *pull-down* metode izvođene su u Pierce Micro-Spin kolonama (*Thermo Fischer Scientific*) s volumenima kolone 25-50 μ L s centrifugiranjem pri $200 \times g$ i 4 °C. Korišteni puferi za *pull-down* bili su: pufer W (c (Tris-HCl 8.0 @ 21°C) = 150 mmol/dm³, c (NaCl) = 150 mmol/dm³, c (β -merkaptioetanol) = 5 mmol/dm³),

pufer E (c (Tris-HCl 8.0 @ 21°C) = 150 mmol/dm³, c (NaCl) = 150 mmol/dm³, c (destiobiotin) = 2,5 mmol/dm³) i pufer R (c (Tris-HCl 8.0 @ 21°C) = 150 mmol/dm³, c (NaCl) = 150 mmol/dm³, c (EDTA) = 1 mmol/dm³, c (HABA) = 1 mmol/dm³). *Pull-down* protokol vidljiv je u tablici 3.6. Korištena količina proteina-mamca bila je 50-300 µg.

Tablica 3.6 Opći protokol *pull-down* kromatografije sa StrepTagII privjeskom.

Redni broj koraka	Otopina	Inkubacija	Dodani volumen	Skupljanje
1.	Pufer W (ekvilibracija)	Ne	16-21 CV	Ne
2.	Uzorak proteina-mamca	Da, 30 min	Ovisno o koncentraciji pročišćenih proteina	Da
3.	Pufer W (ispiranje)	Ne	3 × 4 CV	Da, zasebno
4.	Proteinski ekstrakt <i>H. aurantiacus</i>	Da, 30-60 min	Ovisno o količini lizata	Da
5.	Pufer W (ispiranje)	Da, 1 min	4 × 5 CV	Da, zasebno
6.	Pufer E (elucija)	Ne	3 × 2 CV	Da, zasebno
7.	Pufer R (regeneracija kolone)	Ne	3 × 8 CV	Ne
8.	Pufer R	Ne	1 CV	Ne

Rezultati su analizirani SDS-PAGE elektroforezom opisanom u poglavlju 3.2.2.6, nakon čega su gelovi bojani srebrom po protokolu iz poglavlja 3.2.6.

3.2.6. Bojanje elektroforetskih gelova srebrom

Elektroforetski gelovi s uzorcima *pull-down* kromatografija bojani su srebrom jer je vrlo visoke osjetljivosti, što omogućava precizniju analizu rezultata. Korišten je komercijalni komplet SERVA Silver Staining Kit Native PAGE (*Serva*). Postupak je napravljen prema uputama proizvođača. Ukratko, proces se odvija u šest ključnih koraka. Prvi korak bio je fiksiranje gelova da se imobiliziraju proteini. Drugi korak bio je aktivacija gelova za treći korak bojanja srebrovim nitratom. Četvrti korak bio je razvijanje obojenosti, odnosno reakcija nastanka elementarnog srebra vezanog za proteine. Peti korak bio je zaustavljanje razvijanja te posljednji korak pospremanje gelova u otopinu za dugotrajno čuvanje. Između svih koraka su gelovi isprani ultračistom vodom.

3.2.7. Spektrometrija masa¹

3.2.7.1. Digestija proteina

Uzorke proteina za spektrometriju masa LC-MS/MS treba razgraditi do peptida da bi se mogli analizirati. Proteini su najprije precipitirani u TCA ($\varphi = 20\%$) uz inkubaciju na ledu 30 min. Uzorci su potom centrifugirani 45 min pri $20\,000 \times g$ i $4\text{ }^\circ\text{C}$ nakon čega im je uklonjen supernatant. Talog je ispran tripot s $500\ \mu\text{L}$ hladnog acetona uz centrifugiranje između svakog ispiranja 30 min pri $20\,000 \times g$ i $4\text{ }^\circ\text{C}$. Zaostalo otapalo je otpareno na termobloku 15 min pri $60\text{ }^\circ\text{C}$. Talози su otopljeni u denaturirajućem puferu za triptičku digestiju (c (ureja) = 6 mol/dm^3 , c (tioureja) = 2 mol/dm^3 , c (Tris) = 10 mmol/dm^3 , $\text{pH} = 8,0$), uz inkubaciju na sobnoj temperaturi 30 min i trešnju pri 800 rpm. Sljedeći korak bio je redukcija disulfidnih mostova DTT-om ($c = 5\text{ mmol/dm}^3$) uz inkubaciju na sobnoj temperaturi, 1 h i trešnju pri 800 rpm. Zatim je uslijedila alkilacija cisteinskih bočnih ogranaka uz jodoacetamid ($c = 16,5\text{ mmol/dm}^3$), uz inkubaciju na sobnoj temperaturi, 1 h i trešnju pri 800 rpm. U konačnici, za razgradnju proteina do peptida smjesa je razrijeđena s četiri volumena otopine amonijevog bikarbonata ($c = 20\text{ mmol/dm}^3$) te je dodan tripsin (proteaza koja cijepa peptidne veze proteina iza aminokiselina arginin i lizin) u omjeru $1\ \mu\text{g}$ tripsina: $50\ \mu\text{g}$ proteina, uz inkubaciju na sobnoj temperaturi i trešnju pri 800 rpm. Nakon 14-16 h je ponovno dodan tripsin u istom omjeru te je smjesa inkubirana 3-4 h na $37\text{ }^\circ\text{C}$ uz trešnju pri 800 rpm.

3.2.7.2. Pročišćavanje peptida dobivenih digestijom proteina

Prije analize LC-MS/MS-om, peptidima je potrebno izmijeniti. To je učinjeno pomoću ručno pripremljenih¹ *Stage-tips* (engl. *Stop-and-go tips*) koji sadrže C18 sloj koji služi kao stacionarna faza koja zadržava peptide tijekom izmjene pufera. C18 materijal se aktivira nanošenjem $100\ \mu\text{L}$ metanola te njegovim djelomičnim uklanjanjem centrifugiranjem 30 s pri $2000 \times g$. Važno je paziti da u ovom koraku ne presuši C18 materijal. U sljedećem koraku je dodano $200\ \mu\text{L}$ pufera A* (φ (ACN) = 2% , φ (FA) = 1%) te su *Stage-tips* centrifugirani 2 min pri $2000 \times g$. U otopine peptida dodano je TFA ($\varphi = 1\%$) nakon čega su smjese nanosene na *Stage-tips* te centrifugirane 2 min pri $2000 \times g$. Uzorci su isprani s $200\ \mu\text{L}$ pufera A (φ (mravlja kiselina) = $0,1\%$) te centrifugirani 2 min pri $2000 \times g$. Peptidi su eluirani s C18 materijala uz $50\ \mu\text{L}$ pufera B (φ (ACN) = 80% , φ (FA) = $0,1\%$). Smjesa je uparena na SpeedVac uređaju do ukupnog

¹ Priprema uzoraka za spektrometriju masa, spektrometrija masa i analiza sirovih podataka napravljena je pod budnim okom i uz veliku pomoć doc. dr. sc. Marka Močiboba.

volumena 5 μL , nakon čega je dodano 10 μL pufera A/A* (svježe pripremljenog od 90 % pufera A i 10 % pufera A*). Naposljetku su uzorci centrifugirani 1 h pri $16\,000 \times g$ i $4\text{ }^\circ\text{C}$ što je poslužilo uklanjanju nečistoća prije nanošenja u LC-MS/MS uređaj. Uzorci su injektirani na LC-MS/MS uređaj u volumenu od 3 μL .

3.2.7.3 Razdvajanje i analiza peptida pomoću LC-MS/MS uređaja

Prije analize spektrometrom masa peptide valja razdvojiti kromatografijom obrnutih faza. Peptidi su u smjesi pufera A/A* ($\varphi(\text{ACN}) = 0,2\%$, $\varphi(\text{FA}) = 0,2\%$) nanoseni na sustav EASY-nLCTM 1200 (*Thermo Fischer Scientific*) opremljen pretkolonom i analitičkom kolonom EASY_SprayTM (i. d. $75\ \mu\text{m} \times 15\ \text{cm}$, 3 μm čestice) koje sadrže C18 stacionarnu fazu za kromatografiju obrnutih faza. Peptidi su eluirani pri protoku od 200 nL/min uz linearni gradijent acetonitrila u 0,1 % mravljoj kiselini u trajanju od 60 min s acetonitrirom u 0,1 % mravlje kiseline. EASY-nLCTM sustav je spregnut s Q Exactive Plus spektrometrom masa (*Thermo Fischer Scientific*) s međuspojem za ionizaciju elektroraspršenjem (1,8 kV). Spektri su snimani u pozitivnom modu koristeći tehniku ovisnu o MS1 spektru (engl. *dependent data acquisition*, DDA). MS1 je sniman pri rezoluciji 70 000, a 12 iona najvećeg intenziteta podvrgnuto je fragmentaciji te ponovnoj analizi pri čemu su MS2 spektri snimani pri rezoluciji 17 500 uz dinamičko isključenje u trajanju 15 s.

3.2.7.4. Analiza dobivenih spektara masa

Podatci dobiveni spektrometrijom masa su obrađeni i analizirani pomoću programa Proteome Discoverer 2.4 (*Thermo Fischer Scientific*) sa Sequest HT pretražiteljem. Dobiveni podatci su pretraženi u bazi podataka proteina *H. aurantiacus* preuzetoj iz UniProt baze (izdanje 2023_05). Karbamidometilacija cisteina je definirana kao fiksna modifikacija, a nedostatak N-terminalnog metionina, odnosno njegova acetilacija ili oksidacija definirane su kao varijabilne modifikacije.

3.2.8. Predikcija molekulskih interakcija

Predikcije molekulskih interakcija između HaArgRS2 i potencijalnih interaktora izrađene su na AlphaFold 3 serveru (Abramson i sur., 2024) te su evaluirane prema dobivenim koeficijentima pouzdanosti pTM i ipTM. Koeficijent pTM govori o točnosti cijele predviđene strukture u odnosu na poznate baze podataka, dok ipTM govori o preciznosti predviđanja interakcija aminokiselina na samom sučelju interakcije. Generalno, uzima se da je predikcija vjerojatna ukoliko su vrijednosti pTM veće od 0,5, a vrijednosti ipTM veće od 0,8. Ukoliko je ipTM vrijednost između 0,6 i 0,8, kaže se da je vjerojatnost da je predikcija točna u „sivoj zoni“.

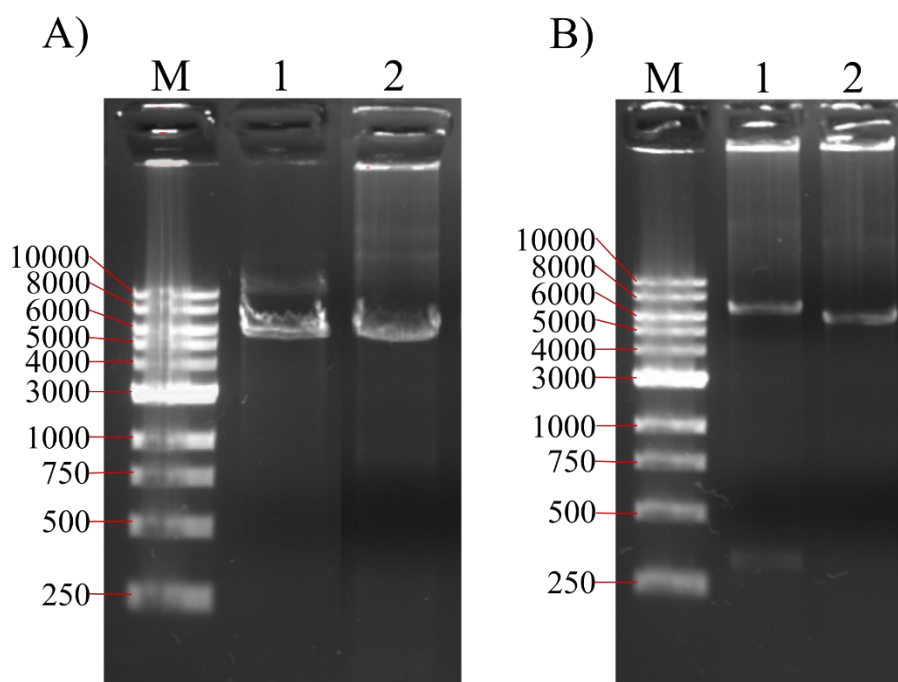
odnosno mogla bi biti ispravna, ali ne mora biti. Ova vrsta predikcija interakcija ne može zamijeniti eksperimentalno dobivene rezultate, ali ih može nadopuniti.

4. REZULTATI

4.1. Kloniranje streptavidinskog privjeska

Prvi korak u istraživanju interaktora atipične arginil-tRNA-sintetaze iz *H. aurantiacus* bila je priprema proteina: HaArgRS2, HaArgRS1 i EcIleRS. Protein HaArgRS1 je tipična arginil-tRNA-sintetaza (HVGH motiv) te je pripremljena radi usporedbe s atipičnom ArgRS (RVDH motiv), a protein EcIleRS pripremljen je da služi kao svojevrsna negativna kontrola. U laboratoriju Gruić već su postojali plazmidi pET28b s ukloniranim genima za EcIleRS, HaArgRS1 i HaArgRS2. Koristeći iste moguće je eksprimirati rekombinantne proteine s HisTag privjeskom (u ovom slučaju na N-kraju proteina) koji se dalje pročišćavaju Ni-NTA afinitetnom kromatografijom. S pročišćenim proteinima napravljen je *pull-down* pomoću HisTag privjeska. Uz to, napravljen je i *pull-down* pomoću StrepTagII privjeska zbog toga što isti ima veću specifičnost vezanja za kolonu i očekuje se manje nespecifično vezanih proteina. U tu svrhu bilo je potrebno uklonirati StrepTagII na 5' kraj gena, odnosno na N-kraj rekombinantnih proteina. Zadržan je i HisTag privjesak koristan za pročišćavanje proteina u velikim količinama Ni-NTA afinitetnom kromatografijom. Osim toga, postojanje dva fuzijska privjeska u rekombinantnim proteinima omogućava ortogonalno pročišćavanje dvjema afinitetnim kromatografijama što rezultira boljom čistoćom proteina. Navedeni privjesci nisu veliki te se ne očekuje da će ometati pravilno smatanje proteina. Da bi se StrepTagII uklonirao, napravljeno je PCR kloniranje s obzirom da se radi o relativno malom insertu. Korištene su početnice koje samo djelomično hibridiziraju s kalupom te nose insert koji kodira StrepTagII (vidi poglavlje 3.2.1.2.). Rezultati kloniranja analizirani su agaroznom gel-elektroforezom i prikazani su na slici 4.1.

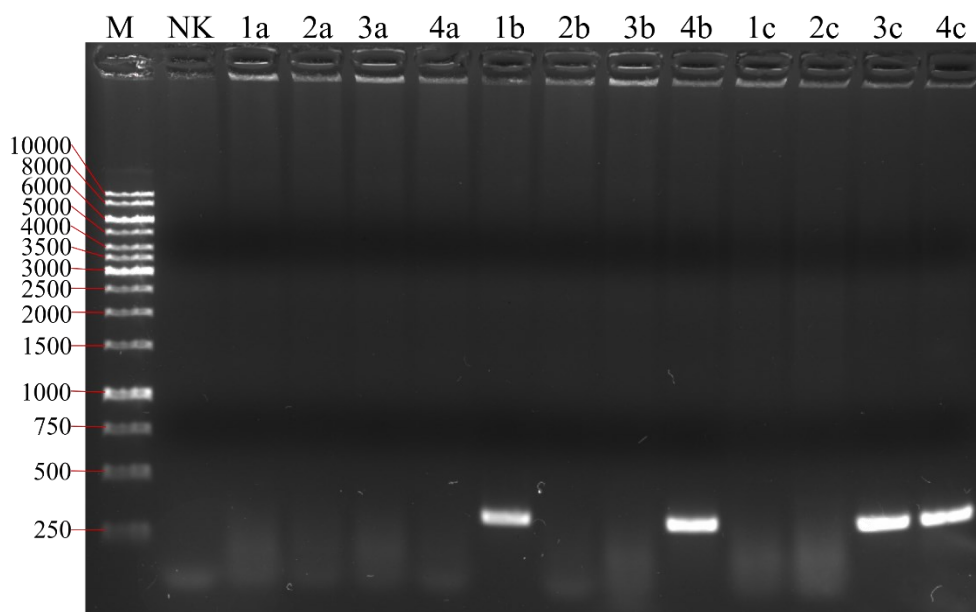
Na slici 4.1 pod A vidljiv je gel s rezultatima PCR kloniranja s plazmidom pET28b koji nosi gen za HaArgRS2. U jažici 1 nalazi se plazmid na kojem nije provedena PCR reakcija i služi kao pozitivna kontrola. U jažici 2 nalazi se uzorak reakcijske smjese PCR kloniranja. Obje vrpce su pri cca. 7000 pb, što je očekivana veličina za korišteni plazmid. Na slici 4.1 pod B vidljiv je gel s rezultatima PCR kloniranja s plazmidima pET28b koji nose gene za EcIleRS (jažica 1) i HaArgRS1 (jažica 2). Obje detektirane vrpce plazmida nalaze se pri cca. 7000 pb, ali vrpca u prvoj jažici je pozicionirana malo više od susjedne vrpce u drugoj jažici, što je očekivano jer je gen za EcIleRS dulji od gena za HaArgRS1.



Slika 4.1 Gel agarozne elektroforeze s uzorcima reakcijskih smjesa iz PCR kloniranja. **A)** gel s uzorcima PCR kloniranja provedenog na plazmidu pET28b s genom za HaArgRS2. U jažice je redom naneseo: **M** marker, **1** plazmid koji nije prošao PCR reakciju, služi kao pozitivna kontrola, **2** uzorak reakcijske smjese PCR kloniranja. **B)** gel s uzorcima PCR kloniranja provedenog na plazmidima pET28b s genima za HaArgRS1 i EcIleRS. U jažice je redom naneseo: **M** marker, **1** uzorak reakcijske smjese PCR kloniranja provednog s plazmidom pET28b s genom za EcIleRS, **2** uzorak reakcijske smjese PCR kloniranja provednog s plazmidom pET28b s genom za HaArgSR1.

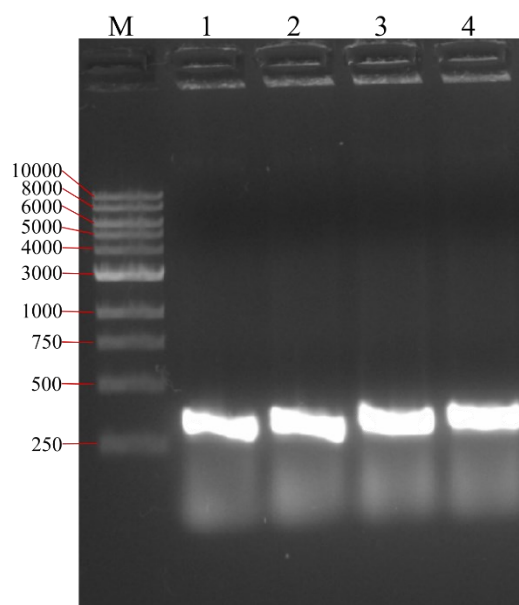
Bakterije su transformirane dobivenim plazmidom metodom elektroporacije (vidi poglavlje 3.2.1.5.) pa su metodom *colony PCR* pretražene narasle kolonije na podlozi s kanamicinom u potrazi za uspješno transformiranim bakterijama. Izostanak produkta znači da kloniranje nije bilo uspješno, a postojanje produkta veličine cca. 300 pb sugerira da je kloniranje vjerojatno bilo uspješno. Rezultati PCR reakcije su analizirani agaroznom elektroforezom (vidi poglavlje 3.2.1.4.), čiji su rezultati vidljivi na slikama 4.2 i 4.3.

Na slici 4.2 vidljiv je gel agarozne elektroforeze s uzorcima reakcijskih smjesa *colony PCR*. Očigledno je da su jažice s uzorcima reakcijskih smjesa PCR napravljenih za kolonije bakterija transformirane plazmidom s EcIleRS genom prazne (jažice 1a-4a), odnosno nije uspio jedan od prethodnih koraka: kloniranje, transformacija ili *colony PCR*. U jažicama s uzorcima reakcijskih smjesa PCR napravljenih za kolonije bakterija transformirane plazmidima s genima za HaArgRS1 (jažice 1b-4b) i HaArgRS2 (jažice 1c-4c) vidljivo je da postoje po dvije vrpce očekivane veličine od oko 300 pb. Iz toga slijedi zaključak da postoje po dvije kolonije za svaki od ta dva gena gdje je vjerojatno uspješno ukloniran StrepTagII.



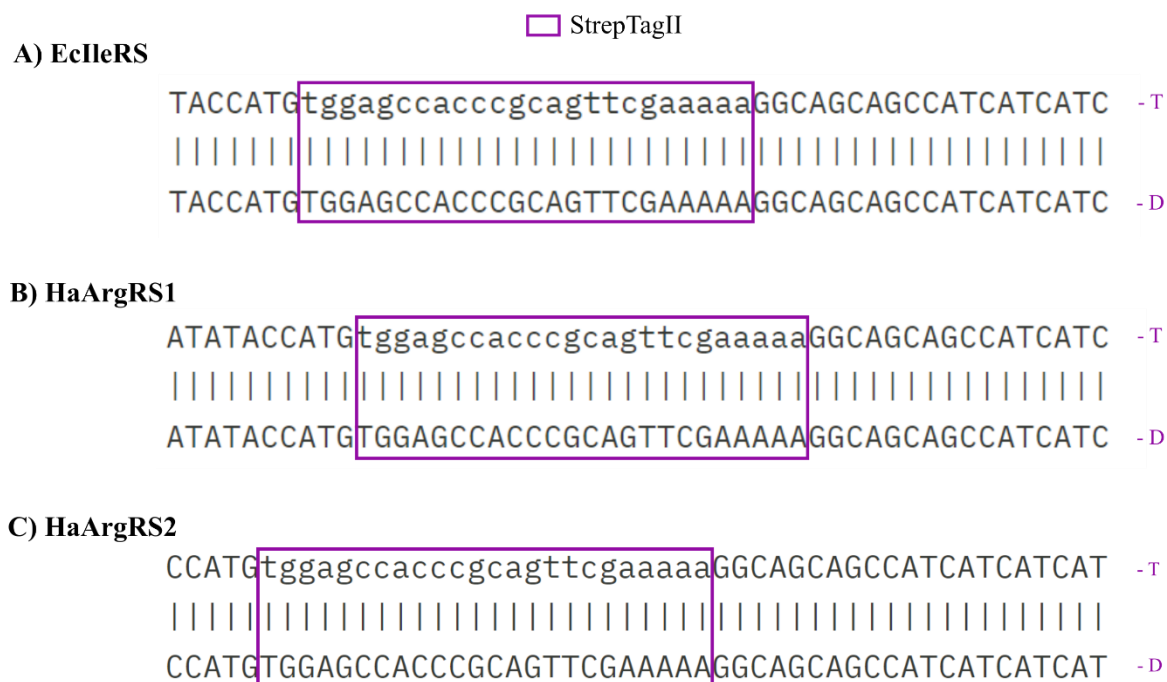
Slika 4.2 Gel agarozne elektroforeze s uzorcima reakcijskih smjesa s *colony PCR*-a. **M** – marker, **NK** – negativna kontrola bez dodane DNA u PCR smjesu, **1a-4a** – kolonije 1-4 transformirane plazmidom s genom za *EcIleRS*, **1b-4b** – kolonije 1-4 transformirane plazmidom s genom za *HaArgRS1*, **1c-4c** – kolonije transformirane plazmidom s genom za *HaArgRS2*. Brojčane oznake veličina navedene su u parovima baza (pb).

Colony PCR bio je ponovljen za plazmid s *EcIleRS* genom te su sve četiri novoodabrane kolonije bile pozitivni, što je prikazano na slici 4.3.



Slika 4.3 Gel agarozne elektroforeze s uzorcima reakcijskih smjesa s *colony PCR*-a. **M** – marker, **1-4** – kolonije 5-8 transformirane plazmidom s genom za *EcIleRS*. Korišteni marker bio je GeneRuler 1kb DNA Ladder (*Thermo Fischer Scientific*) te su brojčane oznake veličina navedene u parovima baza (pb).

Nadalje, potrebno je s maksimalnom sigurnošću potvrditi da je kloniranje uspješno što je učinjeno Sangerovim sekvenciranjem. Ono je napravljeno za cijele gene rekombinantnih proteina od interesa, da se potvrdi da tijekom kloniranja nisu unesene nikakve mutacije. Rezultati su bili zadovoljavajući u sva tri slučaja. Na slici 4.4 prikazano je da je StrepTagII svugdje ispravno ukloniran.

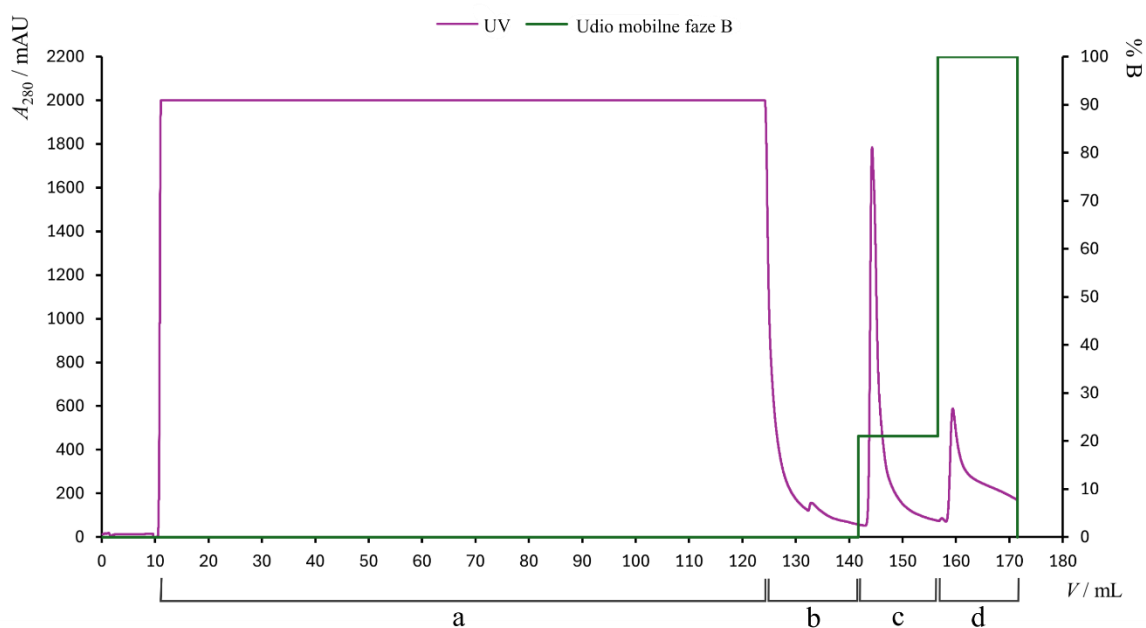


Slika 4.4 Sravnjene teorijski očekivane sekvence (označene slovom T zdesna) plazmida s ukloniranim StrepTagII privjeskom s dobivenim sekvencama Sangerovim sekvenciranjem (označene slovom D zdesna). Ljubičasto je zaokružen slijed što kodira StrepTagII. **A)** plazmid s ukloniranim genom za EcIleRS, **B)** plazmid s ukloniranim genom za HaArgRS1, **C)** plazmid s ukloniranim genom za HaArgRS2. Sravnjeno u EMBOSS Needle algoritmu: https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/psa/emboss_needle

4.2. Proizvodnja i pročišćavanje proteina

Proteini EcIleRS i HaArgRS1 koji imaju samo HisTag (His-EcIleRS, His-HaArgRS1), a korišteni su kao proteini-mamci u *pull-down* metodi na Ni-NTA koloni, bili su prethodno pripremljeni u laboratoriju Gruić. HaArgRS2 rekombinantni protein s HisTag privjeskom (His-HaArgRS2) i sva tri rekombinantna proteina sa StrepTagII i HisTag privjescima (Strep-His-EcIleRS, Strep-His-HaArgRS1, Strep-His-HaArgRS2) uzgojeni su i prekomjerno eksprimirani u *E. coli* (vidi poglavlje 3.2.2.1.) i potom izolirani iz bakterijskih stanica (vidi poglavlje 3.2.2.2.). Naposljetku su pročišćeni afinitetnom kromatografijom iz ukupnog proteinskog ekstrakta (vidi poglavlje 3.2.2.3.). Reprezentativni kromatogram pročišćavanja Strep-His-

HaArgRS2 prikazan je na slici 4.5 te je na njegovom primjeru pokazan tijek afinitetne kromatografije koji je bio istovjetan kod sva četiri pročišćavanja.

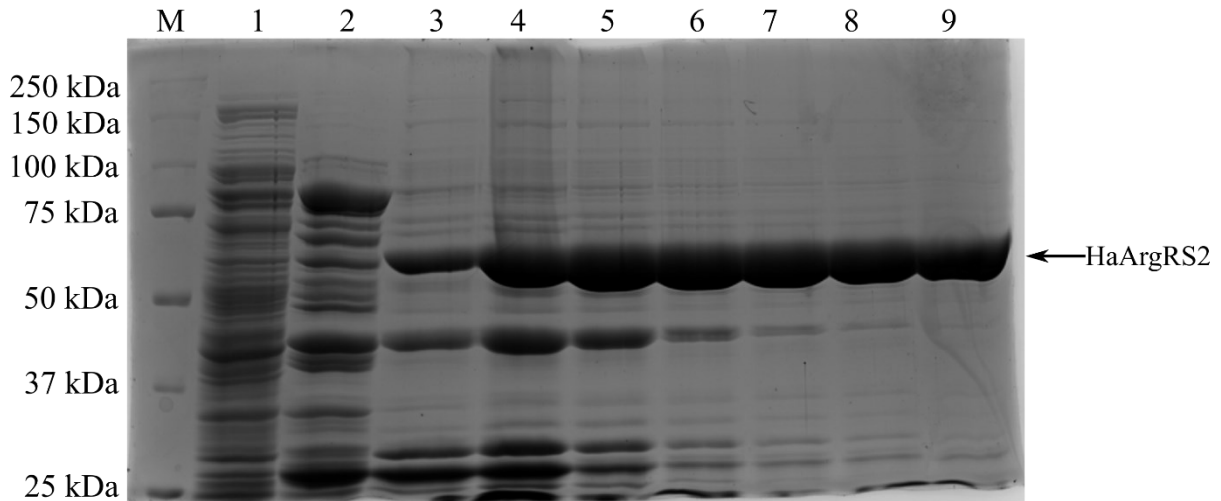


Slika 4.5 Kromatogram pročišćavanja Strep-His-HaArgRS2 rekombinantnog proteina afinitetnom kromatografijom. Označene su faze procesa kromatografije: **a)** nanošenje proteinskog ekstrakta, **b)** ispiranje mobilnom fazom A ($c(\text{imidazol}) = 10 \text{ mmol/dm}^3$), **c)** ispiranje mješavinom mobilnih faza A i B ($c(\text{imidazol}) = 70 \text{ mmol/dm}^3$), **d)** elucija mobilnom fazom B ($c(\text{imidazol}) = 300 \text{ mmol/dm}^3$).

Tijekom nanošenja uzorka na kolonu, vidljiva je široka vrpca visoke apsorbancije (slika 4.4, dio a) koja predstavlja velik broj različitih proteina sadržanih u nanesenom uzorku, odnosno proteinskom ekstraktu, koji se ne vežu na kolonu. Apsorbancija naglo pada nakon što je zaostali proteinski ekstrakt izašao s kolone pri ispiranju mobilnom fazom A ($c(\text{imidazol}) = 10 \text{ mmol/dm}^3$). Pri toj koncentraciji imidazola ne dolazi do ispiranja ni specifično ni nespecifično vezanih proteina s kolone. Pri ispiranju s mješavinom mobilnih faza A i B ($c(\text{imidazol}) = 70 \text{ mmol/dm}^3$) pojavila se jasna vrpca koja predstavlja nespecifično vezane proteine što indicira da su se isprali s kolone. U idealnom slučaju ispiru se isključivo nespecifično vezani proteini, ali u stvarnosti je vjerojatno ispran i određen udio specifično vezanih proteina s kolone. U fazi elucije mobilnom fazom B ($c(\text{imidazol}) = 300 \text{ mmol/dm}^3$) se ponovno pojavljuje jasna vrpca, ali se ovaj put očekuje da su u velikom udjelu isprani specifično vezani proteini s kolone. Uspješnost pročišćavanja provjerava se SDS-PAGE analizom (3.2.2.6.).

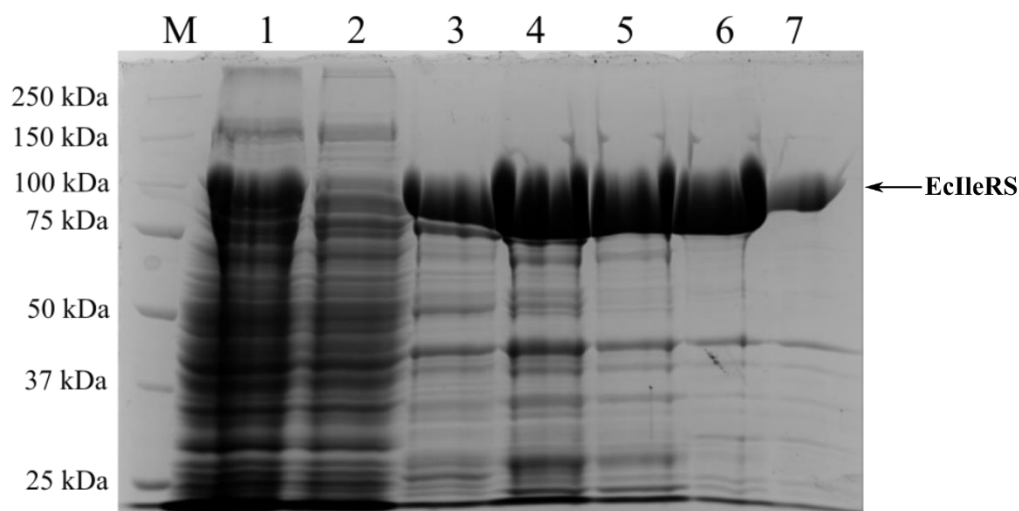
Na slici 4.6 prikazan je SDS-PAGE gel s uzorcima frakcija jednog od pročišćavanja Strep-His-HaArgRS2. Ostala pročišćavanja dala su gotovo jednake rezultate, stoga nisu prikazana. Iz gela je vidljivo da u nevezanoj frakciji (jažica 1) ima mnogo vrpca staničnih

proteina koji se nisu vezali za kolonu. Pri ispiranju mješavinom mobilnih faza A i B (c (imidazol) = 70 mmol/dm³) vidljivo je relativno puno vrpce ispranih nespecifično vezanih proteina s relativno malo HaArgRS2 (pri cca. 64 kDa), što je zadovoljavajuće. U sljedećih sedam jažica su uzastopne frakcije elucije mobilnom fazom B (c (imidazol) = 300 mmol/dm³) gdje je vidljiv dobar prinos HaArgRS2 s određenim nespecifično vezanim nečistoćama. Kasnije sakupljene frakcije čišće su od prethodnih, a prinos je svugdje podjednak.



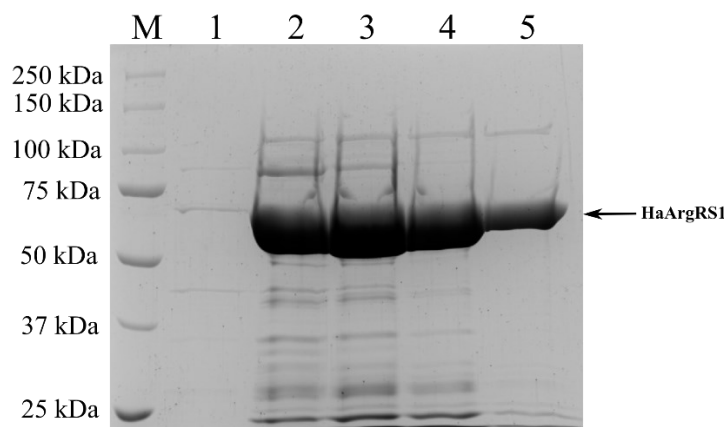
Slika 4.6 SDS-PAGE gel bojan Coomassie Brilliant Blue bojom s uzorcima pročišćavanja Strep-His-HaArgRS2 afinitetnom kromatografijom. Strelicom je naznačen pročišćavani protein. U jažice je redom nanoseno: **M** marker, **1** nevezana frakcija, **2** ispiranje mobilnom fazom A sa 70 mmol/dm³ imidazola, **3-9** uzastopne frakcije elucije mobilnom fazom B s 300 mmol/dm³ imidazola.

Na slici 4.7 prikazan je SDS-PAGE gel s uzorcima frakcija pročišćavanja Strep-His-EcIleRS. Iz gela je vidljivo da u proteinskom ekstraktu (jažica 1) ima mnoštvo staničnih proteina te se zasićenošću vrpce ističe sama EcIleRS (pri cca. 104 kDa). U nevezanoj frakciji je također uočljivo mnoštvo proteinskih vrpca, ali nema značajno puno EcIleRS, što je dobra vijest. Sljedeće tri jažice predstavljaju uzorke ispiranja mješavinom mobilnih faza A i B (c (imidazol) = 70 mmol/dm³). U njima je vidljivo puno EcIleRS i relativno puno nespecifično vezanih proteina koji se ispiru s kolone. Velika količina isprane EcIleRS vjerojatno je djelomično uzrokovana prezasićenjem kolone. U posljednje dvije jažice nalaze se frakcije s eluiranim EcIleRS iz kojih je očigledno da je protein uspješno izoliran te je visoke čistoće.



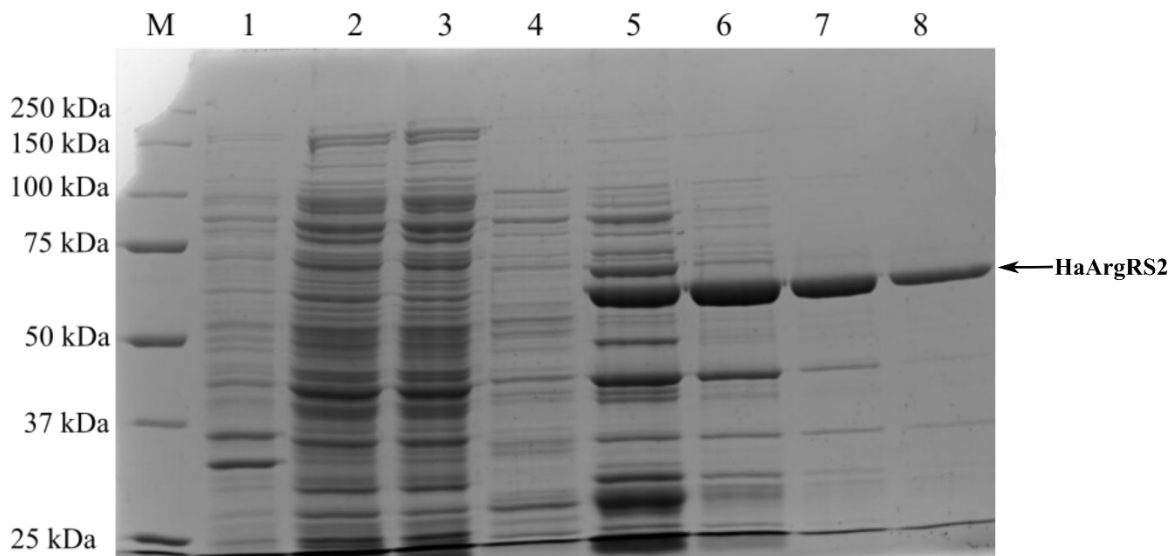
Slika 4.7 SDS-PAGE gel bojan Coomassie Brilliant Blue bojom s uzorcima pročišćavanja Strep-His-EcIleRS afinitetnom kromatografijom. Strelicom je naznačen pročišćavani protein. U jažice je redom nanoseno: **M** marker, **1** proteinski ekstrakt, **2** nevezana frakcija, **3-5** ispiranje mješavinom mobilnih faza A i B sa 70 mmol/dm³ imidazola, **6 i 7** frakcije elucije mobilnom fazom B s 300 mmol/dm³ imidazola.

Na slici 4.8 prikazan je SDS-PAGE gel drugog od dva uzastopna pročišćavanja Strep-His-HaArgRS1. Napravljena su dva pročišćavanja jer je HaArgRS1 većinski isprana s kolone u ispiranju mješavinom mobilnih faza A i B ($c(\text{imidazol}) = 70 \text{ mmol/dm}^3$) s još mnoštvom nespecifično vezanih proteina. Zato je cilj bio dobiti HaArgRS1 bolje pročišćenu u koraku elucije ponovljenog pročišćavanja. Iz gela je vidljivo da u nevezanoj frakciji nema gotovo nikakvih vidljivih vrpca, što nije neobično u slučaju dvije uzastopne afinitetne kromatografije. U sljedeće tri jažice s uzorcima frakcija ispiranja mješavinom mobilnih faza A i B ($c(\text{imidazol}) = 70 \text{ mmol/dm}^3$) vidljivo je da se ponovno mnogo HaArgRS1 ispralo zajedno s relativno malo nespecifično vezanih proteina. U zadnjoj jažici s uzorkom spojenih frakcija elucije mobilnom fazom B ($c(\text{imidazol}) = 300 \text{ mmol/dm}^3$) protein od interesa je vrlo čist, ali ga nema toliko kao u prethodnom koraku ispiranja. Međutim, unatoč poteškoćama tijekom ovog pročišćavanja, vidljivo je da je sve u svemu proteina mnogo i relativno je čist u zadnje četiri jažice, stoga su uzorci spojeni i korišteni u daljnjim eksperimentima.



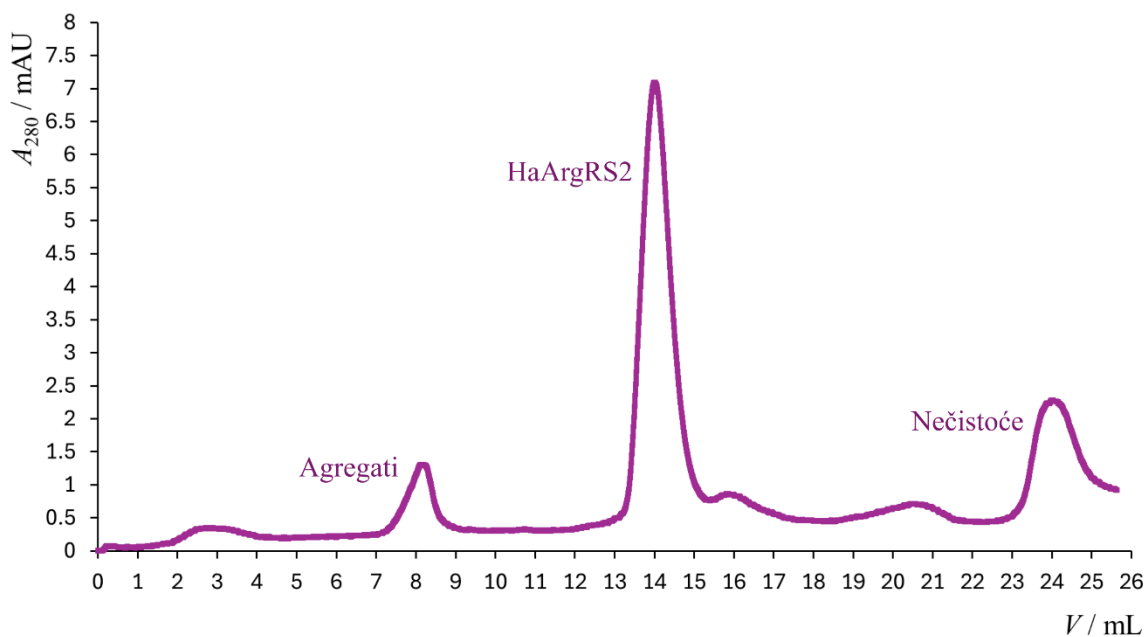
Slika 4.8 SDS-PAGE gel bojan Coomassie Brilliant Blue bojom s uzorcima pročišćavanja Strep-His-HaArgRS1 afinitetnom kromatografijom. Strelicom je naznačen pročišćavani protein. U jažice je redom nanoseno: **M** marker, **1** nevezana frakcija **2-4** ispiranje mješavinom mobilnih faza A i B sa 70 mmol/dm³ imidazola, **5** spojene frakcije elucije mobilnom fazom B s 300 mmol/dm³ imidazola.

Na slici 4.9 prikazan je SDS-PAGE gel s uzorcima frakcija jednog od pročišćavanja His-HaArgRS2. Ostala pročišćavanja dala su gotovo jednake rezultate, stoga nisu prikazana. Iz gela je vidljivo da u talogu netopljivih staničnih komponenti nije zaostala velika količina staničnih proteina (jažica 1), dok ih je u topljivom proteinskom ekstraktu uočljivo puno (jažica 2). Pri ispiranju mobilnom fazom A ($c(\text{imidazol}) = 10 \text{ mmol/dm}^3$) uočljivo je da ima mnogo različitih vrpci proteina koji se nisu vezali za kolonu (jažica 3). Pri ispiranju mješavinom mobilnih faza A i B ($c(\text{imidazol}) = 50 \text{ mmol/dm}^3$) ispire se dio nespecifično vezanih proteina, a ne uočava se ispiranje His-HaArgRS2 (pri cca. 64 kDa), što je povoljno (jažica 4). U zadnje četiri jažice vidljive su uzastopne frakcije elucije mobilnom fazom B ($c(\text{imidazol}) = 200 \text{ mmol/dm}^3$) te se razlikuju u čistoći. U prvoj je velik prinos HaArgRS2, ali je mnogo nespecifično vezanih proteina. U sljedećim je jažicama protein od interesa bolje čistoće i sličnog prinosa što je povoljnije.



Slika 4.9 SDS-PAGE gel bojan Coomassie Brilliant Blue bojom s uzorcima pročišćavanja His-HaArgRS2 afinitetnom kromatografijom. Strelicom je naznačen pročišćavani protein. U jažice je redom nanoseno: **M** marker, **1** talog netopljivih staničnih komponenti, **2** proteinski ekstrakt, **3** ispiranje mobilnom fazom A s 10 mmol/dm³ imidazola, **4** ispiranje mješavinom mobilnih faza A i B s 50 mmol/dm³ imidazola, **5-8** uzastopne frakcije elucije mobilnom fazom B s 200 mmol/dm³ imidazola.

Pokazalo se da je prekomjerno eksprimirana HaArgRS2 prilično nestabilna i sklona agregiranju, što uzrokuje značajne gubitke pročišćenog proteina. Da bi se provjerio udio monomera frakcije elucija s afinitetnih pročišćavanja su podvrgnute analitičkoj gel-filtracijskoj kromatografiji (vidi poglavlje 3.2.2.4). Pomoću ove metode razdvojeni su agregati od monomera na temelju veličine. EcIleRS i HaArgRS1 su bile stabilne što su potvrdili kromatogrami njihovih gel-filtracijskih kromatografija. Na slici 4.10 prikazan je kromatogram jedne od gel-filtracijskih kromatografija HaArgRS2 gdje je uočljivo da je uspješno pročišćena s relativno malim udjelom agregata (udio agregata određen je na svega 10 %), stoga je korištena u daljnjim istraživanjima.

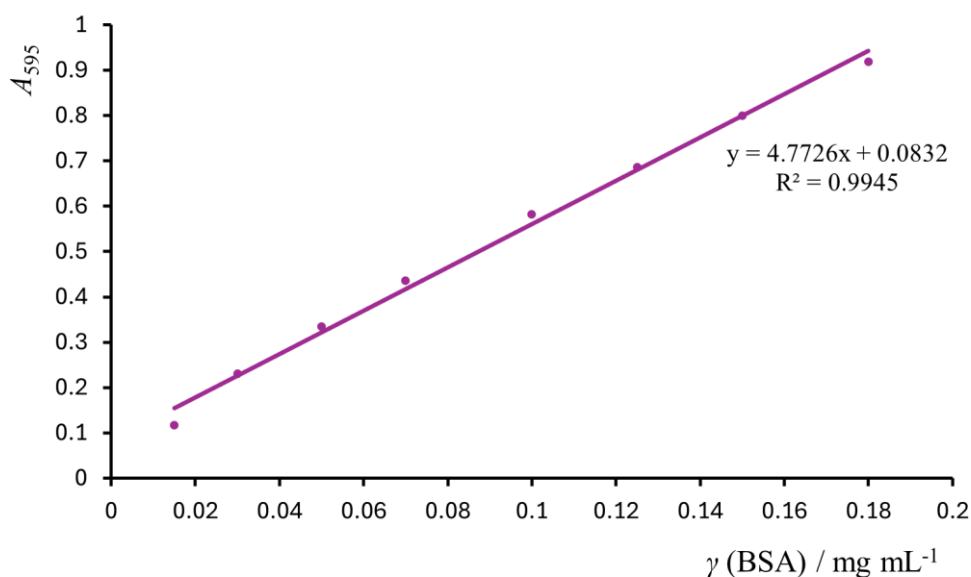


Slika 4.10 Kromatogram analitičke gel-filtracijske kromatografije uzorka elucije afinitetnog pročišćavanja HaArgRS2. Izvedeno na koloni Superdex 200 Increase 10/300 (*Cytiva*). Naznačeni su vrhunci apsorpcije pripadni agregatima i monomerima HaArgRS2 te nečistoćama od malih molekula iz citosola.

Metodom po Bradfordu (vidi poglavlje 3.2.2.5.) određene su koncentracije svim pročišćavanim proteinima te su prikazane u tablici 4.1. U tu svrhu izrađen je baždarni pravac dobiven mjerenjem apsorbancije pri 595 nm različitih koncentracija BSA (slika 4.11).

Tablica 4.1 Masene koncentracije proteina pročišćenih afinitetnom kromatografijom izmjerene metodom po Bradfordu.

Enzim	$\gamma / \text{mg mL}^{-1}$
His-HaArgRS2	0,28
Strep-His-EcIleRS	0,97
Strep-His-HaArgRS1	1,48
Strep-His-HaArgRS2	1,67



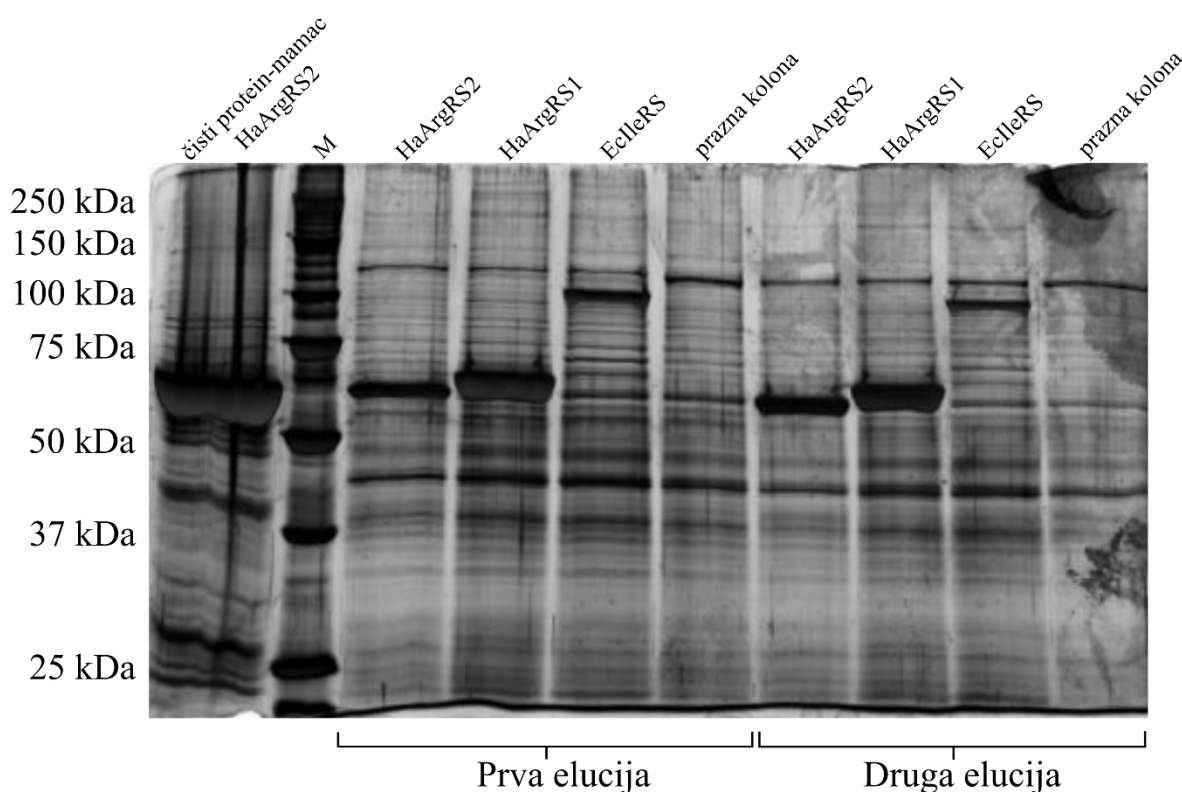
Slika 4.11 Baždarni pravac za određivanje koncentracije pročišćenih proteina metodom po Bradfordu.

4.3. Metoda supročišćavanja afinitetnom kromatografijom pomoću histidinskog privjeska

Pull-down metoda pomoću histidinskog privjeska napravljen je s ciljem traženja proteinskih interaktora atipične arginil-tRNA-sintetaze iz *H. aurantiacus* prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.4. Napravljeni su tri *pull-downa* s proteinima-mamcima pročišćenima afinitetnom kromatografijom (3.2.2.3.): HaArgRS2, HaArgRS1 i EcIleRS te jedan s praznom kolonom. *Pull-down* s HaArgRS2 je onaj u kojem je cilj pronaći interaktore, dok ostala tri služe kao kontrole: prazna kolona služi kao negativna kontrola, EcIleRS također služi kao svojevrsna negativna kontrola, a HaArgRS1 je korištena radi usporedbe s atipičnom HaArgRS2. Kao plijen je korišten proteinski ekstrakt *H. aurantiacus* dobiven sonikacijom (3.2.3.) u kojem se očekuju interaktori. Rezultati su analizirani SDS-PAGE metodom (vidi poglavlje 3.2.2.6.), a dobiveni gelovi bojani srebrom (vidi poglavlje 3.2.6.). Rezultati reprezentativnog *pull-downa* izvedenog na TALON agarozu vidljivi su na slici 4.12.

Na gel je u prvu jažicu nanesen uzorak HaArgRS2 pročišćene afinitetnom kromatografijom. To služi kao kontrola jer su vrpce proteina u tom uzorku (koje ne odgovaraju pročišćenoj HaArgRS2) proteini iz ekspresijskog soja *E. coli*. Neki od njih se potencijalno vežu s proteinom od interesa ili za kolonu i zato ih se može očekivati u uzorcima s *pull-downa*, a oni nikako ne mogu biti traženi biološki relevantni interaktori jer nisu iz *H. aurantiacus* proteoma. Elucija proteina s kolone izvođena je u tri istovjetna koraka kako bi se povećala osjetljivost i razlučivost kromatografije. U jažicama prve elucije (redom: HaArgRS2, HaArgRS1, EcIleRS i

prazna kolona) vidljive su najjače vrpce pripadnog proteina-mamac (obje ArgRS pri cca. 64 kDa, a IleRS pri cca. 104 kDa), osim u praznoj koloni, te mnoštvo vrpce što se pojavljuju u svim jažicama. Situacija je istovjetna i u drugoj eluciji. Nisu uočljive nikakve specifične vrpce koje se pojavljuju samo u jažicama elucija s HaArgRS2 kolone, odnosno nisu detektirani interaktori.



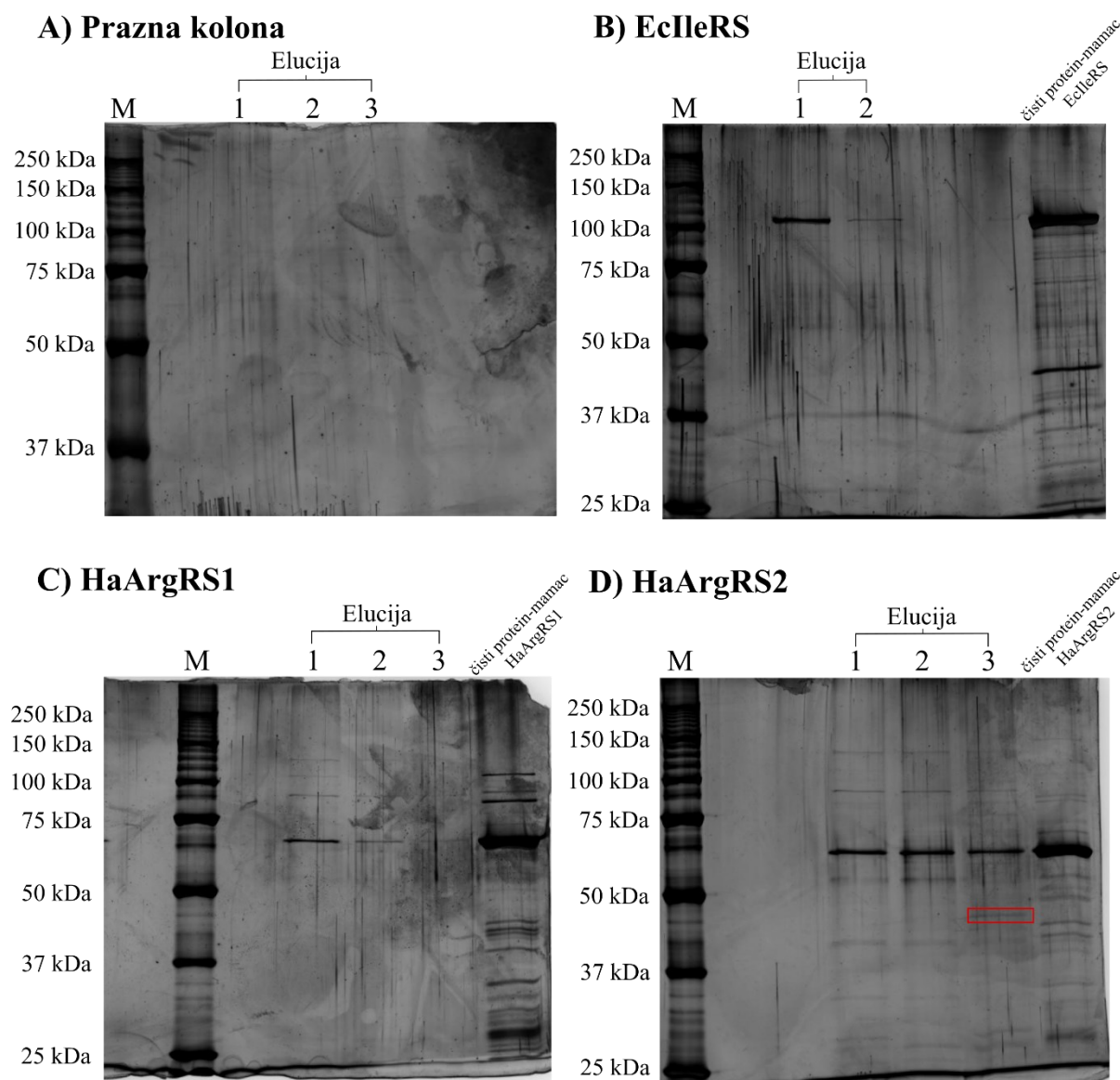
Slika 4.12 SDS-PAGE gel bojan srebrom s uzorcima *pull-down* pomoću HisTag na TALON agarozu. Naznačeni su uzorci dvaju elucija nanešeni u jažice (M označava marker veličina).

Iz gela je bjelodano da je supročišćena prevelika količina nespecifično vezanih proteina što je problem jer je zbog gustoće vrpce lako previdjeti ili izgubiti signal potencijalnog interaktora. Za StrepTactin™ smolu se veže mnogo manje nespecifičnih proteina u odnosu na Ni-NTA i TALON agarozu. Zbog toga je odlučeno koncentrirati se na *pull-down* metodu pomoću StrepTagII. U tom slučaju je očekivano da će potencijalni interaktori biti jednoznačno istaknuti.

4.4. Metoda supročišćavanja afinitetnom kromatografijom pomoću streptavidinskog privjeska

Pull-down metoda pomoću StrepTagII napravljen je s ciljem traženja proteinskih interaktora atipične arginil-tRNA-sintetaze *H. aurantiacus* prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.5. Analogno postupku u prethodnom poglavlju napravljena su tri *pull-down* s proteinima-

mamcima pročišćenima afinitetnom kromatografijom (3.2.2.3.): HaArgRS2, HaArgRS1 i EcIleRS te jedan s praznom kolonom. Korišten je proteinski ekstrakt *H. aurantiacus* dobiven sonikacijom (3.2.3.), u kojem se očekuju interaktori. Rezultati su analizirani SDS-PAGE metodom (vidi poglavlje 3.2.2.6.), a dobiveni gelovi bojani srebrom (vidi poglavlje 3.2.6.). Rezultati dvaju istovjetnih *pull-down* metoda pomoću StrepTagII na kojima su vidljivi potencijalni interaktori HaArgRS2 proteina prikazani su na slikama 4.13 i 4.14.

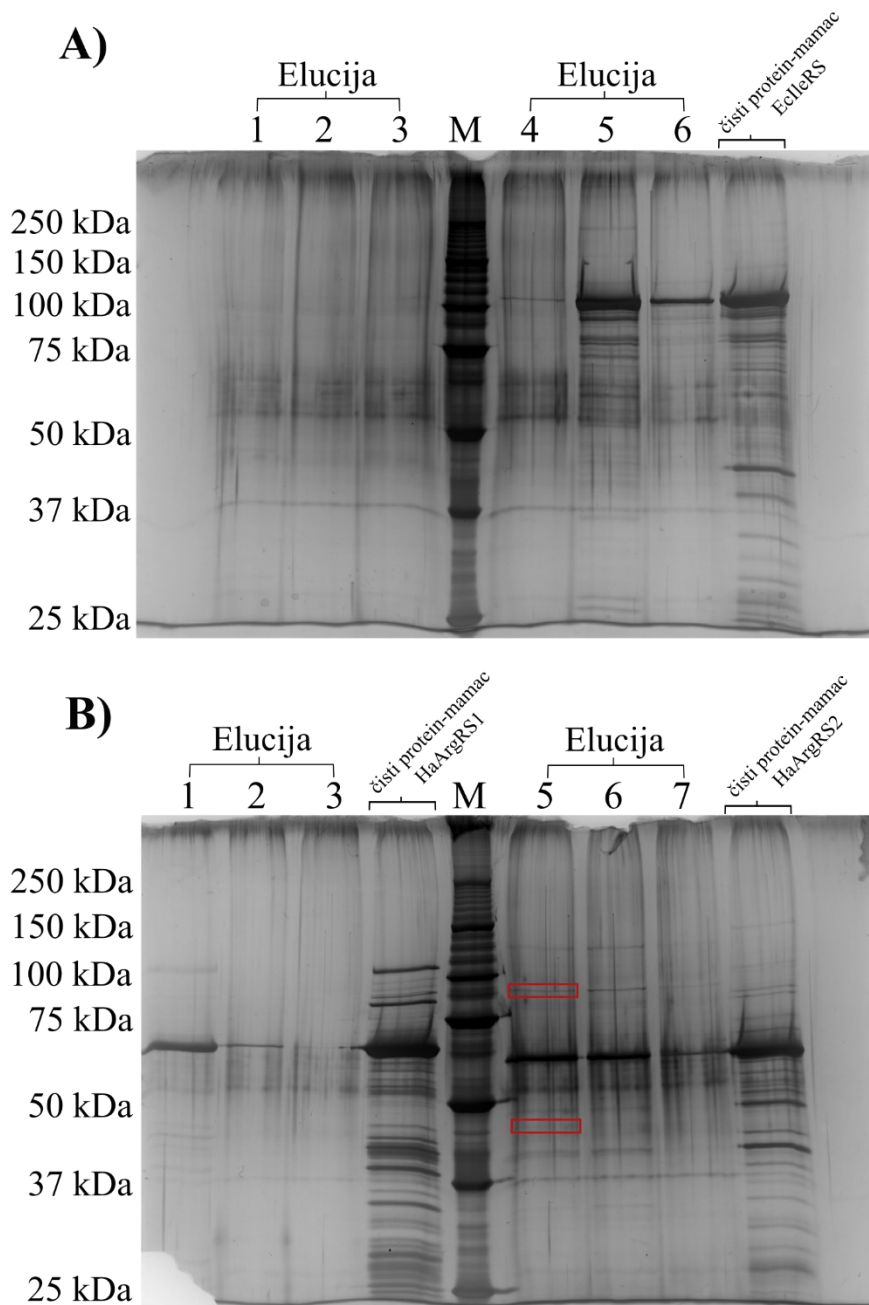


Slika 4.13 SDS-PAGE gelovi bojani srebrom s uzorcima *pull-downa* pomoću StrepTagII. **A)** uzorci s prazne kolone: **M** marker, **1-3** tri uzastopne elucije puferom E; **B)** uzorci s EcIleRS kolone: **M** marker, **1-2** dvije uzastopne elucije puferom E i uzorak EcIleRS pročišćene afinitetnom kromatografijom; **C)** uzorci s HaArgRS1 kolone: **M** marker, **1-3** tri uzastopne elucije puferom E i uzorak HaArgRS1 pročišćene afinitetnom kromatografijom; **D)** uzorci s HaArgRS2 kolone: **M** marker, **1-3** tri uzastopne elucije puferom E i uzorak HaArgRS2 pročišćene afinitetnom kromatografijom. Crveno je zaokružena vrpca potencijalnog proteinskog interaktora.

Na slici 4.13 prikazani su rezultati prvog *pull-down* eksperimenta. Vidljiva su četiri gela - po jedan za svaku provedenu afinitetnu kromatografiju supročišćavanja, s istim rasporedom jažica. U jažicama elucija puferom E (napravljena u tri obroka) je najjače istaknut protein-mamac, što je očekivano. U zadnjim jažicama nanieseni su uzorci proteina-mamaca pročišćenih afinitetnom kromatografijom (osim u gelu pod A jer su na njemu uzorci *pull-downa* s praznom kolonom). Služe kao kontrole jer u njima sve vrpce (osim vrpce dotične aaRS)

predstavljaju proteine iz proteoma *E. coli* u kojoj su prekomjerno eksprimirani proteini od interesa. Zato sve vrpce koje se pojavljuju u njima ne mogu biti smatrane biološki relevantnim interaktorima proteina od interesa. Usporedbom elucija na gelu pod D s elucijama na kontrolnim gelovima (pod A, B i C) uočljiva je jedna vrpca (zaokružena crveno, pri cca. 45 kDa) koja se ne pojavljuje ni na jednom kontrolnom gelu te se pojavljuje samo u uzorku treće elucije HaArgRS2 s kolone. Ta vrpca predstavlja potencijalni protein-interaktor HaArgRS2.

Eksperiment je ponovljen na isti način, a rezultati su prikazani na slici 4.14. Vidljiva su dva gela s uzorcima četiri provedene afinitetne kromatografije supročišćavanja proteina. Na gelu pod A nanoseni su uzorci elucija puferom E s prazne kolone (prve tri jažice) i EcIleRS kolone (jažice 4-6). Na gelu pod B nanoseni su uzorci elucija puferom E s HaArgRS1 kolone (prve tri jažice) i HaArgRS2 kolone (jažice 4-6). Od svakog pročišćavanja nanosene su tri uzastopne frakcije elucije i jedan uzorak proteina-mamca pročišćenog afinitetnom kromatografijom. Usporedbom elucija HaArgRS2 s elucijama ostale tri kolone uočene su dvije vrpce koje se pojavljuju samo u tom supročišćavanju (crveno zaokružene, pri cca. 90 kDa i 45 kDa), stoga su potencijalni interaktori HaArgRS2.



Slika 4.14 SDS-PAGE gelovi gelovi bojani srebrom s uzorcima *pull-downa* pomoću StrepTagII. **A)** gel s uzorcima: **1-3** tri uzastopne frakcije elucije puferom E s prazne kolone, **M** marker, **4-6** tri uzastopne frakcije elucije puferom E s EclleRS kolone, uzorak EclleRS pročišćene afinitetnom kromatografijom; **B)** gel s uzorcima: **1-3** tri uzastopne frakcije elucije puferom E s HaArgRS1 kolone, uzorak HaArgRS1 pročišćene afinitetnom kromatografijom, **M** marker, **5-7** tri uzastopne frakcije elucije puferom E s HaArgRS2 kolone, uzorak HaArgRS2 pročišćene afinitetnom kromatografijom. Crveno su zaokružene vrpce potencijalnih proteinskih interaktora koje se pojavljuju u sve tri frakcije elucije HaArgRS2, ali su zaokružene samo u prvoj jažici radi preglednosti.

U dva ponovljena pokusa pojavljuju se potencijalni interaktori pri cca. 45 kDa, stoga je valjano pretpostaviti da je to jedan te isti interaktor. U prvom eksperimentu pojavljuje se samo

u trećoj eluciji, a u drugom eksperimentu u sve tri što je vjerojatno uzrokovano tehničkom pogreškom pri izvođenju jednog od pokusa. Pojavljuje se još jedan pri cca. 90 kDa, samo u drugom pokusu. S obzirom na to da ovaj pokus ne daje podatke o vrsti i količini proteina, bilo je potrebno provesti spektrometriju masa da se dozna koji se točno proteini kriju iza ovih pronađenih vrpca.

4.5. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa izvedena je na uzorcima elucija dobivenih metodom *pull-down* pomoću StrepTagII (vidi poglavlje 3.2.5.). Proteini su najprije precipitirani, denaturirani te razgrađeni tripsinom u smjesu peptida (vidi poglavlje 3.2.7.1.). Peptidi su odsoljeni i pripremljeni za nanošenje na LC-MS/MS uređaj (vidi poglavlje 3.2.7.2.), gdje su najprije razdvojeni kromatografijom obrnutih faza pa elektroraspršeni u spektrometar masa (vidi poglavlje 3.2.7.3.). Dobiveni spektri masa su obrađeni u programu Proteome Discoverer 2.4 (*Thermo Fischer Scientific*) te su peptidne sekvence pretražene u proteomu *H. aurantiacus* (vidi poglavlje 3.2.7.4.). Dobiveni rezultati su interpretirani istom logikom kao u prethodna dva poglavlja: među proteinima detektiranim u eluciji s HaArgRS2 kolone *pull-downa* su traženi interaktori, dok su uzorci s ostale tri kolone služili kao kontrole. Shodno tome, tablica 4.2 prikazuje proteine koji su detektirani samo u eluciji s HaArgRS2 kolone *pull-downa*, a ne pojavljuju se u uzorcima kontrola.

Tablica 4.2 Rezultati dvaju spektrometrija masa: potencijalni interaktori detektirani isključivo u eluciji s HaArgRS2 kolone *pull-downa*, njihove funkcije, mase i pristupni brojevi u UniProt bazi podataka.

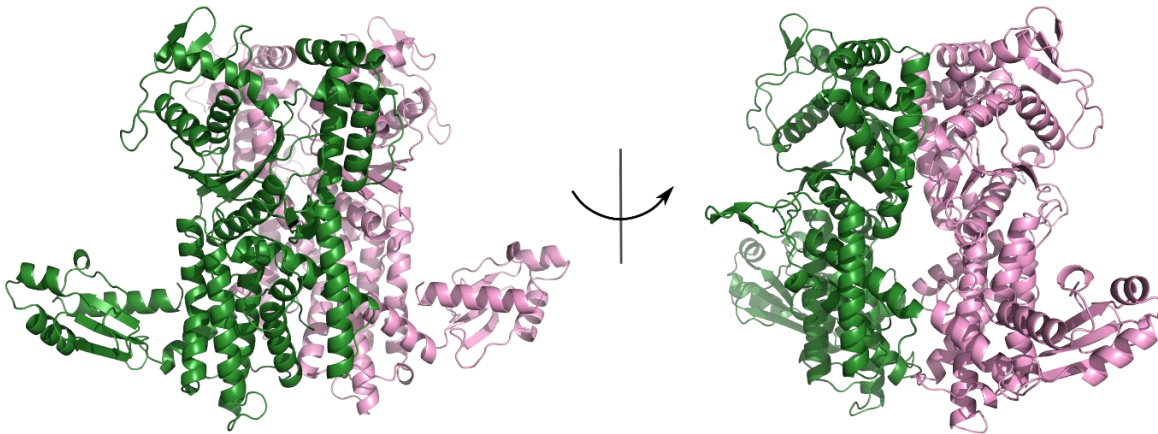
Redni broj pokusa	Naziv proteina	Opis	Masa	UniProt pristupni broj
1	Arginil-tRNA-sintetaza	Tipična HaArgRS1	65,0 kDa	A9AWK8
	Triozafosfat-izomeraza	Sudjeluje u glikolizi i glukoneogenezi; katalizira pretvorbu dihidroksiaceton fosfata u gliceraldehid-3-fosfat	26,4 kDa	A9AUN9
	Aspartat-semialdehid-dehidrogenaza	Sudjeluje u biosintezi aminokiselina Lys, Leu, Ile, Met; katalizira pretvorbu aspartat-4-semialdehida u 4-fosfo-aspartat	37,4 kDa	A9AXA8
	Glukoza-6-fosfat-izomeraza	Sudjeluje u glikolizi i glukoneogenezi; katalizira izomerizaciju glukoza-6-fosfata u fruktoza-6-fosfat	51,0 kDa	A9B1B9
2	Arginil-tRNA-sintetaza	Tipična HaArgRS1	65,0 kDa	A9AWK8
	Protein s NACHT domenom	Neistražena funkcija	107 kDa	A9B8T7
	Protein iz velike podjedinice ribosoma bL12	Sudjeluje u interakciji ribosoma s translacijskim faktorima	13,1 kDa	A9B5G8

Uočljivo je da je jedini protein koji se pojavljuje u obje elucije s HaArgRS2 kolone *pull-downa* baš HaArgRS1 protein, odnosno tipična arginil-tRNA sintetaza. To je čini najizglednijim kandidatom za traženog interaktora. S obzirom na to da su ta dva proteina gotovo iste mase (oko 64 kDa), takav interaktor nije moguće detektirati elektroforezom. Što se tiče ostalih kandidata, vidljivo je da nema podudaranja mase među interaktorima pronađeni metodama SDS-PAGE i spektrometrijom masa. Spektrometrija masa je daleko preciznija i moćnija metoda od SDS-PAGE pa su rezultati dobiveni njom pouzdaniji. Valja istaknuti da je potrebno još uhodavanja i ponavljanja metode spektrometrije masa. Naime, detektiran je nizak broj peptida za sve proteine (jedan do dva peptida za navedene potencijalne interaktore) što znači da je niska pouzdanost rezultata. Samim time moguće je da neki interaktori (primjerice oni vidljivi na slikama 4.12 i 4.13) nisu detektirani. Iz navedenog razloga, potrebno je optimirati i *pull-down* metodu da bi se dobile veće količine proteina za daljnje eksperimente spektrometrije masa.

4.6. Predikcija protein-protein interakcija

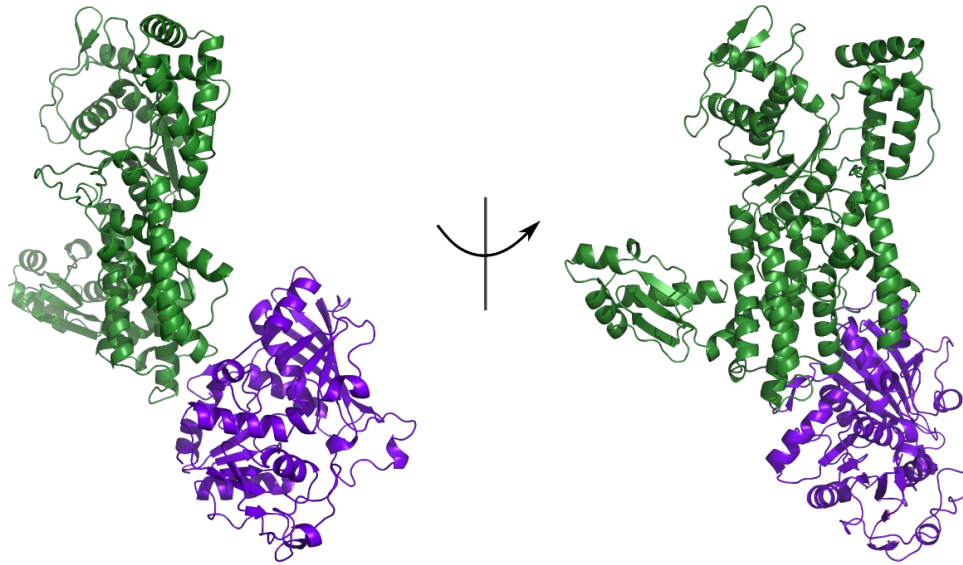
Da bi se upotpunili rezultati spektrometrije masa, izvedeno je predviđanje molekulskih interakcija HaArgRS2 sa svim potencijalnim proteinskim interaktorima u AlphaFold 3 Serveru (Abramson i sur., 2024) (vidi poglavlje 3.2.8.). Samo za tri predikcije je statistička podržanost predikcija bila viša od donje granice ($ipTM > 0,6$ i $pTM > 0,5$).

Na slici 4.15 prikazana je statistički najpodržanija interakcija proteina HaArgRS2 i HaArgRS1, dvaju varijanti arginil-tRNA-sintetaze iz *H. aurantiacus*. Koeficijenti pouzdanosti ove interakcije bili su: $ipTM = 0,71$ i $pTM = 0,81$, što znači da je vjerojatnost točnosti predikcije svrstana u „sivu zonu“. Drugim riječima, postoje izgledi da ova dva proteina doista interagiraju na prikazani način, ali bez dodatnih eksperimenata se to ne može pouzdano ustvrditi.

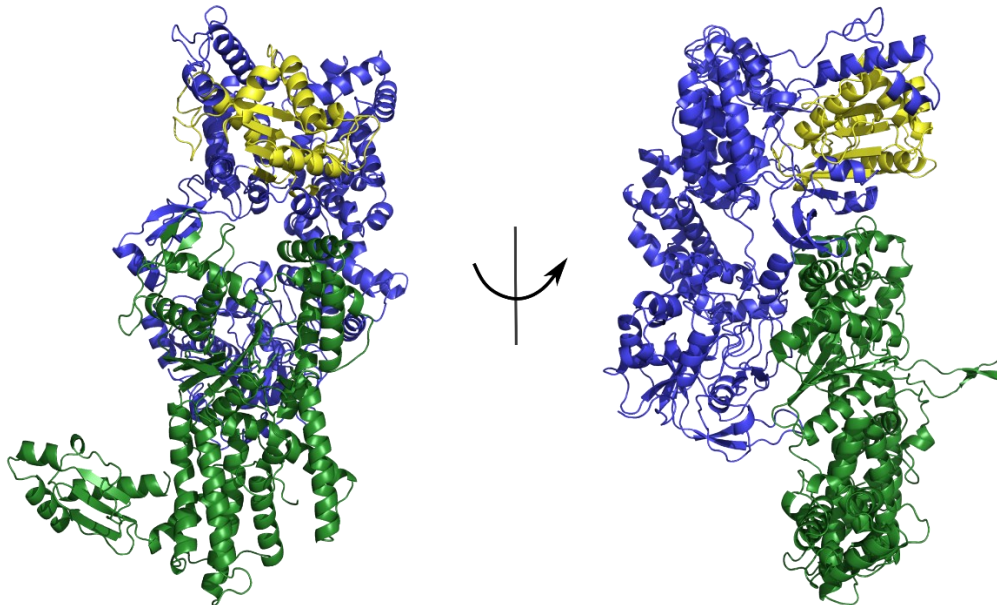


Slika 4.15 Predikcija interakcije proteina HaArgRS2 (zeleno) i HaArgRS1 (ružičasto) izrađena u AlphaFold 3 Serveru (Abramson i sur., 2024).

Na slici 4.16 prikazana je statistički najpodržanija interakcija proteina HaArgRS2 i aspartat-semialdehid-dehidrogenaze, enzima biosintetskih puteva lizina, leucina, izoleucina i metionina. Koeficijenti pouzdanosti ove interakcije bili su: $ipTM = 0,69$ i $pTM = 0,81$, te je i ova predikcija u „sivoj zoni“. Na slici 4.17 prikazana je statistički najpodržanija interakcija proteina HaArgRS2 i proteina s NACHT domenom kojemu nije poznata funkcija. Koeficijenti pouzdanosti ove interakcije bili su: $ipTM = 0,70$ i $pTM = 0,69$, te je i ova predikcija u „sivoj zoni“.



Slika 4.16 Predikcija interakcije proteina HaArgRS2 (zeleno) i aspartat-semialdehyd-dehidrogenaza (ljubičasto) izrađena u AlphaFold 3 Serveru (Abramson i sur., 2024).



Slika 4.17 Predikcija interakcije proteina HaArgRS2 (zeleno) i proteina s NACHT domenom (modro, a NACHT domena žuto obojena) izrađena u AlphaFold 3 Serveru (Abramson i sur., 2024).

Važno je imati na umu da ove predikcije nisu pouzdane i ne mogu zamijeniti eksperimentalno dobivene rezultate. Ono što mogu je dati viziju kako bi interakcijsko sučelje

dvaju proteina moglo izgledati te eventualno potaknuti istraživača na razmišljanje i razvijanje ideja za budući znanstveni rad.

5. RASPRAVA

Da bi se istražilo ima li atipična arginil-tRNA-sintetaza predatorne bakterije *H. aurantiacus* proteinske interaktore koji joj omogućavaju aktivnost, provedena je metoda supročišćavanja tog proteina i kontrolnih proteina afinitetnom kromatografijom. Na SDS-PAGE gelu pronađena su dva kandidata za interaktore HaArgRS2, jedan od cca. 45 kDa i drugi od cca. 90 kDa. Uzorci su dalje analizirani spektrometrijom masa gdje je pronađeno šest kandidata za interaktore. Svi pronađeni interaktori bili su podržani s vrlo malim brojem detektiranih peptida na LC-MS/MS uređaju (jedan ili dva peptida). Nažalost, nijedan od navedenih šest kandidata pronađenih spektrometrijom masa ne podudara se masom s onima viđenima elektroforetskom analizom. HaArgRS1 koji je detektiran spektrometrijom masa, nije bilo moguće detektirati metodom SDS-PAGE jer je gotovo iste mase kao HaArgRS2.

Najpodržaniji pronađeni interaktor bila je tipična arginil-tRNA-sintetaza koja je jedina pronađena u oba izvedena pokusana spektrometrije masa, odnosno u uzorcima s dvaju *pull-down* metoda. Interakcije dvaju homologa nisu novost u biokemiji: zamijećene su kod dominantnih negativnih mutacija u jednom od alela kod diploidnih organizama, gdje mutirani alel inhibira djelovanje funkcionalnog alela. Poznato je kod transdukcije signala da mutirani membranski receptori s protein-kinaznom domenom na citosolnoj strani mogu dimerizirati s funkcionalnima i tako ih inaktivirati (Veitia 2007). Primjerice, serin/treonin receptorska kinaza ERECTA u *Arabidopsis* rodu koja je važna za oblikovanje biljnih organa (Shpak i sur., 2003). Tako se slično može zamisliti da atipična HaArgRS2 dimerizira s tipičnom HaArgRS1, te na neki način regulira njezinu funkciju. Interakcija je modelirana u AlphaFold 3 Serveru gdje je okarakterizirana kao moguća, ali nije izrazito pouzdana. S druge strane, iz dva razloga valja biti oprezan s tumačenjem rezultata. Prvo, valja naglasiti da iako postoje male šanse da je detektirana HaArgRS1 u uzorcima s HaArgRS2 *pull-downa* rezultat zagađenja tijekom izvođenja pokusa jer su obje korištene kao proteini-mamci, činjenica da se pojavljuje u rezultatima oba provedena pokusa spektrometrije masa sugerira da to nije tako. Drugo, bilo bi očekivano da se detektira i obratno, odnosno da se HaArgRS2 pojavljuje u uzorku s HaArgSR1 kolone *pull-downa*, što nije slučaj. To se može objasniti činjenicom da su postojali problemi pri pročišćavanju HaArgRS1 jer je sklona ispiranju s kolone prije elucije te prilično niskom ekspresijom HaArgRS2 u proteomu *H. aurantiacus*.

Ostali potencijalni interaktori detektirani spektrometrijom masa pojavili su se samo u jednom od dva provedena pokusa. Aspartat-semialdehid-dehidrogenaza sudjeluje u biosintetskom putu aminokiselina lizina, leucina, izoleucina i metionina. Svrha njezine

interakcije s HaArgRS2 mogla bi biti regulacija metabolizma dušika na neki dosada nerazjašnjen način, gdje HaArgRS2 igra ulogu senzora L-arginina kao izvora dušika, a aspartat-semialdehid-dehidrogenaza regulira biosintezu navedenih aminokiselina u skladu s tim. Predikcija ove interakcije (AlphaFold 3 Server) je moguća, ali nije izrazito pouzdana. Protein velike podjedinice ribosoma bL12 sudjeluje u interakciji ribosoma s translacijskim faktorima. Pronađeno je da ArgRS iz arheje *M. thermoautotrophicus* doista interagira s L12 proteinom velike podjedinice ribosoma koji se nalazi u blizini A mjesta ribosoma te navedena interakcija potencijalno služi recikliranju tRNA^{Arg} prilikom translacije (Godinic-Mikulcic i sur., 2014). Ista interakcija može se očekivati i između HaArgRS2 i bL12 proteina. Predikcija ove interakcije (AlphaFold 3 Server) nije izgledna. Glukoza-6-fosfat-izomeraza i triozafosfat-izomeraza su enzimi glikolize i glukoneogeneze koji, prema dosadašnjim istraživanjima, ne sudjeluju u regulaciji tih dvaju ciklusa, stoga je u ovoj fazi istraživanja teško predložiti što bi mogla značiti njihova interakcija s HaArgRS2. Predikcija njihovih interakcija s HaArgRS2 (AlphaFold 3 Server) nije izgledna. Zadnji potencijalni interaktor je protein s NACHT domenom kojemu nije istražena funkcija. Obitelj proteina s NACHT domenom spada u veću, NTPaznu obitelj proteina, odnosno one koji hidroliziraju nukleotide. NACHT domena pronađena je u sve tri domene života. Utvrđeno je da neki proteini s ovom domenom imaju ulogu u obrani bakterija od bakteriofaga (Kibby i sur., 2023), što znači da HaArgRS2 možda ima obrambenu ulogu (ukoliko doista interagira s ovim proteinom). U eukariotima, proteini s NACHT domenom nerijetko imaju ulogu u antibakterijskoj obrani (Hu i sur., 2014; Richter i Levin, 2019), a s obzirom na to da je *H. aurantiacus* predatorna bakterija, HaArgRS2 bi mogla imati nekakvu ulogu u predaciji nad drugim bakterijama. Još jedan aspekt kojeg valja sagledati jest činjenica da HaArgRS2 nije pronađena aktivnost dosada te je uočeno da veže L-arginin i tRNA^{Arg}, ali ne i ATP. Ovaj protein ima domenu koja bi mogla vezati ATP te potencijalno omogućavati HaArgRS2 izvršavanje njezine kanonske funkcije. Predikcija ove interakcije (AlphaFold 3 Server) je moguća, ali nije izrazito pouzdana (slika 4.15).

Naposljetku, postavljene su brojne teorije o funkciji HaArgRS2 proteina na temelju pronađenih interaktora. Za sigurnu potvrdu ijedne od predloženih interakcija potrebno je dodatno optimirati *pull-down* metodu, pokušati *pull-down* s većim volumenima kolone i većim masama proteina-mamaca, u svrhu pripreme uzoraka za spektrometriju masa. Zbog toga se može očekivati da neki proteinski interaktori nisu još pronađeni, primjerice oni čije su vrpce vidljive na gelovima SDS-PAGE, ali nisu detektirani spektrometrijom masa. U slučaju da se u ponovljenim pokusima dobije ponovno neki od ovih interaktora s boljim količinama

detektiranih peptida, valjalo bi taj protein prekomjerno eksprimirati, pročistiti i potvrditi interakciju *pull-down* metodom i/ili nekom biofizičkom metodom poput mikroskopska termoforeze (engl. *microscale thermophoresis, MST*). U svakom slučaju, učinjen je značajan korak naprijed u razrješavanju uloge atipične arginil-tRNA-sintetaze predatorne bakterije *Herpetosiphon aurantiacus*.

6. ZAKLJUČCI

- Uspješno su pripremljeni rekombinantni proteini sa streptavidinskim privjeskom metodom PCR kloniranja što je potvrđeno Sangerovim sekvenciranjem.
- Uhodane su metode supročišćavanja afinitetnom kromatografijom koristeći: histidinski, odnosno streptavidinski fuzijski privjesak.
- Pronađena su dva potencijalna proteinska interaktora atipične arginil-tRNA-sintetaze predatorne bakterije *H. aurantiacus* na gelu SDS-PAGE s uzorcima dobivenima metodom supročišćavanja afinitetnom kromatografijom pomoću streptavidinskog privjeska. Jedan je mase oko 45 kDa, a drugi oko 90 kDa.
- Pronađeno je šest potencijalnih proteinskih interaktora atipične HaArgRS2 spektrometrijom masa provedenom na uzorcima dobivenima *pull-down* metodom: triozafosfat-izomeraza, glukoza-6-fosfat-izomeraza, aspartat-semialdehid-dehidrogenaza, protein s NACHT domenom, protein velike podjedinice ribosoma bL12 i tipična arginil-tRNA-sintetaza.
- Najznačajniji kandidat za proteinskog interaktora atipične HaArgRS2 jest tipična HaArgRS1 jer je jedina pronađena u obje replike spektrometrije masa.
- Nijedna predikcija molekularnih interakcija (AlphaFold 3 Server) između HaArgRS2 i šest detektiranih proteina spektrometrijom masa nije visoko pouzdana. Tri predikcije interakcija su u „sivoj zoni“ pouzdanosti, odnosno moguće su, ali nisu čvrsto statistički podržane. Radi se o interakcijama HaArgSR2 s: HaArgRS1, aspartat-semialdehid-dehidrogenazom i proteinom s NACHT domenom. Ostale predikcije interakcija vrlo su niske vjerodostojnosti.
- Eksperimentalne metode treba dodatno optimirati da se dobije veći prinos interaktora kako bi se pouzdano potvrdile ovdje detektirane interakcije.

7. ZAHVALE

Najljepše se zahvaljujem profesorici dr. sc. Iti Gruić Sovulj na prilici i povjerenju koje mi je ukazala, na svom prenesenom znanju i posebice, na usađenoj ljubavi prema biokemiji.

Od srca se zahvaljujem i Igoru na velikom trudu, strpljenju i uloženom vremenu u rad sa mnom. Puno hvala za povjerenje, razumijevanje, uvažavanje i odgovaranje na tisuću i jedno pitanje. Hvala što nijednom nisam napustila ZBK bez osmijeha na licu. Hvala i za slobodu da dođem tek u 9 ujutro...

Hvala Petri za posuđivanje radnog mjesta, stolica, kemikalija i povremeno posvajanje.

Hvala doc. dr. sc. Marku Močibobu za pomoć sa spektrometrijom masa.

Hvala Petru što je uvijek spremno bio Bolek mojem Loleku.

Hvala i ostatku ZBK na savjetima, pruženoj pomoći i podrški.

Veliko hvala mami, tati, sestri I i baki što su me neumorno podupirali, držali fiže, vjerovali u mene i navijali za moje proteinčiće.

Hvala Mati, Marti i Karli što su bili uz mene.

Na kraju, najljepše hvala mom Luki što je beskrajno strpljivo slušao moje kukanje, što je vjerovao u mene više nego li ja u sebe i što me uvijek držao za ruku kada mi je bilo teško.

8. POPIS LITERATURE

- Abramson, Josh, Jonas Adler, Jack Dunger, Richard Evans, Tim Green, Alexander Pritzel, Olaf Ronneberger, Lindsay Willmore, Andrew J. Ballard, Joshua Bambrick, Sebastian W. Bodenstein, David A. Evans, Chia Chun Hung, Michael O'Neill, David Reiman, Kathryn Tunyasuvunakool, Zachary Wu, Akvilė Žemgulytė, Eirini Arvaniti, Charles Beattie, Ottavia Bertolli, Alex Bridgland, Alexey Cherepanov, Miles Congreve, Alexander I. Cowen-Rivers, Andrew Cowie, Michael Figurnov, Fabian B. Fuchs, Hannah Gladman, Rishub Jain, Yousuf A. Khan, Caroline M. R. Low, Kuba Perlin, Anna Potapenko, Pascal Savy, Sukhdeep Singh, Adrian Stecula, Ashok Thillaisundaram, Catherine Tong, Sergei Yakneen, Ellen D. Zhong, Michal Zielinski, Augustin Židek, Victor Bapst, Pushmeet Kohli, Max Jaderberg, Demis Hassabis, i John M. Jumper. 2024. „Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3“. *Nature* 630(8016):493–500. doi: 10.1038/s41586-024-07487-w.
- Arakawa, Tsutomu, i Serge N. Timasheff. 1985. „Theory of protein solubility“. *Methods in Enzymology* 114:49–77. doi: 10.1016/0076-6879(85)14005-X.
- Berg, J. M., J. Tymoczko, Jr. Gregory J. Gatto, i L. Stryer. 2015. *Biochemistry*. 8th izd. W.H.Freeman.
- Brennan T., i Sunderalingam M. 1976. „Structure, of transfer RNA molecules containing the long variable loop“. *Nucleic Acids Research* 3(11):3235–52.
- Brkic, A., M. Leibundgut, J. Jablonska, V. Zanki, Z. Car, V. Petrovic Perokovic, A. Marsavelski, N. Ban, i I. Gruic-Sovulj. 2023. „Antibiotic hyper-resistance in a class I aminoacyl-tRNA synthetase with altered active site signature motif“. *Nature Communications* 14(1):1–12. doi: 10.1038/s41467-023-41244-3.
- Brown, James R., i W. Ford Doolittle. 1995. „Root of the universal tree of life based on ancient aminoacyl-tRNA synthetase gene duplications“. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:2441–45.
- Cavarelli, Jean, Bé Né Dicte Delagoutte, Gilbert Eriani, Jean Gangloff, i Dino Moras. 1998. „L-Arginine recognition by yeast arginyl-tRNA synthetase“. *The EMBO Journal* 17(18):5438–48.

- Chan, Patricia P., i Todd M. Lowe. 2016. „GtRNADB 2.0: An expanded database of transfer RNA genes identified in complete and draft genomes“. *Nucleic Acids Research* 44(D1):D184–89. doi: 10.1093/nar/gkv1309.
- Chan, Pedro, i Jim Warwicker. 2009. „Evidence for the adaptation of protein pH-dependence to subcellular pH“. *BMC Biology* 7(69):1–10. doi: 10.1186/1741-7007-7-69.
- Chiti, Fabrizio, Massimo Stefani, Niccolò Taddei, Giampietro Ramponi, i Christopher M. Dobson. 2003. „Rationalization of the effects of mutations on peptide and protein aggregation rates“. *Nature* 424(6950):805–8. doi: 10.1038/nature01891.
- Deng, Minghua, Kui Zhang, Shipra Mehta, Ting Chen, i Fengzhu Sun. 2003. „Prediction of Protein Function Using Protein–Protein Interaction Data“. *Journal of Computational Biology* 10(6):947–60. doi: 10.1089/106652703322756168.
- Dibbelt, Leif, Ulrich Pachmann', i Hans G. Zachau. 1980. „Serine activation is the rate limiting step of tRNA^{Ser} aminoacylation by yeast seryl tRNA synthetase“. *Nucleic Acids Research* 8(17):4021–40.
- Dibbelt, Leif, i Hans G. Zachau. 1981. „On the rate limiting step of yeast tRNA^{Phe} aminoacylation“. *FEBS Letters* 129(1):173–76.
- Freches, André, i Joana Costa Fradinho. 2024. „The biotechnological potential of the Chloroflexota phylum“. *Applied and Environmental Microbiology* 90(6). doi: 10.1128/aem.01756-23.
- Giegé, Richard, i Mathias Springer. 2012. „Aminoacyl-tRNA Synthetases in the Bacterial World“. *EcoSal Plus* 5(1). doi: 10.1128/ecosalplus.4.2.1.
- Gilbert Eriani, Marc Delarue, Olivier Poch, Jean Gangloff & Dino Moras. 1990. „Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs“. *Nature* 347:203–6.
- Godinic-Mikulcic, Vlatka, Jelena Jaric, Basil J. Greber, Vedran Franke, Vesna Hodnik, Gregor Anderluh, Nenad Ban, i Ivana Weygand-Durasevic. 2014. „Archaeal

aminoacyl-tRNA synthetases interact with the ribosome to recycle tRNAs“. *Nucleic Acids Research* 42(8):5191–5201. doi: 10.1093/nar/gku164.

Gruić-Sovulj, Ita, Liam M. Longo, Jagoda Jabłońska, i Dan S. Tawfik. 2022. „The evolutionary history of the HUP domain“. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 57(1):1–15. doi: 10.1080/10409238.2021.1957764.

Guigou, Ludovic, i Marc Mirande. 2005. „Determinants in tRNA for activation of arginyl-tRNA synthetase: Evidence that tRNA flexibility is required for the induced-fit mechanism“. *Biochemistry* 44(50):16540–48. doi: 10.1021/bi051575h.

Holt, J. G., i R. A. Lewin. 1968. „*Herpetosiphon aurantiacus* gen. et sp. n., a New Filamentous Gliding Organism“. *Journal of Bacteriology* 95(6):2407–8.

Hu, Yi Wei, Zhang Long Yu, Na Na Xue, Pin Nie, i Ming Xian Chang. 2014. „Expression and protective role of two novel NACHT-containing proteins in pathogen infection“. *Developmental and Comparative Immunology* 46(2):323–32. doi: 10.1016/j.dci.2014.05.007.

Jumper, John, Richard Evans, Alexander Pritzel, Tim Green, Michael Figurnov, Olaf Ronneberger, Kathryn Tunyasuvunakool, Russ Bates, Augustin Židek, Anna Potapenko, Alex Bridgland, Clemens Meyer, Simon A. A. Kohl, Andrew J. Ballard, Andrew Cowie, Bernardino Romera-Paredes, Stanislav Nikolov, Rishub Jain, Jonas Adler, Trevor Back, Stig Petersen, David Reiman, Ellen Clancy, Michal Zielinski, Martin Steinegger, Michalina Pacholska, Tamas Berghammer, Sebastian Bodenstern, David Silver, Oriol Vinyals, Andrew W. Senior, Koray Kavukcuoglu, Pushmeet Kohli, i Demis Hassabis. 2021. „Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold“. *Nature* 596(7873):583–89. doi: 10.1038/s41586-021-03819-2.

Kibby, Emily M., Amy N. Conte, A. Maxwell Burroughs, Toni A. Nagy, Jose A. Vargas, Lindsay A. Whalen, L. Aravind, i Aaron T. Whiteley. 2023. „Bacterial NLR-related proteins protect against phage“. *Cell* 186(11):2410–24. doi: 10.1016/j.cell.2023.04.015.

Kozłowski, Lukasz P. 2016. „IPC - Isoelectric Point Calculator“. *Biology Direct* 11(1):1–16. doi: 10.1186/s13062-016-0159-9.

- Lee, Chan Ping, Nripendranath Mandal, Michael R. Dyson, i Uttam L. Rajbhandary. 1993. „The discriminator base influences tRNA structure at the end of the acceptor stem and possibly its interaction with proteins“. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7149–52.
- Lee, N., i H. Reichenbach. 2006. „The Genus *Herpetosiphon*“. Str. 854–77 u *The Prokaryotes*. New York, NY: Springer New York.
- Linares-Otoya, Luis, Virginia Linares-Otoya, Lizbeth Armas-Mantilla, Cyntia Blanco-Olano, Max Crüsemann, Mayar L. Ganoza-Yupanqui, Julio Campos-Florian, Gabriele M. König, i Till F. Schäberle. 2017. „Diversity and antimicrobial potential of predatory bacteria from the peruvian coastline“. *Marine Drugs* 15(308). doi: 10.3390/md15100308.
- Livingstone, Paul G., Russell M. Morpew, Alan R. Cookson, i David E. Whitworth. 2018. „Genome analysis, metabolic potential, and predatory capabilities of *Herpetosiphon llansteffanense* sp. nov.“. *Applied and Environmental Microbiology* 84(22). doi: 10.1128/AEM.01040-18.
- Martinis, Susan A., Pierre Plateau, Jean Cavarelli, i Catherine Florentz. 1999. „Aminoacyl-tRNA synthetases: A new image for a classical family“. *Biochimie* 81:683–700.
- Minajigi, Anand, i Christopher S. Francklyn. 2008. „RNA-assisted catalysis in a protein enzyme: The 2-hydroxyl of tRNA Thr A76 promotes aminoacylation by threonyl-tRNA synthetase“. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105(46):17748–53. doi: 10.1073/pnas.0804247105.
- Moras, Dino, i Jean Cavarelli. 2000. „tRNA aminoacylation by arginyl-tRNA synthetase: induced conformations during substrates binding“. *The EMBO Journal* 19(21):5599–5610.
- Nelson, David L., i Michael M. Cox. 2017. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 7th izd. W. H. Freeman and Company.
- Nett, M., Ö. Erol, S. Kehraus, M. Koeck, A. Krick, E. Eguereva, E. Neu, i G. M. Koenig. 2006. „Siphonazole, an Unusual Metabolite from *Herpetosiphon* sp.“. *Angewandte Chemie International Edition*. doi: 10.1002/anie.200504525.

- Perona, John J., i Ita Gruic-Sovulj. 2014. „Synthetic and editing mechanisms of aminoacyl-tRNA synthetases.“ *Topics in current chemistry* 344:1–41. doi: 10.1007/128_2013_456.
- Perona, John J., i Andrew Hadd. 2012. „Structural diversity and protein engineering of the aminoacyl-tRNA Synthetases“. *Biochemistry* 51(44):8705–29. doi: 10.1021/bi301180x.
- Richter, Daniel J., i Tera C. Levin. 2019. „The origin and evolution of cell-intrinsic antibacterial defenses in eukaryotes“. *Current Opinion in Genetics and Development* 58:111–22. doi: 10.1016/j.gde.2019.09.002.
- Rubio Gomez, Miguel Angel, i Michael Ibba. 2020. „Aminoacyl-tRNA synthetases“. *RNA* 26(8):910–36. doi: 10.1261/rna.071720.119.
- Schieferdecker, Sebastian, Nicole Domin, Christine Hoffmeier, Donald A. Bryant, Martin Roth, i Markus Nett. 2015. „Structure and absolute configuration of auriculamide, a natural product from the predatory bacterium herpetosiphon aurantiacus“. *European Journal of Organic Chemistry* 2015(14):3057–62. doi: 10.1002/ejoc.201500181.
- Shimada, Atsushi, Osamu Nureki, Mie Goto, Seizo Takahashi, i Shigeyuki Yokoyama. 2001. „Structural and mutational studies of the recognition of the arginine tRNA-specific major identity element, A20, by arginyl-tRNA synthetase“. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98(24):13537–42. doi: 10.1073/pnas.231267998.
- Shpak, Elena D., Michael B. Lakeman, i Keiko U. Torii. 2003. „Dominant-Negative Receptor Uncovers Redundancy in the Arabidopsis ERECTA Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Kinase Signaling Pathway That Regulates Organ Shape“. *The Plant Cell* 15(5):1095–1110. doi: 10.1105/tpc.010413.
- Stephen, Preyesh, Sheng Ye, Ming Zhou, Jian Song, Rongguang Zhang, En Duo Wang, Richard Giegé, i Sheng Xiang Lin. 2018. „Structure of Escherichia coli Arginyl-tRNA Synthetase in Complex with tRNAArg: Pivotal Role of the D-loop“. *Journal of Molecular Biology* 430(11):1590–1606. doi: 10.1016/J.JMB.2018.04.011.

Strickler, Samantha S., Alexey V. Gribenko, Alexander V. Gribenko, Timothy R. Keiffer, Jessica Tomlinson, Tracey Reihle, Vakhtang V. Loladze, i George I. Makhatadze. 2006. „Protein stability and surface electrostatics: A charged relationship“. *Biochemistry* 45(9):2761–66. doi: 10.1021/bi0600143.

Varadi, Mihaly, Damian Bertoni, Paulyna Magana, Urmila Paramval, Ivanna Pidruchna, Malarvizhi Radhakrishnan, Maxim Tsenkov, Sreenath Nair, Milot Mirdita, Jingi Yeo, Oleg Kovalevskiy, Kathryn Tunyasuvunakool, Agata Laydon, Augustin Židek, Hamish Tomlinson, Dhavanthi Hariharan, Josh Abrahamson, Tim Green, John Jumper, Ewan Birney, Martin Steinegger, Demis Hassabis, i Sameer Velankar. 2024. „AlphaFold Protein Structure Database in 2024: providing structure coverage for over 214 million protein sequences“. *Nucleic Acids Research* 52(D1):D368–75. doi: 10.1093/nar/gkad1011.

Veitia, Reiner A. 2007. „Exploring the molecular etiology of dominant-negative mutations“. *Plant Cell* 19(12):3843–51. doi: 10.1105/tpc.107.055053.

Zhang, Chun Mei, John J. Perona, Kang Ryu, Christopher Francklyn, i Ya Ming Hou. 2006. „Distinct Kinetic Mechanisms of the Two Classes of Aminoacyl-tRNA Synthetases“. *Journal of Molecular Biology* 361(2):300–311. doi: 10.1016/j.jmb.2006.06.015.

Živković, I. (2021): Mehanizmi ostvarivanja supstratne specifičnosti u sintetskom i korektivnom mjestu izoleucil-tRNA-sintetaze, Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Kemijski odsjek, Zagreb

9. SAŽETAK

Ana Madunić

Potencijalni proteinski interaktori atipične arginil-tRNA-sintetaze predatorne bakterije

Herpetosiphon aurantiacus

Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) su enzimi koji pripajaju pripadne aminokiseline i tRNA reakcijom u dva koraka. Prvi korak je aktivacija aminokiseline adenilatom iz ATP-a, a drugi korak je prijenos aminokiseline na tRNA. AaRS se prema strukturnim i mehanističkim razlikama dijele u razrede I i II. U razredu I visoko je očuvan motiv histidil-x-glicil-histidin (HxGH motiv, x je hidrofobna aminokiselina, najčešće izoleucin) u aktivnom mjestu koji je ključan za prvi korak reakcije, specifičnije, za vezanje ATP-a. Poznato je da izmjene HxGH motiva mogu biti fiziološki relevantne, primjerice varijanta IleRS s izmijenjenim HxGH u glicil-izoleucil-histidil-histidin (GIHH) motiv ispoljava hiperrezistenciju na antibiotik mupirocin. Nadalje, u predatornoj bakteriji *Herpetosiphon aurantiacus* pronađene su dvije homologne arginil-tRNA-sintetaze (ArgRS) od kojih je jedna tipična, sadrži HVGH motiv i izvršava kanonsku funkciju (HaArgRS1), a druga atipična, ima izmijenjen HxGH u arginil-valil-aspartil-histidin (RVDH) motiv te zasada nije utvrđeno da izvršava kanonsku funkciju aminoaciliranja tRNA^{Arg} (HaArgRS2). Uočeno je i da je znatno slabije eksprimirana u odnosu na HaArgRS1, u normalnim uvjetima rasta. To sve upućuje na to da HaArgRS2 potencijalno ima novu funkciju u stanici. Da bi se to ispitalo, istraženo je ima li HaArgRS2 proteinske interaktore u proteomu *H. aurantiacus*. Izvedena je metoda supročišćavanja afinitetnom kromatografijom, a rezultati su analizirani metodom SDS-PAGE i spektrometrijom masa. Metodom SDS-PAGE pronađena su dva potencijalna interaktora, a spektrometrijom masa čak šest. Istaknuti potencijalni interaktori su sama tipična HaArgRS1 i dosada neistraženi protein s NACHT domenom. Rezultati upućuju na to da atipična arginil-tRNA-sintetaza ima značajnu nekanonsku ulogu kod predatornih bakterija roda *Herpetosiphon*, stoga je od velike važnosti nastaviti potragu za njezinim interaktorima.

Ključne riječi: arginil-tRNA-sintetaza, HxGH motiv, *Herpetosiphon aurantiacus*, interaktori, supročišćavanje afinitetnom kromatografijom

10. ABSTRACT

Ana Madunić

Potential protein interactors of atypical arginyl-tRNA synthetase from predatory bacterium *Herpetosiphon aurantiacus*

Aminoacyl-tRNA synthetases (aaRS) charge tRNA with its cognate amino acid in a two-step reaction. The first step is the activation of the amino acid by ATP, and the second is the transfer of the aminoacyl moiety to the tRNA. Based on structural and mechanistic differences, aaRS are divided into two classes, I and II. In class I, a highly conserved motif histidyl-x-glycyl-histidine (HxGH motif, where x is a hydrophobic amino acid, usually isoleucine) is found in the active site, and is proven to be crucial for activation reaction, specifically for ATP binding. It is known that natural variations of the HxGH motif can be physiologically relevant. For example, one variant of IleRS which has a modified HxGH into a glycyl-isoleucyl-histidyl-histidine (GIHH) motif confers hyper-resistance to the antibiotic mupirocin. Furthermore, in the predatory bacterium *Herpetosiphon aurantiacus*, two homologous arginyl-tRNA synthetases (ArgRS) have been found. Typical, contains the aforementioned HVGH motif and executes its canonical function (HaArgRS1), while the other is atypical, with the HxGH motif altered to arginyl-valyl-aspartyl-histidine (RVDH), and has not yet been proven to execute aminoacylation of tRNA^{Arg} (HaArgRS2). HaArgRS2 has significantly lower expression compared to HaArgRS1 under normal growth conditions. This suggests that HaArgRS2 may have a novel function in the cell. To explore this, we investigated whether HaArgRS2 has protein interactors within the *H. aurantiacus* proteome. The chosen method was the pull-down assay, and the results were analyzed by SDS-PAGE and mass spectrometry. SDS-PAGE revealed two potential protein interactors of HaArgRS2, while mass spectrometry unveiled six of them. The most interesting potential interactors were the typical HaArgRS1 itself and a previously uncharacterized protein containing the NACHT domain. The results suggest that atypical arginyl-tRNA synthetase performs an important non-canonical role in the predatory genus *Herpetosiphon*, therefore it is of utmost importance to continue with this research.

Keywords: arginyl-tRNA synthetase, HxGH motif, *Herpetosiphon aurantiacus*, interactors, pull-down assay