



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet

**Nikolina Šoštarić i Petar Šutalo**

Dvojni karakter domene arginil-tRNA-sintetaze u vezanju tRNA i  
prijenosu informacija prema udaljenom katalitičkom mjestu

Zagreb, 2014.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za biokemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Ivane Weygand-Đurašević te neposrednim vodstvom dipl. ing. biol. Ane Crnković i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2013./2014.

### ***Popis odabranih kratica***

- aa-AMP → aminoacil-adenilat
- aaRS → aminoacil-tRNA-sintetaza
- AMP → adenzin-5'-monofosfat
- ATP → adenzin-5'-trifosfat
- CPI → povezujući peptid I
- DNA → deoksiribonukleinska kiselina
- mRNA → glasnička ribonukleinska kiselina
- MtArgRS → arginil-tRNA-sintetaza arheje *Methanothermobacter thermoautotrophicus*
- $\Delta NnMtArgRS$  → arginil-tRNA-sintetaza arheje *Methanothermobacter thermoautotrophicus* s delecijom n aminokiselina s N-terminalnog kraja proteina
- MttRNA<sup>Arg</sup> → tRNA arheje *Methanothermobacter thermoautotrophicus* specifična za arginin
- PAGE → elektroforeza na poliakrilamidnom gelu
- PEG → polietilenglikol
- PP<sub>i</sub> → pirofosfat
- RF → Rossmannov nabor
- RNA → ribonukleinska kiselina
- rRNA → ribosomska ribonukleinska kiselina
- tRNA<sup>aa</sup> → izoakceptorska transportna ribonukleinska kiselina specifična za aminokiselinu aa

***Popis dvadeset standardnih aminokiselina i odgovarajuće kratice***

- alanin, Ala (A)
- arginin, Arg (R)
- asparagin, Asn (N)
- asparaginska kiselina, Asp (D)
- cistein, Cys (C)
- glutamin, Gln (Q)
- glutaminska kiselina, Glu (E)
- glicin, Gly (G)
- histidin, His (H)
- izoleucin, Ile (I)
- leucin, Leu (L)
- lizin, Lys (K)
- metionin, Met (M)
- fenilalanin, Phe (F)
- prolin, Pro (P)
- serin, Ser (S)
- treonin, Thr (T)
- triptofan, Trp (W)
- tirozin, Tyr (Y)
- valin, Val (V)

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. Uloga aminoacil-tRNA-sintetaza u prijenosu genetičke informacije .....	1
1.1.1. <i>Supstrati aminoacil-tRNA-sintetaza</i> .....	3
1.1.2. <i>Mehanizam aminoacilacije</i> .....	4
1.1.3. <i>Kinetika enzimski kataliziranih reakcija</i> .....	6
1.2. Podjela i građa aminoacil-tRNA-sintetaza .....	7
1.2.1. <i>Aminoacil-tRNA-sintetaze razreda I</i> .....	8
1.2.2. <i>Aminoacil-tRNA-sintetaze razreda II</i> .....	10
1.2.3. <i>Prepoznavanje supstrata</i> .....	11
1.3. Arginil-tRNA-sintetaza .....	11
<b>2. HIPOTEZA</b> .....	<b>13</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>16</b>
3.1. Materijali .....	16
3.1.1. <i>Standardne kemikalije</i> .....	16
3.1.2. <i>Aminokiseline i nukleotidi</i> .....	17
3.1.3. <i>Enzimi i ostali proteini</i> .....	17
3.1.4. <i>Boje</i> .....	17
3.1.5. <i>Ostale kemikalije i komercijalni kompleti</i> .....	17
3.1.6. <i>Puferi</i> .....	18
3.1.7. <i>Sojevi i plazmidi bakterije Escherichia coli</i> .....	20
3.2. Metode .....	21
3.2.1. <i>Metode rada s proteinima</i> .....	21
3.2.1.1. <i>Otvaranje stanica soniciranjem</i> .....	21
3.2.1.2. <i>Afinitetna kromatografija</i> .....	21
3.2.1.3. <i>Gel-filtracija</i> .....	22
3.2.2. <i>Metode rada s tRNA</i> .....	23
3.2.2.1. <i>Izolacija RNA iz stanica domaćina</i> .....	23
3.2.2.2. <i>Odvajanje tRNA od nukleinskih kiselina većih molekulskih masa</i> .....	23
3.2.2.3. <i>Kromatografija ionske izmjene</i> .....	24
3.2.2.4. <i>Kromatografija obrnutih faza</i> .....	24
3.2.3. <i>Formiranje kompleksa MtArgRS:MttRNA<sup>Arg</sup></i> .....	25
3.2.3.1. <i>Nativna elektroforeza na poliakrilamidnom gelu</i> .....	25
3.2.3.2. <i>Bojenje srebrom</i> .....	26
3.2.3.3. <i>Izračun ravnotežnih konstanti disocijacije</i> .....	27

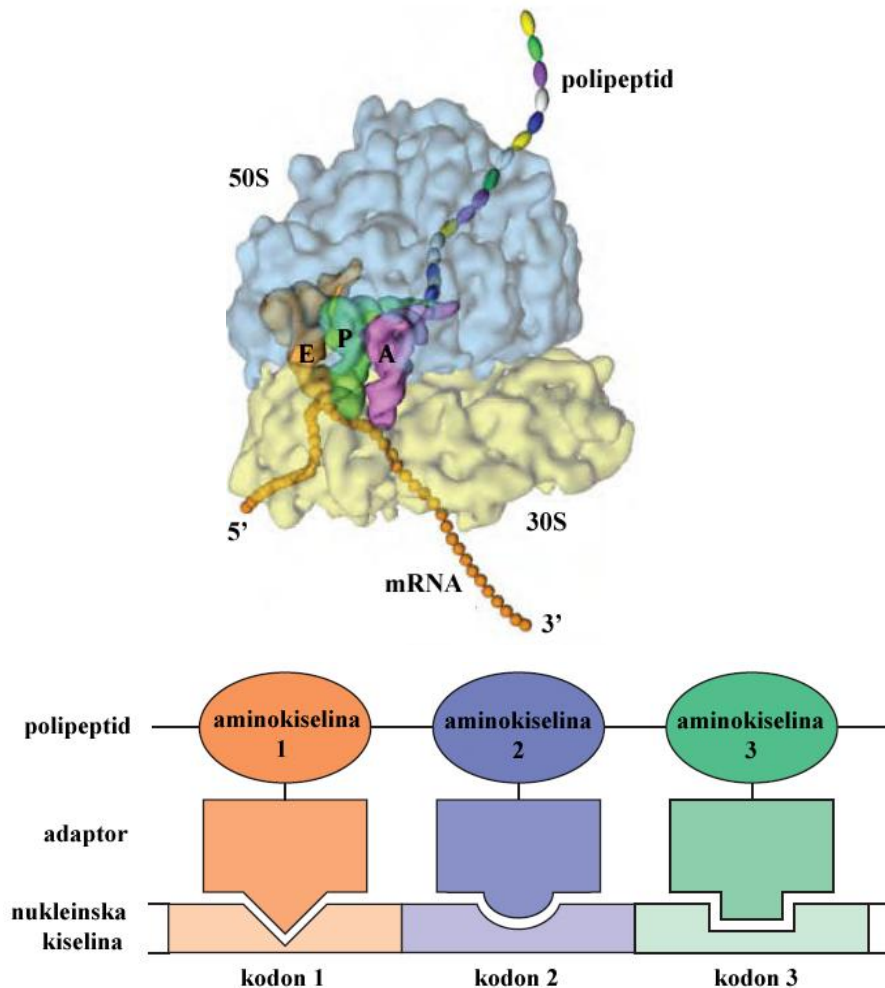
3.2.4. Ostale elektroforetske metode .....	28
3.2.4.1. Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u prisustvu SDS-a.....	28
3.2.4.2. Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u prisustvu ureje.....	29
3.2.4.3. Western-analiza.....	30
3.2.4.4. Elektroforeza na gelu agaroze .....	31
3.2.5. Enzimski kinetika.....	32
3.2.5.1. Određivanje akceptorske aktivnosti tRNA.....	32
3.2.5.2. Određivanje kinetičkih parametara $K_m$ i $k_{cat}$ .....	33
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>35</b>
4.1. Pročišćavanje divljeg tipa i skraćenih inačica MtArgRS .....	35
4.2. Optimiranje postupka pročišćavanja MttRNA <sup>Arg</sup> .....	38
4.3. Ispitivanje stabilnosti kompleksa MtArgRS:MttRNA <sup>Arg</sup> .....	48
4.3.1. Ravnotežne konstante disocijacije određene gel-retardacijskom elektroforezom .	48
4.3.1.1. Divlji tip MtArgRS.....	50
4.3.1.2. Deletant $\Delta N21$ MtArgRS .....	51
4.3.1.3. Deletant $\Delta N39$ MtArgRS .....	54
4.3.1.4. Deletant $\Delta N89$ MtArgRS .....	55
4.3.1.5. Deletant $\Delta N_{101}$ MtArgRS .....	56
4.3.2. Vezanje MtArgRS i heterologne tRNA domaćina.....	58
4.4. Kinetički parametri divljeg tipa i deletanata MtArgRS .....	59
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>61</b>
5.1. Izolacija biomakromolekula od interesa.....	61
5.2. N-terminalna domena MtArgRS .....	69
5.2.1. Konformacija N-terminalnih deletanata MtArgRS .....	69
5.2.2. Ravnotežne konstante disocijacije i kinetički parametri .....	72
5.2.3. Značaj N-terminalne domene u strukturi MtArgRS .....	75
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>78</b>
<b>7. POPIS LITERATURE.....</b>	<b>79</b>
<b>8. SAŽETAK.....</b>	<b>83</b>
<b>9. SUMMARY.....</b>	<b>85</b>
<b>10. ZAHVALE .....</b>	<b>87</b>
<b>11. ŽIVOTOPISI .....</b>	<b>88</b>

## **1. UVOD**

### **1.1. Uloga aminoacil-tRNA-sintetaza u prijenosu genetičke informacije**

Molekule deoksiribonukleinske kiseline (DNA) građene su od deoksiribonukleotida međusobno povezanih fosfodieterskim vezama i nalaze se u stanicama svih živih organizama. Značaj ovih molekula leži u činjenici da je samim slijedom nukleotida određena genetička informacija. Prijenos genetičke informacije ili ekspresija gena je proces pretvorbe informacije zadane navedenim slijedom u funkcionalne biomolekule poput proteina i molekula ribonukleinskih kiselina (RNA).

Prijenos genetičke informacije je od iznimne važnosti jer omogućava pravilnu i pravovremenu sintezu proteina (biomakromolekula građenih od aminokiselina međusobno povezanih peptidnim vezama) čije su uloge u stanicama brojne (enzimska kataliza, prijenos i pohrana malih molekula i iona, imunološka zaštita itd.). Prijenos genetičke informacije obuhvaća transkripciju i translaciju. Pojam transkripcije odnosi se na sintezu molekula RNA po uzoru na molekulu DNA. U provođenju transkripcije najzaslužniji enzim jest RNA-polimeraza, a molekule RNA nastale transkripcijom mogu se podijeliti na glasničke (mRNA), ribosomske (rRNA) i transportne (tRNA). Za razliku od prokariotskih, u eukariotskim stanicama molekule mRNA se dodatno dorađuju u vidu izrezivanja introna (sljedova nukleotida molekule DNA umetnutih između kodirajućih sljedova koji se transkribiraju i stoga postoje u transkriptu, ali se ne koriste tijekom translacije). Molekule tRNA i rRNA često prolaze kroz posttranskripcijsku doradu koja uključuje modifikaciju pojedinih, točno određenih, dušičnih baza ribonukleotida. Sve tri vrste transkripcijom sintetiziranih molekula RNA kasnije sudjeluju u procesu translacije, koji se može podijeliti na inicijaciju, elongaciju i terminaciju. Tijekom translacije slijed nukleotida molekule mRNA prevodi se u slijed aminokiselina proteina. Na makromolekulskom kompleksu (ribosom) sastavljenom od proteina i molekula rRNA dolazi do vezanja molekule mRNA. Sljedove od po tri nukleotida molekule mRNA (kodone) prepoznaju tri komplementarna nukleotida molekule tRNA (antikodoni), a istovremeno je na suprotnom kraju molekule tRNA vezana pripadna aminokiselina. Nastanak peptidne veze između dviju aminokiselina dovedenih na ribosom uz pomoć odgovarajućih molekula tRNA katalizira peptidil-transferaza, ribozim koji se javlja kao sastavni dio ribosoma, a prikaz sinteze polipeptida dan je na slici 1.1 gore. Dakle, točna sinteza proteina prema na ribosomu vezanoj molekuli mRNA ovisi o prisutnosti ispravno aminoacilirane tRNA, što je prvi iznio Francis Crick te je poznato kao hipoteza adaptora (slika 1.1 dolje).



Slika 1.1. (gore) Prikaz biosinteze polipeptida na ribosomu. Na slici su istaknute 30S i 50S podjedinice ribosoma, molekula mRNA s označenim 3' i 5'-krajem, tri molekule tRNA (ljubičasto, zeleno i narančasto) u mjestima A, P i E ribosoma te nastajući polipeptidni lanac.<sup>[1]</sup> (dolje) Shematski prikaz donošenja ispravnih aminokiselina na ribosom. Molekule tRNA služe kao adaptori čiji antikodon s jedne strane stvara interakcije s kodonom mRNA, dok je na suprotnoj strani vezana aminokiselina do čije ugradnje u polipeptidni lanac treba doći.<sup>[2]</sup>

Jednu od ključnih uloga u prijenosu genetičke informacije imaju enzimi koji kataliziraju nastanak kovalentne veze između molekule tRNA i pripadne aminokiseline. Proces se naziva aminoacilacija, a enzimi koji u njemu sudjeluju zajednički se nazivaju aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS; ako se primjerice radi o aminoacil-tRNA-sintetazi koja katalizira stvaranje esterske veze između aminokiseline arginina i tRNA specifične za ovu aminokiselinu,  $tRNA^{Arg}$ , tada se ime enzima skraćeno zapisuje kao ArgRS ili RRS prema ustanovljenim kraticama ove aminokiseline). Važnost aaRS leži u činjenici da povezuju aminokiselinu upravo s onom tRNA koja sadrži antikodon komplementaran kodonu koji



određuje tu aminokiselinu. Drugim riječima, aaRS su jedini enzimi koji čitaju genetički kod i stoga je njihova točnost prilikom katalize neophodna za točnu biosintezu proteina.

### 1.1.1. Supstrati aminoacil-tRNA-sintetaza

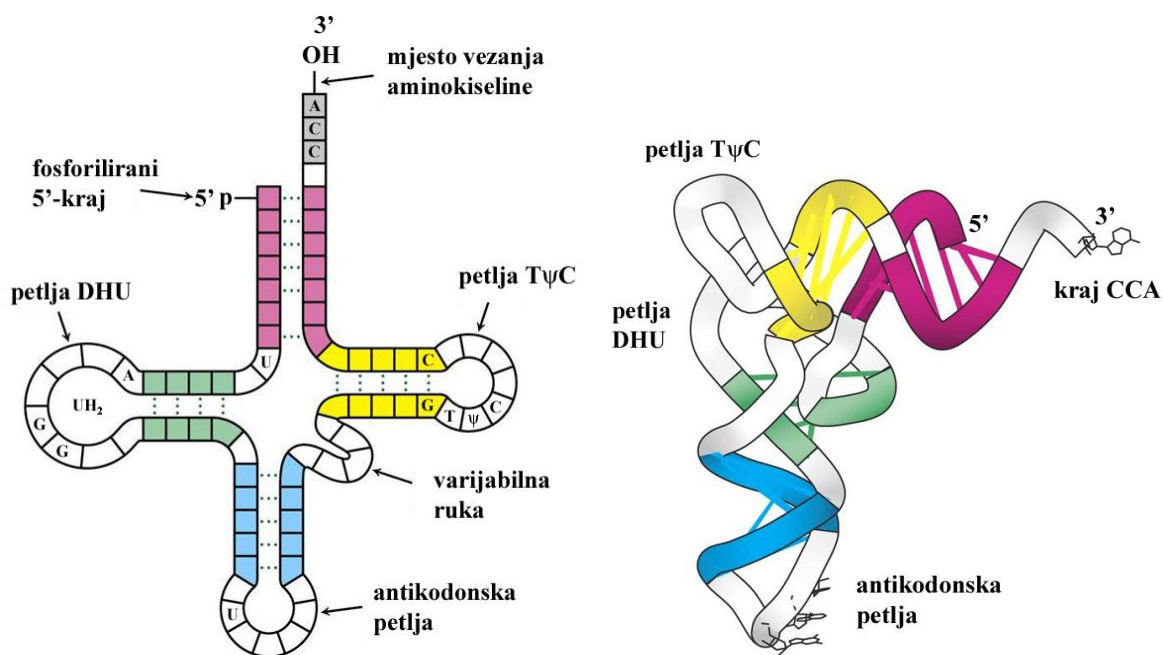
Molekula adenzin-5'-trifosfata (ATP), određena aminokiselina i pripadna molekula tRNA supstrati su aminoacil-tRNA-sintetaza.<sup>[1]</sup>

ATP se sastoji od riboznog prstena na koji je N- $\beta$ -glikozidnom vezom na prvi ugljikov atom vezan N-9 dušikov atom dušične baze adenina, a na hidrosilnoj skupini petog ugljikovog atoma riboznog prstena vezane su tri fosfatne skupine međusobno povezane fosfoanhidridnim vezama. Aktivan oblik ATP-a je obično njegov kompleks s manganovim ( $Mn^{2+}$ ) ili magnezijevim ( $Mg^{2+}$ ) ionom te je kao molekula vrlo često korišten u metabolizmu u sprezi s drugim reakcijama zahvaljujući svojoj izrazito egzergonoj reakciji hidrolize.<sup>[1]</sup> Kompleksni spoj ATP-a i  $Mg^{2+}$  koristi se i u reakciji koju kataliziraju aaRS.<sup>[3]</sup>

U sastav proteina ulazi dvadeset standardnih aminokiselina i neke nestandardne aminokiseline (selenocistein (Sel) i pirolizin (Pyl)) – do njihove ugradnje u polipeptidne lance dolazi uz pomoć molekula tRNA kako je prethodno opisano. Ostale nestandardne aminokiseline u sastavu proteina nastale su posttranslacijskim modifikacijama standardnih aminokiselina koje su prethodno ugrađene u protein (npr. hidroksiprolin u kolagenu). Nestandardne aminokiseline koje ne ulaze u sastav polipeptida imaju druge uloge u metabolizmu te su često intermedijeri u metaboličkim putevima standardnih aminokiselina. Aminokiseline koje grade proteine uobičajeno su  $\alpha$ -aminokiseline, što znači da na ugljikovom atomu na koji je vezana karboksilna skupina ( $\alpha$ -ugljikov atom) imaju vezanu i amino skupinu. Ove se molekule međusobno razlikuju prema bočnom ogranku vezanom na  $\alpha$ -ugljikov atom, koji je u slučaju nekih aminokiselina jednostavan alikilni lanac, dok u drugim slučajevima može sadržavati dodatne funkcionalne skupine poput amidne, amino, hidrosilne, karboksilne ili tiolne skupine. Upravo o kemijskoj građi bočnog ogranka ovisi velik broj svojstava prema kojima se pojedine aminokiseline međusobno razlikuju.

Iako se molekule tRNA međusobno razlikuju, postoje određene strukturne karakteristike koje su svima zajedničke, što nije iznenađujuće s obzirom da molekule tRNA na sličan način moraju stvarati interakcije s ribosomom i proteinima koji sudjeluju u translaciji. Sve poznate molekule tRNA jednolančane su polinukleotidne molekule duljine lanca između 73 i 93 ribonukleotida, od čega tipično između 7 i 15 posjeduje na neki način modificiranu bazu. Dio lanca postoji u obliku petlji, dok se otprilike pola od ukupnog broja ribonukleotida sparuje tvoreći dvolančane regije. Sekundarna struktura molekula tRNA

slikovito se opisuje kao „djetelina“, dok je ukupan raspored atoma u prostoru, tj. terciarna struktura, oblika slova L (slika 1.2). U strukturi tRNA javljaju se tri petlje ili omče<sup>[1]</sup> (jednolančani dio molekule određen jednom sparenom regijom), redom od 5'-kraja prema 3'-kraju to su DHU<sup>[1]</sup> (ili D<sup>[4]</sup>), antikodonska i T $\psi$ C. Petlja DHU je dobila ime prema neuobičajenoj bazi u svojoj strukturi (dihidrouridinu), dok T $\psi$ C posjeduju neuobičajene baze ribotimidin (T) i pseudouridin ( $\psi$ ).<sup>[4]</sup> Potonje dvije petlje doprinose interakcijama važnim za ispravno smatanje tRNA, a T $\psi$ C također stvara interakcije s velikom podjedinicom rRNA.<sup>[4]</sup> 5'-kraj molekule tRNA je fosforilirani, a molekula završava slijedom nukleotida 5'CCA3' na samom 3'-kraju. Ovaj je slijed izuzetno važan u reakciji aminoacilacije. Dvolančani dijelovi tRNA nazivaju se peteljka, od kojih treba istaknuti akceptorsku (sparene baze sa samog početka i kraja lanca, izuzevši 5'CCA3') i antikodonsku peteljku (definira antikodonsku petlju). Dio molekule odgovoran za najveću varijaciju u veličini je tzv. varijabilna ruka smještena između antikodonske i peteljke T $\psi$ C.

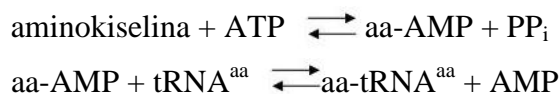


Slika 1.2. (lijevo) Prikaz sekundarne strukture molekule tRNA, tzv. „djetelina“. Dvolančani su dijelovi molekule (peteljke) istaknuti različitim bojama. Također su istaknuti položaji nekih tipičnih nukleotida te su navedeni nazivi pojedinih petlji. (desno) Tercijarna struktura molekule tRNA (korištene su iste boje kao i na prikazu lijevo).<sup>[1]</sup>

### 1.1.2. Mehanizam aminoacilacije

Aminoacil-tRNA-sintetaze kataliziraju nastanak esterske veze između ugljikovog atoma  $\alpha$ -karboksilne skupine aminokiseline i kisikovog atoma 3'-hidroksilne skupine riboznog prstena 3'-terminalnog ribonukleotida pripadne molekule tRNA. Mehanizam reakcije

aminoacilacije može se podijeliti na dva koraka: aktivaciju aminokiseline i prijenos aktivirane aminokiseline na pripadnu molekulu tRNA. Općenito se ta dva koraka mogu zapisati na sljedeći način.<sup>[3]</sup>



gdje je ATP adenzin-5'-trifosfat, aa-AMP aminoacil-adenilat, PP<sub>i</sub> pirofosfat, tRNA<sup>aa</sup> pripadna molekula tRNA i aa-tRNA<sup>aa</sup> aminoacilirana molekula tRNA.

Aktivacija aminokiseline odvija se uz pomoć ATP-a te u prisustvu iona Mg<sup>2+</sup> koji s ATP-om tvori kompleksni spoj. U ovom koraku jedan od α-karboksilnih kisikovih atoma aminokiseline napada α-fosforov atom iz kompleksa ATP-a s Mg<sup>2+</sup> čime nastaje pentakovalentni međuprodukt na α-fosforovom atomu što dovodi do inverzije konfiguracije ovog fosfata.<sup>[3]</sup> Nedavna istraživanja pokazala su da postoji važna razlika u mehanizmu aktivacijskog koraka između enzima koji pripadaju razredu I i II<sup>[5]</sup> (podjela aaRS na razrede i temelji iste detaljnije su opisani u nastavku uvoda, v. podnaslov 1.2). Naime, kod ispitanih sintetaza razreda I (podrazredi IA, IB i IC, s izuzetkom TrpRS) nukleofilni napad se odvija tako da *syn*-kisikov atom iz karboksilne skupine aminokiseline napadne α-fosforov atom molekule ATP-a, dok kod sintetaza razreda II (ispitane su sve aaRS razreda II osim SerRS, SepRS i PylRS, gdje je Sep kratica za fosfoserin) kao nukleofil djeluje *anti*-kisikov atom.<sup>[5]</sup> Ova razlika u mehanizmu aaRS posljedica je građe aktivnog mjesta enzima.<sup>[5]</sup> Naposljetku kao međuprodukt reakcije nastaje aminoacil-adenilat i oslobađa se pirofosfat (PP<sub>i</sub>). Veza koja nastaje između aminokiseline i adenzin-5'-monofosfata (AMP) u ovom koraku po prirodi je miješana anhidridna veza.

U drugom koraku aktivirana se aminokiselina prenosi na molekulu tRNA odgovarajućeg antikodona, točnije na njezin 3'-kraj koji uvijek sadrži slijed nukleotida 5'CCA3'. Reakcija se odvija tako što 2'-hidroksilna ili 3'-hidroksilna skupina ribozog prstena iz 3'-terminalnog adenilata nukleofilno napadne karbonilni ugljikov atom aminoacil-adenilata, pri čemu nastaje aminoacilirana tRNA i otpušta se AMP. Koja će od dvije hidroksilne skupine 3'-terminalnog nukleotida iz tRNA stvoriti estersku vezu s aminokiselinom ovisi o kojoj se aaRS radi – upravo ta razlika jedan je od mogućih temelja za podjelu ovih enzima na razrede, a prema njoj aaRS iz razreda I kataliziraju nastanak esterske veze na 2'-hidroksilnoj skupini tRNA, a aaRS razreda II (s iznimkom PheRS) na 3'-hidroksilnoj skupini.<sup>[3]</sup> Neovisno o tome na koju se hidroksilnu skupinu riboznog prstena aminokiselina prvotno veže, naposljetku se dobiva tRNA aminoacilirana na 3'-hidroksilnoj skupini (ukoliko se radi o aaRS koja prvotno

prenosi aminokiselinu na 2'-hidroksilnu skupinu, tada se aminokiselina reakcijom transesterifikacije prenosi na 3'-hidroksilnu skupinu).

Dodatna razlika u mehanizmima aminoacilacije aaRS razreda I i II jest u koraku koji određuje brzinu reakcije (najsporiji korak u mehanizmu reakcije). Dok je kod aaRS razreda I korak koji određuje brzinu reakcije u pravilu otpuštanje produkta s enzima, kod aaRS razreda II taj je korak povezan sa stvaranjem produkta na enzimu kao što je kinetičkim istraživanjima pokazano na primjerima CysRS i ValRS iz razreda I, AlaRS i ProRS iz razreda II<sup>[6]</sup> te prethodno na još šest aaRS.

Među aaRS postoje četiri obavezna ribonukleoproteinska enzima: GluRS, GlnRS, ArgRS i LysRS-I. Iako ovi enzimi mogu vezati aminokiselinu i/ili ATP, oni ne mogu katalizirati stvaranje aminoacil-adenilata ako na njih nije vezana pripadna tRNA. Vezanje molekule tRNA omogućava ispravno pozicioniranje bočnih ogranaka aminokiselina aktivnog mjesta, tako da tek prilikom vezanja tRNA dolazi do konformacijskih promjena nužnih za katalitičku aktivnost ovih aaRS.<sup>[3]</sup>

### 1.1.3. Kinetika enzimski kataliziranih reakcija

Učinkovitost enzima pri provođenju enzimski katalizirane reakcije moguće je opisati pomoću kinetičkih parametara. Različite vrste kinetičkih eksperimenata mogu dati uvid u način na koji enzim obavlja svoju funkciju (u smislu reakcijskog mehanizma) i u katalitičku aktivnost enzima u biološkim uvjetima. Pomiješa li se enzim sa supstratom u suvišku, kroz relativno kratak početni vremenski period koncentracija međuprodukta se povećava i naposljetku postiže neku konstantnu vrijednost. Vremenski period u kojem koncentracija međuprodukta raste naziva se predustaljenim stanjem, a onaj u kojem je promjena koncentracije međuprodukta u vremenu jednaka nuli naziva se ustaljenim stanjem.<sup>[7]</sup> Kinetički eksperimenti za praćenje dolaska u ustaljeno stanje izvedbeno su nešto zahtjevniji, ali pružaju uvid u specifičnosti mehanizma enzimski katalizirane reakcije. S druge strane, kinetikom ustaljenog stanja ne dobiva se uvid u mehanizam reakcije, međutim moguće je odrediti kinetičke parametre (Michaelisovu konstantu ( $K_m$ ) i obrtni broj ( $k_{cat}$ )) koji su složene funkcije koeficijenata brzina pojedinih koraka, ali su istovremeno i odraz aktivnosti enzima u fiziološkim uvjetima.

Kada je supstrat prisutan u velikom suvišku s obzirom na enzim, u početnom vremenu reakcije moguće je uvesti pretpostavku da je koncentracija supstrata približno jednaka početnoj, a koncentracija produkta približno nula zbog čega se povratna reakcija ne odvija. Pri ovakvim uvjetima, ovisnost koncentracija reaktanata i produkata o vremenu u općenitom je

slučaju linearna, pri čemu je nagib pravca jednak početnoj brzini reakcije.<sup>[7]</sup> Ovisnost brzine reakcije o koncentraciji supstrata uobičajeno se opisuje jednadžbom Michaelis-Menten koja glasi:

$$v_0 = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

gdje je  $v_0$  početna brzina reakcije,  $V_{\max}$  maksimalna brzina reakcije (limes funkcije kada koncentracija supstrata teži beskonačnosti),  $[S]$  početna koncentracija supstrata i  $K_m$  Michaelisova konstanta. Pretpostavi li se da je vezanje supstrata i enzima u brzoj ravnoteži, tada se na mjestu  $K_m$  u jednadžbi nalazi konstanta disocijacije kompleksa enzima sa supstratom. Parametar  $K_m$  predstavlja kumulativnu konstantu koja uključuje koeficijente brzina reakcija zasebnih koraka reakcijskog mehanizma i moguće je pokazati kako je uvijek jednak koncentraciji supstrata pri kojoj se postiže polovica maksimalne brzine reakcije.<sup>[1,7]</sup> Iako  $K_m$  nije jednak konstanti disocijacije kompleksa enzima sa supstratom, ponekad se interpretira upravo kao mjera afiniteta enzima prema supstratu<sup>[8]</sup>; općenito vrijedi da je  $K_m$  prividna konstanta disocijacije koju se može promatrati kao ukupnu konstantu disocijacije svih molekulskih vrsta u kojima enzim stvara interakcije sa supstratom, produktom ili nekim modificiranim oblikom istih.<sup>[7]</sup> Također je eksperimentalno pokazano da za mnoge enzime  $K_m$  predstavlja aproksimaciju koncentracije supstrata *in vivo*.<sup>[1]</sup> Drugi važan katalitički parametar je obrtni broj,  $k_{\text{cat}}$ , koji je jednak omjeru maksimalne brzine reakcije,  $V_{\max}$ , i ukupne množinske koncentracije enzima prisutnog u reakciji. Parametar  $k_{\text{cat}}$  predstavlja broj molekula supstrata koje molekula enzima prevede u molekule produkta u jedinici vremena u uvjetima zasićenja enzima supstratom.<sup>[1]</sup>

### 1.2. Podjela i građa aminoacil-tRNA-sintetaza

Aminoacil-tRNA-sintetaze su enzimi odgovorni za dekodiranje genetičkog koda u svim živim stanicama. Univerzalnost genetičkog koda govori u prilog tome da su aaRS jedni od najstarijih enzima koji su preuzeli funkciju nekadašnjih ribozima. Ovisno o aminokiselini čiji prijenos na pripadnu tRNA kataliziraju, aaRS se dijele na 24 obitelji<sup>[3]</sup> koje su svrstane u dva razreda. Podjela na razrede tijekom povijesti istraživanja ovih enzima nije bila jedinstvena, pa se tako može napraviti na temelju specifičnih strukturnih motiva u smislu slijeda aminokiselina prisutnih u pojedinim enzimima (KMSKS i HIGH kod razreda I u sklopu Rossmannovog nabora, odnosno kod enzima razreda II radi se o tri motiva u sklopu antiparalelene  $\beta$ -ploče što je detaljnije opisano u nastavku poglavlja)<sup>[2,9]</sup>, na temelju hidroksilne skupine 3'-terminalnog nukleotida tRNA na koju se prenosi aminokiselina<sup>[4]</sup>, na

temelju mehanizma odnosno kinetike reakcije<sup>[6]</sup> ili na temelju orijentacije tRNA prilikom vezanja na aaRS<sup>[10]</sup>. U ovom je poglavlju korištena potonja podjela, iako treba napomenuti da pojedini enzim često pripada istom razreda u više različitih podjela (enzimi jednog razreda nerijetko imaju više zajedničkih svojstava). U sklopu te podjele aaRS se dijele na dva razreda s obzirom na način vezanja tRNA, što znači da ili mali ili veliki utror dvostruko zavijene akceptorske peteljke tRNA može biti orijentiran prema enzimu prilikom vezanja – aaRS razreda I čini ukupno 11 obitelji enzima podijeljenih u pet podrazreda, a aaRS razreda II 13 obitelji enzima podijeljenih u tri podrazreda. Analogan način obavljanja funkcije ovih enzima govori u prilog evolucijskoj konvergenciji jer su kod svih enzima istog razreda topologija katalitičke domene i pojedini strukturni motivi aktivnog mjesta ostali očuvani.<sup>[3]</sup> Međutim, s obzirom da se za razliku od molekula tRNA, karakteriziranih sekundarnom strukturom „djeteline“ te tercijarnom strukturom oblika slova L, kod aaRS iz dvaju razreda ne mogu pronaći tolike strukturne sličnosti, javilo se mišljenje da su enzimi razreda I i II nekada činili nezavisne translacijske sustave (svaki za po deset aminokiselina) koji su naknadno spojeni omogućivši sintezu proteina pomoću cjelokupnog seta od dvadeset aminokiselina.<sup>[11]</sup> Takvo mišljenje ipak mora biti odbačeno budući da katalitički strukturni motivi jednog razreda sadrže aminokiseline za čije su uključivanje u polipeptidni lanac zaduženi enzimi drugog razreda.<sup>[11]</sup>

Neke eukariotske aaRS posjeduju dodatne domene. Pojedininim enzimima one su potrebne radi asocijacije u multi-tRNA-sintetazne komplekse čije formiranje pogoduje efikasnijoj sintezi proteina. Dodatne domene također mogu osigurati enzimu obavljanje nekih novih funkcija, primjerice ljudske citoplazmatske LeuRS i GlnRS služe kao senzori koji pokreću staničnu smrt ovisnu o glutaminu. Budući da se aaRS također mogu povezati s nekim ljudskim bolestima, ispitivanje i razumijevanje uloga dodatnih domena od velike je važnosti. Poznato je da dodatne domene mogu poboljšati kinetiku aminoaciliranja i da nove funkcije mogu djelomično ovisiti o kanonskim domenama.<sup>[3]</sup>

### *1.2.1. Aminoacil-tRNA-sintetaze razreda I*

Na temelju poravnanja aminokiselinskih sljedova, odnosno strukturne sličnosti, aaRS razreda I dodatno se dijele na podrazrede IA (MetRS, LeuRS, IleRS, ValRS), IB (CysRS, GlnRS, GluRS), IC (TyrRS, TrpRS), ID (ArgRS) i IE (LysRS-I).<sup>[3]</sup> ArgRS je tipična aaRS razreda I i nalazi se u zasebnom podrazredu. S druge strane, LysRS je zanimljiva zbog činjenice da krši pravilo o razredima, tj. nalazi se u oba razreda zbog čega je ovdje označena kao LysRS-I. Za razliku od LysRS-II, enzim LysRS-I je nastao prvi te se ne nalazi kod eukariota. Enzimi ovog

razreda redom su monomerni s izuzetkom podrazreda IC čiji enzimi MetRS i CysRS mogu postojati u monomernom i dimernom obliku.

Kod aaRS razreda I katalitičke domene poprimaju oblik poznat pod nazivom Rossmannov nabor (RF od eng. *Rossmann fold*) prema Michaelu Rossmannu koji je prvi put istaknuo značaj ovog strukturnog oblika.<sup>[2,3]</sup> Općenito govoreći, radi se o otvorenoj  $\beta$ -ploči, jednoj od čestih strukturnih domena globularnih proteina. Gotovo svi takvi proteini imaju ulogu enzima i mnogi od njih vežu mononukleotide ili dinukleotide.<sup>[2]</sup> U konkretnom slučaju aaRS razreda I, domena je smještena blizu N-terminalnog dijela polipeptidnog lanca te se radi o paralelnoj  $\beta$ -ploči od pet niti povezanih  $\alpha$ -zavojnica. Svi enzimi razreda I posjeduju dodatnu domenu umetnutu u RF, tzv. povezujući peptid I (CPI) koji kod monomernih enzima ovog razreda ima ulogu vezanja jednolančanog 3'-kraja molekule tRNA. Kod dimernih enzima ovog razreda (podrazred IC), umetnuti peptid služi kao sučelje dimera. Kod podrazreda IA (s iznimkom MetRS), ova domena umetnuta u RF je relativno velika i služi kao dodatno katalitičko mjesto za hidrolizu pogrešno aminoacilirane tRNA. Kao zanimljiv primjer može se spomenuti ljudska mitohondrijska LeuRS s mutacijama u hidrolitičkom mjestu zbog čega je ono izgubilo ulogu u popravku pogrešaka, međutim enzim je zadržao CPI domenu te je kinetičkim mjerenjima pokazano da njeno zadržavanje u strukturi enzima omogućava bolju diskriminaciju aminokiselina u aminoacilacijskom aktivnom mjestu.<sup>[12]</sup>

C-terminalne domene razlikuju se među enzimima, a njihova uloga je (s iznimkom LeuRS) vezanje antikodona tRNA. Domena koja stvara interakcije s antikodonom tRNA nije očuvana čak ni između aaRS istog razreda; različite aaRS razvile su specifične strukturne elemente sa svrhom specifičnog prepoznavanja pripadne tRNA.<sup>[13]</sup>

Kod svih aaRS razreda I također postoje dodatni segmenti, osobito u terminalnim područjima polipeptidnih lanaca te unutar i oko Rossmannovog nabora. Za vezanje ATP-a ovi enzimi koriste dva sačuvana motiva: HIGH (His-Ile-Gly-His) na prvoj polovici RF i KMSKS (Lys-Met-Ser-Lys-Ser) na petlji smještenoj neposredno nakon RF. Pogodna orijentacija pomične petlje koja sadrži KMSKS motiv od velike je važnosti za stabilizaciju međuprodukta nastalog u prvom koraku reakcije aminoaciliranja kod aaRS razreda I. Enzim sudjeluje velikim dijelom svoje površine u vezanju tRNA, pa se tako u slučaju devet monomernih aaRS tRNA veže na enzim od dijela koji prepoznaje antikodonsku peteljku pa sve do aktivnog mjesta. Osim već spomenutog prepoznavanja jednolančanog 3'-kraja tRNA od strane CPI, RF može vezati akceptorsku peteljku tRNA sa strane manjeg utora. Iznimka su dimerni enzimi ovog razreda, podrazred IC, koji vežu akceptorsku peteljku tRNA sa strane velikog utora; takvo je ponašanje inače tipično za enzime razreda II. Prilikom vezanja na aaRS, molekula

tRNA mijenja svoju konformaciju, posebno u području antikodona te na 3'-kraju koji poprima oblik ukosnice kako bi se prilagodio aktivnom mjestu. Unatoč tome, općeniti L-oblik molekule tRNA ostaje očuvan tijekom vezanja. Zanimljiv primjer drugačijeg vezanja tRNA kod enzima razreda I nalazimo kod nekih bakterija i arheja čije MetRS posjeduju dodatnu C-terminalnu domenu zaslužnu za dimerizaciju enzima i povišenje afiniteta prema tRNA. Dimer MetRS tako može vezati dvije molekule tRNA, a samo je vezanje antikooperativno.<sup>[3]</sup>

Kao što je navedeno u sklopu opisa mehanizma aminoacilacije, postoje četiri aaRS koje aktivaciju aminokiseline kao prvi korak reakcije mogu izvršiti samo ukoliko je na njih vezana tRNA. Vidljivo je da se bez iznimke radi o monomernim enzimima razreda I. Moguće je da porijeklo takve razlike među enzimima razreda I proizlazi iz interakcija katalitičke domene s perifernim strukturnim motivima te se na taj način povezuju vezanje tRNA na enzim i formiranje aktivnog mjesta. Nepoznavanje točnog mehanizma zbog kojeg postoji ova ovisnost katalitičke aktivnosti nekih aaRS o vezanju tRNA predstavlja zasad neriješen problem.<sup>[3]</sup>

### 1.2.2. Aminoacil-tRNA-sintetaze razreda II

Analogno načinu podjele enzima razreda I u podrazrede, enzimi razreda II također se mogu podijeliti na podrazrede IIA (SerRS, ProRS, ThrRS, GlyRS, HisRS), IIB (AspRS, AsnRS, LysRS-II) i IIC (PheRS, AlaRS, GlyRS, SepRS, PylRS).<sup>[3]</sup> Enzimi ovog razreda međusobno su mnogo različitiji od enzima razreda I. Većinom se radi o dimerima, iako postoje monomeri, homotetrameri i tetrameri tipa ( $\alpha\beta$ )<sub>2</sub>.

Katalitička domena aaRS razreda II poprima oblik antiparalelne  $\beta$ -ploče sastavljene od sedam niti i okružene  $\alpha$ -zavojnica.<sup>[3,9]</sup> Kao i kod aaRS razreda I, na katalitičku domenu ovih enzima vežu se ATP, aminokiselina i 3'-kraj tRNA. Domena s aktivnim mjestom posjeduje tri očuvana motiva od kojih jedan služi kao sučelje dimera, drugi za vezanje ATP-a, a treći spreže vezanje aminokiseline, ATP-a i 3'-kraja tRNA. Potonji motiv nema analoga u razredu I. Kako je prethodno spomenuto, svi enzimi razreda II imaju zajednički način vezanja tRNA na način da je veliki utor dvostruke zavojnice akceptorske peteljke orijentiran prema katalitičkoj domeni. Za razliku od aaRS razreda I, dio enzima razreda II ne stvara interakcije s antikodonskom petljom tRNA (npr. AlaRS i SerRS).<sup>[2]</sup> Budući da je samo sedam od trinaest aaRS razreda II kokristalizirano s tRNA, može se reći da strukturne informacije vezane uz stvaranje interakcija tRNA i enzima nisu dostupne u onoj mjeri u kojoj je to slučaj s aaRS razreda I gdje postoje s tRNA kokristalizirani svi enzimi osim LysRS-I i jedne GluRS.<sup>[3]</sup>



### 1.2.3. Prepoznavanje supstrata

Prilikom rada aaRS od iznimne je važnosti spajanje pripadne tRNA s ispravnom aminokiselinom kako bi u konačnici nastao polipeptid slijeda aminokiselina zadanog slijedom nukleotida u DNA. Upravo zbog toga nameće se važnost ispravnog odabira supstrata od strane aaRS; u tom pogledu problematičniji supstrat je aminokiselina. Naime, aminokiseline su relativno male i međusobno poprilično slične molekule zbog čega pojedini enzimi imaju problema s odabirom ispravne. Iz tog razloga mnoge aaRS posjeduju neki od mehanizama za popravak pogreške (spomenuto u sklopu podnaslova 1.2.1). Primjer enzima koji ne treba, te stoga i ne posjeduje mehanizam za popravak pogrešaka, jest CysRS koja građom aktivnog mjesta omogućava specifičan izbor aminokiseline cisteina.<sup>[14]</sup> Naravno, pritom treba uzeti u obzir posebnost cisteina kao jedine standardne aminokiseline koja sadrži atom sumpora u bočnom ogranku.

Stvaranje kompleksa aaRS i tRNA u pravilu uzrokuje konformacijske promjene obje molekule.<sup>[15]</sup> Više različitih molekula tRNA može biti aminoacilirano istom aminokiselinom uz pomoć određene aaRS; takva skupina molekula tRNA naziva se izoakceptorskom porodicom. Molekule tRNA koje pripadaju istoj izoakceptorskoj porodici posjeduju strogo očuvane nukleotide na određenim pozicijama kako bi specifično mogle stvoriti interakcije s aaRS; očuvani nukleotidi nazivaju se identitetnim elementima i općenito se mogu podijeliti na pozitivne i negativne.<sup>[15]</sup> Kao pozitivni identitetni elementi javljaju se nukleotidi u jednolančanim regijama tRNA, spareni nukleotidi i strukturni motivi.<sup>[15]</sup> Očuvani nukleotidi se tipično nalaze u antikodonskoj peteljci i petlji te na akceptorskoj peteljci.<sup>[16]</sup> Naime, na temelju kristalnih struktura kompleksa aaRS s tRNA uočeno je da enzim tvori interakcije u obliku vodikovih veza sa skupinama smještenim u jednom ili oba navedena dijela tRNA, te ponekad s varijabilnom rukom, dok se spoj petlji T $\psi$ C i D proteže od enzima. Kao zanimljivost treba spomenuti prepoznavanje elemenata D-petlje koje je primijećeno kod tri molekule tRNA (tRNA<sup>Ile</sup>, tRNA<sup>Phe</sup> i tRNA<sup>Arg</sup>)<sup>[16]</sup>, a prvi je put uočeno na primjeru kristalne strukture kvaščeve ArgRS u kompleksu s pripadnom tRNA<sup>[17]</sup>.

### 1.3. Arginil-tRNA-sintetaza

Enzim arginil-tRNA-sintetaza pripada zasebnom podrazredu aminoacil-tRNA-sintetaza razreda I. Riječ je o monomernom enzimu koji provodi reakciju arginilacije izoakceptorskih molekula tRNA<sup>Arg</sup> čiji su antikodoni komplementarni kodonima CGU, CGC, CGA, CGG, AGA i AGG molekula mRNA.<sup>[1]</sup>

U bazi podataka PDB<sup>[18]</sup> koja sadrži eksperimentalno riješene tercijarne strukture biomakromolekula može se pronaći tek nekolicina kristalnih struktura samih ArgRS ili u kompleksu s nekim od supstrata. Tako su dosad riješene i u znanstvenim člancima objavljene tri strukture eukariotske ArgRS iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, ScArgRS (same<sup>[19]</sup>, u kompleksu s tRNA<sup>Arg</sup> te tRNA<sup>Arg</sup> i L-argininom<sup>[17]</sup>), dvije strukture bakterijskih enzima (iz bakterije *Thermus thermophilus*<sup>[20]</sup>, TtArgRS, i iz bakterije *Escherichia coli*<sup>[21]</sup>, EcArgRS), te dvije strukture arhejske ArgRS iz arheje *Pyrococcus horikoshii*, PhArgRS (u kompleksu s tRNA<sup>Arg</sup> te tRNA<sup>Arg</sup> i analogom ATP-a<sup>[22]</sup>). Svi enzimi su monomerni i sadrže približno šesto aminokiselina (607 aminokiselina u slučaju ScArgRS, 592 aminokiseline kod TtArgRS, 578 aminokiselina kod EcArgRS i 629 kod PhArgRS).<sup>[17,20-22]</sup> ArgRS iz organizma *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (MtArgRS) nije kristalizirana, međutim genom ove arheje je sekvenciran te je na temelju njega poznat aminokiselinski slijed njene arginil-tRNA-sintetaze.<sup>[23]</sup>

Na primjeru riješene kristalne strukture ScArgRS vidljivo je kako enzim stvara interakcije s antikodonskom petljom, D-petljom i peteljkom te akceptorskom peteljkom i 3'-krajem molekule tRNA.<sup>[17]</sup> Pritom se nukleotid D20 specifičan za kvasac (molekule tRNA ostalih organizama na tom mjestu imaju A20) smješta u blizinu nekolicine aminokiselina N-terminalne domene enzima. Zabilježeno je međutim da mutacije spomenutih aminokiselina u alanin ne uzrokuju promjenu katalitičkih parametara reakcije aminoacilacije, iz čega je izveden zaključak da N-terminalna domena ArgRS nije ključna za vezanje pripadne tRNA.<sup>[24]</sup> Istovremeno, mutacije analognih ogranaka TtArgRS uzrokuju primjetan porast vrijednosti Michaelisove konstante i pad maksimalne brzine enzimske katalizirane reakcije što upućuje na katalitičku važnost ovih ogranaka.<sup>[22]</sup> Kod arhejskog je sustava na temelju kristalne strukture PhArgRS pretpostavljeno postojanje hidrofobnih efekata između aminokiselina N-terminalne domene i nukleotida G19 i A20 molekule tRNA, međutim visoke vrijednosti prosječnih *B*-faktora ogranaka N-terminalne domene upućuju na to da D-petlja ne stvara jake interakcije s N-terminalnom domenom.<sup>[22]</sup> Također je zabilježeno da delecija N-terminalne domene PhArgRS ne uzrokuje značajnije promjene u katalitičkoj aktivnosti ovog enzima.<sup>[22]</sup>

### 2. HIPOTEZA

Vjernost biosinteze proteina očuvana je točnim aminoaciliranjem molekule tRNA pripadnom aminokiselinom te dekodiranjem mRNA na ribosomu. Stoga je od ključne važnosti da enzimi aminoaciliranje tRNA, aminoacil-tRNA-sintetaze, s visokom specifičnošću esterificiraju pripadnu tRNA odgovarajućom aminokiselinom s obzirom da je interakcija antikodona tRNA i kodona mRNA temelj za ugradnju određene aminokiseline u rastući polipeptidni lanac. Pogreške u aminoaciliranju, a posljedično i u primarnoj strukturi proteina, mogu dovesti do nastanka nefunkcionalnih molekula. Točnost rada aminoacil-tRNA-sintetaza osigurava se prepoznavanjem identitetnih elemenata molekule tRNA (nukleotida na točno određenim pozicijama) od strane enzima, kao i odabirom ispravne aminokiseline. U slučaju sustava arginil-tRNA-sintetaze, većina identitetnih elemenata smještena tRNA<sup>Arg</sup> je u akceptorskoj peteljci, antikodonskoj petlji i varijabilnoj ruci, uz dodatak diskriminatorne baze kod 3'-kraja te nukleotida u D-petlji.<sup>[16]</sup> Istovremeno, na temelju poznate kristalne strukture kompleksa ScArgRS s argininom i poravnanja aminokiselinskog slijeda kvašćevog proteina sa sljedovima ArgRS drugih organizama pretpostavljen je univerzalan način prepoznavanja ovog supstrata od strane ArgRS koji se temelji na interakcijama s aminokiselinama aktivnog mjesta proteina potpuno očuvanih u svim ArgRS (Asp351, Asn153 i Tyr347 u slučaju ScArgRS).<sup>[19]</sup>

Aktivno mjesto enzima arginil-tRNA-sintetaze podliježe drastičnim konformacijskim promjenama koje nastupaju po vezanju pripadne molekule tRNA<sup>Arg</sup> zbog čega vezanje malih supstrata, na način koji bi omogućio početak enzimski katalizirane reakcije, nije moguće bez prethodnog formiranja ribonukleoproteinskog kompleksa ArgRS:tRNA<sup>Arg</sup>.<sup>[17,25]</sup> Dakle, prvi korak (tj. nastajanje aminoacil-adenilata) u mehanizmu reakcije katalizirane od strane ovog enzima nije moguć ukoliko supstrat drugog koraka (tRNA<sup>Arg</sup>) prethodno nije ispravno pozicioniran te u mogućnosti stvaranja interakcija s enzimom. Jedan od kritičnih dijelova tRNA<sup>Arg</sup> odgovornih za prepoznavanje ArgRS je njena D-petlja koja stupa u interakciju s N-terminalnom domenom enzima. Riječ je o globularnoj domeni miješane  $\alpha\beta$ -topologije povezane s ostatkom enzima putem fleksibilne omče.

Tijekom 2012. godine provedeno je istraživanje arginil-tRNA-sintetaze iz arheje *Methanothermobacter thermautotrophicus* s ciljem ispitivanja uloge N-terminalne regije ovog enzima u vezanju pripadne molekule tRNA te u vezanju makromolekulskog proteinskog partnera MtSerRS. U istraživanju su korištene varijante ovog enzima s različitim delecijama N-kraja proteina. Uklanjanjem elemenata N-terminalne domene enzima smanjena je sposobnost arhejske ArgRS za stvaranje interakcija s MtSerRS, kao i za prepoznavanje

heterolognih molekula tRNA<sup>Arg</sup> iz bakterije *E. coli*. Kako bi se dobio prikladan homologni supstrat u vidu molekula tRNA<sup>Arg</sup> iz arheje *M. thermoautotrophicus*, optimirana je proizvodnja rekombinantnih molekula MttRNA<sup>Arg</sup> heterolognom ekspresijom u *E. coli* te njeno pročišćavanje pomoću slabog anionskog izmjenjivača.

Do sada je relativno malen broj istraživanja posvećen ispitivanju utjecaja pojedinih elemenata ArgRS u prepoznavanju pripadnih molekula tRNA<sup>[20,24]</sup>, dok je nešto veći broj istraživanja bio usmjeren na ispitivanje značaja pojedinih identitetnih elemenata tRNA<sup>Arg</sup> u stvaranju interakcija s enzimom<sup>[26-29]</sup>. Unatoč tome što je usporedbom kristalne strukture kvaščeve ArgRS u slobodnom obliku i u kompleksu s tRNA primijećen pomak zavojnice H1, biokemijska uloga ovog elementa sekundarne strukture enzima nikad nije potvrđena. Sudeći prema kristalnoj strukturi kompleksa ArgRS iz arheje *Pyrococcus horikoshii* i tRNA<sup>Arg</sup>, N-terminalna domena enzima ostvaruje brojne interakcije s D-petljom molekule tRNA, međutim autori su izvijestili da uklanjanjem N-terminalne domene iz PhArgRS ne dolazi do promjene katalitičkih parametara.<sup>[22]</sup> Enzim MtArgRS pokazuje veliku sličnost na razini primarne strukture s enzimom PhArgRS te su oblici enzima MtArgRS skraćeni na N-kraju (korišteni u ovom radu) konstruirani korištenjem strukture nastale homolognim modeliranjem po uzoru na riješenu kristalnu strukturu PhArgRS. Za razliku od PhArgRS, enzim MtArgRS pokazuje bitno drastičnije posljedice po uklanjanju elemenata N-terminalne domene.

Smatra se da su u ranom stadiju molekulske evolucije interakcije među molekulama RNA zamijenjene interakcijama između proteina i molekula RNA, a ribonukleoproteinski katalizatori poput ribosoma u današnje vrijeme predstavljaju relikte.<sup>[30]</sup> Važnost ispitivanja načina rada makromolekula koje danas pokazuju osobine ribonukleoproteina stoga leži u činjenici da ona predstavljaju značajan korak u razumijevanju evolucije živog svijeta.

### Specifični ciljevi ovog rada su:

1. Izolirati divlji tip MtArgRS i četiri mutirane inačice (N-terminalni deletanti) istog u obliku varijanti sa heksahistidinskim privjeskom.
2. Izolirati rekombinantnu MttRNA<sup>Arg</sup><sub>CCU</sub> uzgojenu u ekspresijskom soju bakterije *Escherichia coli* i optimirati pročišćavanje kromatografijom obrnutih faza.
3. Ispitati stabilnost kompleksa MtArgRS:MttRNA<sup>Arg</sup><sub>CCU</sub> za divlji tip enzima i mutirane inačice metodom gel-retardacijske elektroforeze u nativnim uvjetima pri visokoj i niskoj ionskoj jakosti.
4. Kvantificirati stabilnost pojedinog kompleksa (pod 3.) određivanjem ravnotežnih konstanti disocijacije metodom gel-retardacijske elektroforeze.

## **§ 2. Hipoteza**

---

5. Usporedbom vrijednosti disocijacijskih konstanti (pod 4.) s kinetičkim parametrima dobivenim u reakciji aminoacilacije pri uvjetima ustaljenog stanja zaključiti jesu li elementi N-terminalne domene u mogućnosti prenijeti informaciju o sastavu D-petlje vezane molekule tRNA udaljenom aktivnom mjestu enzima.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Standardne kemikalije

agaroz (Sigma)

akrilamid (Sigma)

2-amino-2-hidroksimetilpropan-1,3-diol, Tris (Sigma)

amonijev persulfat, APS (Serva)

$\beta$ -merkaptoetanol (Sigma)

borna kiselina,  $B(OH)_3$  (Kemika)

1,4-di[2-(5-feniloksazolil)]benzen, POPOP (Calbiochem)

2,5-difeniloksazol, PPO (Merck)

ditiotreititol, DTT (Sigma)

dušična kiselina,  $HNO_3$ ,  $w = 65\%$  (Kemika)

etanol,  $EtOH$ ,  $\varphi = 96\%$  (Kemika)

etidijev bromid (Sigma)

etilendiamintetraoctena kiselina, EDTA (Kemika)

fenilmetilsulfonil-fluorid, PMSF (Sigma)

fenol (Kemika)

formaldehid (metanal),  $HCHO$  (Sigma)

glicerol,  $\varphi \approx 100\%$  (Gram-Mol)

glicin (Sigma)

imidazol (Sigma)

kalijev dikromat,  $K_2Cr_2O_7$  (Kemika)

klorovodična kiselina,  $HCl$ ,  $w = 36\%$  (Kemika)

kloroform,  $CHCl_3$  (Kemika)

magnezijev acetat,  $Mg(OAc)_2$  (Fluka)

magnezijev klorid,  $MgCl_2$  (Kemika)

metanol,  $CH_3OH$  (Carlo Erba)

N,N'-metilenbisakrilamid (Sigma)

N, N, N', N'-tetrametiletilendiamin, TEMED (Sigma)

N-(2-hidroksietil)piperazin-N'-2-etansulfonska kiselina, Hapes (Sigma)

natrijev acetat,  $NaOAc$  (Kemika)

natrijev dodecil-sulfat, SDS (Merck)

### § 3. Materijali i metode

---

natrijev karbonat, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (*Kemika*)

natrijev klorid, NaCl (*Gram-Mol*)

ledena octena kiselina, HOAc (*Kemika*)

polietilenglikol, PEG (*Sigma*)

srebrov(I) nitrat, AgNO<sub>3</sub> (*Kemika*)

toluen (*Zorka*)

triklorooctena kiselina, TCA (*Kemika*)

Tween20 (*Sigma*)

urea (*Kemika*)

#### 3.1.2. Aminokiseline i nukleotidi

adenozin-5'-trifosfat, ATP (*Sigma*)

[<sup>14</sup>C]arginin, [<sup>14</sup>C]Arg (*PerkinElmer*)

#### 3.1.3. Enzimi i ostali proteini

albumin goveđeg seruma, BSA (*BioLabs*)

monoklonska anti-polihistidinska antitijela proizvedena u mišu (*Sigma*)

poliklonska anti-mišja antitijela konjugirana peroksidazom iz hrena proizvedena u zecu (*Sigma*)

#### 3.1.4. Boje

bromfenol plava, BPB (*Serva*)

ksilencijanol fluorofosfat, XCFE (*Serva*)

toluidinsko modriilo (*Sigma*)

*Coomassie Brilliant Blue R-250* (*Sigma*)

Ponceau S (*Sigma*)

#### 3.1.5. Ostale kemikalije i komercijalni kompleti

mlijeko u prahu (*Dukat*)

Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (*GE Healthcare*)

otopina razvijaa (GBX developer and replenisher, *Kodak*)

otopina fiksira (GBX fixer and replenisher, *Kodak*)

#### 3.1.6. Pufferi

- puffer TA:  $c(\text{Tris}) = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{HOAc}) = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$  (pH 6,8)
- puffer TAE:  $c(\text{Tris}) = 40 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{HOAc}) = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{EDTA, pH 8,0}) = 1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$
- puffer TBE:  $c(\text{Tris}) = 90 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{B(OH)}_3) = 90 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{EDTA}) = 2 \text{ mmol dm}^{-3}$  (pH 8,0)
- puffer TBS:  $c(\text{Tris}) = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{NaCl}) = 150 \text{ mmol dm}^{-3}$  (pH 7,6)
- puffer za prijenos (western-analiza):  $c(\text{Tris}) = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{glicin}) = 192 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\varphi(\text{EtOH}) = 19,2 \%$  (pH 8,0)
- puffer za razdvajanje (SDS-PAGE):  $c(\text{Tris}) = 375 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma(\text{SDS}) = 1 \text{ g dm}^{-3}$  (titrirano HCl-om do pH 8,8)
- puffer za sabijanje (SDS-PAGE):  $c(\text{Tris}) = 125 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma(\text{SDS}) = 1 \text{ g dm}^{-3}$  (titrirano HCl-om do pH 6,8)
- elektroforetski puffer za SDS-PAGE:  $c(\text{Tris}) = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{glicin}) = 192 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{SDS}) = 3,5 \text{ mmol dm}^{-3}$
- puffer za reakciju aminoacilacije:  $c(\text{DTT}) = 4 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{Tris-HCl, pH 7,6}) = 60 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{MgCl}_2) = 18,8 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{ATP}) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma(\text{BSA}) = 0,4 \text{ g dm}^{-3}$
- puffer za dodatno pročišćavanje proteina gel-filtracijom:  $c(\text{Tris-HCl, pH 7,6}) = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{NaCl}) = 150 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{EDTA}) = 0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{DTT}) = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$
- puffer za pohranu proteina:  $c(\text{Hepes}) = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{NaCl}) = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{DTT}) = 2 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\varphi(\text{glicerol}) = 5 \%$
- puffer TBS/Tween20:  $c(\text{Tris-HCl, pH 7,5}) = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{NaCl}) = 150 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\varphi(\text{Tween20}) = 0,05 \%$

#### **Pufferi za formiranje kompleksa**

- puffer visoke ionske jakosti:  $c(\text{Hepes}) = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{NaCl}) = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{MgCl}_2) = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{DTT}) = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$  (pH 7,0)
- puffer niske ionske jakosti:  $c(\text{Hepes}) = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{MgCl}_2) = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{DTT}) = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$  (pH 7,0)
- puffer snižene ionske jakosti korišten za gel-filtraciju:  $c(\text{Hepes}) = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{NaCl}) = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{MgCl}_2) = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{DTT}) = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$  (pH 7,0)



#### ***Puferi za pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom***

- pufer **A1**:  $c(\text{Tris-HCl, pH 7,6}) = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{NaCl}) = 500 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{imidazol}) = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\varphi(\text{glicerol}) = 10 \%$ ,  $c(\text{PMSF}) = 0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\beta\text{-merkaptotanol}) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$
- pufer **B1**:  $c(\text{Tris-HCl, pH 7,6}) = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{NaCl}) = 500 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{imidazol}) = 30 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\varphi(\text{glicerol}) = 10 \%$ ,  $c(\text{PMSF}) = 0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\beta\text{-merkaptotanol}) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$
- pufer **C1**:  $c(\text{Tris-HCl, pH 7,6}) = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{NaCl}) = 500 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{imidazol}) = 250 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\varphi(\text{glicerol}) = 10 \%$ ,  $c(\text{PMSF}) = 0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\beta\text{-merkaptotanol}) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$

#### ***Puferi za kromatografiju ionske izmjene***

- pufer **A2**:  $c(\text{NaOAc}) = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{NaCl}) = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$
- pufer **B2**:  $c(\text{NaOAc}) = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{NaCl}) = 1 \text{ mol dm}^{-3}$

#### ***Puferi za kromatografiju obrnutih faza***

- pufer **A3**:  $c(\text{NaOAc}) = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{Mg}(\text{OAc})_2) = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{NaCl}) = 400 \text{ mmol dm}^{-3}$
- pufer **B3**:  $c(\text{NaOAc}) = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{Mg}(\text{OAc})_2) = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{NaCl}) = 400 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\varphi(\text{EtOH}) = 30 \%$

Puferi i sve ostale otopine pripravljene su u redestiliranoj vodi i sterilizirane autoklaviranjem zbog opasnosti od razgradnje nukleinskih kiselina RNazama (visoke temperature uzrokuju njihovu denaturaciju i posljedično inaktivaciju). Otopine korištene tijekom rada na sustavu za automatiziranu tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti dodatno su još filtrirane te degazirane korištenjem ultrazvučne kupelji Elmasonic (*Elma*) radi uklanjanja mogućnosti izlaska plinova u obliku mjehurića prilikom provođenja spomenute kromatografije i posljedičnog narušavanja ravnomjernog protoka eluenta, kao i ometanja detektora. Vrijednosti pH otopina izmjerene su MP220 pH-metrom (*Mettler Toledo*), a titracije pojedinih otopina provedene su uz miješanje na magnetskoj mješalici (*Biosan*).

#### 3.1.7. Sojevi i plazmidi bakterije *Escherichia coli*

##### **Sojevi *E. coli***

**BL21(DE3)** (genotip  $F^- dcm ompT hsdS_B (r_B^- m_B^-) gal dcm$  (DE3); *Novagen*): laboratorijski soj korišten za prekomjernu ekspresiju gena kloniranih u ekspresijski vektor pET. Navedeni soj pogodan je zbog mutacije u genima *lon* i *ompT*, čime je spriječeno djelovanje proteaza i razgradnja proteina prilikom pročišćavanja.

**Rosetta (DE3)** (genotip  $F^- ompT hsdS_B (r_B^- m_B^-) gal dcm$  (DE3) *pRARE* (Cam<sup>R</sup>); *Novagen*): laboratorijski soj korišten za prekomjernu ekspresiju gena kloniranih u ekspresijski vektor pET, derivat soja BL21 stanica napravljen tako da je ekspresija proteina koji sadrže aminokiseline kodirane rijetkim kodonima (AUA, AGG, AGA, CUA, CCC i GGA) poboljšana unutar same *E. coli*. Ovaj soj sadrži poseban plazmid s genima za tRNA koji prepoznaju navedene rijetke kodone, a ujedno je nosilac rezistentnosti na antibiotik kloramfenikol.

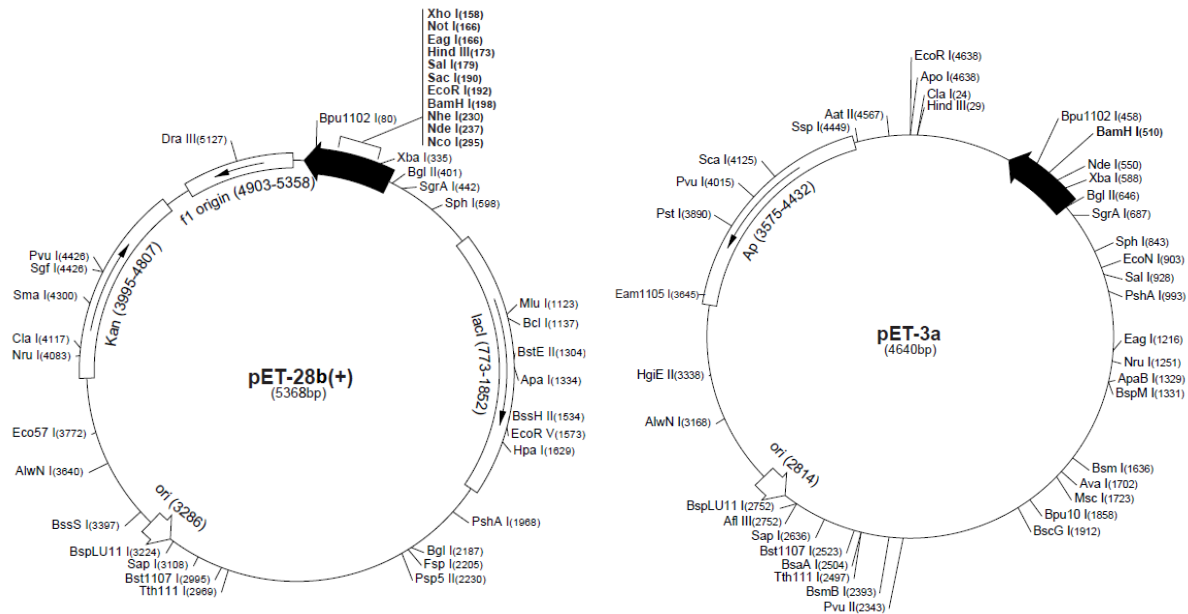
##### **Plazmidi za ekspresiju proteina i tRNA u *E. coli***

**pET28b**: plazmidni vektor (slika 3.1 lijevo) koji sadrži inducibilni promotor *T7lac*. Za indukciju može služiti analog alolaktoze izopropiltio- $\beta$ -galaktozid. Pogodan je za dobivanje proteina obilježenih i neobilježenih polihistidinskim privjeskom na N- ili C-kraju. Također, ovaj plazmid nosi rezistenciju na antibiotik kanamicin.

**pETA3a**: plazmidni vektor koji sadrži inducibilni promotor *T7lac*. Kao induktor se može koristiti izopropiltio- $\beta$ -galaktozid. Za razliku od plazmida pET3a prikazanog na slici 3.1 desno, plazmid pETA3a ima dodatno uklonjeno restrikcijsko mjesto *EcoRV*. Ovaj plazmid nosi rezistenciju na antibiotik ampicilin.

Prekomjerna ekspresija divljeg tipa proteina MtArgRS vršena je pomoću vektora pET28b u koji je pripadni gen ugrađen između restrikcijskih mjesta *BamHI* i *XhoI*. Geni krnjih proteina ugrađivani su na istom položaju istoimenog plazmida. Kao ekspresijski sustav korišten je Rosetta (DE3) soj bakterije *E. coli*.

Za prekomjernu ekspresiju MttRNA<sup>Arg</sup> korišten je vektor pETA3a u koji je pripadni gen ugrađen između restrikcijskih mjesta *SalI* i *BamHI*. Kao ekspresijski sustav korišten je soj bakterije *E. coli* BL21(DE3).



Slika 3.1. Restriksijska mapa ekspresijskih vektora pET28b(+) (lijevo) i pET-3a (desno).

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Metode rada s proteinima

#### 3.2.1.1. Otvaranje stanica soniciranjem

Izdvajanjem iz stanice protein može biti izdvojen i od bioloških molekula koje pomažu u stabilizaciji njegove native strukture zbog čega se može povećati sklonost proteina denaturaciji. Iz tog su razloga izolacija i pročišćavanje proteina provedeni pri sniženoj temperaturi unatoč tome što je protein porijeklom iz termofilnog organizma. Stanice (Rosetta (DE3)-pET28b-MtArgRS, Rosetta (DE3)-pET28b- $\Delta$ N21MtArgRS, Rosetta (DE3)-pET28b- $\Delta$ N39MtArgRS, Rosetta (DE3)-pET28b- $\Delta$ N89MtArgRS, Rosetta (DE3)-pET28b- $\Delta$ N<sub>tot</sub>MtArgRS) su resuspendirane u minimalnom volumenu pufera **A1**, pri čemu je smjesa hladena na ledu. Bez uklanjanja s leda, stanice su sonicirane sondom Vibra Cell 72446 (*Bioblock Scientific*) u intervalima od po jedne minute s jednom minutom odmora između dvaju podvrgavanja uzorka ultrazvučnim valovima radi sprječavanja pretjeranog zagrijavanja istog. Nakon centrifugiranja pri 4 °C na 10 000 g tijekom 1 h (Centrifuge 5430 R, *Eppendorf*), supernatant (sadrži stanične proteine uključujući i rekombinantni protein od interesa) je prenesen u čistu tubicu (*Falcon*) i pohranjen na ledu do početka idućeg koraka pročišćavanja.

#### 3.2.1.2. Afinitetna kromatografija

U cilju postizanja specifičnog vezanja željenog proteina na stacionarnu fazu s imobiliziranim niklovim(II) ionima (Ni-NTA-agaroz), na N-terminalni kraj proteina dodan je

heksahistidinski privjesak prilikom manipulacije genom za MtArgRS u vektoru pET28b, tj. na razini DNA. Za razliku od kromatografskih tehnika navedenih u daljnjem tekstu, ova je kromatografija provedena pri atmosferskom tlaku.

Prije provođenja same metode, iz kolone je ispuštena vodena otopina etanola ( $\varphi = 20\%$ ) uobičajeno korištena za čuvanje Ni-NTA-agaroze (*Qiagen*), te je dotični volumen stacionarne faze ispran s 10 puta većim volumenom redestilirane vode. Ni-NTA-smola je potom uravnotežena u puferu **A1**, nakon čega je kroz kolonu postepeno propušten sav supernatant dobiven centrifugiranjem nakon soniciranja. Stacionarna je faza potom isprana s prosječno 25 mL pufera **A1**. Nadalje je kolona isprana s 10 mL pufera **B1**. Elucija proteina izvršena je s 10 mL pufera **C1** (pufer bitno povišene koncentracije imidazola u odnosu na prethodna dva pufera). Sakupljene su frakcije dobivene ispiranjem stacionarne faze puferom **A1**, **B1** te frakcije dobivene samim propuštanjem uzorka kroz kolonu s ciljem analize sastava istih metodom SDS-PAGE (oznaka FT od eng. *flow through*). Tijekom ispiranja puferom **C1** eluat je frakcioniran, odnosno sakupljane su frakcije od po 2 mL. Kromatografija je provedena pri temperaturi od 4 °C zbog smanjenja mogućnosti denaturacije proteina tijekom postupka, a analiza frakcija napravljena je naknadno metodom SDS-PAGE (v. 3.2.4.1). Frakcije pročišćenih proteina ukoncentrirane su pomoću membrana (*Milipore*) dvostruko niže vrijednosti MWCO (engl. *molecular weight cut off*) od relativne molekulske mase proteina, nakon čega su pohranjene na – 80 °C u puferu za pohranu proteina (v. 3.1.6).

#### 3.2.1.3. Gel-filtracija

Gel-filtracija je provedena pomoću kolone Superdex 200 HR 10/300 (*GE Healthcare*) i sustava za automatiziranu tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti Äkta Purifier 10 (*GE Healthcare*). Navedena je gel-filtracijska kolona pogodna za razdvajanje makromolekula relativne molekulske mase  $10^4 - 6 \cdot 10^5$ . Metoda gel-filtracije korištena je za dodatno pročišćavanje proteina nakon afinitetne kromatografije i za provjeru postojanja artificijelnih dimera deletanta  $\Delta N21MtArgRS$ .

Prilikom dodatnog pročišćavanja, otopine proteina (čuvane pri temperaturi od – 80 °C) postepeno su otapane na ledu, a gel-filtracijska kolona je uravnotežena u pogodnom puferu (v. 3.1.6, pufer za dodatno pročišćavanje proteina gel-filtracijom). Uzorak pojedine otopine proteina centrifugiran je tijekom 10 minuta pri 4 °C i 12 000 g u cilju uklanjanja lošije smotanih proteina sklonih agregaciji, a 200  $\mu$ L supernatanta je nanoseno na kromatografsku kolonu. Tijekom gel-filtracije praćene su apsorbancije pri valnim duljinama od 260 nm i 280 nm. Frakcije koje sadrže protein su potom ukoncentrirane pomoću membrana pogodne

(minimalno dvostruko niže) vrijednosti MWCO i čuvane su na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Koncentracije proteina određene su spektrofotometrom ND-1000 (*NanoDrop*) na temelju poznavanja dekadskih molarnih apsorpcijskih koeficijenata pojedinih proteina (tablica 4.1).

Pri utvrđivanju postojanja mogućih artificijelnih dimera deletanta  $\Delta\text{N21MtArgRS}$  provedene su dvije gel-filtracijske kromatografije uz korištenje pufera snižene ionske jakosti (zbog osjetljivosti stacionarne faze nije moguće korištenje pufera koji uopće ne sadrži NaCl). U jednom slučaju protein je prije nanošenja na kolonu deseterostruko razrijeđen u odnosu na koncentraciju u otopini u kojoj je pohranjen, dok je u drugom slučaju protein bio tretiran otopinom detergenta i natrijevog klorida ( $\varphi(\text{Tween20}) = 1\%$ ,  $c(\text{NaCl}) = 0,5\text{ mol dm}^{-3}$ ). Kao i u prethodnim slučajevima, praćene su apsorbancije pri  $\lambda = 260\text{ nm}$  i  $\lambda = 280\text{ nm}$ .

#### 3.2.2. Metode rada s tRNA

##### 3.2.2.1. Izolacija RNA iz stanica domaćina

Stanice BL21(DE3)-pET $\Delta$ 3a-MttRNA<sup>Arg</sup> (riječ je o izoakceptoru s antikodonskim slijedom 5'CCU3', međutim u daljnjem tekstu oznaka antikodona je izostavljena radi pojednostavljenja zapisa) su resuspendirane u minimalnom volumenu acetatnog pufera ( $c(\text{NaOAc}) = 0,3\text{ mol dm}^{-3}$ , titrirano octenom kiselinom do pH 5,2) te je dodan jednak volumen zasićene vodene otopine fenola. Nakon izmućkivanja tijekom 5 minuta i centrifugiranja na 4 000 g pri 10  $^{\circ}\text{C}$  tijekom približno 5 minuta dolazi do razdvajanja faza: gornja (vodena) faza sadrži nukleinske kiseline i ugljikohidrate, a donja faza (fenolna) denaturirane proteine. Također se javlja međusloj koji čine denaturirani proteini. Vodena faza je izdvojena i izmućkivana tijekom daljnjih 5 minuta s jednakim volumenom smjese fenola i kloroforma. Faze su ponovno razdvojene centrifugiranjem, te je fenol zaostao iz prethodnog koraka u vodenoj fazi dodatno ekstrahiran kloroformom. Nakon centrifugiranja i odvajanja faza, vodena je faza prebačena u čistu tubicu te joj je dodan trostruko veći volumen hladnog etanola ( $\varphi = 96\%$ ). Takva smjesa je ostavljena na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; dodatak etanola uzrokuje taloženje nukleinskih kiselina i ugljikohidrata.

##### 3.2.2.2. Odvajanje tRNA od nukleinskih kiselina većih molekulskih masa

Nastali talog je oboren centrifugiranjem (4 000 g pri 4  $^{\circ}\text{C}$  tijekom 1 h), nakon čega je ispran Fetanolom ( $\varphi = 80\%$ ) i ponovo centrifugiran daljnjih 1 h. Etanol je potom odliven, a otvor tubice prekriven je parafilmom (*Pechiney Plastic Packaging*) na kojem su izbušene rupice. Etanol je uparen iz taloga u DNA120 Speedvacu (*Thermo Savant*). Posušenom talogu je dodana minimalna količina redestilirane vode potrebna za njegovo potpuno otapanje. Tako

### § 3. Materijali i metode

---

dobivenoj otopini dodane su otopine Tris-a i NaCl-a (do konačnih koncentracija  $c(\text{Tris}) = 0,25 \text{ mol dm}^{-3}$  i  $c(\text{NaCl}) = 1 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 8,4). Dobivena je otopina inkubirana 1 h pri 37 °C u termobloku (*Grant Bio*). Ovi blago bazični uvjeti omogućuju hidrolizu esterskih veza uzrokujući deacilaciju aminoaciliranih molekula tRNA; elektroforezom na poliakrilamidnom gelu u prisustvu ureje te elektroforezom na agaroznom gelu provjereno je uzrokuju li ovi uvjeti istovremeno i lužnatu hidrolizu molekula RNA (v. 3.2.4.2 i 3.2.4.4). Deaciliranim uzorcima dodane su otopine PEG 6000 i  $\text{MgCl}_2$  (do konačnog masenog udjela  $w(\text{PEG}) = 8 \%$ , odnosno koncentracije  $c(\text{MgCl}_2) = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) radi taloženja nukleinskih kiselina većih molekulskih masa. Smjesa je centrifugirana 20 minuta na 12 000 g, nakon čega je supernatant odvojen te mu je dodan jednak volumen otopine natrijevog acetata ( $c = 2,68 \text{ mol dm}^{-3}$ ) i trostruko veći volumen hladnog etanola ( $\varphi = 96\%$ ). Smjesa je ostavljena preko noći na  $-20 \text{ °C}$  radi taloženja nukleinskih kiselina. Sljedeći dan talog je oboren centrifugiranjem (1 h pri 4 °C i 4 000 g), osušen je u Speedvacu te otopljen u redestiliranoj vodi.

#### 3.2.2.3 Kromatografija ionske izmjene

Kolona slabog anionskog izmjenjivača (HiPrep DEAE FF 16/10, proizvođač *GE Healthcare*)<sup>1</sup> korištena je za dodatno pročišćavanje molekula tRNA od kontaminirajućih vrsta korištenjem automatiziranog sustava Äkta Purifier 10. Kod ove se metode vezanje molekula na stacionarnu fazu temelji na elektrostatskim interakcijama.

Kroz kolonu je propušten pufer **B2** radi vezanja kloridnih iona na dietilaminoetilne ostatke. Kolona je potom postupnim povećanjem volumnog udjela pufera **A2** prevedena u potpunosti u pufer **A2**. Na kolonu je nanesen 1 mL uzorka otopine tRNA, ugljikohidrata, ostataka PEG-a i neistaloženih nukleinskih kiselina većih molekulskih masa, a elucija je vršena postupnim povećanjem volumenog udjela pufera **B2**. Prilikom kromatografije praćena je apsorbancija pri  $\lambda = 260 \text{ nm}$ . Frakcije sakupljene prilikom provođenja ove metode analizirane su elektroforezom na poliakrilamidnom gelu u prisustvu ureje (v. 3.2.4.2).

#### 3.2.2.4. Kromatografija obrnutih faza

Metoda RPC temeljena je na hidrofobnim efektima između molekula i nepolarne stacionarne faze te je korištena za razdvajanje različitih vrsta ribonukleinskih kiselina. Za kromatografiju obrnutih faza ukupne tRNA *E. coli* korištena je kolona Vydac C<sub>4</sub> (214TP) (*Grace*), dok je za

---

<sup>1</sup> U daljnjem tekstu punilo ove kolone je radi jednostavnosti zvano DEAE-sefarozom, pri čemu je sefaroza naziv za modificirana zrnca umrežene agaroze (polimerni materijal) izvedeno iz imena *Separation-Pharmacia-Agarose*.

sve ostale kromatografije ove vrste korištena kolona Jupiter C4 (*Phenomenex*). Neovisno o koloni, prilikom izvedbe ove metode uvijek je korišten automatizirani sustav Äkta Purifier 10.

Kromatografska kolona uravnotežena je u smjesi pufera **A3** i **B3**, pri čemu je volumni udio pufera **B3** iznosio 5 %, a zatim je na nju nanesen uzorak tRNA (točan volumen nanesenog uzorka ovisi o spektrofotometrijski određenoj koncentraciji nukleinskih kiselina) u pravilu prethodno pročišćen kromatografijom anionske izmjene (v. 3.2.2.4). U svrhu elucije postepeno je povećavan volumni udio pufera **B3** u eluensu, a tijekom kromatografije je praćena apsorbanacija pri  $\lambda = 260$  nm. Za daljnju upotrebu provedeno je ukoncentriravanje frakcija pomoću Speedvaca i deaminoacilacija frakcija koje sadrže MttRNA<sup>Arg</sup> (ukoliko je potrebno) postupkom opisanim u sklopu podnaslova 3.2.2.2. Zbog složenosti kromatograma, prisutnost i udio MttRNA<sup>Arg</sup> u pojedinim frakcijama dodatno je dokazivana reakcijom aminoaciliranja, tj. određivanjem akceptorske aktivnosti tRNA (v. 3.2.5.1). Frakcije su također analizirane na poliakrilamidnom gelu u prisustvu ureje (v. 3.2.4.2). Način optimiranja postupka pročišćavanja prekomjerno eksprimiranih molekula MttRNA<sup>Arg</sup> detaljnije je objašnjen u sklopu prikaza rezultata rada.

Budući da količina MttRNA<sup>Arg</sup> dobivena u jednoj preparaciji nije bila dostatna za provođenje svih eksperimenata, cjelokupni je postupak pročišćavanja ponavljan više puta tijekom izrade ovog rada.

#### 3.2.3. Formiranje kompleksa MtArgRS:MttRNA<sup>Arg</sup>

##### 3.2.3.1. Nativna elektroforeza na poliakrilamidnom gelu

Za razliku od elektroforetskih metoda opisanih u nastavku poglavlja, ova vrsta elektroforeze provodi se pri nenedenaturirajućim uvjetima za biomakromolekule. Sami uvjeti su prilagođeni proučavanom specifičnom sustavu. Ova je elektroforetska metoda korištena za ispitivanje stabilnosti nekovalentnih kompleksa MttRNA<sup>Arg</sup> s divljim tipom MtArgRS i svim pripremljenim deletantima ovog proteina uz korištenje dvaju različitih pufera. Pritom su u nastavku teksta korišteni opisni nazivi „visoka“ i „niska“ ionska jakost dodjeljeni prema razlici u koncentraciji natrijevog klorida među pojedinim puferima (v. 3.1.6).

Pri uvjetima visoke ionske jakosti, kompleksi su pripremljeni inkubacijom proteina u suvišku i prethodno renaturirane tRNA u pripadnom puferu (pufer visoke ionske jakosti) pri 41 °C tijekom 10 minuta u termobloku. Točna koncentracija proteina u smjesi nije od presudne važnosti, već je bitno samo da je ona višestruko veća od vrijednosti ravnotežne konstante disocijacije. Renaturacija tRNA provedena je zagrijavanjem otopine tRNA tijekom 4 minute na 80 °C, što uzrokuje narušavanje strukture dvolančanih dijelova molekule, nakon

### § 3. Materijali i metode

---

čega je dodana otopina  $\text{MgCl}_2$  do konačne koncentracije  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Otopina je ostavljena na sobnoj temperaturi kako bi se postepeno hladila do postizanja termičke ravnoteže. Analogan postupak proveden je sa svim pripremljenim proteinima i uz korištenje alternativnog pufera (pufer niske ionske jakosti). U uređaju za vertikalnu elektroforezu Mini Protean II (*Bio-Rad*) kroz poliakrilamidni gel ( $w(\text{akrilamid-biskrilamid u masenom omjeru } 29:1) = 9\%$ , TA pufer, katalizator APS ( $\gamma(\text{APS}) = 0,7 \text{ } \mu\text{g cm}^{-3}$ ) i inicijator polimerizacije TEMED ( $w(\text{TEMED}) = 0,05\%$ ) je propuštena struja stalnog napona ( $U = 120 \text{ V}$ ) tijekom 30 minuta radi uspostavljanja podnaponske ravnoteže iona u gelu prije samog nanošenja uzoraka. Kao elektroforetski pufer korišten je pufer TA. Uzorcima je nakon inkubacije dodana boja za nanošenje uzoraka ( $\varphi(\text{glicerol}) = 4,7\%$ ,  $\gamma(\text{BPB}) = 3 \text{ g dm}^{-3}$ ) u volumnom omjeru 1:12. Uzorci su nanoseni na gel te je provedena elektroforeza pri naponu  $U = 120 \text{ V}$  tijekom približno 1 h, tj. do istjecanja uzorcima dodane boje iz gela.

#### 3.2.3.2. Bojenje srebrom

Za detekciju molekula proteina i nukleinskih kiselina na gelu korišteno je bojenje srebrom. Ova je metoda odabrana zbog svoje visoke osjetljivosti, odnosno mogućnosti detekcije nanogramskih količina uzoraka, a sam protokol bojenja srebrom može se podijeliti u više faza. Radi fiksacije makromolekula gel je najprije potresan na tresilici (Mini Rocker MR-1, *Biosan*) u otopini **I** ( $\varphi(\text{EtOH}) = 48\%$ ,  $c(\text{HOAc}) = 2,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ). Nakon 20 minuta otopina **I** je odsisana korištenjem vodene sisaljke te je gel inkubiran otopinom **II** ( $\varphi(\text{EtOH}) = 9,6\%$ ,  $c(\text{HOAc}) = 0,856 \text{ mol dm}^{-3}$ ) narednih 20 minuta. Otopina **II** je zatim uklonjena, a gelu je dodana dušičnom kiselinom zakiseljena otopina kalijevog dikromata ( $c(\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7) = 3,4 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{HNO}_3) = 2,8 \text{ mmol dm}^{-3}$ ). Kisela otopina  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  oksidira moguće tragove nekog od reducensa jer bi isti u kasnijem postupku mogao reducirati srebrove(I) ione. Gel je potresan tijekom 5 minuta u navedenoj otopini prilikom čega se obojio u žuto. Nakon uklanjanja ove otopine gel je ispiran redestiliranom vodom do obezbojenja, te je daljnjih 20 minuta inkubiran otopinom srebrovog(I) nitrata ( $c(\text{AgNO}_3) = 12 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) nakon čega je ona odsisana, a gel je ispran malom količinom redestilirane vode. Potonji korak omogućava vezanje  $\text{Ag}^+$  na negativno nabijene skupine makromolekula. Sljedeća gelu dodana otopina je predrazvijatelj ( $c(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 280 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{HCHO}) = 1,16 \text{ mol dm}^{-3}$ ), po čijem uklanjanju je uslijedio dodatak otopine razvijача ( $c(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 280 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{HCHO}) = 4,24 \text{ mol dm}^{-3}$ ). Nakon pojavljivanja vrpca na gelu, otopina razvijача je uklonjena, a daljnja redukcija srebrovog(I) iona inhibirana je dodatkom otopine octene kiseline ( $c(\text{HOAc}) = 170 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) koja reagira s formaldehidom. Slike poliakrilamidnih gelova u boji (većinom slike gelova korištene za



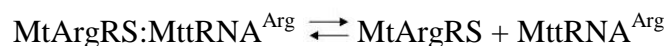
### § 3. Materijali i metode

---

kvantifikaciju količine kompleksa) napravljene su skeniranjem (*Canon iR1018*) radi bolje kvalitete istih. Crno-bijele slike agaroznog gela i većine poliakrilamidnih gelova, kao i fotografskog filma, napravljene su pomoću ultraljubičaste (kod korištenja etidijevog bromida, v. 3.2.4.4) ili vidljive svjetlosti korištenjem aparata MiniBIS Pro (*Bio-Imaging Systems*).

#### 3.2.3.3. Izračun ravnotežnih konstanti disocijacije

Ravnotežna konstanta disocijacije kompleksa proteina i nukleinskih kiselina može se odrediti gel-retardacijskom elektroforezom ukoliko su uvjeti pogodni za nastanak istih (podnaslov 3.2.3.1). Sama jednadžba ravnotežnog procesa može se prikazati na sljedeći način:



te pritom za fizikalnu veličinu od interesa vrijedi sljedeća relacija:

$$K_d = \frac{[\text{MtArgRS}] \cdot [\text{MttRNA}^{\text{Arg}}]}{[\text{MtArgRS:MttRNA}^{\text{Arg}}]}$$

gdje su uglatim zagradama dane ravnotežne koncentracije pojedinih vrsta. Naboj svih makromolekula pri vrijednosti pH elektroforetskog pufera je negativan što uzrokuje njihovo putovanje prema anodi tijekom elektroforeze. Nukleinske kiseline su makromolekule nosioci negativnog naboja zahvaljujući negativno nabijenim kisikovim atomima u fosfodieterskim vezama između pojedinih nukleotida, osim ukoliko se eksperiment provodi pri izuzetno niskim vrijednostima pH što ovdje nije slučaj (takvi bi uvjeti bili daleko od fizioloških). Teoretska vrijednost izoelektrične točke proteina MtArgRS procijenjena je dostupnim serverom na  $5,10^{[31,32]}$ , tako da se sve molekule (uključujući potencijalno nastale komplekse navedenih vrsta) kreću prema anodi.

Količina kompleksa u pojedinoj točki titracije kvantificirana je korištenjem programa ImageJ 1.47<sup>[33]</sup> koji omogućava kvantifikaciju signala na elektroforetskim gelovima. Svaki signal koji pripada kompleksu dodatno je korigiran za pozadinski signal (u konkretnom slučaju, od pojedinog je signala oduziman odziv u prvoj jažici gdje je nanesen uzorak samog proteina). Nelinearna regresija podataka provedena je programom GraphPad Prism 6<sup>[34]</sup> gdje su podaci utočnjeni u jednadžbu kojom je moguće opisati vezanje molekula u stehiometrijskom omjeru 1:1. Navedena jednadžba glasi:

$$Y = \frac{B_{\text{max}} \cdot X}{K_d + X}$$

gdje je  $Y$  veličina proporcionalna količini kompleksa izražena u arbitrarnim jedinicama,  $X$  analitička koncentracija liganda,  $B_{\text{max}}$  maksimalno specifično vezanje izraženo u istim jedinicama kao i  $Y$ , a  $K_d$  je pripadna ravnotežna konstanta disocijacije kompleksa koja se

### § 3. Materijali i metode

---

može očitati kao vrijednost na osi apscisa čija je pripadna vrijednost osi ordinata jednaka polovici  $B_{\max}$ .<sup>[35]</sup> U ovom slučaju vrijednosti  $X$  su koncentracije MttRNA<sup>Arg</sup> određene preko akceptorske aktivnosti pojedinog uzorka te uz poznavanje ukupne (spektrofotometrijski izmjerene) koncentracije tRNA, a vrijednosti  $Y$  su dobivene kvantifikacijom i korekcijom signala na gelovima pomoću programa ImageJ 1.47. S obzirom da u matematičkom izvodu dolazi do kraćenja koeficijenata proporcionalnosti, nanošenje bilo koje veličine proporcionalne koncentraciji kompleksa na os ordinata je opravdano i ispravno, tj. izračunati  $K_d$  će biti isti neovisno o tome.

#### 3.2.4. Ostale elektroforetske metode

##### 3.2.4.1. Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u prisustvu SDS-a

Za razliku od one u nativnim uvjetima, elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u prisustvu SDS-a (SDS-PAGE) je denaturirajuća vrsta elektroforeze u kojoj anionski detergent natrijev dodecilsulfat uzrokuje denaturaciju proteina. Proteini također zbog interakcija s ovom tvari poprimaju jednak omjer mase i naboja, što omogućava procjenu relativne molekulske mase proteina na temelju njegove pokretljivosti u gelu. Ova je vrsta elektroforeze korištena za detekciju i procjenu količine te čistoće prekomjerno eksprimiranog proteina u frakcijama sakupljenim prilikom pročišćavanja afinitetnom kromatografijom i gel-filtracijom.

Gel za razdvajanje ( $w(\text{akrilamid-biskrilamid u masenom omjeru } 29:1) = 9 \%$ , pufer za razdvajanje,  $\gamma(\text{APS}) = 0,7 \mu\text{g cm}^{-3}$ ,  $w(\text{TEMED}) = 0,05 \%$ ) čini tri četvrtine ukupnog gela, a preostalu (gornju) četvrtinu čini gel za sabijanje ( $w(\text{akrilamid-biskrilamid u masenom omjeru } 29:1) = 4 \%$ , pufer za sabijanje,  $\gamma(\text{APS}) = 0,7 \mu\text{g cm}^{-3}$ ,  $w(\text{TEMED}) = 0,05 \%$ ) manjeg stupnja umreženja kako bi uzorci kroz njega putovali brže i na taj se način sabili na gornjoj granici gela za razdvajanje. Prilikom polimerizacije gela za razdvajanje, smjesa je natkrivena slojem redestilirane vode koji se uklanja po završetku polimerizacije navedenog gela, a prije nanošenje smjese gela za razdvajanje. Uzorci frakcija pomiješani su s puferom za nanošenje na gel ( $\gamma(\text{SDS}) = 50 \text{ g dm}^{-3}$ ,  $\gamma(\text{BPB}) = 0,1 \text{ g dm}^{-3}$ ,  $\varphi(\text{glicerol}) = 30 \%$ ,  $\varphi(\beta\text{-merkaptetoanol}) = 8 \%$ ,  $c(\text{Tris-HCl, pH } 6,8) = 250 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) u volumnom omjeru 3:1 i zagrijani su na  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  tijekom 3 minute nakon čega su nanoseni na gel (ukupni volumen nanosen na gel je  $12 \mu\text{L}$ ). Elektroforeza je provedena pri stalnom naponu  $U = 120 \text{ V}$  tijekom putovanja uzoraka kroz gel za sabijanje i pri naponu  $U = 180 \text{ V}$  pri putovanju kroz gel za razdvajanje. Sastav elektroforetskog pufera korištenog u ovoj metodi naveden je u sklopu podnaslova 3.1.6. Ukupno trajanje elektroforeze iznosilo je 70 minuta. Za vizualizaciju proteina u gelu nakon elektroforeze korištena je otopina boje *Coomassie Brilliant Blue R-250* ( $\gamma(\text{Coomassie$

### § 3. Materijali i metode

---

*Brilliant Blue R-250*) = 2,5 g dm<sup>-3</sup>, *c*(HOAc) = 1,67 mol dm<sup>-3</sup>,  $\varphi$ (CH<sub>3</sub>OH) = 45 %) s kojom je gel potresan na tresilici tijekom 10 minuta. Boja difundira u cijeli gel zbog čega je potrebno naknadno odbojavanje. Difuzija nevezane boje iz gela pospješuje se povišenjem temperature, zbog čega se gel ostavlja u kipućoj destiliranoj vodi (1 – 1,5 dm<sup>3</sup>) tijekom daljnjih desetak minuta.

#### 3.2.4.2. Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u prisustvu ureje

Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u prisustvu ureje denuracijska je vrsta elektroforeze za nukleinske kiseline. Urea zbog svoje kemijske građe može kompetirati za vodikove veze uobičajeno ostvarene između baza nukleotida ribonukleinske kiseline i na taj način narušava se tercijarna strukturu tRNA. Ova je vrsta elektroforeze korištena za ispitivanja lužnate hidroliza tRNA u preparativnom koraku i za analizu frakcija sakupljenih kromatografijama ionske izmjene i obrnutih faza.

Kao i u slučaju nativne elektroforeze, kroz gel (*w*(akrilamid-biskrilamid u masenom omjeru 29:1) = 10 %, pufer TBE, *c*(urea) = 6 mol dm<sup>-3</sup>,  $\gamma$ (APS) = 0,7  $\mu$ g cm<sup>-3</sup>, *w*(TEMED) = 0,05 %, je propuštena struja (*U* = 120 V, *t* = 15 min) radi uspostavljanja podnaponske ravnoteže iona prije samog nanošenja uzoraka na gel. Kao elektroforetski pufer korišten je pufer TBE. Također prije nanošenja uzoraka, a poslije uspostave podnaponske ravnoteže, jažice su isprane s pomoću injekcije i igle elektroforetskim puferom radi uklanjanja kristalizirane ureje koja bi mogla ometati samo nanošenje uzorka u jažicu, kao i prodiranje uzorka iz jažice u gel. Uzorci su za nanošenje na gel pripremani miješanjem s otopinom boje ( $\varphi$ (glicerol) = 30 %, *w*(XCFF) = 0,5 g dm<sup>-3</sup>, *w*(BPB) = 0,5 g dm<sup>-3</sup>, *c*(urea) = 6 mol dm<sup>-3</sup>, pufer TAE) u omjeru 1:1 te zagrijavanjem na 80 °C tijekom 3 minute i naglim premještanjem u led. Svrha ovog dijela postupka jest denaturacija molekula RNA pomoću povišene temperature i ureje, a naglo premještanje u led sprječava ponovni nastanak stabilnih dvolančanih regija (renaturaciju); zbog na ovaj način ukinutih efekata različitih sekundarnih i tercijarnih struktura na pokretljivost molekula u gelu, one se kreću sukladno svojoj veličini. U slučaju analize frakcija sakupljenih tijekom kromatografskog postupka pročišćavanja tRNA, volumeni prikladni za nanošenje na gel tretirani su na prethodno opisan način. Prilikom ispitivanja dolazi li do lužnate hidrolize molekula RNA u preparativnom koraku korištenom za deacilaciju, uzorci su pripremljeni inkubacijom alikvota nukleinskih kiselina s puferima Tris-HCl različitih vrijednosti pH (vrijednosti pH iznosile su 7,40, 8,03, 8,49, 9,00 i 10,6). Uzorci su potom tretirani na analogan način kao kod procesa deacilacije, a nastavak moguće hidrolize je zaustavljen zakiseljavanjem koncentriranom klorovodičnom kiselinom do

### § 3. Materijali i metode

---

konačne vrijednosti pH 4. Ukupni volumeni uzorka nanošeni na gel iznosili su 12  $\mu\text{L}$ . Elektroforeza je provedena tijekom 80 minuta uz napon  $U = 120 \text{ V}$ . Za vizualizaciju većih količina nukleinskih kiselina na poliakrilamidnim gelovima korišteno je toluidinsko modriilo ( $\gamma(\text{toluidinsko modriilo}) = 4 \text{ g dm}^{-3}$ ,  $\varphi(\text{EtOH}) = 50 \%$ ,  $c(\text{HOAc}) = 1,67 \text{ mol dm}^{-3}$ ) postupkom analognim onome opisanom za boju *Coomassie Brilliant Blue R-250* (v. 3.2.4.1), a bojenje srebrom (v. 3.2.3.2) je korišteno ukoliko je bilo potrebno detektirati manje količine tvari.

#### 3.2.4.3. Western-analiza

Western-analiza kao metoda koja omogućava specifičnu detekciju iznimno malih količina tvari korištena je kao dodatna analitička metoda prilikom proučavanja ponašanja deletanta  $\Delta\text{N21MtArgRS}$  pri kompleksiranju u uvjetima visoke ionske jakosti.

Nakon provedene native elektroforeze na poliakrilamidnom gelu smjesa  $\Delta\text{N21MtArgRS}$  i tRNA u različitim koncentracijama kada su uzorci inkubirani u puferu visoke ionske jakosti, gel je inkubiran 20 minuta u puferu za prijenos (v. 3.1.6). Prijenos molekula na nitroceluloznu membranu vršen je aparaturom za polusuhi prijenos 2117 Multiphor II (*Pharmacia LKB*). Na anodnu ploču postavljena su dva lista filtrirnog papira (*Whatman 3MM*) natopljenog puferom za prijenos, na njih je postavljena nitrocelulozna membrana (*Hybond-C Extra, Amersham Biosciences*) veličine gela na koju je zatim smješten gel. Na sam gel također je postavljeno nekoliko listova filtrirnog papira natopljenih puferom za prijenos te je iz cijele konstrukcije istisnut zrak koji bi djelovao kao izolator prilikom provođenja električne struje. Nakon postavljanja katodne ploče propuštana je struja konstantne jakosti (tolika da je za danu aparaturu pripadna gustoća struje iznosila  $I / A_{\text{gel}} = 0,8 \text{ mA cm}^{-2}$ ) tijekom 90 minuta. Po završetku postupka, učinkovitost prijenosa na membranu provjerena je reverzibilnim bojenjem otopinom boje Ponceau S ( $w(\text{Ponceau S}) = 0,1 \%$  u otopini octene kiseline  $w(\text{HOAc}) = 5 \%$ ). Radi sprječavanja nespecifičnog vezanja antitijela na membranu u daljnjem postupku, membrana je preko noći inkubirana otopinom nemasnog mlijeka u prahu ( $\gamma = 50 \text{ g dm}^{-3}$ ) u puferu TBS/Tween20 uz potresanje na tresilici pri temperaturi od  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Sljedeći dan je otopina mlijeka uklonjena i membrana je isprana dva puta po 10 minuta puferom TBS. Membrana je zatim inkubirana tijekom 1 h otopinom primarnih anti-polihistidinskih antitijela proizvedenih u mišu (otopina dobivena razrijeđenjem komercijalno dostupnih otopina antitijela u volumnom omjeru 1:3000 u puferu TBS) koja specifično vežu heksahistidinski privjesak proizvedenih proteina. Po završetku inkubacije primarnim antitijelima, membrana je isprana tri puta po 10 minuta puferom TBS te joj je dodana otopina sekundarnih anti-mišjih antitijela konjugiranih peroksidazom iz hrena

### § 3. Materijali i metode

---

proizvedenih u zecu (otopina je dobivena razrijeđenjem komercijalno dostupnih antitijela u volumnom omjeru 1:10000 u puferu TBS). Sekundarna se antitijela specifično vežu na primarna tijekom inkubacije u trajanju 1 h. Nakon tri uzastopna ispiranja membrane po 10 minuta puferom TBS radi uklanjanja nespecifično vezanih sekundarnih antitijela koja bi tijekom detekcije uzrokovala pozadinski šum, na membrani je kemiluminescencijski detektiran položaj proteina koji sadrže heksahistidinski privjesak. Za detekciju je korišten komplet Amersham ECL (*GE Healthcare*). Otopine peroksida i luminola iz navedenog kompleta pomiješane su u volumnom omjeru 1:1 tako da ukupni volumen prema površini membrane bude  $0,1 \text{ mL cm}^{-2}$ . Membrana je inkubirana smjesom otopina luminola i peroksida tijekom 5 minuta pri sobnoj temperaturi, nakon čega je pažljivo omotana u prozirnu foliju te je pojava kemiluminescencije zabilježena u tamnoj komori na fotografskom filmu *BioMaxLight* (*Kodak*). Luminol služi kao supstrat peroksidazi hrena te prilikom reakcije oksidacije luminola dolazi do emisije svjetlosti čiji je intenzitet proporcionalan količini ishodne vrste koja sadrži heksahistidinski privjesak na membrani. Nakon izlaganja fotografskog filma membrani omotanoj prozirnom folijom tijekom 3 minute, film je uronjen u otopinu razvijaača do pojave signala, potom je ispran u destiliranoj vodi, uronjen u fiksir i ponovno ispran u destiliranoj vodi.

#### 3.2.4.4. Elektroforeza na gelu agaroze

Elektroforeza na gelu agaroze je metoda koja se koristi za detekciju i međusobno razdvajanje nukleinskih kiselina većih molekulskih masa. Za razliku od svih prethodno opisanih elektroforetskih metoda, ovdje je riječ od horizontalnoj elektroforezi. U sklopu ovog rada, metoda elektroforeze na agaroznom gelu korištena je pri ispitivanju lužnate hidrolize tRNA u preparativnom koraku.

Isti uzorci koji su nanoseni na poliakrilamidni gel u prisustvu ureje tijekom ispitivanja lužnate hidrolize RNA (v. 3.2.4.2) pomiješani su s bojom za nanošenje ( $\varphi(\text{glicerol}) = 30 \%$ ,  $w(\text{XCF}) = 2,5 \text{ g dm}^{-3}$ ,  $w(\text{BPB}) = 2,5 \text{ g dm}^{-3}$ , TAE pufer) u volumnom omjeru 1:10. Ukupno je  $25 \mu\text{L}$  svakom uzorku nanoseno na agarozni gel ( $\gamma(\text{agaroz}) = 10 \text{ g dm}^{-3}$ , otopina u puferu TAE kojem je dodan etidijev bromid ( $\gamma(\text{etidijev bromid}) = 50 \mu\text{g dm}^{-3}$ )) uronjen u elektroforetski pufer TAE. Elektroforeza je provedena pri stalnom naponu  $U = 130 \text{ V}$  tijekom 35 minuta (izvor napona EPS 600, *Pharmacia Biotech*) pri sobnoj temperaturi. Za detekciju je korištena fluorescentna boja etidijev bromid koja se interkalira među parove baza nukleinskih kiselina i tada se njezina fluorescencija mnogostruko povećava (fluorescira narančasto, dakle u vidljivom području spektra) prilikom pobude elektromagnetskim valovima valne duljine

### § 3. Materijali i metode

---

312 nm koji pripadaju ultraljubičastom području. S obzirom da je etidijev bromid poznati mutagen, rukovanje njime zahtjeva osobit oprez.

#### 3.2.5. Enzimska kinetika

Kinetika ustaljenog stanja korištena je za određivanje kinetičkih parametara u vidu Michaelisove konstante za MttRNA<sup>Arg</sup> i obrtnog broja divljeg tipa MtArgRS i skraćenih inačica istog. U posebnom slučaju određivanje udjela tRNA<sup>Arg</sup> u ukupnoj količini tRNA (ubičajeno određivana spektrofotometrom ND-1000), tj. određivanju akceptorske aktivnosti tRNA, bitno je da reakcije izađe iz ustaljenog stanja (odnosno da se odvije „do kraja“).

##### 3.2.5.1. Određivanje akceptorske aktivnosti tRNA

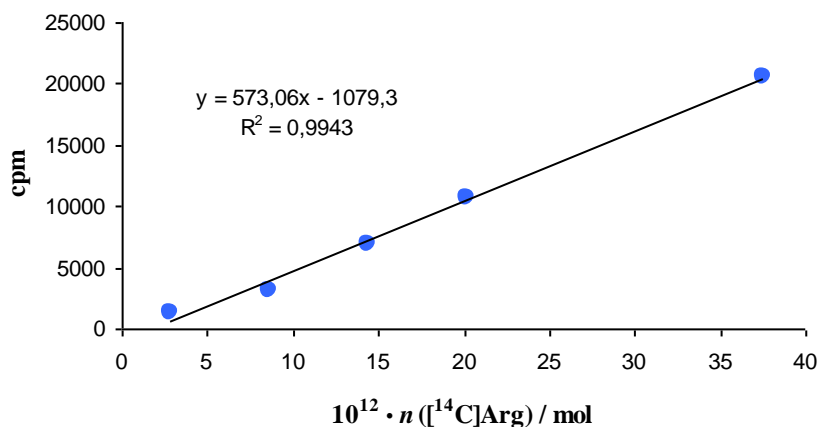
Reakcijske smjese kod određivanja udjela MttRNA<sup>Arg</sup> u ukupnoj tRNA (određivanje akceptorske aktivnosti tRNA) pripravljene su prvotnim miješanjem uzorka renaturirane tRNA i otopine natrijevog klorida u puferu za reakciju aminoaciliranja (v. 3.1.6). Otopina je potom inkubirana u termobloku pri 42 °C, a zasebno su u istom termobloku inkubirane i otopina [<sup>14</sup>C]Arg i otopina enzima.<sup>2</sup> U reakcijsku smjesu je potom dodana radioaktivno obilježena aminokiselina, a reakcija je započeta dodatkom enzima. Ukupan volumen reakcijske smjese iznosio je 40 μL, a sastav iste je sljedeći:  $c(\text{tRNA}_{\text{ukupna}}) = 2 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{enzim}) = 225 \text{ nmol dm}^{-3}$ ,  $c([\text{}^{14}\text{C}]\text{Arg}) = 70 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{NaCl}) = 150 \text{ mmol dm}^{-3}$  u puferu za reakciju aminoacilacije. Određivanje akceptorske aktivnosti provođeno je puštanjem da se reakcija odvije kroz duži vremenski period pri 42 °C, nakon čega je određena ukupna koncentracija nastalog produkta. 40 minuta i 60 minuta od početka reakcije uzeti su alikvoti reakcijske smjese od po 17 μL i naneseni su na označene komadiće filtrirnog papira (*Whatman 3MM*). Papirići su odmah potom uronjeni u hladnu otopinu trikloroctene kiseline ( $\gamma(\text{TCA}) = 100 \text{ g dm}^{-3}$ ). TCA uzrokuje taloženje makromolekula na filtrirnom papiru, dok se istovremeno radioaktivno obilježena aminokiselina nevezana za tRNA ne taloži. Otopina TCA je ostavljena u ledu na rotirajućoj platformi (*Gerhardt*) još narednih 20 minuta nakon uranjanja posljednjeg filtrirnog papira radi ispiranja ostataka [<sup>14</sup>C]Arg. U cilju daljnjeg smanjenja mogućeg pozadinskog signala izazvanog ostacima [<sup>14</sup>C]Arg, filtrirni papirići su isprani još dva puta u trajanju od po pet minuta otopinom TCA ( $\gamma(\text{TCA}) = 50 \text{ g dm}^{-3}$ ) postavljenoj na rotirajuću platformu. Radi lakšeg sušenja, papirići su potom potresani tijekom tri minute u otopini etanola, nakon čega su sušeni u inkubatoru (BTE-S, *Termo-medicinski aparati*)

---

<sup>2</sup> Napomena: dijelove postupka koji uključuju direktan kontakt s radioaktivitetom provodila je dipl. ing. biol. Ana Crnković.

### § 3. Materijali i metode

tijekom 30 minuta pri 80 °C. Suhi filtrirni papirići uronjeni su u 2,5 mL scintilacijske otopine ( $\gamma(\text{PPO}) = 5 \text{ g dm}^{-3}$  i  $\gamma(\text{POPOP}) = 0,3 \text{ g dm}^{-3}$  u toluenu) i postavljeni u scintilacijski brojač Tri-Carb 2900TR (*PerkinElmer*) gdje su kao rezultat dobivene količine zabilježenog radioaktiviteta u cpm (eng. *counts per minute*, broj otkucaja u minuti pri scintilacijskom mjerenju radioaktivnosti). Radi određivanja množine radioaktivno obilježene tvari koja je dala prethodno navedeni odziv, također je bilo potrebno izraditi baždarni pravac. Stoga su na komadiće filtrirnog papira pipetirane poznate količine  $[^{14}\text{C}]\text{Arg}$ , papirići su posušeni, uronjeni u scintilacijsku otopinu i postavljeni u scintilacijski brojač. Ovisnost tako izmjerenih cpm o množini  $[^{14}\text{C}]\text{Arg}$  korištena je kao baždarni pravac. Prilikom svakog eksperimenta izrađen je novi baždarni pravac, a grafički prikaz jednog od njih zajedno s jednadžbom i vrijednosti  $R^2$  dan je na slici 3.2.



Slika 3.2. Baždarni pravac korišten pri određivanju akceptorske aktivnosti tRNA u frakcijama sakupljenim kromatografijom obrnutih faza. Uz pravac je dana pripadna jednadžba i vrijednost korelacijskog koeficijenta  $R^2$ .

Na temelju poznate veze između količine tvari i odziva cpm, određena je koncentracija produkta nastalog u reakciji. Budući da je reakcija bila provedena tako da se svoj prisutnoj  $\text{MttRNA}^{\text{Arg}}$  omogući pretvorba u produkt reakcije, množina produkta jednaka je množini  $\text{MttRNA}^{\text{Arg}}$  prisutne u ishodnoj reakcijskoj smjesi.

#### 3.2.5.2. Određivanje kinetičkih parametara $K_m$ i $k_{cat}$

Kinetički parametri određeni su kinetikom ustaljenog stanja također uz korištenje radioaktivno obilježene aminokiseline. Reakcijske smjese su pripremljene slično onima opisanim u sklopu podnaslova 3.2.5.1. Otopina renaturirane  $\text{MttRNA}^{\text{Arg}}$  poznate koncentracije u pripadnom puferu uz dodatak natrijevog klorida zagrijana je u termobloku na

### § 3. Materijali i metode

---

42 °C. Potom joj je dodana na istu temperaturu zagrijana otopina [<sup>14</sup>C]Arg, a reakcija je započeta dodatkom enzima reakcijskoj smjesi. Ukupni volumen reakcijske smjese bio je 40 μL, a njen je sastav:  $c(\text{MtArgRS}) = 16,5 \text{ nmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{NaCl}) = 0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $c([\text{}^{14}\text{C}]\text{Arg}) = 70 \text{ μmol dm}^{-3}$  u puferu za reakciju aminoacilacije, a koncentracija tRNA je varirana (serijsko razrijeđenje) u rasponu od približno  $0,125 \cdot K_m$  do  $2 \cdot K_m$ . Koncentracija enzima kod određivanja kinetičkih parametara pomoću deletanata bila je nešto veća nego u slučaju divljeg tipa i iznosila je  $50 \text{ nmol dm}^{-3}$ . Sastav reakcijskih smjesa prilagođen je praćenju reakcije u dijelu kada postoji linearna ovisnost koncentracije nastalog produkta o vremenu (ustaljeno stanje). Reakcije su provedene u termobloku pri 42 °C, a alikvoti reakcijskih smjesa od po 9 μL uzimani su svakih 30 sekundi počevši od jedne minute u odnosu na početak reakcije. Za svaku reakciju sakupljeno je po četiri točke (taloženje nanošenjem na označeni filtrirni papirić i uranjanje u otopinu TCA,  $\rho(\text{TCA}) = 100 \text{ g dm}^{-3}$ , napravljeno je četiri puta). Ispiranje filtrirnih papirića i njihovo sušenje te brojanje radioaktiviteta u scintilacijskom brojaču napravljeno je na način identičan onom opisanom u podnaslovu 3.2.5.1, a za obradu podataka također je bio potreban baždarni pravac.

Iz baždarnog pravca moguće je za svaku vremensku točku na temelju poznate vrijednosti cpm odrediti količinu nastalog produkta. Za svaku reakcijsku smjesu pojedinog enzima (za svaki enzim provedene su reakcije pri više koncentracija  $\text{MttRNA}^{\text{Arg}}$ ) ovisnost koncentracije produkta o vremenu trajanja reakcije je linearna, a nagib je jednak promjeni koncentracije sudionika reakcije u vremenu, tj. brzini reakcije (stehiometrijski koeficijent iznosi 1). Ovisnost brzine reakcije o koncentraciji supstrata, u konkretnom slučaju riječ je o početnoj koncentraciji  $\text{MttRNA}^{\text{Arg}}$ , daje krivulju Michaelis-Menten (v. 1.1.3). Programom GraphPad Prism 6<sup>[34]</sup> napravljena je nelinearna regresija čime su dobiveni parametri  $V_{\text{max}}$  i  $K_m$  iz jednadžbe Michaelis-Menten. Obrtni broj je izračunat dijeljenjem maksimalne brzine reakcije  $s$  (poznatom) ukupnom množinskom koncentracijom enzima koji je sudjelovao u reakciji.



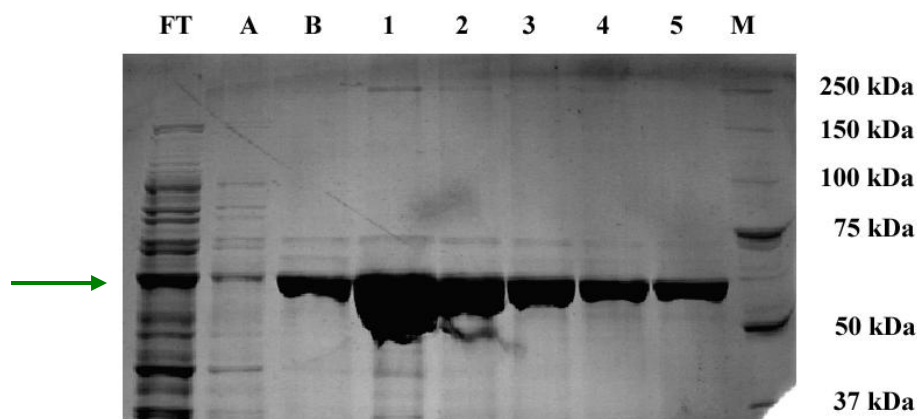
### 4. REZULTATI

#### 4.1. Pročišćavanje divljeg tipa i skraćenih inačica MtArgRS

Divlji tip i četiri skraćena oblika arginil-tRNA-sintetaze iz metanogene arheje *M. thermoautotrophicus* heterologno eksprimirani u *E. coli* izolirani su u sklopu izrade ovog rada. Pripremljena su četiri skraćena proteina:  $\Delta N_{21}MtArgRS$ ,  $\Delta N_{39}MtArgRS$ ,  $\Delta N_{89}MtArgRS$  i  $\Delta N_{tot}MtArgRS$ , gdje brojevi označavaju broj aminokiselina koji pojedinom enzimu nedostaju s N-kraja u odnosu na divlji tip istog. Enzimu  $\Delta N_{tot}MtArgRS$  nedostaje cijela N-terminalna domena, tj. svih 106 aminokiselina s tog kraja proteina. Nakon lize stanica u kojima je prekomjerno eksprimiran protein od interesa te pročišćavanja danog proteina pomoću afinitetne kromatografije, sakupljene frakcije nanosene su na poliakrilamidni gel te je provedena elektroforeza u prisustvu SDS-a (SDS-PAGE). Ovaj tip elektroforeze rabljen je u svrhu provjere uspješnosti izolacije proteina, procjene čistoće i prinosa istog. Rezultat SDS-PAGE (obojeni poliakrilamidni gel) kojom su razdvojeni sadržaji frakcija skupljenih prilikom pročišćavanja deletanta  $\Delta N_{21}MtArgRS$  prikazan je na slici 4.1. Analizom gela moguće je ustvrditi da je s dobrim prinosom izoliran protein relativne molekulske mase od približno 60 kDa (jažice 1 – 5) što je u vrlo dobrom slaganju s teoretskom  $M_r$  analiziranog deletanta  $\Delta N_{21}MtArgRS$  od 63,4 kDa (relativne molekulske mase i dekadski molarni apsorpcijski koeficijenti divljeg tipa i deletanata MtArgRS korišteni u izradi ovog rada navedeni su u tablici 4.1). Procjena relativne molekulske mase vrši se usporedbom putovanja rekombinantnog proteina i molekulskih standarda (jažica M) tijekom elektroforeze. Također je vidljivo da se dio eksprimiranog proteina nije vezao na afinitetni matriks (nevezana frakcija, jažica FT od eng. *flow through*). Prilikom ispiranja kolone puferom **A1** dolazi do neznatnog eluiranja  $\Delta N_{21}MtArgRS$ , a već s dodatkom pufera **B1** (tj. uz koncentraciju imidazola od 30 mmol dm<sup>-3</sup>) ispire se značajnija količina proteina. Najveći dio  $\Delta N_{21}MtArgRS$  se eluira po dodatku pufera **C1** koncentracije imidazola od 250 mmol dm<sup>-3</sup>. Iz slike 4.1 moguće je vidjeti da pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom ne omogućava dobivanje potpuno čistog proteina. Osim najintenzivnije vrpce (odgovara željenom proteinu), vidljive su i tanje vrpce potekle od staničnih proteina nespecifično vezanih za stacionarnu fazu. Iako se količina kontaminirajućih vrsti i stoga intenzitet njihovih vrpca na navedenom poliakrilamidnom gelu smanjuje tijekom postupka, potrebna je dodatna metoda pročišćavanja željenog proteina. U ovom je radu u tu svrhu korištena gel-filtracija (opisano u daljnjem tekstu). Analiza analogna ovoj izvršena je prilikom izolacije svakog pojedinog deletanta i divljeg tipa proteina MtArgRS te su dobiveni gelovi analognog izgleda

## § 4. Rezultati

Razlika se očituje u drugačijem položaju proteina od interesa na gelu, što ovisi o relativnoj molekularnoj masi istog, te u manjim varijacijama u intenzitetu tih vrpca; potonje je posljedica razlike u količinama samog proteina u pojedinom staničnom ekstraktu.



Slika 4.1. Analiza uspješnosti izolacije  $\Delta N21MtArgRS$  afinitetnom kromatografijom. Elektroforezom na denaturirajućem poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE) razdvojen je sadržaj frakcija sakupljenih tijekom pročišćavanja. Ispiranja su označena FT (nevezana frakcija, skraćenica od eng. *flow through*), A (ispiranje puferom **A1**), B (ispiranje puferom **B1**); frakcije prilikom elucije puferom **C1** označene su brojevima 1-5; M je marker masa. Zelenom je strelicom označen položaj  $\Delta N21MtArgRS$ . Gel je obojen otopinom boje *Coomassie Brilliant Blue R-250*.

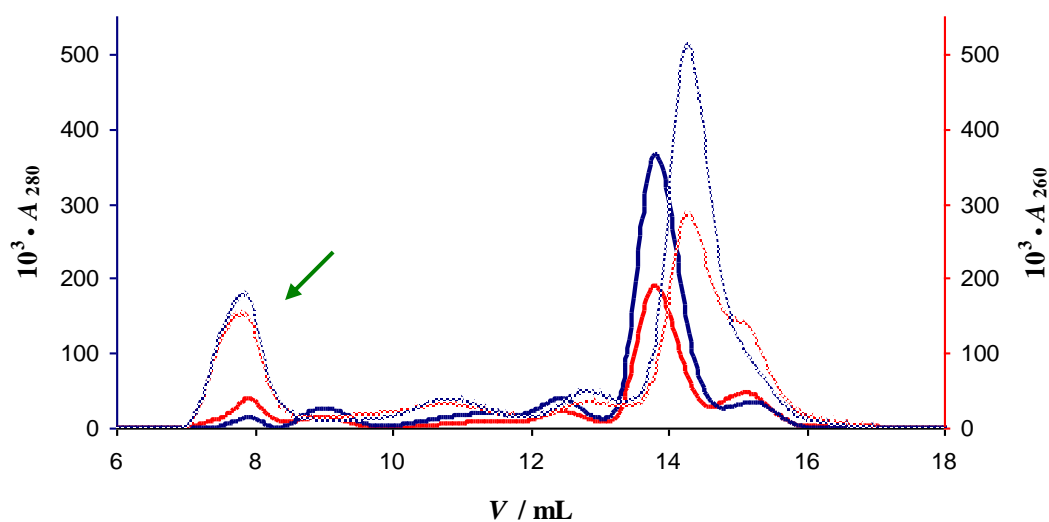
Tablica 4.1. Relativne molekulske mase i dekadski molarni apsorpcijski koeficijenti divljeg tipa i deletanata MtArgRS korišteni u ovom radu. Teorijski dekadski molarni apsorpcijski koeficijenti procijenjeni su uz pomoć programa ProtParam.<sup>[36]</sup>

protein	$M_r$ / kDa	$10^{-3} \cdot \epsilon_{280} / (\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1})$
MtArgRS	63,6479	53,210
$\Delta N21MtArgRS$	61,3553	51,800
$\Delta N39MtArgRS$	59,3479	51,800
$\Delta N89MtArgRS$	53,8176	50,310
$\Delta N_{\text{tot}}MtArgRS$	52,8802	47,330

Dodatno pročišćavanje divljeg tipa i deletanata MtArgRS provedeno je metodom gel-filtracije. Slika 4.2 prikazuje kromatograme divljeg tipa MtArgRS i proteina s najvećom delecijom,  $\Delta N_{\text{tot}}MtArgRS$ . Ovaj postupak pročišćavanja proveden je za svaki rabljeni protein, a kromatogrami prikazani na slici 4.2 odabrani su za ilustraciju zbog najveće razlike u masi proteina što rezultira i najvidljivijim pomakom volumena elucije. Nasuprot tome, deletanti  $\Delta N21MtArgRS$  i  $\Delta N39MtArgRS$  se eluiraju pri istom volumenu kao divlji tip (13,8 mL).

## § 4. Rezultati

Prazan volumen stupca iznosi približno 7,7 mL (na slici 4.2 signal označen zelenom strelicom). Kod konkretnih kromatograma prikazanih na slici 4.2, signal divljeg tipa proteina nalazi se na 13,82 mL, a  $\Delta N_{\text{tot}}\text{MtArgRS}$  na 14,28 mL. Pojašnjenje ovakve razlike u volumenima elucije dano je u sklopu narednog poglavlja. Prilikom svake gel-filtracije provedene u sklopu pročišćavanja proteina praćene su apsorbancije pri dvije valne duljine, 280 nm (maksimum apsorpcijskih spektara aromatskih aminokiselina triptofana i tirozina) i 260 nm (maksimum apsorpcijskih spektara nukleotidnih baza). U nastavku poglavlja svi kromatogrami dobiveni snimanjem apsorbancije pri valnoj duljini od 280 nm prikazani su plavom bojom, a oni koji pripadaju mjerenju apsorbancije pri 260 nm crvenom bojom. Iako je u smislu sakupljanja frakcija koje sadrže protein od interesa važno praćenje apsorbancije pri  $\lambda = 280$  nm, podatak o apsorbanciji pri  $\lambda = 260$  nm dobar je pokazatelj potencijalne kontaminacije uzorka proteina nukleinskim kiselinama. Naime, u dostupnoj se literaturi može pronaći koliki omjer navedenih apsorbancija odgovara pojedinom udjelu nukleinskih kiselina u uzorku smjese proteina i nukleinskih kiselina.<sup>[37]</sup> Kako je kasnije navedeno, ovaj je podatak u kvalitativnom smislu važan pri određivanju ravnotežnih konstanti disocijacije kompleksa MtArgRS s pripadnom tRNA metodom gel-retardacijske elektroforeze.

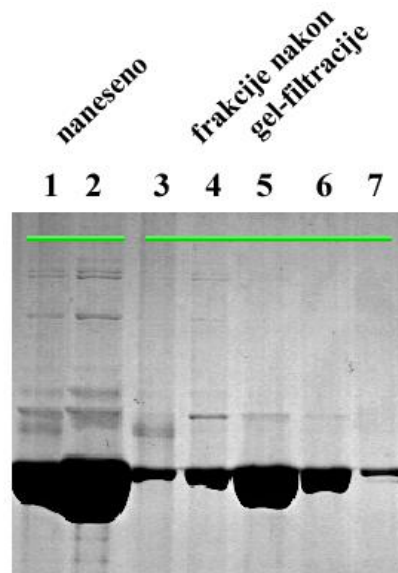


Slika 4.2 Preklopljeni kromatogrami dobiveni zasebnim gel-filtracijama MtArgRS i deletanta  $\Delta N_{\text{tot}}\text{MtArgRS}$ . Podebljanom punom crtom otisnuti kromatogram pripada pročišćavanju divljeg tipa MtArgRS, a točkasto otisnuti pročišćavanju  $\Delta N_{\text{tot}}\text{MtArgRS}$ . Crvene su krivulje dobivene snimanjem apsorbancija pri 260 nm, a plave pri 280 nm. Zelenom je strelicom označen signal koji odgovara praznom volumenu stupca.

Po završetku pročišćavanja proteina gel-filtracijom, pojedine frakcije analizirane su metodom SDS-PAGE. Rezultat te vrste dan je na slici 4.3 na kojoj je vidljivo da korak dodatnog

## § 4. Rezultati

kromatografskog pročišćavanja (ovdje gel-filtracija) zaista doprinosi povećanju čistoće željenog proteina budući da se broj vrpce koje pripadaju kontaminirajućim proteinskim vrstama smanjio nakon propuštanja proteina kroz gel-filtracijsku kolonu. Kao i kod koraka afinitetne kromatografije, analogan je postupak analize sakupljenih frakcija proveden sa svakom od inačica proteina te su rezultati slični ovdje prikazanima.



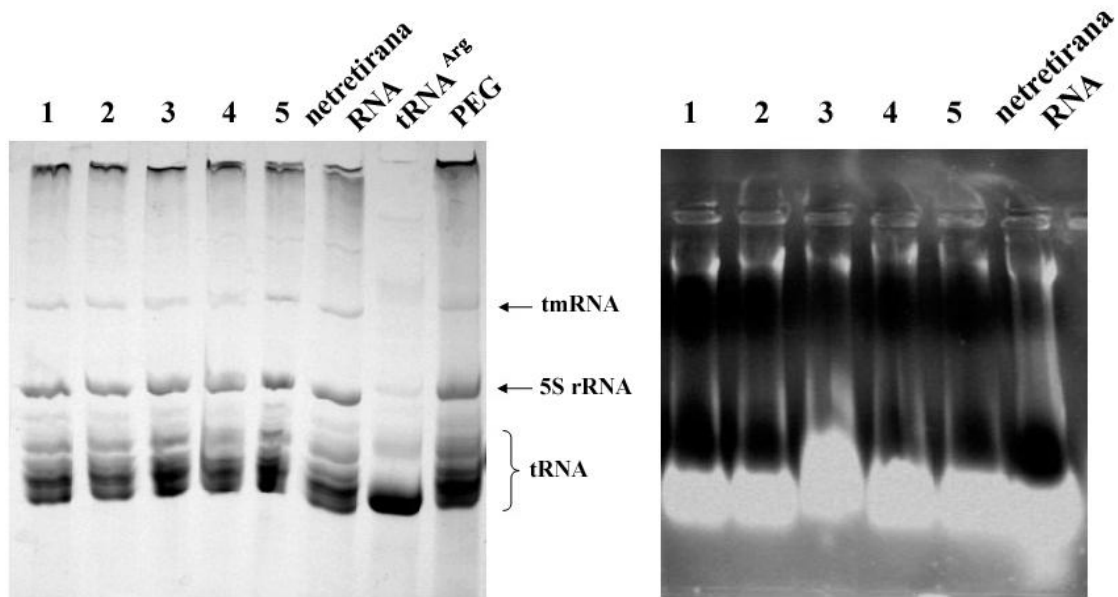
Slika 4.3. Analiza frakcija sakupljenih tijekom gel-filtracije deletanta  $\Delta N89MtArgRS$  prethodno pročišćenog afinitetnom kromatografijom. Analiza je izvršena denaturirajućom elektroforezom uzoraka (SDS-PAGE). Prve dvije jažice sadrže uzorak prije nanošenja na kolonu, a narednih pet sadrži frakcije sakupljene tijekom gel-filtracije (volumen elucije između 12 i 15 mL). Za vizualizaciju je korištena boja *Coomassie Brilliant Blue R-250*.

### 4.2. Optimiranje postupka pročišćavanja $MttRNA^{Arg}$

U svrhu ispitivanja interakcije  $MtArgRS$  s pripadnom  $tRNA^{Arg}$ , eksprimiran je gen za  $tRNA$  iz arheje *M. thermoautotrophicus* u bakteriji *E. coli*. Ovakva ekspresija naziva se heterolognom jer je arhejski gen eksprimiran u bakterijskom organizmu koji ga inače ne sadrži. Za razliku od pročišćavanja proteina, heterologno eksprimirana  $tRNA$  izolirana je korištenjem smjese fenola i kloroforma, nakon što je prethodno bakterijska stanica lizirana i djelomično su eliminirani bakterijski proteini prisutni u lizatu korištenjem zasićene vodene otopine fenola. Nakon otvaranja stanica i pročišćavanja nukleinskih kiselina od proteina, dobivena smjesa koja sadrži nukleinske kiseline i željenu  $tRNA$  aminoacilirana je s ciljem utvrđivanja udjela heterologne  $MttRNA^{Arg}$  u ukupnoj  $tRNA$  dobivenoj iz stanice. Reakcija je provedena bez i uz prethodnu renaturaciju izoliranih molekula. Ovim pristupom željelo se ustvrditi sadrži li (i ako da, u kojoj mjeri) uzorak izolirane  $MttRNA^{Arg}$  denaturirane vrste. Ukoliko je  $tRNA$  nepravilno oblikovana u smislu tercijarne strukture, pripadna aaRS je ne

može pravilno prepoznati i aminoacilirati. Ovdje je zabilježeno da početni uzorak sadrži oko 30 % denaturiranih molekula tRNA<sup>Arg</sup> s obzirom da je u reakciji aminoacilacije alikvot koji prethodno nije renaturiran pokazao 30 % manju akceptorsku aktivnost. Potencijalni razlog za denaturaciju može biti sam proces ekstrakcije (denaturacija tRNA tijekom ekstrakcije), ali i gomilanje nepravilno smotane heterologne tRNA tijekom ekspresije u samom organizmu domaćina.

Tijekom izdvajanja nukleinskih kiselina ekstrakcijom fenolom i kloroformom te taloženja etanolom, uz željene molekule dolazi i do izdvajanja staničnih ugljikohidrata te drugih vrsta RNA. Nukleinske kiseline većih molekulskih masa moguće je istaložiti dodatkom inertnog polimera polietilenglikola, a kromatografijom na slabom ionskom izmjenjivaču uzorak se dodatno pročišćuje. Prije provođenja ovih dvaju koraka, uzorak je podvrgnut blago bazičnim uvjetima pri kojima dolazi do hidrolize esterskih veza između tRNA i aminokiseline. Cilj ovog koraka jest deacilacija, tj. odstranjivanje aminokiseline, heterolognih molekula MttRNA<sup>Arg</sup> koje su u organizmu domaćina mogle biti aminoacilirane od strane endogene (bakterijske) ArgRS. Bazični bi uvjeti međutim istovremeno mogli uzrokovati nepoželjnu hidrolizu fosfodieterskih veza molekula RNA, što bi u konkretnom slučaju dovelo do degradacije molekule od interesa. Tretiranjem uzoraka nukleinskih kiselina puferima Tris-HCl različitih bazičnih vrijednosti pH, zaustavljanjem potencijalne hidrolize zakiseljavanjem te nanošenjem uzoraka na poliakrilamidni gel u prisustvu ureje (slika 4.4 lijevo) pokazano je da tijekom deacilacije ne dolazi do hidrolize molekula RNA (ili je ona zanemariva). U slučaju hidrolize, pri dnu gela trebali bi biti vidljivi manji, odnosno brže putujući fragmenti (uzorci 1 – 5) u odnosu na uzorak netretirane RNA. Uz molekule tRNA različitih veličina, na gelu se u nekim uzorcima primjećuje vrpca koja odgovara ribosomskoj 5S rRNA i tmRNA (transportna glasnična RNA). Nanošenjem veće količine tretiranih uzoraka na agarozni gel također nije pronađeno postojanje manjih fragmenata (slika 4.4 desno). U predzadnjoj jažici denaturirajućeg poliakrilamidnog gela koja sadrži uzorak prethodno pročišćene tRNA specifične za arginin vidljiv je izostanak vrpce koje pripadaju drugim vrstama ribonukleinskih kiselina. Na istom je gelu analiziran i sadržaj taloga po precipitaciji PEG-om. Može se zamijetiti da dodatkom PEG-a dolazi i do djelomičnog taloženja prisutnih molekula tRNA (posljednja jažica na slici 4.4 lijevo).



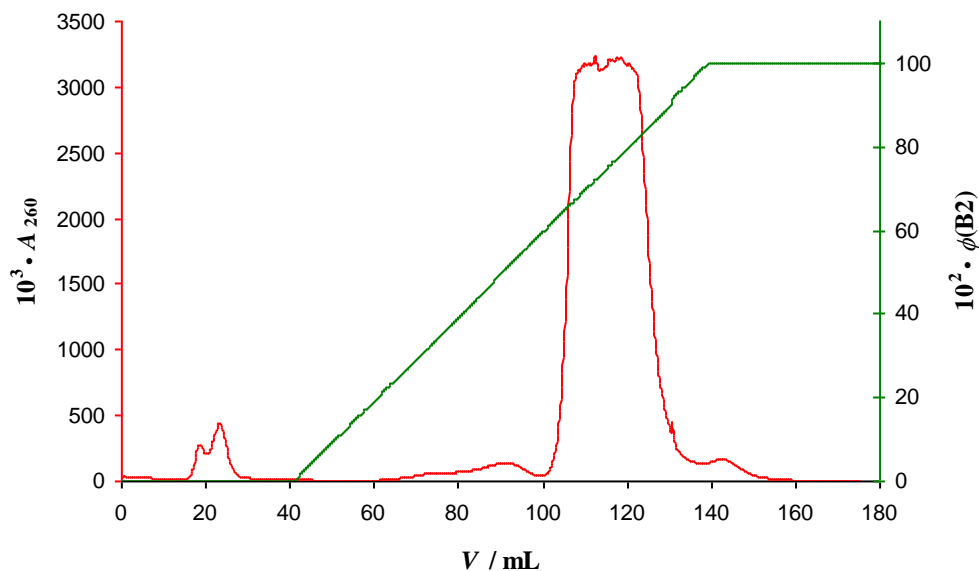
Slika 4.4. Analiza potencijalne hidrolize fosfodiesterskih veza molekula RNA u preparativnom koraku elektroforezama na poliakrilamidnom gelu u prisustvu ureje (lijevo) i agaroznom gelu (desno). Brojevima označene jažice odgovaraju uzorcima RNA tretiranim Tris-HCl-om određenog pH (jažica 1 pH 7,40; jažica 2 pH 8,03; jažica 3 pH 8,49; jažica 4 pH 9,00; jažica 5 pH 10,6); uzorak označen „netretirana RNA“ nije tretiran Tris-HCl-om; tRNA<sup>Arg</sup> je nezavisno pročišćena tRNA<sup>Arg</sup>; resuspendirani talog nastao nakon dodatka polietilenglikola označen je kraticom „PEG“.

Desno od slike poliakrilamidnog gela prikazana je karakteristična pokretljivost dane vrste molekula RNA. Nukleinske kiseline su vizualizirane toluidinskim modrilom u slučaju poliakrilamidnog gela, odnosno etidijevim bromidom u slučaju agaroznog gela.

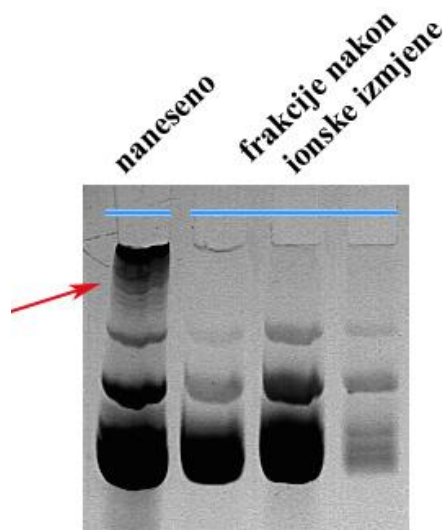
Prvi korak u optimiranju metode za izolaciju molekula tRNA od interesa iz bakterija *E. coli* sastojao se u nanošenju deaciliranog uzorka (prema prethodno navedenom, radi se o smjesi ugljikohidrata, eventualnih ostataka PEG-a i zaostalih nukleinskih kiselina veće molekulske mase pored željenih nukleinskih kiselina) na kolonu slabog anionskog izmjenjivača. Prije pročišćavanja MttRNA<sup>Arg</sup> iz obogaćene smjese dobivene prekomjernom ekspresijom u *E. coli* (BL21), postupak je ispitan korištenjem ukupne tRNA izolirane iz istog soja, tj. tRNA *E.coli* u uvjetima kada uvjetovane ekspresije nije bilo. Poznato je kako je kromatografijom ukupne tRNA na slabom ionskom izmjenjivaču (kao što je to ovdje DEAE-sefaroza) moguće postići relativno dobro razdvajanje upotrebom vrlo „plitkog“ gradijenta i ponavljanjem kromatografije pri kiselom i fiziološkom pH.<sup>[38]</sup> Međutim, kako je ovdje cilj bilo postizanje dobrog razdvajanja dodatnom upotrebom kromatografije obrnutih faza, a ne samom kromatografijom ionske izmjene, upotrijebljen je „strmi“ gradijent (relativno naglo povećanje volumnog udjela pufera **B2** u eluensu) kojim se željelo smanjiti gubitke u prinosu heterologne tRNA. Izgled pritom dobivenog kromatograma gotovo je identičan za razdvajanje endogene *E.coli* (ukupne) tRNA i uzorka obogaćenog MttRNA<sup>Arg</sup>. Reprezentativni

## § 4. Rezultati

kromatogram prikazan je na slici 4.5 i na njemu je uočljiv apsorpcijski maksimum koji sadrži različite vrste nukleinskih kiselina (v. Rasprava) eluirane pri volumnom udjelu pufera **B2** u eluensu od približno 60 %. Analiza frakcija dominantnog signala dana je na slici 4.6.



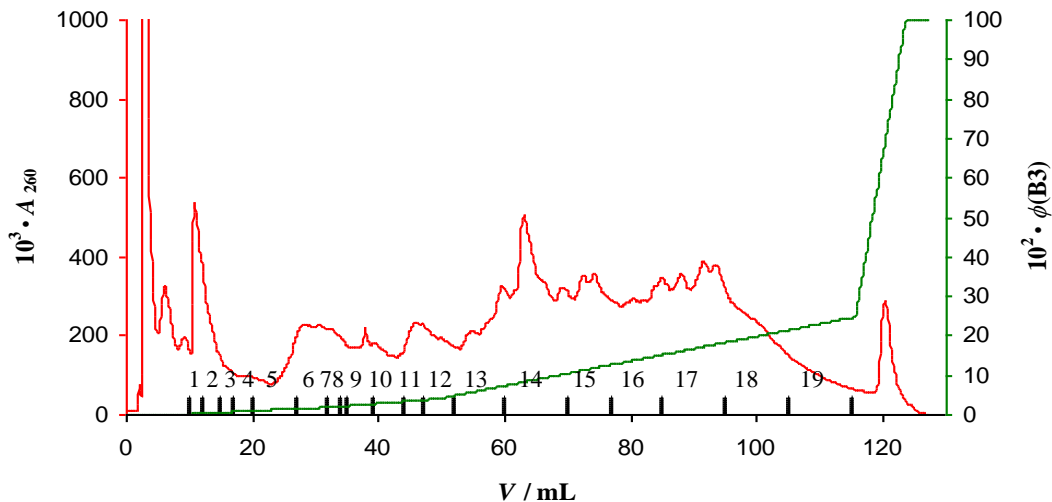
Slika 4.5. Kromatogram dobiven snimanjem apsorbancije pri  $\lambda = 260$  nm prilikom pročišćavanja tRNA izolirane iz *E. coli* s prekomjerno eksprimiranom MttRNA<sup>Arg</sup> (crvena krivulja). Ovisnost volumnog udjela pufera **B2** u eluensu o volumenu eluiranja dana je zelenom bojom.



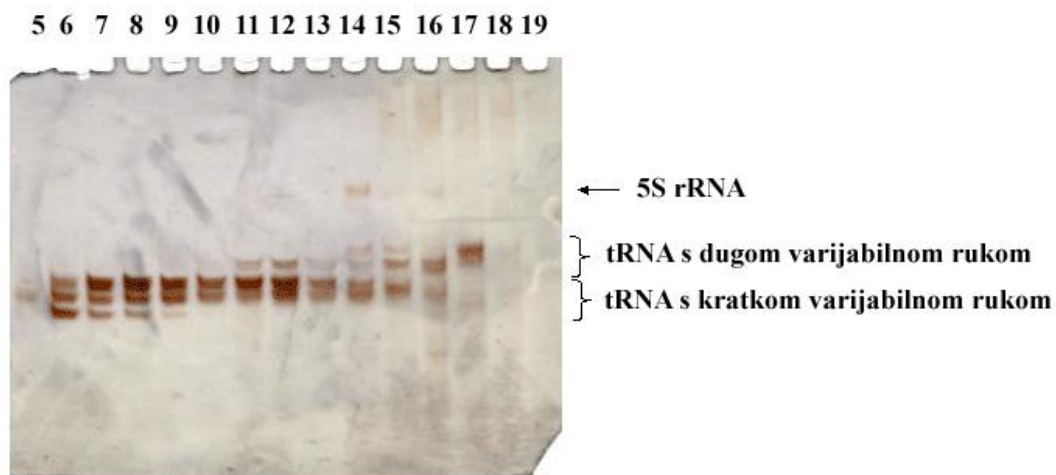
Slika 4.6. Analiza sastava relevantnih frakcija nakon kromatografije na DEAE-sefarozi elektroforezom na poliakrilamidnom gelu u prisustvu ureje. Prva jažica sadrži uzorak nanesen na kolonu, a naredne tri sadrže frakcije dominantnog signala (slika 4.5). Crvenom strelicom označene su vrpce molekula većih molekularskih masa (zaostale nakon taloženja PEG-om) uklonjene kromatografijom ionske izmjene. Gel je obojen toluidinskim modrilom.

Nakon kromatografije na DEAE-sefarozi relevantne frakcije (slika 4.6) su sakupljene i nukleinske kiseline su ponovno istaložene dodatkom etanola i otopine natrijevog acetata. Talog je otopljen u redestiliranoj vodi i nanesen na kolonu za kromatografiju obrnutih faza. Dobiveni kromatogrami (slike 4.7 i 4.9) složenog su izgleda. U uzorku koji je sadržavao endogenu tRNA bakterije *E. coli* u kojoj nije bilo prekomjerno eksprimirane MttRNA<sup>Arg</sup> očekivano ne postoji dominantni signal (v. Rasprava), a pripadni kromatogram dan je na slici 4.7. Istaknuti signal na samom početku kromatograma vjerojatno pripada molekulama adenozin-5'-trifosfata koje se lako kopurificiraju prilikom izolacije RNA iz organizma. Pojedine frakcije označene na kromatogramu na slici 4.7 analizirane su na poliakrilamidnom gelu u prisustvu ureje (slika 4.8). U svrhu detekcije ovdje je korišteno bojenje srebrom kako bi se detektirala i vrlo mala količina prisutne RNA. Analizom frakcija na 10 %-tnom denaturirajućem poliakrilamidnom gelu (slika 4.8) moguće je stoga razlučiti niz vrpci koje pripadaju molekulama tRNA različitih veličina. Duljina tRNA bakterije *E. coli* tipično se kreće između 74 (tRNA<sup>Cys</sup>, tRNA<sup>Gly</sup>) i 77 nukleotida (tRNA<sup>Arg</sup>, tRNA<sup>Asp</sup>), a odstupanje postoji u molekula tRNA koje sadrže dugu varijabilnu ruku. Bakterije i eukariotski kloroplasti sadrže tri izoakceptorske porodice tRNA s dugom varijabilnom rukom: tRNA<sup>Leu</sup>, tRNA<sup>Ser</sup> i tRNA<sup>Tyr</sup>. U arheja i eukariota dugu varijabilnu ruku posjeduju tRNA<sup>Ser</sup> i tRNA<sup>Leu</sup>, dok je istovremeno duga varijabilna ruka kod tRNA<sup>Tyr</sup> bitno manje očuvana.<sup>[39]</sup> Analiza frakcija dobivenih razdvajanjem ukupne tRNA iz *E. coli* (slika 4.8) pokazuje postojanje generalnog trenda pri kojemu se dulje molekule eluiraju kasnije u gradijentu etanola. Naime, u ovoj se metodi molekule RNA razdvajaju na temelju više faktora, između ostalog i broja nukleotida (v. Rasprava).





Slika 4.7. Kromatogram dobiven praćenjem apsorbancije pri  $\lambda = 260$  nm prilikom pročišćavanja ukupne tRNA iz *E. coli* kromatografijom obrnutih faza (crvena krivulja). Uzorak je prethodno pročišćen kromatografijom ionske izmjene. Ovisnost volumnog udjela pufera **B3** u eluensu o volumenu eluiranja dana je zelenom bojom. Dodatno su na osi apscisa označene i numerirane frakcije od kojih je dio (frakcije 5 – 19) analiziran denaturirajućom elektroforezom (prikazano na slici 4.8).



Slika 4.8. Elektroforezom na poliakrilamidnom gelu u prisustvu ureje analizirane frakcije 5 – 19 sakupljene tijekom provođenja kromatografije obrnutih faza tRNA *E. coli* (slika 4.7). S obzirom na relativnu pokretljivost uzoraka, desno od slike vrpce su pripisane odgovarajućim nukleinskim kiselinama prisutnim u ishodišnoj smjesi. Gel je obojen srebrom.

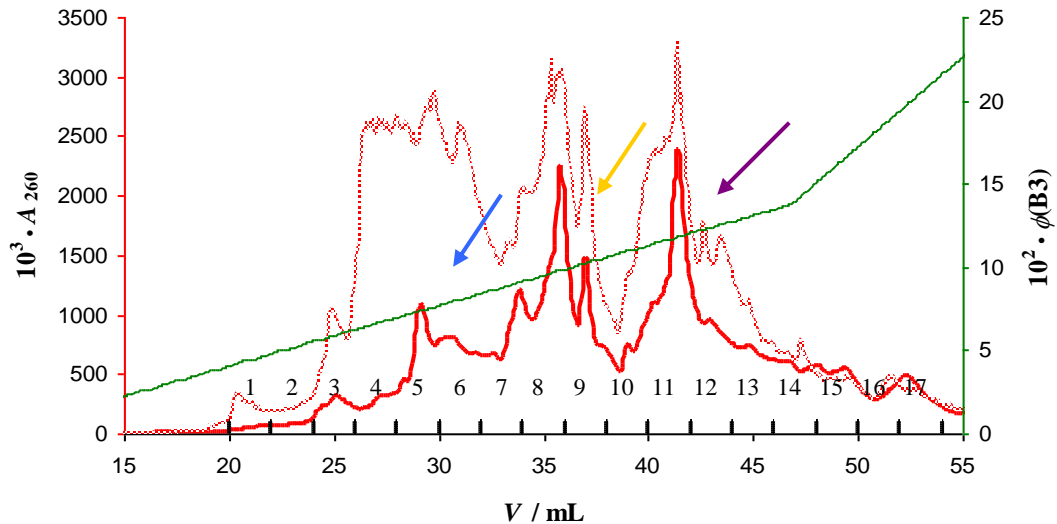
Kao što je prethodno spomenuto, u slučaju kada je provedena prekomjerna ekspresija molekula MttRNA<sup>Arg</sup> u organizmu *E. coli* također je kao prvi kromatografski postupak iz prethodno navedenih razloga korištena kromatografije anionske izmjene. Kromatogram na slici 4.5 potječe upravo od pročišćavanja takvog uzorka. Daljnje razdvajanje smjese

nukleinskih kiselina obogaćene s MttRNA<sup>Arg</sup> (sakupljene u jedan dominantni signal pri kromatografiji ionske izmjene) provedeno je kromatografijom obrnutih faza. Jedan je alikvot iskorišten za kromatografiju na identičan način kako je to učinjeno s bakterijskom ukupnom tRNA, dok je drugi prije nanošenja na kolonu podvrgnut reakciji arginilacije, tj. reakciji kovalentnog povezivanja arginina i tRNA<sup>Arg</sup> posredovano s MtArgRS. Prilikom kromatografije netretiranog (prvog) uzorka tRNA uočena su tri dominantna signala koja u naknadno provedenoj reakciji aminoacilacije pokazuju najveću aktivnost. Budući da MttRNA<sup>Arg</sup> ne može varirati duljinom nukleotida jer je dobivena ekspresijom jednog izoakceptorskog gena, ali može sadržajem dodatnih grupa (posttranskripcijske modifikacije, v. Rasprava) i terciarnom strukturom, zaključeno je kako tri dominantna signala pripadaju trima populacijama MttRNA<sup>Arg</sup> različitog stupnja modificiranosti. Kako ovakvo razdvajanje MttRNA<sup>Arg</sup> umanjuje prinos, a ne povećava razdvajanje od kontaminirajućih vrsta tRNA, s ciljem usavršavanja ovog oblika pročišćavanja korištena je i arginilirana MttRNA<sup>Arg</sup>, tj. Arg-MttRNA<sup>Arg</sup>. Razlog ovom pristupu leži u činjenici da se uvođenjem dodatne polarne skupine (arginina) željelo utjecati na vrijeme eluiranja i kasno eluirajuće populacije MttRNA<sup>Arg</sup> pomaknuti na početni dio gradijenta etanola, potencijalno u zajednički signal. No po podvrgavanju uzorka arginilaciji ponovno se javljaju tri istaknuta signala. Istovremeno dolazi do njihovog pomaka tijekom elucije prema nižem udjelu etanola, ali proporcionalno za svaki signal. Radi lakšeg uočavanja pomaka do kojeg dolazi uslijed arginilacije uzorka, na slici 4.9 preklapljena su ova dva kromatograma.

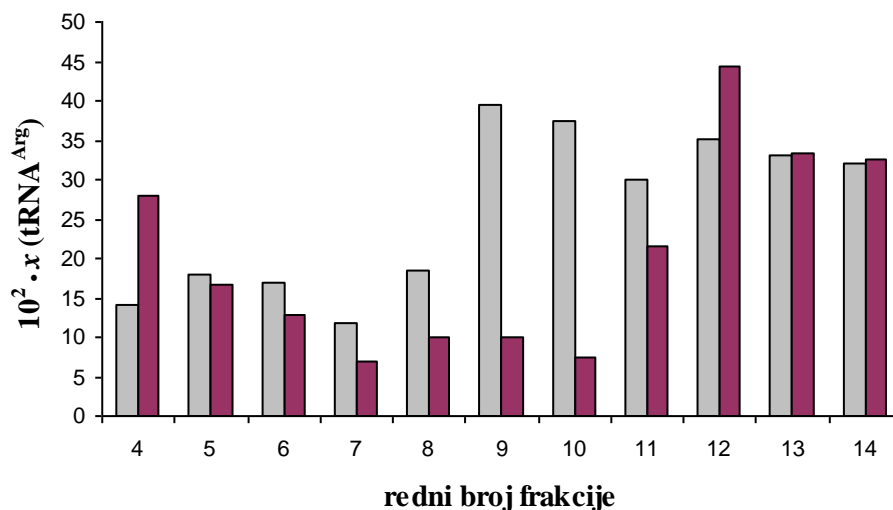
Kromatogrami dobiveni metodom kromatografije obrnutih faza uobičajeno su vrlo kompleksnog izgleda zbog čega je za konačnu identifikaciju frakcija koje sadrže MttRNA<sup>Arg</sup> provedena reakcija aminoaciliranja (određivanje akceptorske aktivnosti tRNA) korištenjem radioaktivno obilježenog supstrata [<sup>14</sup>C]Arg. Na taj je način moguće odrediti ne samo sadrži li pojedina frakcija željenu tRNA, već i udio tRNA<sup>Arg</sup> u ukupnom sadržaju iste. Na slici 4.10 dan je grafički prikaz podataka o akceptorskoj aktivnosti tRNA frakcija označenih na kromatogramu prikazanom na slici 4.9. Na njemu je vidljivo da se tRNA<sup>Arg</sup> nalazi u svakom od tri zasebna dominantna signala. Frakcije koje pripadaju svakom od njih s kromatografije nearginilirane tRNA, označena strelicama na slici 4.9, podvrgnute su dodatnom ciklusu pročišćavanja kromatografijom obrnutih faza (slika 4.11), pri čemu je korišten „plići“ gradijent pufera **B3** nego kod prethodne kromatografije. Ovakva promjena uzrokuje daljnje razdvajanje različitih molekula koje su na prethodnom kromatogramu (slika 4.9) pripadale istom signalu. Sakupljenim je frakcijama određena akceptorska aktivnost, pa su tako na slici 4.11 označene arginilnom tRNA najbogatije frakcije u pojedinoj kromatografiji obrnutih faza,

## § 4. Rezultati

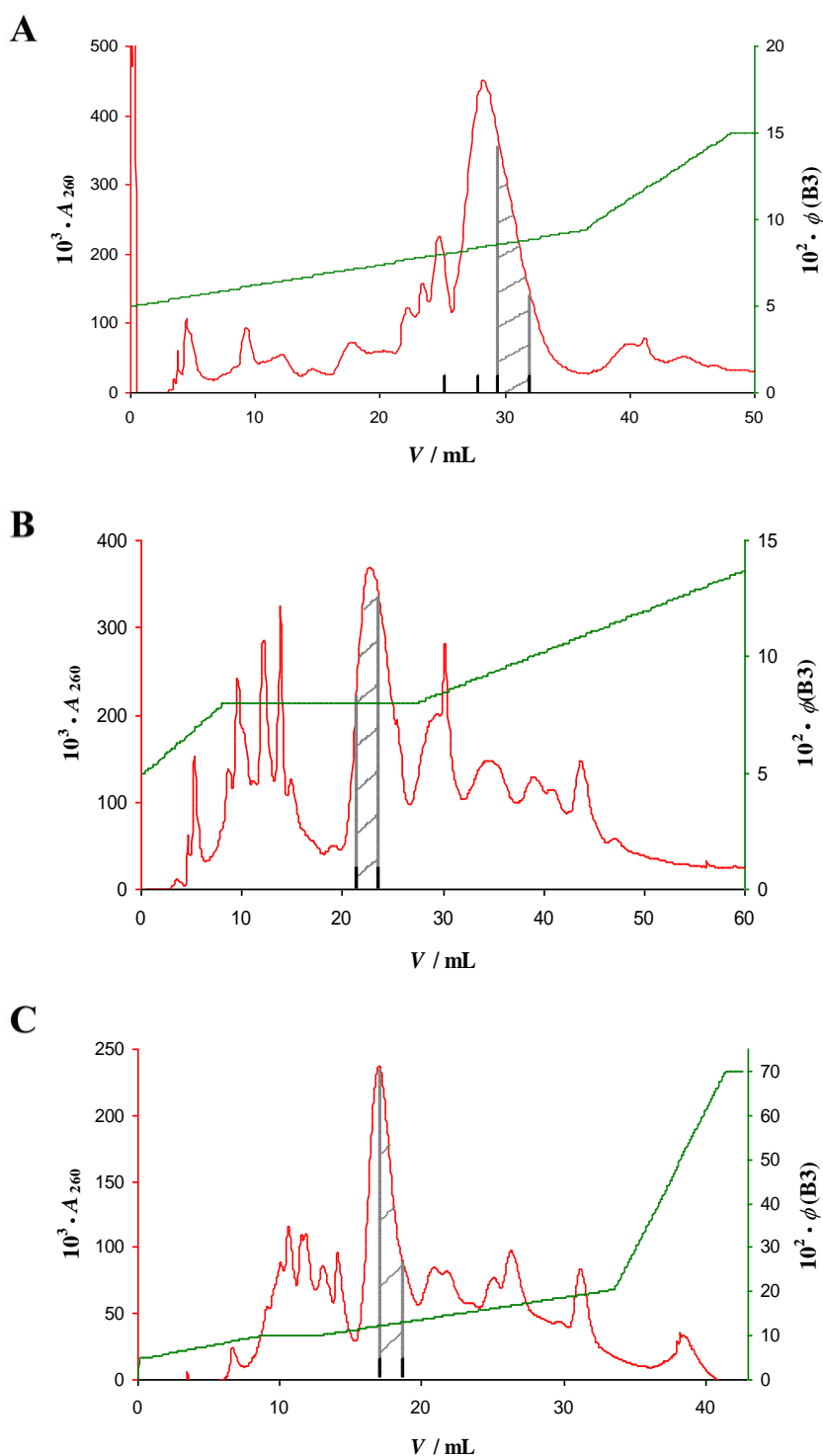
a u opisu slike naveden je množinski udio tRNA<sup>Arg</sup> u pojedinoj. Vidljivo je da je ovakvim postupkom moguće dobiti MttRNA<sup>Arg</sup> stopostotne čistoće.



Slika 4.9. Kromatogrami netretiranog i arginiliranog alikvota tRNA u kromatografiji obrnutih faza. Oba uzorka su prethodno pročišćena kromatografijom ionske izmjene. Kromatogrami (crvene linije) su dobiveni praćenjem apsorbancije pri  $\lambda = 260$  nm. Točkasto otisnut kromatogram pripada arginiliranom uzorku tRNA, a podebljanim punom crtom otisnut nearginiliranom uzorku tRNA. Zeleno je prikazana ovisnost volumnog udjela pufera **B3** u eluentsu o volumenu eluiranja. Na osi apscisa označene frakcije daju uvid u sadržaj istih.



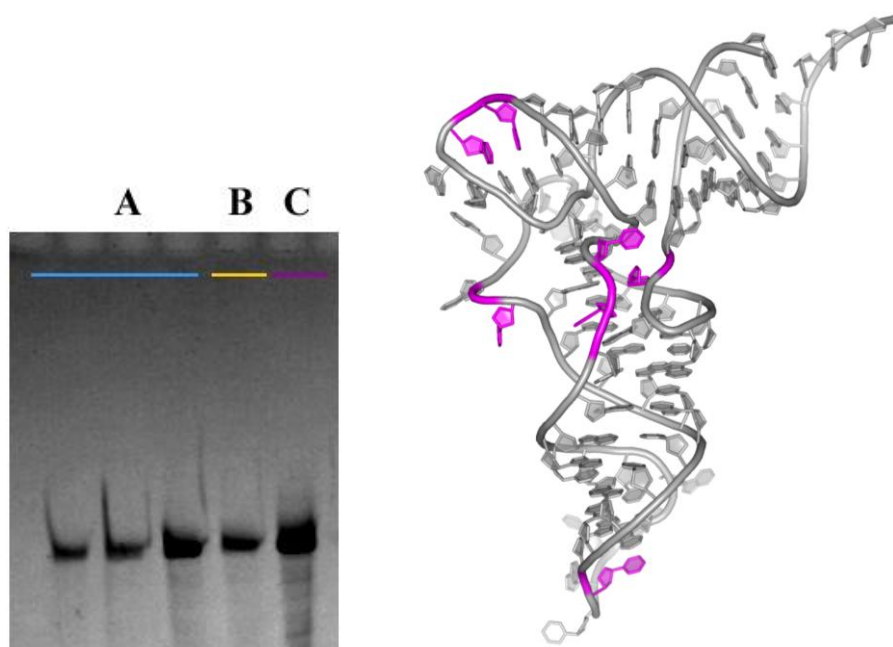
Slika 4.10. Množinski udio tRNA<sup>Arg</sup> u ukupnoj tRNA u frakcijama prikupljenim tijekom provođenja kromatografije obrnutih faza (slika 4.9) za prethodno nearginiliranu (sivi stupci) i arginiliranu (ljubičasti stupci) tRNA.



Slika 4.11. Kromatogrami dobiveni snimanjem apsorbancije pri  $\lambda = 260$  nm prilikom pročišćavanja frakcija prvog (A; plavom strelicom označen na slici 4.9), drugog (B; žutom strelicom označen na slici 4.9) i trećeg (C; ljubičastom strelicom označen na slici 4.9) dominantnog signala kromatografijom obrnutih faza. Zeleno je prikazana ovisnost volumnog udjela pufera **B3** u eluensu o volumenu eluiranja. Crnim su crtama na osi apscisa označene frakcije s visokim udjelom tRNA<sup>Arg</sup>: (A) redom 68,22 % i 88,75 %, a sivo iscrtkanom području pripada frakcija s najvišim množinskim udjelom tRNA<sup>Arg</sup> od 91,82 %, (B i C) sivo iscrtkanim područjima pripadaju frakcije u kojima je množinski udio tRNA<sup>Arg</sup> približno 1.

## § 4. Rezultati

Analiza nekolicine frakcija u kojima je aminoaciliranjem potvrđen visok udio MttRNA<sup>Arg</sup> (označene frakcije i iscrtkana područja pojedinih kromatograma) također je provedena elektroforezom na poliakrilamidnom gelu u prisustvu ureje. Pripadni je gel prikazan na slici 4.12 lijevo. Na njemu je vidljiv potpuni izostanak višestrukih vrpca u slučajevima svih pet ispitanih frakcija što dalje potvrđuje prikladnost provedenih metoda za izdvajanje MttRNA<sup>Arg</sup>. Na slici 4.12 desno prikazan je model MttRNA<sup>Arg</sup> na kojem su istaknuta potencijalna mjesta posttranskripcijskih modifikacija procijenjena na osnovu posttranskripcijskih modifikacija tRNA<sup>Arg</sup> domaćina *E. coli*. U narednom je poglavlju detaljnije pojašnjen utjecaj ovih modifikacija na samo pročišćavanje, kao i kemijska priroda svake od njih.



Slika 4.12. (lijevo) Elektroforezom na poliakrilamidnom gelu u prisustvu ureje analizirane frakcije najvišeg udjela MttRNA<sup>Arg</sup> (redom svih pet frakcija izdvojenih na slici 4.11) dobivene pročišćavanjem kromatografijom ionske izmjene te dvjema kromatografijama obrnutih faza. Frakcije su označene prema tome s koje kromatografije obrnutih faza na slici 4.11 potječu kao A, B i C. Također su na gelu različitim bojama istaknute jažice ovisno o tome kojem signalu na slici 4.9 frakcije pripadaju. Gel je obojen toluidinskim modrilom. (desno) Model MttRNA<sup>Arg</sup> na kojemu su ružičasto istaknuta mjesta potencijalnih posttranskripcijskih modifikacija. U gornjem desnom dijelu modela vidljiv je jednolančani dio molekule koji pripada 3'-kraju (5'CCA3') molekule na koji dolazi do vezanja aminokiseline pomoću pripadne aminoacil-tRNA-sintetaze. Slika je napravljena u programu PyMOL.<sup>[40]</sup>

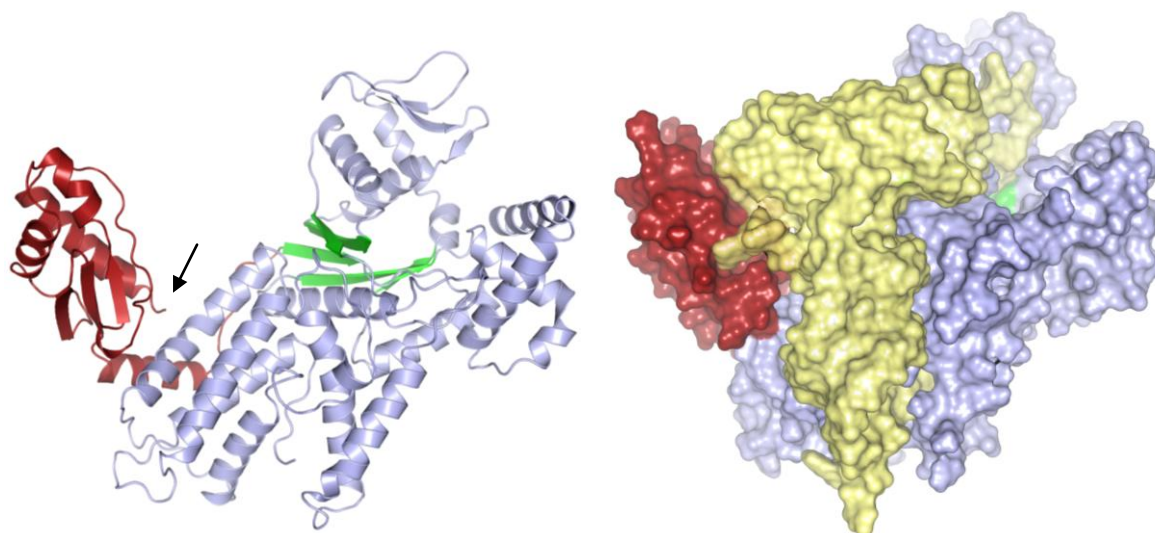
### 4.3. Ispitivanje stabilnosti kompleksa MtArgRS:MttRNA<sup>Arg</sup>

Arginil-tRNA-sintetaza katalizira nastanak arginilirane tRNA<sup>Arg</sup>, a reakcija je karakterizirana uzajamno uvjetovanim konformacijskim promjenama molekule enzima i tRNA koja istovremeno služi kao i supstrat i kao kofaktor. Kao posljedica, tek po vezanju tRNA dolazi do sklapanja aktivnog mjesta ovog enzima. S ciljem ispitivanja uloge pojedinih elemenata N-terminalne domene arginil-tRNA-sintetaze iz arheje *M. thermoautotrophicus* (MtArgRS) u vezanju pripadne tRNA, korišteni su divlji tip i četiri krnja oblika enzima skraćena s N-kraja. Vrijednosti ravnotežnih konstanti disocijacije kompleksa divljeg oblika i deletanata MtArgRS s MttRNA<sup>Arg</sup> pokazatelji su uloge elemenata N-terminalne domene u vezanju pripadne tRNA. Pritom je elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u nativnim uvjetima metoda od izbora za određivanje ove fizikalne veličine.

#### 4.3.1. Ravnotežne konstante disocijacije određene gel-retardacijskom elektroforezom

Gel-retardacijska elektroforeza često je korištena metoda za ispitivanje stabilnosti kompleksa proteina i nukleinskih kiselina. Razlog pogodnosti ove metode jest različita pokretljivost pojedinih vrsta koje se nalaze u inkubiranoj smjesi. Naime, molekule MttRNA<sup>Arg</sup> trebale bi se prema anodi kretati brže od proteina MtArgRS zahvaljujući većem broju negativno nabijenih skupina, manjoj veličini samih molekula kao i kompaktnoj tercijarnoj strukturi. Ukoliko dolazi do stvaranja nekovalentnog kompleksa ovih dviju vrsta, rezultirajući kompleks bit će pokretljiviji od MtArgRS zahvaljujući negativnijem naboju, a istovremeno sporiji od same MttRNA<sup>Arg</sup> zbog svoje veličine. S obzirom da je procijenjena promjena izoelektrične točke deletanata u odnosu na divlji tip proteina mala, očekivan odnos pokretljivosti jednak je kod kompleksiranja svih korištenih proteina. Pritom je važno uvjete elektroforeze prilagoditi ispitivanom sustavu kako ne bi došlo do narušavanja native strukture makromolekula, što bi rezultiralo smanjenom mogućnošću stvaranja interakcija između istih.

Sam protein od interesa sadrži različite elemente sekundarne strukture u svojoj građi ( $\alpha$ -zavojnice i  $\beta$ -ploče) te se može podijeliti na više funkcionalnih domena analogno načinu koji je opisan za aaRS razreda I (v. 1.2.1). Na slici 4.13 lijevo dan je prikaz tercijarne strukture MtArgRS na kojem su zeleno istaknute niti  $\beta$ -ploče koja čini dio Rossmannovog nabora (dakle dio aktivnog mjesta), dok je crveno označena ispitivana N-terminalna domena. Pri stvaranju kompleksa s tRNA, ovaj supstrat zauzima velik dio površine samog enzima. Na slici 4.13 desno prikazano je ovo vezanje.



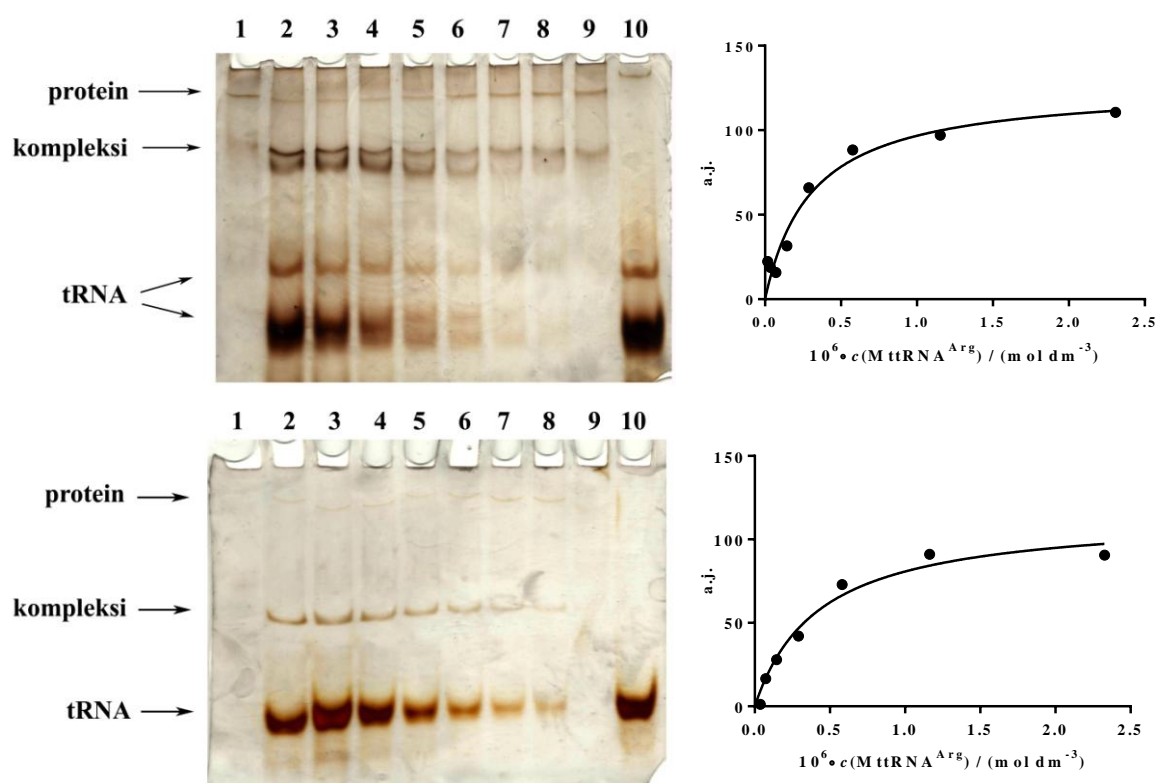
Slika 4.13. (lijevo) Prikaz tercijarne strukture MtArgRS.  $\alpha$ -zavojnice su prikazane spiralnim vrpčama, a niti  $\beta$ -ploča trakama na kojima je strelicom označen smjer (od N-kraja prema C-kraju lanca). Crveno je istaknuta N-terminalna domena, a zeleno niti  $\beta$ -ploče koja je dio Rossmannovog nabora. Crna strelica označava mjesto vezanja afinitetnog privjeska u divljem tipu enzima. (desno) Prikaz kompleksa MtArgRS:MttRNA<sup>Arg</sup>. Protein je u istoj orijentaciji i istim bojama kao i na slici lijevo, a „površina“ molekule tRNA je prikazana žuto. Slike su napravljene u programu PyMOL.<sup>[40]</sup>

Rezultati elektroforeze (poliakrilamidni gel i pripadna krivulja koja opisuje vezanje za slučajeve gdje je istu bilo moguće dobiti) u nativnim uvjetima pri kojima su određivane ravnotežne konstante disocijacije prikazani su na slikama 4.14, 4.15 i 4.18 – 4.20, a pripadne vrijednosti ravnotežnih konstanti disocijacije pri visokoj i niskoj ionskoj jakosti navedene su u tablici 4.2 zajedno s vrijednostima korelacijskih koeficijenata  $R^2$ . Ovaj je koeficijent omjer modelom opisanih varijacija u odnosu na ukupne varijacije podataka, te služi kao pokazatelj uspješnosti nelinearne regresije. U prvoj jažici uvijek se nalazi sami protein, a u posljednjoj sama tRNA. Od druge do devete jažice koncentracija proteina je stalna, dok se koncentracija tRNA smanjuje (serijsko razrijeđenje). Vrpca prisutna u jažicama 2 – 9 koja ne postoji u prvoj i posljednjoj (inkubacijske smjese ne sadrže obje komponente pa formiranje kompleksa nije niti moguće) predstavlja kompleks. Za slučaj da je dio proteina pročišćen u kompleksu s bakterijskom tRNA<sup>Arg</sup> prilikom kvantifikacije vrpce karakteristične za kompleks korigirane su s obzirom na odgovarajući položaj na gelu u razini prve jažice. Na taj način potencijalni doprinos takve molekulske vrste je poništen. Broj vrpce koje pripadaju molekulama tRNA nije svugdje jednak i ovisi o pojedinačnoj preparaciji; stoga je za svaki korišteni uzorak tRNA zasebno određena akceptorska aktivnost, a koncentracija određena preko apsorbancije pri 260 nm korigirana je za udio tRNA<sup>Arg</sup> u smjesi. Svi gelovi obojeni su srebrom.

## § 4. Rezultati

### 4.3.1.1. Divlji tip MtArgRS

Prilikom ispitivanja stabilnosti kompleksa divljeg tipa MtArgRS s MttRNA<sup>Arg</sup> dobiveni su stabilni kompleksi u uvjetima niske i visoke ionske jakosti (slika 4.14). Usporedbom jažica 2 – 9 s jažicama 1 (protein) i 10 (tRNA) mogu se uočiti vrpce padajućeg intenziteta od druge prema devetoj jažici koji ne postoje u prvoj i posljednjoj jažici. Upravo navedene vrpce pripadaju kompleksu MtArgRS:MttRNA<sup>Arg</sup>. Slabi signal na visini kompleksa u prvoj jažici pripada enzimu s kopurificiranom tRNA, međutim utjecaj istog je poništen oduzimanjem intenziteta tog signala od svih preostalih. Sam protein manje je pokretljiv od kompleksa zbog prethodno navedenih razloga (početak podnaslova 4.3). Tako je moguće u jažici 1 te u jažicama 2 – 9 zapaziti vrpcu koja pripada proteinu (u jažicama 2 – 9 riječ je o slobodnom proteinu koji je u ravnoteži s kompleksom). Budući da prikazane dvije titracije nisu provedene s istim uzorkom MttRNA<sup>Arg</sup>, na gornjoj je slici pri dnu gela vidljiv veći broj vrpki koje pripadaju slobodnoj tRNA. Taj je uzorak tRNA bio pročišćen samo jednom kromatografijom obrnutih faza zbog čega je udio ostalih vrsta tRNA nešto veći.



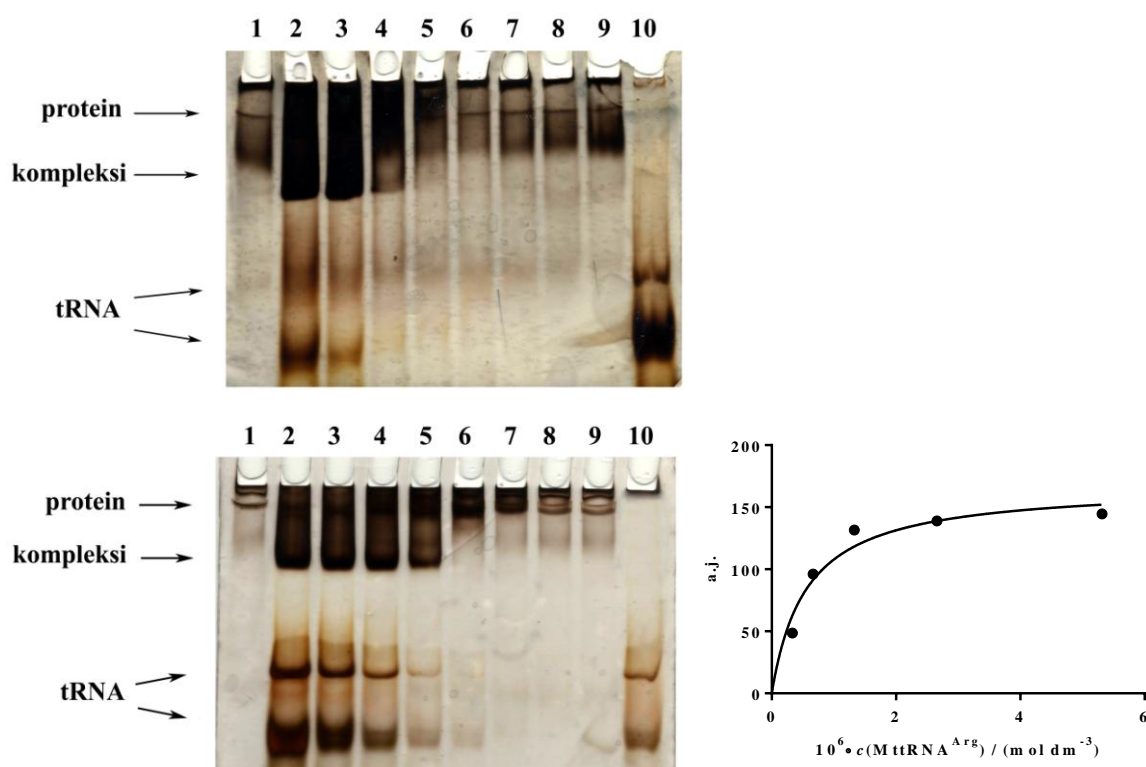
Slika 4.14. (gore) Nativna elektroforeza smjesa dobivenih titracijom MtArgRS ( $c = 2,12 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ) s MttRNA<sup>Arg</sup> pri uvjetima visoke ionske jakosti. (dolje) Titracija MtArgRS ( $c = 2,12 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ) s MttRNA<sup>Arg</sup> pri uvjetima niske ionske jakosti. Desno od slika gelova nalaze se krivulje koje opisuju vezanje. U oba slučaja prva jažica sadrži protein u pripadnom puferu, uzorci 2 – 9 sadrže stalnu koncentraciju proteina i tRNA u serijskom razrijeđenju, a uzorak broj 10 sadrži tRNA u koncentraciji jednakoj onoj u jažici broj 2 (najveća koncentracija).



## § 4. Rezultati

### 4.3.1.2. Deletant $\Delta N21MtArgRS$

$\Delta N21MtArgRS$  sadrži jednu  $\alpha$ -zavojnica manje na N-kraju nego divlji tip enzima. Pri ispitivanju stabilnosti kompleksa ovog deletanta s  $MttRNA^{Arg}$  uočeno je netipično gibanje samog proteina i kompleksa protein s tRNA pri uvjetima visoke ionske jakosti. Devijantno se ponašanje očituje kroz promijenjenu pokretljivost nastalih kompleksa na način da isti putuju najbrže pri najvišim koncentracijama tRNA (jažice 2 i 3), sporije pri narednih nekoliko koncentracija te u posljednjim opet pokazuju povećanu pokretljivost. Da se zaista radi o gibanju proteina „zarobljenog“ u kompleksu s tRNA dokazano je western-analizom opisanom u nastavku teksta. Nasuprot tomu, inkubacijom uzoraka u puferu niske ionske jakosti dobiva se uniformno gibanje kompleksa, neovisno o koncentracijskom gradijentu tRNA. Stoga je pri ovim uvjetima bilo moguće korištenjem ovisnosti nastale količine kompleksa o koncentraciji  $MttRNA^{Arg}$  odrediti ravnotežnu konstantu disocijacije za deletant  $\Delta N21MtArgRS$ .



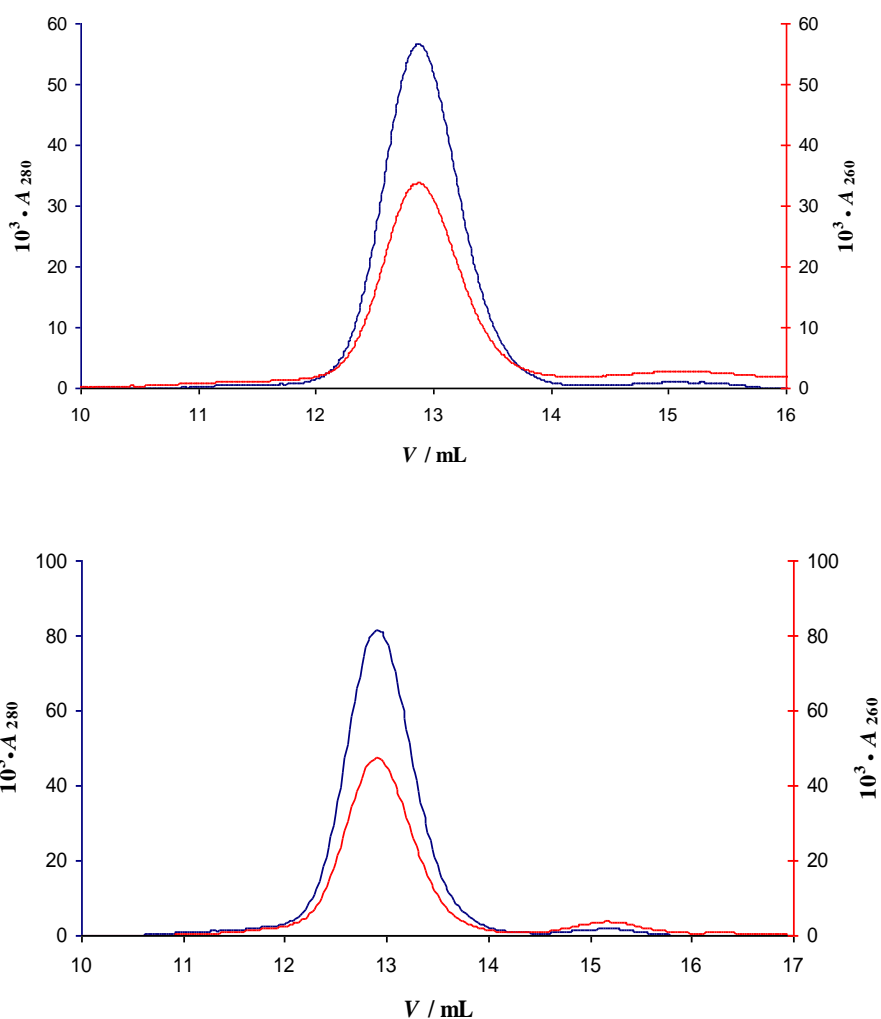
Slika 4.15. (gore) Nativna elektroforeza smjesa dobivenih titracijom  $\Delta N21MtArgRS$  ( $c = 1,41 \mu mol\ dm^{-3}$ ) s  $MttRNA^{Arg}$  pri uvjetima visoke ionske jakosti. Budući da kompleksi nisu dobiveni, uz sliku gela nije dana pripadna krivulja. (dolje) Titracija  $\Delta N21MtArgRS$  ( $c = 1,41 \mu mol\ dm^{-3}$ ) s  $MttRNA^{Arg}$  pri uvjetima niske ionske jakosti. Uz sliku gela nalazi se krivulja koja opisuje vezanje. Raspored uzoraka u jažicama analogan je onom opisanom uz sliku 4.14.

Prilikom ispitivanja makromolekula *in vitro*, moguće je potaknuti nastanak određenih pojava koje se u staničnim uvjetima ne zbivaju. Tako je, primjerice, kod visokih koncentracija rekombinantnih monomernih proteina moguće potaknuti artificijelnu oligomerizaciju. Jedno od potencijalnih objašnjenja ponašanja deletanta  $\Delta N21MtArgRS$  prilikom native elektroforeze u uvjetima više ionske jakosti uključuje stvaranje dimera. Na taj način bi pojava različite pokretljivosti uključivala simultano stvaranje kompleksa prirodne i neprirodne stehiometrije  $((\Delta N21MtArgRS)_1:(tRNA^{Arg})_1)$ ,  $((\Delta N21MtArgRS)_2:(tRNA^{Arg})_1)$ . Ukoliko  $\Delta N21MtArgRS$  pri višim koncentracijama oligomerizira, takva bi se pojava mogla pratiti uz pomoć gel-filtracije. Stoga je protein  $\Delta N21MtArgRS$  deseterostruko razrijeđen i nanesen na gel-filtracijsku kolonu: u uvjetima snižene koncentracije proteina potencijalno nastali artificijelni dimeri trebali bi disocirati te se eluirati kasnije u odnosu na preparaciju istog više koncentracije. Pripadni kromatogram dan je na slici 4.16 (gore). Iako je volumen elucije od 12,90 ml bliži volumenu pri kojem bi se eluirao globularni protein mase 120 kDa, nego 60 kDa, do promjene u volumenu nije došlo prilikom razrjeđenja rekombinantnog proteina. Da je to zaista volumen u kojemu se eluira monomerni  $\Delta N21MtArgRS$  potvrđeno je dodatnom gel-filtracijom otopine ovog proteina u prisustvu detergenta Tween20 i povišene koncentracije natrijevog klorida (slika 4.16 dolje). Pomak ovako tretiranog proteina prema kasnijem vremenu elucije nije zapažen. Zanimljivo je da je po dodatku detergenta došlo do izdvajanja male količine kopurificirane tRNA (vidljivo kao slabi signal nakon dominantnog apsorpcijskog maksimuma smještenog pri 12,90 mL).

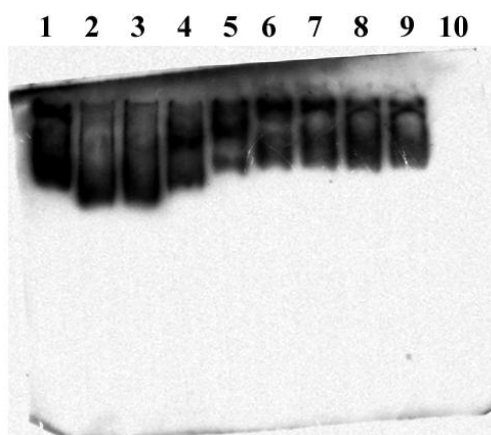
Na osnovu detekcije proteina i proteinskih kompleksa srebrom ponekad nije moguće sa sigurnošću utvrditi radi li se zaista o slobodnom proteinu, slobodnoj tRNA ili kompleksu RNA i proteina. Uzork tome jest neselektivna priroda ove metode, tj. pomoću srebra dolazi do obojenja svih vrsta prisutnih na gelu. Za razliku od toga, s bojama poput toluidinskog modrila ili *Coomassie Brilliant Blue* R-250 vizualizira se samo jedna od navedenih vrsta makromolekule (nukleinske kiseline ili proteini). Primjer situacije u kojoj nije moguće sa sigurnošću utvrditi prirodu pojedine vrpce jest aberantno gibanje  $\Delta N21MtArgRS$  pri elektroforezi u uvjetima visoke ionske jakosti (slika 4.15 gore). Kako  $\Delta N21MtArgRS$  posjeduje heksahistidinski privjesak, njegovo je gibanje moguće specifično detektirati upotrebom primarnih antitijela koja specifično vežu polihistidinski privjesak. Dakle, western-analizom moguće je potvrditi da uočeni signali zaista pripadaju samom proteinu, odnosno kompleksima proteina i tRNA. Pripadni fotografski film prikazan je na slici 4.17 i demonstrira da vrpce neobične pokretljivosti zaista sadrže protein od interesa. Prilikom stvaranja kompleksa moguće je da se mali segment poput slijeda od šest histidina pronade na

## § 4. Rezultati

kontaktnoj površini s vezanom RNA. Međutim, dio proteina gdje se nalazi polihistidinski privjesak orijentiran je sa suprotne strane proteina u odnosu na onu s kojom MttRNA<sup>Arg</sup> stvara interakcije. Drugim riječima, privjesak je dodan na N-kraj proteina, neposredno na originalnu aminokiselinu glicin (Gly21) koja ne sudjeluje u oblikovanju mjesta za vezanje tRNA (slika 4.13 desno). S obzirom na prethodno, upotreba navedenih antitijela je pogodna za ovakvo ispitivanje. Sam položaj u smislu većeg pomaka detektiranih vrpca na gelu govori da nije riječ o samom proteinu  $\Delta N21\text{MtArgRS}$ , nego o njegovom kompleksu s pripadnom tRNA.



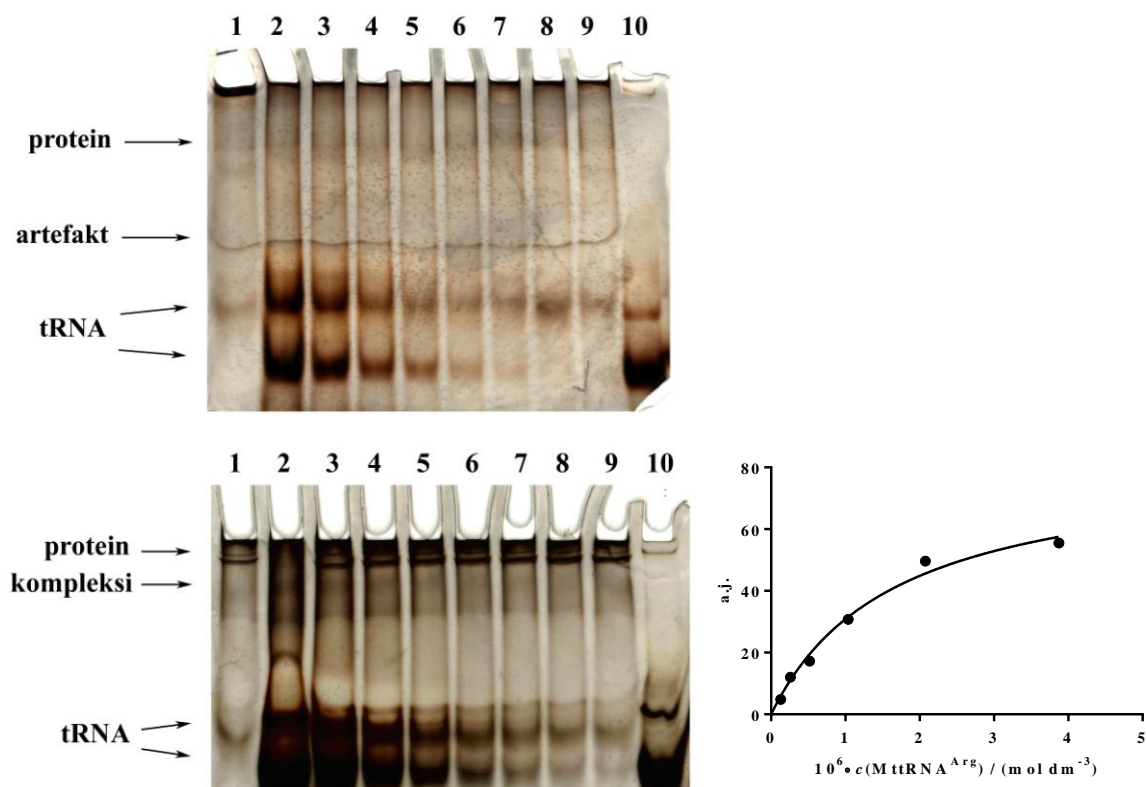
Slika 4.16. Gel-filtracijski kromatogrami dobiveni snimanjem apsorbancija pri valnim duljinama od 260 i 280 nm prilikom utvrđivanja postojanja artifičnih dimera  $\Delta N21\text{MtArgRS}$ : (gore) pročišćene otopine dobivene deseterostrukim razrjeđenjem pohranjene otopine proteina i (dolje) dodatkom natrijevog klorida do koncentracije  $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$  te detergenta Tween20 do 1 %-tnog volumnog udjela priređenoj otopini proteina.



Slika 4.17. Fotografski film kao rezultat western-analize elektroforetskog gela kod određivanja ravnotežne konstante disocijacije  $\Delta N21MtArgRS:MttRNA^{Arg}$  pri uvjetima visoke ionske jakosti. Na filmu su detektirani signali onih vrsta koje sadrže polihistidinski privjesak. Raspored uzoraka je označen i jednak onome na slici 4.15.

#### 4.3.1.3. Deletant $\Delta N39MtArgRS$

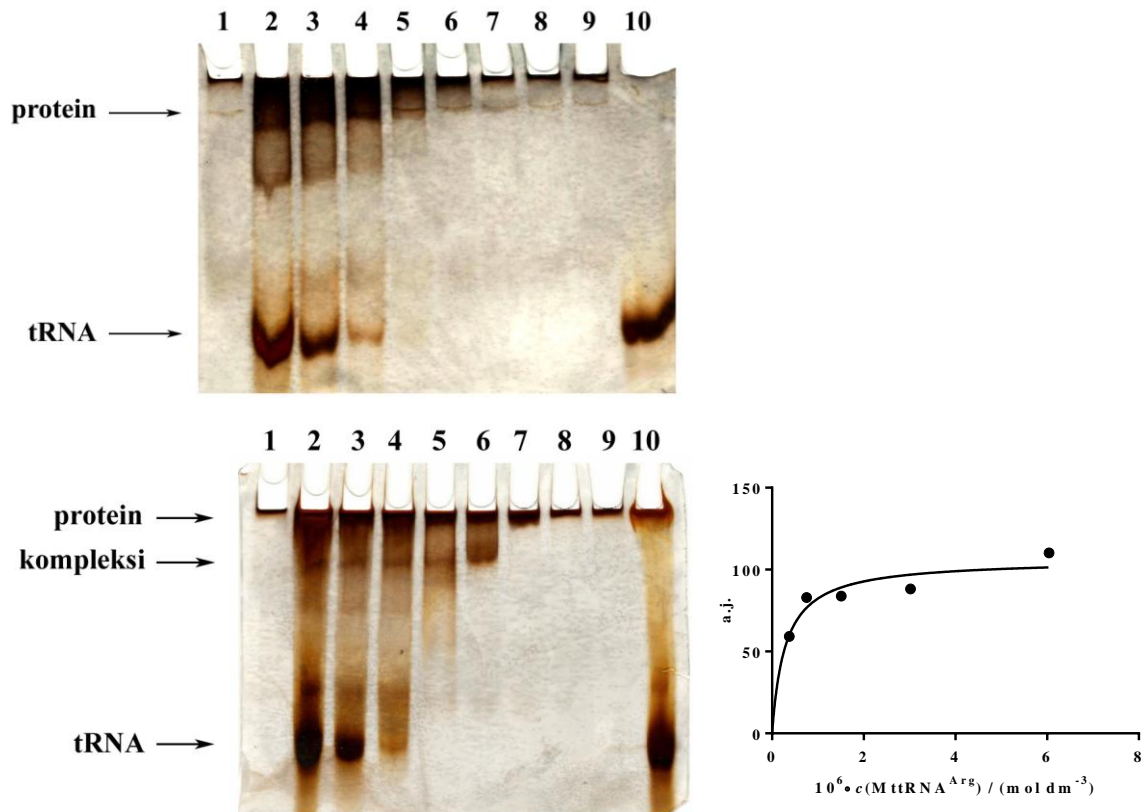
Proteinu  $\Delta N39MtArgRS$  nedostaju prva  $\alpha$ -zavojnica i omča koja u divljem tipu proteina spaja navedenu zavojnica N-kraja s prvom po redu niti  $\beta$ -ploče N-terminalne domene. U uvjetima visoke ionske jakosti stabilni kompleksi  $\Delta N39MtArgRS:MttRNA^{Arg}$ , kao i u slučaju  $\Delta N21MtArgRS$ , nisu dobiveni. Istovremeno su kompleksi uspješno formirani i detektirani u uvjetima niske ionske jakosti te je kvantifikacijom količine kompleksa na prethodno opisan način bilo moguće odrediti afinitet enzima prema tRNA, odnosno, odrediti ravnotežnu konstantu disocijacije. Uz pripadni gel je stoga dana krivulja vezanja pomoću koje je određena vrijednost  $K_d$ . Pored slika gelova asignirani su sadržaji pojedinih jažica na temelju smještaja vrpca i usporedbe istih među različitim jažicama. Na gornjem je gelu moguće vidjeti nastali artefakt – iako isti nije vidljiv u jažici broj 10, intenziteti tih linija nikako ne odgovaraju očekivanima ukoliko bi bila riječ o kompleksima (u tom bi slučaju trebalo postojati postepeno slabljenje intenziteta signala budući da bi sa smanjenjem koncentracije tRNA i količine potencijalno dobivenog kompleksa trebala biti manja). Također je vidljivo kako je donji gel nešto tamnije boje zbog duljeg vremena razvijanja prilikom bojenja srebrom, međutim to ne utječe na određenu vrijednosti ravnotežne konstante disocijacije budući da se produljenjem vremena ekspozicije obojenost svih vrpca proporcionalno pojačava u odnosu na pozadinu.



Slika 4.18. (gore) Nativna elektroforeza smjesa dobivenih titracijom  $\Delta N39\text{MtArgRS}$  ( $c = 3,71 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ) s  $\text{MttRNA}^{\text{Arg}}$  pri uvjetima visoke ionske jakosti. Budući da kompleksi nisu dobiveni, uz sliku gela nije dana pripadna krivulja. (dolje) Titracija  $\Delta N39\text{MtArgRS}$  ( $c = 3,71 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ) s  $\text{MttRNA}^{\text{Arg}}$  pri uvjetima niske ionske jakosti. Uz sliku gela nalazi se krivulja koja opisuje vezanje. Rasporedi uzoraka analogni su onom opisanom uz sliku 4.14.

#### 4.3.1.4. Deletant $\Delta N89\text{MtArgRS}$

Enzim  $\Delta N89\text{MtArgRS}$  ima deletirane sve elemente strukture koji nedostaju  $\Delta N39\text{MtArgRS}$ , kao i dodatnu deleciju dviju  $\alpha$ -zavojnica i svih triju niti  $\beta$ -ploče uobičajeno prisutne u strukturi N-terminalne domene. Slično slučajevima kod prethodno opisanih deletanta, s  $\Delta N89\text{MtArgRS}$  stabilni kompleksi nisu detektirani u uvjetima visoke ionske jakosti (gornji dio slike 4.19). Pri uvjetima niske ionske jakosti zapažen je nastanak nekovalentnih kompleksa  $\Delta N89\text{MtArgRS}:\text{MttRNA}^{\text{Arg}}$  te su pripadne vrpce kvantificirane u svrhu određivanja vrijednosti  $K_d$ . S obzirom na nisku koncentraciju tRNA u posljednje tri jažice u kojima je smjesa sadržavala i protein i tRNA od interesa, vrpce koje pripadaju kompleksima u ovim su slučajevima preslabe u odnosu na pozadinski signal. Iz ovog razloga, navedene točke titracije nisu korištene pri izračunu  $K_d$ .



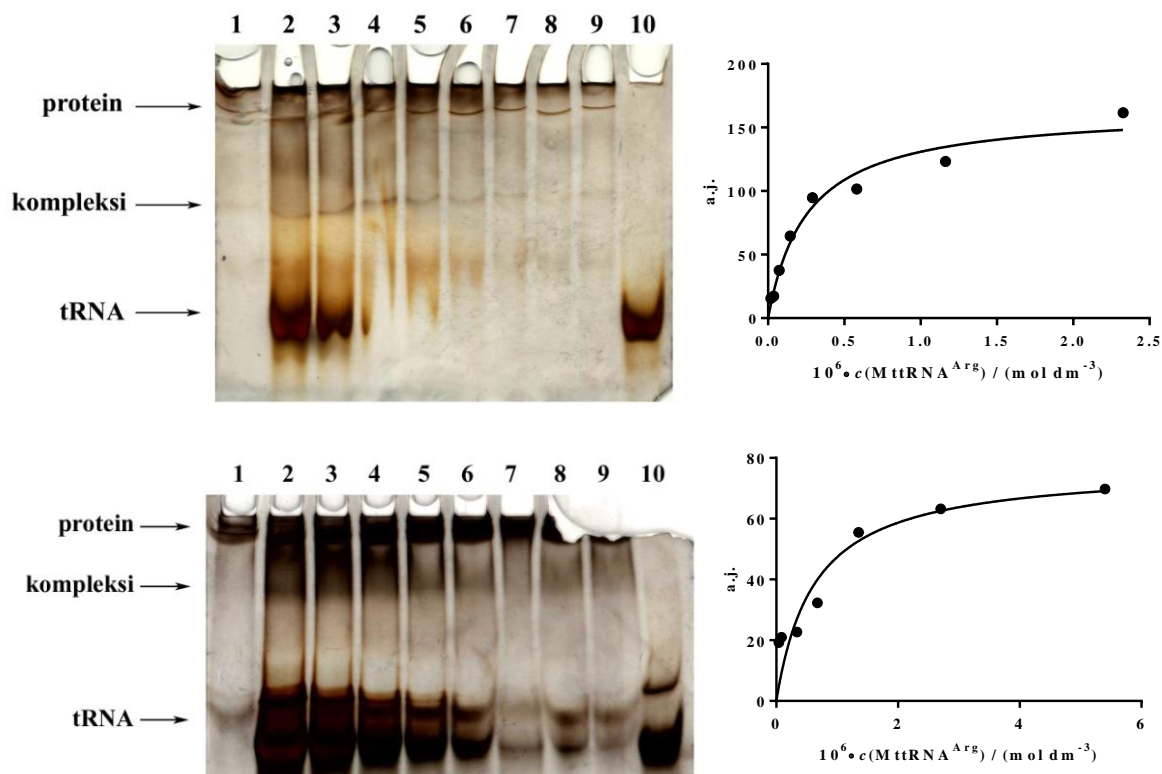
Slika 4.19. (gore) Nativna elektroforeza smjesa dobivenih titracijom  $\Delta\text{N}89\text{MtArgRS}$  ( $c = 1,36 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ) s  $\text{MttRNA}^{\text{Arg}}$  pri uvjetima visoke ionske jakosti. Kompleksi nisu dobiveni, pa uz sliku gela nema krivulje vezanja. (dolje) Titracija  $\Delta\text{N}89\text{MtArgRS}$  ( $c = 3,19 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ) s  $\text{MttRNA}^{\text{Arg}}$  pri uvjetima niske ionske jakosti. Uz sliku gela nalazi se krivulja koja opisuje ovisnost arbitrarnih jedinica proporcionalnih količini kompleksa o koncentraciji  $\text{MttRNA}^{\text{Arg}}$ . U oba je slučaja raspored uzoraka analogan onome opisanom uz sliku 4.14.

#### 4.3.1.5. Deletant $\Delta\text{N}_{\text{tot}}\text{MtArgRS}$

$\Delta\text{N}_{\text{tot}}\text{MtArgRS}$  je enzim kojem je metodama genetičkog inženjerstva uklonjena cijela N-terminalna domena u odnosu na divlji tip enzima (dakle, svi crveno označeni dijelovi strukture na slici 4.13 nedostaju ovom enzimu). Unatoč napravljenoj deleciji, kompleksi  $\Delta\text{N}_{\text{tot}}\text{MtArgRS}:\text{MttRNA}^{\text{Arg}}$  su uspješno izdvojeni metodom gel-retardacijske elektroforeze pri uvjetima visoke i niske ionske jakosti. Sadržaj pojedinih vrpca asigniran je desno od slika gelova (slika 4.20). S obzirom da inkubacijska smjesa u jažici broj 7 na donjem gelu nije čitava nanescena na gel, ova točka nije uzeta u obzir prilikom izračuna vrijednosti  $K_d$  na temelju krivulje vezanja. Da se zaista radi o nepotpuno nanesenom uzorku, moguće je ustanoviti na osnovu količine slobodne tRNA u istoj jažici; s obzirom da uzorci sadrže serijski razrijeđenu tRNA, količina slobodne tRNA na svim gelovima pada gotovo linearno. Usporedbom dviju susjednih vrpca koje odgovaraju slobodnoj tRNA, vidljivo je da u jažici 7 postoji manje tRNA nego u idućoj inkubacijskoj smjesi (nanescenoj u jažicu broj 8). Analogno

## § 4. Rezultati

nekim prethodnim slučajevima, u prvoj jažici se javlja slabi signal porijeklom od kopurificirane tRNA (v. Rasprava), zbog čega su preostali signali (2 – 9) korigirani oduzimanjem tog intenziteta. Donji gel na slici 4.20 nešto je jače razvijen tako da je situacija analogna onoj kod detekcije kompleksu u slučaju mutanta  $\Delta N39\text{MtArgRS}$  pri niskoj ionskoj jakosti (slika 4.18 dolje).



Slika 4.20. Nativna elektroforeza smjesa dobivenih titracijom  $\Delta N_{\text{tot}}\text{MtArgRS}$  ( $c = 5,06 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ) s  $\text{MttRNA}^{\text{Arg}}$  pri uvjetima visoke ionske jakosti. (dolje) Titracija  $\Delta N_{\text{tot}}\text{MtArgRS}$  ( $c = 3,15 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ) s  $\text{MttRNA}^{\text{Arg}}$  pri uvjetima niske ionske jakosti. Desno od slika gelova nalaze se krivulje vezanja. U oba je slučaja raspored uzoraka analogan onome opisanom uz sliku 4.14.

Radi preglednosti i lakše usporedbe vrijednosti ravnotežnih konstanti disocijacije dobivenih metodom gel-retardacijske elektroforeze, iste su navedene u sklopu tablice 4.2 zajedno s vrijednosti koeficijenta  $R^2$ .

## § 4. Rezultati

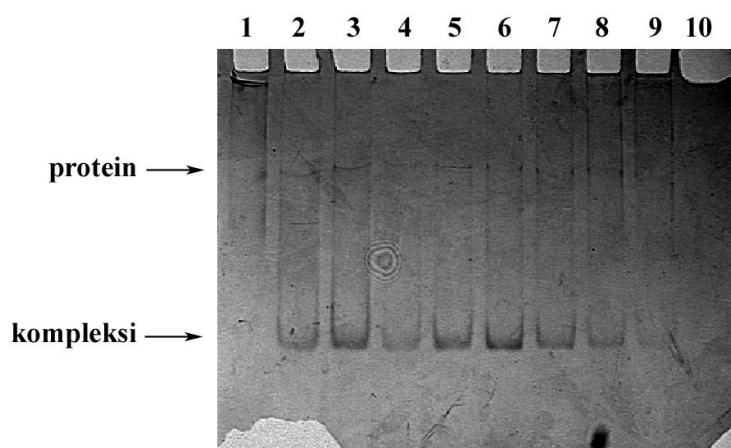
Tablica 4.2. Sumarni prikaz ravnotežnih konstanti disocijacije divljeg tipa i mutanata MtArgRS s MttRNA<sup>Arg</sup> određenih metodom gel-retardacijske elektroforeze u nativnim uvjetima uz pufere visoke i niske ionske jakosti. N.D. (prema skraćenici eng. *not determined*) – vrijednost  $K_d$  nije određena ovom metodom.

kompleks	visoka $I_c$		niska $I_c$	
	$10^6 \cdot K_d / (\text{mol dm}^{-3})$	$R^2$	$10^6 \cdot K_d / (\text{mol dm}^{-3})$	$R^2$
MtArgRS:tRNA <sup>Arg</sup>	0,306	0,96	0,425	0,97
$\Delta N21$ MtArgRS:MttRNA <sup>Arg</sup>	N.D.	-	0,558	0,93
$\Delta N39$ MtArgRS:MttRNA <sup>Arg</sup>	N.D.	-	1,670	0,99
$\Delta N89$ MtArgRS:MttRNA <sup>Arg</sup>	N.D.	-	0,290	0,83
$\Delta N_{\text{tot}}$ MtArgRS:MttRNA <sup>Arg</sup>	0,256	0,97	0,628	0,85

### 4.3.2. Vezanje MtArgRS i heterologne tRNA domaćina

U cilju provjere jesu li signali uočeni u prvoj jažici na visini kompleksa MtArgRS:MttRNA<sup>Arg</sup> posljedica kopurifikacije prekomjerno eksprimiranih proteina s endogenom tRNA iz organizma domaćina *E. coli*, proveden je eksperiment analogan onome čiji je cilj bilo određivanje ravnotežne konstante disocijacije. Dakle, provedena je gel-retardacijska elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u nativnim uvjetima. Prilikom eksperimenta korišten je divlji tip enzima MtArgRS izoliran na prethodno opisan način (v. podnaslov 4.1) te ukupna tRNA izolirana iz organizma bakterije *E. coli* (v. podnaslov 4.2). Kao puffer pri kompleksiranju korišten je onaj visoke ionske jakosti. Rezultat eksperimenta prikazan je na slici 4.21. U jažicama 2 – 9 ove slike vidljive su vrpce čiji položaj odgovara onome kompleksa, dakle vrste koje su putovale dalje od samog proteina u prvoj jažici. Vrste povećane pokretljivosti posljedica su vezanja tRNA na protein, što doprinosi povećanju nabojnog broja i stoga bržem putovanju kroz gel. Budući da u uzorku tRNA ne postoji homologni supstrat MttRNA<sup>Arg</sup> koji MtArgRS preferentno veže, nastali kompleks potječe od vezanja bakterijske tRNA na MtArgRS. Sama tRNA koja se veže na protein od interesa vjerojatno je EctRNA<sup>Arg</sup> s obzirom na izuzetnu sličnost bakterijske i arhejske tRNA<sup>Arg</sup> (v. slika 5.2 u podnaslovu 5.1). U posljednjoj jažici nije vidljiv signal koji pripada nukleinskim kiselinama (iako je uzorak nukleinskih kiselina nanesen na gel) zbog korištenog načina vizualizacije (*Coomassie Brilliant Blue R-250* kojim se detektiraju proteini, ali ne i nukleinske kiseline).





Slika 4.21. Nativnom elektroforezom razdvojene komponente smjese dobivenih titracijom MtArgRS ( $c = 1,57 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ) s ukupnom tRNA iz *E. coli* pri uvjetima visoke ionske jakosti. Prvi uzorak na gelu sadrži protein u puferu, uzorci 2 – 9 sadrže stalnu koncentraciju proteina i tRNA u serijskom razrijeđenju (najveća koncentracija je u uzorku broj 2 i iznosi  $400 \mu\text{mol dm}^{-3}$ , od čega je barem jedna dvadesetina tRNA<sup>Arg</sup>), a uzorak broj 10 sadrži tRNA u koncentraciji jednakoj onoj u jažici broj 2. Gel je obojen otopinom boje *Coomassie Brilliant Blue R-250*.

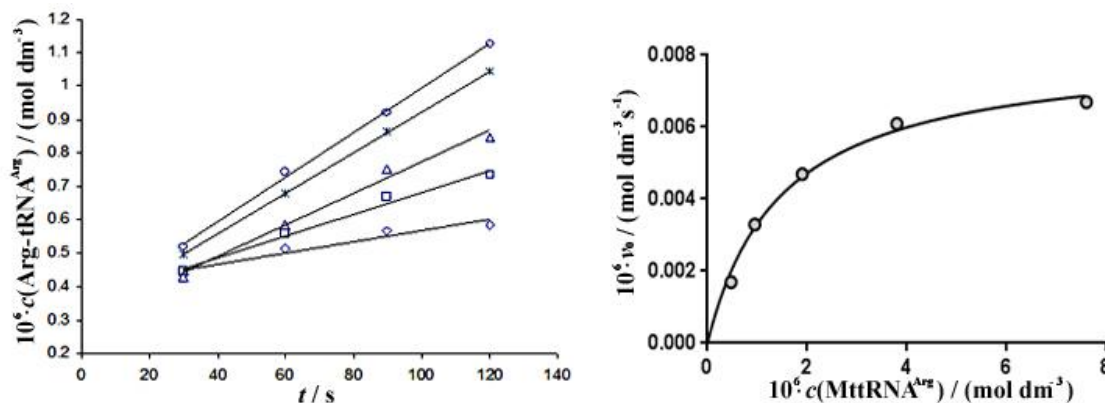
#### 4.4. Kinetički parametri divljeg tipa i deletanata MtArgRS

U sklopu svakog kinetičkog eksperimenta izrađen je novi baždarni dijagram čiji izgled je analogan danom primjeru (v. Materijali i metode, slika 3.2). Iz tog razloga u sklopu ovog podnaslova baždarni pravac nije prikazan. Eksperimenti su provedeni korištenjem radioaktivno obilježene aminokiseline koja služi kao supstrat ispitivanom enzimu, a koja omogućava točnu kvantifikaciju produkta reakcije. Naime, kao što je opisano ranije, uranjanjem alikvota reakcije u otopinu triklorooctene kiseline u određenom vremenu od početka reakcije dolazi do taloženja prisutne tRNA. Kako enzim MtArgRS specifično arginilira MttRNA<sup>Arg</sup>, prisutna radioaktivna aminokiselina ugrađuje se u krajnji produkt reakcije

(Arg-MttRNA<sup>Arg</sup>). Stoga izmjerena količina radioaktiviteta odgovara količini nastalog produkta reakcije. Na slici 4.22 prikazano je određivanje kinetičkih parametara na primjeru divljeg tipa enzima. Pritom je na lijevom dijelu slike vidljiv način određivanja početnih brzina reakcije pri korištenim koncentracijama supstrata (svaki niz točaka označenih različitim simbolom pripada eksperimentu provedenom s drugom koncentracijom MttRNA<sup>Arg</sup>). Kroz točke koje pripadaju pojedinom mjerenju provučeni su pravci koji najbolje opisuju iste. Budući da se brzina kemijske reakcije može izračunati kao promjena koncentracije bilo kojeg reaktanta ili produkta reakcije u vremenu podijeljena stehiometrijskim koeficijentom istog, nagib pravaca na slici 4.22 lijevo jednak je upravo početnoj brzini enzimijski katalizirane reakcije (stehiometrijski koeficijent produkta je 1). Ovisnost na taj način izračunatih iznosa

## § 4. Rezultati

početnih brzina reakcije o koncentraciji supstrata ( $\text{MttRNA}^{\text{Arg}}$ ) dana je točkama na slici 4.22 desno. Nelinearnom regresijom dobivena je pripadna Michaelis-Menten krivulja iz koje je moguće odrediti vrijednosti  $V_{\text{max}}$  i  $K_m$ . Vrijednost obrtnog broja  $k_{\text{cat}}$  dobiva se dijeljenjem  $V_{\text{max}}$  ukupnom množinskom koncentracijom enzima korištenog u reakciji.



Slika 4.22. (lijevo) Ovisnost koncentracije produkta reakcije katalizirane od strane MtArgRS o vremenu trajanja reakcije za reakcijske smjese s različitim koncentracijama  $\text{MttRNA}^{\text{Arg}}$ . Koncentracija produkta određena je korištenjem baždarnog pravca. (desno) Michaelis-Menten krivulja dobivena za reakciju divljeg tipa enzima MtArgRS.

Eksperimenti analogni onome za divlji tip enzima provedeni su i s dva deletanta koja sadrže najveće delecije ( $\Delta\text{N89MtArgRS}$  i  $\Delta\text{N}_{\text{tot}}\text{MtArgRS}$ ). Parametri preostalih dvaju deletanata ( $\Delta\text{N21MtArgRS}$  i  $\Delta\text{N39MtArgRS}$ ) nisu određeni do trenutka pisanja rada. Rezultati za ispitane enzime u vidu određenih vrijednosti  $K_m$  i  $k_{\text{cat}}$  dani su u tablici 4.3.

Tablica 4.3. Kinetički parametri (obrotni broj i Michaelisova konstanta) određeni u uvjetima ustaljenog stanja korištenjem divljeg tipa MtArgRS i dvaju skraćenih oblika istog. U posljednjem je stupcu dan omjer vrijednosti  $k_{\text{cat}}$  i  $K_m$  pojedinog enzima (tzv. katalitička efikasnost). Kao supstrati u reakciji korišteni su  $\text{MttRNA}^{\text{Arg}}$ , ATP i radioaktivno obilježen arginin,  $[^{14}\text{C}]\text{Arg}$ .

enzim	$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	$10^6 \cdot K_m (\text{MttRNA}^{\text{Arg}}) / (\text{mol dm}^{-3})$	$10^{-3} \cdot \text{mol dm}^{-3} \text{s} \cdot (k_{\text{cat}} / K_m)$
MtArgRS	0,563	1,27	443
$\Delta\text{N89MtArgRS}$	0,039	3,67	10,6
$\Delta\text{N}_{\text{tot}}\text{MtArgRS}$	0,028	7,79	3,59

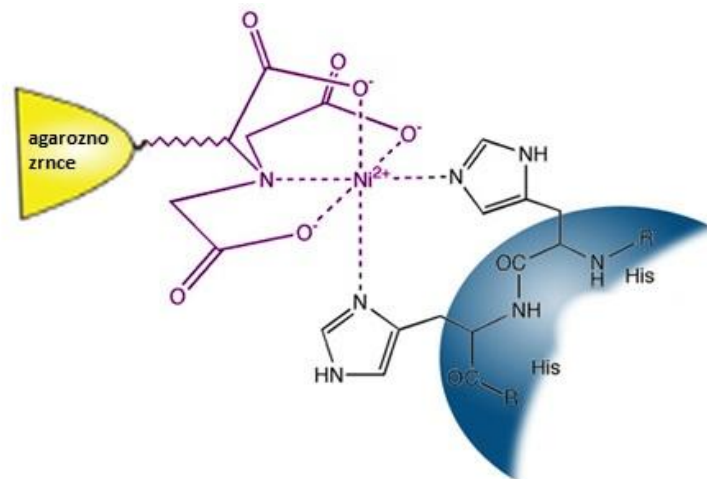
## 5. RASPRAVA

### 5.1. Izolacija biomakromolekula od interesa

Tijekom pročišćavanja prekomjerno eksprimiranih proteina iz ekspresijskog sustava bitno je u što većoj mjeri prilagoditi uvjete kako ne bi došlo do agregacije, degradacije i denaturacije proteina. Iako se naknadno može pokušati provesti renaturacija ovih biomakromolekula, teško je ustvrditi je li time postignuta ispravna konformacija proteina, tj. je li postignuta konformacija jednaka biološki aktivnoj (nativnoj) i koliki udio proteina uzorka ju je poprimio. Stoga su u procesu prekomjerne ekspresije divljeg tipa i deletanata arginil-tRNA-sintetaze arheje *M. thermoautotrophicus* u domaćinu *E. coli* korišteni uvjeti koji promiču korektno smatanje i stabiliziraju nativni oblik rekombinantnog proteina (npr. relativno niska količina izopropiltio- $\beta$ -galaktozida tijekom indukcije, upotreba soja Rosetta umjesto originalnog *E. coli* (BL21)). Također su pri pročišćavanju odabrane metode koje minimiziraju mogućnost narušavanja prethodno postignute konformacije proteina.

Metoda afinitetne kromatografije omogućava izdvajanje željenog proteina od gotovo svih preostalih staničnih proteina. Prije razvitka metoda genetičkog inženjerstva, arginil-tRNA-sintetaza je bila pročišćavana ovom metodom, no pritom su korištena punila s imobiliziranom ukupnom tRNA ili pročišćenom tRNA<sup>Arg</sup>. Ovakav oblik afinitetnog pročišćavanja bio je znatno dugotrajniji od današnjeg te je uzrokovao degradacije samog proteina.<sup>[41]</sup> Razvitkom metoda genetičkog inženjerstva postupak afinitetne kromatografije postao je u određenom smislu univerzalan – dodatak specifičnog (poli)peptidnog privjeska na molekulu od interesa omogućava njeno specifično vezanje na komercijalno dostupnu stacionarnu fazu koja sadrži čvrsto vezan ligand velikog afiniteta prema privjesku ili u nekim slučajevima metalni ion kojem navedeni privjesak može poslužiti kao ligand. Tako je moguće, primjerice, dodavanjem polihistidinskog slijeda na N- ili C-kraj rekombinantnog proteina imobilizirati takav protein na stacionarnu fazu s koordinatno vezanim ionima prijelaznih metala (često Ni<sup>2+</sup> ili Co<sup>2+</sup>). Ovakav je pristup primijenjen u ovom radu. U korištenoj stacionarnoj fazi (ovdje Ni-NTA-agaroz) na svaki od niklovih(II) iona vezani su jedan dušikov i tri kisikova atoma nitrilotriacetne kiseline te dvije molekule vode; pritom je raspored oko metalnog iona oktaedarski. Kada se na spomenutu stacionarnu fazu doda vodena otopina imidazola (imidazolni prsten također gradi bočni ogranak histidina), molekule imidazola zamjenjuju molekule vode u postojećem kompleksnom spoju stvarajući vrlo stabilan novi kompleksni spoj. Dvije molekule vode analogno tome mogu biti zamijenjene s dva prostorno bliska histidinska bočna ogranka proteina (slika 5.1). Elucija vezanih molekula

u ovom se slučaju temelji na istiskivanju istih sa stacionarne faze korištenjem pufera visoke koncentracije imidazola koji kompetira s polihistidinskim privjeskom proteina od interesa za vezanje na stacionarnu fazu.



Slika 5.1. Prikaz vezanja histidinskih bočnih ograna na niklov(II) ion stacionarne faze (agaroza modificirana nitrilotriocetnom kiselinom).

Osim polihistidinskog, postoje i druge vrste afinitetnih privjesaka poput čitavog globularnog proteina glutation-S-transferaze. „Dodavanje“ privjeska vrši se na razini DNA, odnosno gena, tako da je rekombinantni protein zapravo fuzija dvaju (nezavisnih) aminokiselinskih sljedova kodiranih u istom okviru čitanja. Komercijalno dostupni vektori sadrže takve umjetne sljedove smještene na 5'- ili 3'-kraju u odnosu na mjesto u koje se ugrađuje slijed željenog gena. Najčešće je između slijeda odgovornog za nastanak privjeska i slijeda unutar kojeg se ugrađuje gen od interesa prisutan i kratki aminokiselinski slijed čija je funkcija omogućiti relativnu fleksibilnost nativnog dijela proteina u odnosu na privjesak, kao i pružiti potencijalno mjesto cijepanja specifičnim proteazama čijim se radom privjesak korišten za pročišćavanje može po istome ukloniti. Općenito govoreći, dodatak nekog od privjesaka može i ne mora utjecati na ukupnu strukturu i funkciju proteina od interesa. Iz slike 4.1, gdje je prikazana analiza frakcija prikupljenih tijekom pročišćavanja deletanta  $\Delta N21MtArgRS$  afinitetnom kromatografijom, može se zaključiti da je ova metoda prikladna za pročišćavanje proteina s polihistidinskim privjeskom iz smjese staničnih proteina. Ispiranje određene količine proteina od interesa kroz stacionarnu fazu bez vezanja na istu (jažica označena s FT na slici 4.1) moguća je posljedica velike količine proteina od interesa u smjesi staničnih proteina zbog čega je nadmašen kapacitet kolone. Iz ovog razloga postoji mogućnost da određeni dio proteina nije bio u mogućnosti vezanja na kolonu. Također je primijećena elucija jednog dijela prekomjerno eksprimiranog proteina uz dodatak pufera s manjim

koncentracijama imidazola (puferi **A1** i **B1**). Ovakvo ponašanje proteina implicira heterogenost uzorka te je moguće pretpostaviti kako tijekom povišene ekspresije ovog proteina u *E. coli* dio populacije rekombinantnog proteina ne posjeduje ispravnu tercijarnu strukturu. Naime, potpuna ili djelomična denaturacija može rezultirati slabijom izloženosti heksahistidinskog privjeska, odnosno slabijim vezanjem za Ni-NTA stacionarnu fazu. Količina proteina eluirana puferima **A1** i **B1** mogla bi se smanjiti promjenom (smanjenjem) koncentracije imidazola, međutim konačne bi frakcije tada sadržavale veći udio kontaminacija staničnim proteinima, kao i potencijalno lošije smotane proteine od interesa.

Daljnje pročišćavanje proteina provedeno je gel-filtracijom koja je poznata kao nedestruktivna metoda. Sam se postupak temelji na mogućnosti zadržavanja molekula manjeg hidrodinamičkog radijusa unutar pora gela i istovremenoj nemogućnosti takvog zadržavanja u slučaju većih molekula. Do elucije dolazi ovisno o hidrodinamičkom radijusu, odnosno molekulskoj masi ukoliko se pretpostavi podjednak oblik i solvatiranost svih molekula. Pritom se vrste najmanjeg hidrodinamičkog radijusa (tj. manje mase uz navedene pretpostavke) eluiraju posljednje. Raspon veličina molekula koje je ovom metodom moguće međusobno razdvojiti ovisi o samom punilu kolone, tj. o veličini pora stacionarne faze. Ako se pak na kolonu nanese uzorak u kojem veličina molekula nadmašuje veličinu prisutnih pora, tada do njihove elucije dolazi u praznom volumenu stupca. S obzirom na pozadinu same metode, u kontekstu pročišćavanja proteina od interesa moguće je odvajanje onih molekula koje se od njega dostatno razlikuju po veličini. Da gel-filtracija zaista doprinosi povećanju čistoće uzorka proteina pokazano je metodom SDS-PAGE analize (slika 4.3). Iz omjera apsorbanacija pri valnim duljinama od 260 nm i 280 nm praćenih tijekom gel-filtracija kojima su pročišćavani proteini može se zaključiti da i divlji tip MtArgRS i skraćene inačice često kopurificiraju s određenom količinom nukleinskih kiselina, vjerojatno s endogenom tRNA<sup>Arg</sup> domaćina *E. coli*. Heterologno prepoznavanje divljeg tipa MtArgRS i EctRNA<sup>Arg</sup> dano je na slici 4.28, a da je MtArgRS u mogućnosti arginilirati bakterijsku tRNA pokazano je i ranije.<sup>[42]</sup> Na ovaj se način može objasniti povremena pojava vrpce na visini koja odgovara kompleksima MtArgRS:EctRNA<sup>Arg</sup> u jažici sa samim proteinom tijekom native elektroforeze. Kao što je u sklopu prethodnih poglavlja navedeno, mogući utjecaj tog pozadinskog signala poništen je pri izračunu  $K_d$  oduzimanjem istog od svakog pojedinog signala koji pripada kompleksu. Razlog heterolognom prepoznavanju leži u relativno sličnim primarnim sljedovima argininskih izoakceptora i duljini elemenata sekundarne strukture (slika 5.2).

## § 5. Rasprava

MthermArgCCT	GGGCCCGTAGCCTAGCCAGG-ATAGGGCATCAGACTCCTAATCTGAAGGTC CCGGGTTCA 59
MthermArgTCT	GGGCCCGTAGCCTAGCCAGG-ATAGGGGCTCGGACTTCTAATCCGAAGGTC CCGGGTTCA 59
MthermArgTCG	GGGCCCGTAGTCTAGCCAGG-ATAGGGGCTCGGACTTCTAATCCGAAGGTC CCGGGTTCA 60
EcoliArgCCG	GCGCCCGTAG-CTCAGCTGG-ATAGAGCGCTGCCCTCCGGAGGCAGAGGTCTCAGGTTTCG 58
EcoliArgTCT	GCGCCCTTAG-CTCAGTTGG-ATAGAGCAACGACCTTCTAAGTCGTGGGCCGCAGGTTTCG 58
EcoliArgACG	GCATCCGTAG-CTCAGCTGG-ATAGAGTACTCGGCTACGAACCGAGCGGTCGGAGGTTTCG 58
EcoliArgCCT	GTCTCTTAG-TTAA-ATGG-ATATAACGAGCCCTCCTAAG-GGCTAATTGCAGGTTTCG 56
MthermArgGCG	GCCCTGATAG--TG TAGCGG-ATATCAGTAGGACTGCGGATCCTATTAC-CCGGGTTCA 56
	*            ***    *            **    ***            .            **    *    .            .            .            *****
MthermArgCCT	AATCCCGGCGGGTCCGCCA 78
MthermArgTCT	AATCCCGGCGGGTCCGCCA 78
MthermArgTCG	AATCCCCCGGGTCCGCCA 79
EcoliArgCCG	AATCCTGTCCGGCGCGCCA 77
EcoliArgTCT	AATCCTGCAGGGCGCGCCA 77
EcoliArgACG	AATCCTCCCGGATGCACCA 77
EcoliArgCCT	ATTCCTGCAGGGACACCA 75
MthermArgGCG	AGTCCCGGTCAGGGCACCA 75
	*    ***            .            .            *    .            ***

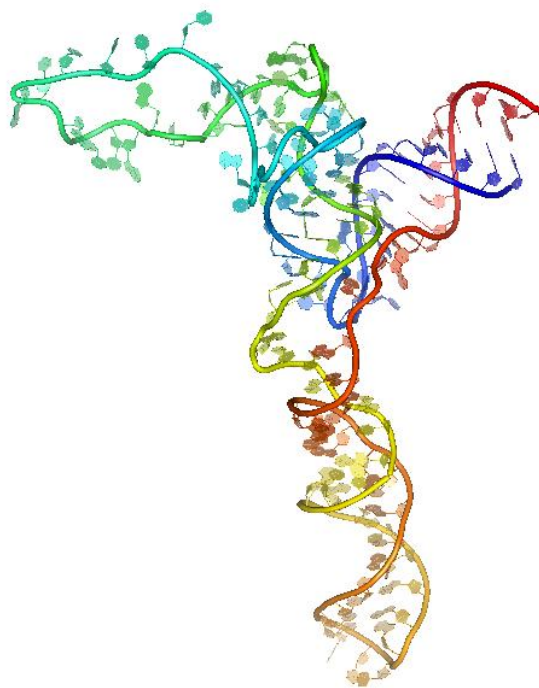
Slika 5.2. Poravnati sljedovi izoakceptorskih molekula tRNA<sup>Arg</sup> iz *M. thermoautotrophicus* i *E. coli*. Lijevo od svakog slijeda naveden je organizam i slijed antikodona danog izoakceptora. Bojama su označeni nukleotidi koji pripadaju peteljka tRNA: tamno-plavo akceptorska peteljka, ružičasto peteljka koja određuje D-omču, svijetlo-plavo peteljka koja određuje TψC-omču i zeleno antikodonska peteljka. Zvezdicama su označeni u potpunosti očuvani položaji, što znači da se u svakoj od ovih molekula na tom mjestu nalazi isti nukleotid. Sljedovi su preuzeti iz dostupne baze podataka (Genomic tRNA Database)<sup>[43]</sup>, a poravnanje je napravljeno programom Clustal.<sup>[44]</sup>

Za izolaciju prekomjerno eksprimirane tRNA<sup>Arg</sup><sub>CCU</sub> arheje *M. thermoautotrophicus* iz domaćina *E. coli* kao prvi korak korištena je liza stanica zasićenom vodenom otopinom fenola, nakon čega je vodeni sloj (u kojem se nalaze nukleinske kiseline) dodatno ekstrahiran smjesom fenola i kloroforma. Ova smjesa učinkovitije ekstrahira nukleinske kiseline (što rezultira višim prinosom RNA) od navedene otopine fenola jer dodatak kloroforma smanjuje smještaj netopljivih kompleksa RNA i proteina u međusloju.<sup>[45]</sup> Za razliku od proteina, denaturacija tRNA je reverzibilna i ispravna tercijska struktura relativno lako se može povratiti postupkom renaturacije (v. Materijali i metode). Postupak renaturacije rutinski se koristi prilikom enzimskih testova koji rabe tRNA proizvedenu transkripcijom *in vitro*, no kod proizvodnje tih molekula prekomjernom ekspresijom u organizmu domaćina (i posljedičnim uvođenjem modifikacija u stvoreni transkript) postupak renaturacije nije uvijek potreban: pojedini transkripti posjeduju dostatnu stabilnost i ne gube nativnu, ispravnu tercijsku strukturu prilikom ekstrakcija i kromatografskih postupaka. Potreba za renaturacijom tRNA individualna je i određuje se empirijski. Osim (moguće) denaturacije, potencijalni problem prilikom pročišćavanja tRNA uzgojene *in vivo* predstavljaju blago bazični uvjeti u procesu deacilacije koji bi mogli uzrokovati hidrolizu fosfodieterskih veza. Analizama na poliakrilamidnom gelu uz prisustvo ureje te elektroforezom na agaroznom gelu u sklopu ovog rada pokazano je da pri bazičnim uvjetima u vremenskom periodu i pri temperaturi inkubacije

tijekom deacilacije ne dolazi do uočljive degradacije izolirane tRNA (podnaslov 4.2, slika 4.4).

Molekule tRNA od interesa često se pročišćavaju korištenjem neke vrste anionskog izmjenjivača. S obzirom na negativni naboj molekula tRNA, dolazi do njihovog vezanja za pozitivno nabijene ostatke stacionarne faze (u konkretnom slučaju riječ je o dietilaminoetilnim ograncima), a do elucije molekula dolazi ovisno o jačini vezanja. Drugim riječima, što više negativno nabijenih skupina molekula sadrži, to je veći broj interakcija s matriksom pa je i vezanje jače zbog čega do elucije dolazi pri višim koncentracijama soli. U dostupnoj literaturi moguće je pronaći primjere pročišćavanja tRNA<sup>Lys</sup> iz jetre štakora anionskim izmjenjivačem<sup>[46]</sup>, pročišćavanja RNA proizvedene *in vitro* slabim<sup>[47]</sup> i jakim<sup>[48]</sup> anionskim izmjenjivačem, kao i metode za pročišćavanje heterologno eksprimirane RNA pomoću slabog anionskog izmjenjivača<sup>[49]</sup>. Alternativno se koristi i kromatografija obrnutih faza.<sup>[50]</sup> Za pročišćavanje tRNA<sup>Leu</sup> i tRNA<sup>Arg</sup> prekomjerno eksprimiranih u *E. coli* korištena je i kombinacija po dviju kolona anionskih izmjenjivača različitog kemijskog sastava punila.<sup>[51,52]</sup> U sklopu izvedbe ovog rada na raspolaganju je bila kolona slabog anionskog izmjenjivača koja je korištena kao prvi korak u pročišćavanju prekomjerno eksprimirane MttRNA<sup>Arg</sup>. S obzirom na to da je gradijent pufera pri izvedbi ove kromatografije takav da se u što većoj mjeri izbjegnu gubici heterologne MttRNA<sup>Arg</sup>, sve vrste tRNA prisutne u uzorku pripadaju istom signalu. Ta je pojava vjerojatno posljedica podjednakih elektrostatskih interakcija koje različite tRNA ostvaruju sa stacionarnom fazom zahvaljujući međusobno sličnoj terciarnoj strukturi, tako da do elucije svih molekula dolazi kod približno sličnog volumnog udjela pufera s većom koncentracijom soli. Budući da je svaka fosfodieterska veza između nukleotida molekula nukleinskih kiselina nosilac po jednog negativnog naboja, molekule veće molekulske mase (većeg broja nukleotida) jače se vežu za stacionarnu fazu izmjenjivača, zbog čega do njihove elucije dolazi kasnije u usporedbi s tRNA. Kao što je spomenuto, tipične duljine tRNA *E. coli* kreću se između 74 i 77 nukleotida, s izuzetkom onih koje posjeduju dugu varijabilnu ruku. Za usporedbu, najčešća kontaminacija, 5S rRNA duljine je 120, dok su 16S i 23S rRNA duge 1542 i 2904 nukleotida. Iako je 5S rRNA skoro dvostruko veća od željenih molekula, najvjerojatnije se u gradijentu soli eluira istovremeno kad i tRNA zbog slične terciarne strukture (slika 5.3). Za izdvajanje MttRNA<sup>Arg</sup> iz smjese tRNA potrebno je dakle koristiti dodatnu metodu pročišćavanja. Unatoč tome što pri upotrijebljenom gradijentu ne dolazi do razdvajanja malih ribonukleinskih kiselina (većinom tRNA, 5S rRNA i tmRNA), korak anionske ionske izmjene bio je neizostavan u svakoj preparaciji zbog mogućnosti nanošenja velike količine uzorka u jednoj kromatografiji i zbog

uspješnog izdvajanja ostataka ugljikohidrata, PEG-a (elucija pri samom početku gradijenta) i dijela nukleinskih kiselina većih molekulskih masa (eluiraju se pri samom kraju gradijenta) koje nisu istaložene dodatkom polietilenglikola.



Slika 5.3. Tercijarna struktura 5S rRNA iz *E. coli*. Usporedbom sa slikom 4.12 (desno) može se uočiti sličnost tercijskih struktura 5S rRNA i tRNA. Struktura je preuzeta iz baze podataka PDB<sup>[18]</sup> (PDB kod: 1C2X), a slika je napravljena u programu PyMOL<sup>[40]</sup>.

Kao dodatna analitička metoda za izolaciju MttRNA<sup>Arg</sup> korištena je kromatografija obrnutih faza u kojoj se razdvajanje molekula temelji na raspodjeli između polarne mobilne i nepolarne stacionarne faze. Tijekom razdvajanja kromatografijom obrnutih faza elucija se vrši upotrebom gradijenta organskog otapala (ovdje etanola) čija je relativna permitivnost niža u odnosu na vodu. Pritom se molekule RNA razdvajaju na osnovu niza faktora, između ostalog i relativne duljine (broja nukleotida). Prethodno je u literaturi navedeno da postoji mogućnost pročišćavanja specifične tRNA kromatografijom obrnutih faza u kombinaciji s hidrofobnom kromatografijom, kao i da se učinkovitost izdvajanja može poboljšati manipulacijama molekulom tRNA poput aminoacilacije, formilacije i sl.<sup>[53]</sup> Također treba istaknuti da specifični sustav određenog izoakceptora tRNA (okarakteriziranog između ostalog i porijeklom organizma iz kojeg potječe) zahtjeva optimiranje uvjeta u cilju postizanja maksimalnog iskorištenja postupka.<sup>[53]</sup> Pročišćavanje MttRNA<sup>Arg</sup> prethodno je provedeno korištenjem slabog anionskog izmjenjivača, međutim na taj način nisu uspostavljeni uvjeti za



daljnje razdvajanje smjese različitih tRNA izdvojenih iz stanica domaćina. Na slici 4.9 prikazani su kromatogrami kromatografije obrnutih faza arginilirane i nearginilirane frakcije tRNA prethodno pročišćenih kromatografijom ionske izmjene. Prilikom iste vrste kromatografije provedene na uzorku tRNA *E. coli* očekivano ne postoje dominantni apsorpcijski maksimumi jer je u normalnom metabolizmu ovog prokariota potreban podjednaki sadržaj svih molekula tRNA. Naime, organizam bakterije proizvodi različite tRNA u omjeru optimalnom za određeni životni kontekst, a udio pojedine tRNA varira od 1 do 7 %<sup>[54]</sup>. Nasuprot tome, kod pročišćavanja tRNA u uvjetima gdje je provedena prekomjerna ekspresija javljaju se tri dominantna signala aktivna u reakciji arginilacije. Signali pripadaju molekulama MttRNA<sup>Arg</sup> različite hidrofobnosti budući da do elucije istih dolazi pri različitim volumnim udjelima organskog otapala (u konkretnom slučaju, etanola). Mogućnost da se radi o endogenoj EctRNA<sup>Arg</sup> odbačena je s obzirom na razliku u kinetičkim parametrima (MtArgRS arginilira EctRNA<sup>Arg</sup>, međutim pripadni je  $k_{cat}$  dva reda veličine manji od onog za reakciju s MttRNA<sup>Arg</sup>). Razdvajanje ukupne populacije molekula MttRNA<sup>Arg</sup> na nekoliko zasebnih vrsta tijekom kromatografije obrnutih faza otežava njihovo pročišćavanje. Pojedini signal preklapa se sa signalom određenih vrsta tRNA *E. coli*, tako da je povećanje udjela MttRNA<sup>Arg</sup> u preparatu minimalno. Također, prinos tRNA prilikom pročišćavanja ovisi o uspješnosti precipitacije sakupljenih frakcija etanolom, što je proces koji ovisi o koncentraciji prisutne nukleinske kiseline. Stoga se prethodnom arginilacijom molekula MttRNA<sup>Arg</sup> željelo ispitati mogućnost da se dodavanjem nabijene skupine (tj. arginina vezanog na 3'-kraj molekule) tri dominantna signala pomaknu prema manjim volumenima elucije i potencijalno grupiraju u jedinstveni apsorpcijski maksimum čime bi se olakšala izolacija tRNA od interesa. Arginilacija međutim nije uzrokovala takav efekt, već je uočen proporcionalan pomak dominantnih signala prema manjim volumenima elucije u odnosu na netretirani uzorak (slika 4.9). Određivanje akceptorske aktivnosti tRNA u frakcijama pokazalo je da nije došlo do takvog vezanja arginilirane MttRNA<sup>Arg</sup> na stacionarnu fazu kakvo bi omogućilo eluciju u jedinstvenom signalu; svaki od tri signala u oba slučaja sadrži molekulu od interesa. Određivanjem udjela tRNA<sup>Arg</sup> u sakupljenim frakcijama potvrđeno je da pomak dominantnih signala reflektira pomak pojedinih populacija MttRNA<sup>Arg</sup>. Dakle, arginilacija MttRNA<sup>Arg</sup> ne potiče uniformni način vezanja na stacionarnu fazu kakav bi omogućio eluciju različitih populacija MttRNA<sup>Arg</sup> u jedinstvenom signalu. Uočeni pomak signala vjerojatna je posljedica male promjene naboja koju uzrokuje dodatak arginina molekuli MttRNA<sup>Arg</sup> i/ili promjene konformacije molekule tRNA po dodatku kovalentno vezanog aminokiselinskog ostatka. U oba slučaja očekuje se blago smanjenje

hidrofobnosti tRNA, drugačija raspodjela molekula između hidrofobne stacionarne i hidrofilne pokretne faze u korist pokretne faze te, kao posljedica, smanjenje volumena elucije. S druge strane, provođenjem dodatne kromatografije obrnutih faza za uzorak koji odgovara pojedinom dominantnom signalu (uz blagu promjenu uvjeta) moguće je izolirati MttRNA<sup>Arg</sup> stopostotne čistoće. Čistoća je procijenjena određivanjem akceptorske aktivnosti tRNA sakupljenog uzorka nakon dodatne kromatografije obrnutih faza, kao i analizom na poliakrilamidnom gelu uz prisustvo ureje (slike 4.11 i 4.12). Promjena uvjeta pri dodatnom kromatografskom koraku pritom se odnosi na izmjenu gradijenta organskog otapala tj. brzinu promjene volumnog udjela pufera **B3** tijekom kromatografije. Naime, ukoliko je ta promjena blaža, odnosno povećanje volumnog udjela pufera **B3** je postepenije, moguće je postići bolje razdvajanje molekula i dodatno razdvajanje molekula koje su se u strmijem gradijenu eluirale približno istovremeno.

Tri istaknuta signala uočena kod kromatografije obrnutih faza na uzorku nukleinskih kiselina izoliranih iz bakterije *E. coli* u kojima je prekomjerno eksprimirana MttRNA<sup>Arg</sup> javljaju se zbog posttranskripcijskih modifikacija koje enzimi bakterije domaćina mogu nadodati. Kao što je ranije spomenuto, mogućnost da se radi o endogenoj bakterijskoj tRNA<sup>Arg</sup> odbačena je na osnovu razlike u kinetičkim parametrima u reakciji arginilacije enzimom MtArgRS. S druge strane, u sklopu nezavisnog istraživanja spektrometrijom masa potvrđeno je da se radi o transkriptima MttRNA<sup>Arg</sup> s različitom količinom nadodanih posttranskripcijskih modifikacija. Ovisno o tome koliko se baza nukleotida modificira (i na koji način), nastale molekule poprimaju različita svojstva te pokazuju drugačije ponašanje (u smislu retencije) prilikom kromatografije obrnutih faza. Kako je prethodno istaknuto, svaki zaseban signal može se dodatno pročistiti istom metodom. Ovako pročišćena MttRNA<sup>Arg</sup> nije korištena za određivanje ravnotežnih konstanti disocijacije jer je unatoč izuzetnoj čistoći prinos ovako dobivene tRNA premali (iz 0,5 dm<sup>3</sup> baterijske kulture dobije se približno 20 µg MttRNA<sup>Arg</sup> pojedinog stupnja modificiranosti), a postupak je izuzetno dugotrajan i skup. Iz tog je razloga za određivanje termodinamičkih konstanti disocijacije u pravilu korištena MttRNA<sup>Arg</sup> pročišćena ionskom izmjenom i jednom kromatografijom obrnutih faza. Daljnjim istraživanjem mogao bi se odrediti sastav baza u pojedinoj skupini posttranskripcijski modificiranih molekula MttRNA<sup>Arg</sup> metodom spektrometrije masa.<sup>[55]</sup> Također bi bilo interesantno ustvrditi mogu li pojedine modifikacije utjecati na promjenu kinetičkih parametara u reakciji aminoacilacije kao što je to pokazano u sustavu GlnRS.<sup>[56]</sup> Osim navedenog, bilo bi zanimljivo ispitati stabilnost kompleksa MtArgRS s različito modificiranim MttRNA<sup>Arg</sup> te u sprezi s kristalizacijom i računalnim simulacijama pokušati

## § 5. Rasprava

utvrditi ulogu istih u sustavu arginil-tRNA-sintetaze ove arheje.<sup>[57]</sup> Potencijalne modifikacije MttRNA<sup>Arg</sup> (procijenjene na osnovu modifikacija tRNA<sup>Arg</sup> u bakteriji *E. coli*) navedene su u tablici 5.1.

Tablica 5.1. Moguće posttranskripcijske modifikacije tRNA<sup>Arg</sup> bakterije *E. coli* zajedno s položajima nukleotida u polinukleotidnom lancu na čijim bazama se dane modifikacije odvijaju, elementom tRNA u kojem se modificirani nukleotid nalazi te nabrojenim izoakceptorskim molekulama kod kojih su pronađene modifikacije. U posljednjem je stupcu navedeno postoji li mogućnost pojave pojedine modifikacije kod arhejske tRNA korištene prilikom izrade ovog rada, MttRNA<sup>Arg</sup><sub>CCU</sub>.

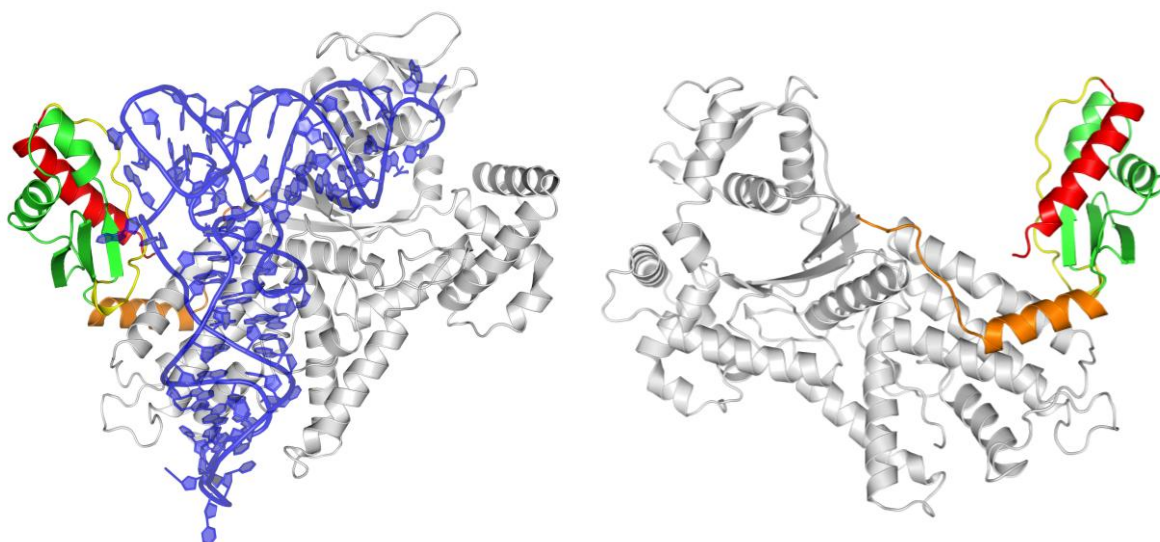
posttranskripcijska modifikacija	položaj u EctRNA <sup>Arg</sup>	izoakceptor	element tRNA	prisutnost u MttRNA <sup>Arg</sup> <sub>CCU</sub>
4-tiouridin	8	ACG	akceptorski	da
dihidrouridin	17	ACG, CCG	D-domena	ne
pseudouridin	20A	ACG, CCG	D-domena	da
pseudouridin	40	UCU	–	ne
pseudouridin	55	svi	T-domena	da
5-metiluridin	54	svi	T-domena	da
3-(3-amino-3-karboksipropil)uridin	47	ACG	varijabilna regija	da
5-metilaminometiluridin	34	UCU	domena antikodona	ne
2-tiocitidin	32	ACG, CCG, UCU	domena antikodona	da
1-metilgvanozin	37	CCG	domena antikodona	ne
7-metilgvanozin	46	ACG, CCG	varijabilna regija	da
2-metiladenozin	37	ACG	domena antikodona	ne
inozin	34	ACG	domena antikodona	ne
N <sup>6</sup> -treonilkarbamoidadenozin	37	UCU, CCU	domena antikodona	da

### 5.2. N-terminalna domena MtArgRS

#### 5.2.1. Konformacija N-terminalnih deletanata MtArgRS

N-terminalni deletanti enzima MtArgRS prethodno su konstruirani u laboratoriju Zavoda za biokemiju radi ispitivanja uloge ove domene u vezanju proteinskog partnera MtSerRS. Kako

je u sklopu ovog rada spomenuto, broj aminokiselina uklonjenih s N-terminalnog kraja polipeptidnog lanca određen je na temelju tercijarne strukture MtArgRS dobivene homolognim modeliranjem prema PhArgRS kao kalupu (s obzirom da je kristalna struktura PhArgRS poznata i dostupna, PDB kod 2ZUE<sup>[18]</sup>). Kraćenja su napravljena tako da svakom idućem proteinu nedostaje progresivno po jedan ili više dijelova sekundarne strukture na N-terminalnom kraju. Tako enzimu  $\Delta N21$ MtArgRS nedostaje zavojnica H1 (numeracija elemenata sekundarne strukture od N- prema C-kraju, gdje H stoji za  $\alpha$ -zavojnicu prema eng. *helix*, a S za nit  $\beta$ -ploče prema eng. *strand*). S druge strane,  $\Delta N89$ MtArgRS je konstruiran tako da mu nedostaje ista zavojnica H1, ali također i zavojnice H2 i H3, kao i niti S1-3 koje čine  $\beta$ -ploču N-terminalne domene proteina. Na slici 5.4 prikazan je model same MtArgRS (desno) i u kompleksu s tRNA (lijevo) na kojem su različitim bojama označene napravljene delecije.



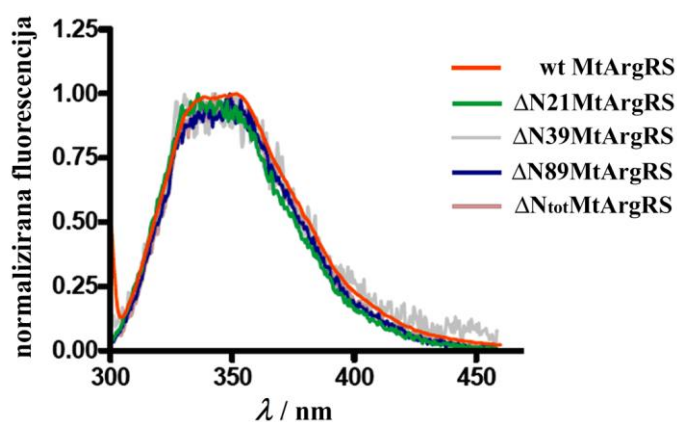
Slika 5.4. (lijevo) Struktura MtArgRS (sivo) u kompleksu s tRNA<sup>Arg</sup> (plavo) dobivena homolognim modeliranjem na temelju PhArgRS u kompleksu s pripadnom tRNA<sup>Arg</sup> kao kalupom. Crveno je označen dio strukture deletiran kod  $\Delta N21$ MtArgRS; crveno i žuto označeni dijelovi deletirani su kod  $\Delta N39$ MtArgRS; crveno, žuto i zeleno obojeni dijelovi strukture deletirani su kod  $\Delta N89$ MtArgRS;  $\Delta N_{tot}$ MtArgRS ima deletirane sve bojama istaknute dijelove strukture proteina (crveno, žuto, zeleno i narančasto). (desno) Struktura MtArgRS rotirana za 180° u odnosu na sliku kompleksa. Istaknuti dijelovi strukture istih su boja kao i na slici lijevo. Za vizualizaciju je korišten program PyMOL.<sup>[40]</sup>

Prilikom istraživanja doprinosa određenog strukturnog elementa enzima (bilo određene aminokiseline ili pak čitavog segmenta poput elementa sekundarne strukture ili zasebne domene) u vezanju pripadnog supstrata ili katalizi, tipičan pristup uključuje mutiranje ili uklanjanje (deleciju) navedenog elementa i praćenje promjena stabilnosti kompleksa

enzim:supstrat, odnosno promjenu kinetičkih parametara. Za ovakva istraživanja od iznimne je važnosti da sama mutacija ne uzrokuje bitne promjene u ukupnoj konformaciji proteina. Ukoliko sama mutacija uzrokuje promjenu konformacije makromolekule, tada se ne može sa sigurnošću tvrditi da je potencijalno opažena promjena svojstava enzima (stabilnost kompleksa enzim:supstrat, promjena  $K_m$  ili  $k_{cat}$ ) posljedica utjecaja koji taj element ima na promatrano svojstvo. Primjerice, ukoliko delecija uzrokuje generalnu promjenu tercijarne strukture i istovremeno se u kinetičkom eksperimentu zabilježi pad vrijednosti  $k_{cat}$ , takvu oslabljenu katalitičku aktivnost enzima ne može se pripisati ulozi deletiranog slijeda u katalitičkoj reakciji jer ista također može biti uzrokovana promjenom smještaja drugih aminokiselinskih bočnih ogranaka važnih za reakciju. U slučaju deletanata MtArgRS, očuvanost tercijarne strukture proteina uslijed delecija procijenjena je na temelju intrinzične fluorescencije proteina (slika 5.5).

Radijativni procesi vraćanja pobuđene molekule u osnovno stanje zajednički se nazivaju luminescencijom te se mogu podijeliti na fosforescenciju (dolazi do promjene multipliciteta stanja) i fluorescenciju (do promjene multipliciteta ne dolazi).<sup>[58]</sup> U kontekstu intrinzične fluorescencije proteina od značaja su tri aminokiseline čiji bočni ogranci pokazuju ovo svojstvo: triptofanski (Trp), tirozinski (Tyr) i fenilalaninski (Phe). Unatoč tome što promjene konformacije proteina utječu na fluorescenciju Tyr i Phe, njihovi ih niski dekadski molarni apsorpcijski koeficijenti i kvantna iskorištenja, kao i relativna neosjetljivost pripadnih emisijskih spektara s obzirom na njihovo okruženje, čine bitno manje upotrebljivima od Trp.<sup>[59]</sup> Navedeno se također može smatrati sretnom okolnošću budući da proteini uobičajeno sadrže manji broj Trp nego Phe i Tyr. Elektromagnetskim zračenjem valnih duljina od 295 nm i više moguće je selektivno pobuđivati Trp. Bočni ogranci triptofana aromatskog su karaktera, zbog čega se često nalaze smješteni u unutrašnjosti proteina ili na sučelju domena (nisu dakle na površini proteina i direktno izloženi otapalu). Uslijed potencijalnog narušavanja prostorne strukture proteina dolazi do jačeg izlaganja ovih ogranaka otapalu, a energija (i stoga njoj obrnuto proporcionalna valna duljina) emitiranog zračenja u ovom slučaju izuzetno ovisi o polarnosti okoline jer je dipolni moment pobuđenog stanja Trp relativno velik ( $\approx 6$  D).<sup>[59]</sup> Ukoliko je Trp izložen vodi (relativna permitivnost iznosi 78,54 pri 25 °C)<sup>[60]</sup>, njegov je emisijski maksimum smješten pri valnoj duljini od 355 nm; ukoliko je pak Trp smješten u hidrofobnu unutrašnjost proteina (relativna permitivnost između 2,5 i 4; točna vrijednost varira ovisno o slučaju)<sup>[61]</sup>, dolazi do pomaka navedenog maksimuma prema kraćim valnim duljinama, tipično oko 335 nm.<sup>[59]</sup>

Arginil-tRNA-sintetaza posjeduje četiri triptofanska ostatka (pozicije 171, 256, 434 i 473 unutar polipeptidnog lanca) od kojih niti jedan nije uklonjen uvođenjem delecija, tj. svi korišteni deletanti sadrže sve spomenute Trp. Slika 5.5 prikazuje fluorescencijske spektre divljeg tipa i mutiranih varijanti MtArgRS. Spektri svih mutanata mogu se posve preklopiti s onim dobivenim za divlji tip enzima te na temelju toga možemo zaključiti da je općenita tercijarna struktura korištenih mutanata očuvana i jednaka onoj divljeg tipa enzima. Zbog toga zapažene promjene svojstava deletanata u odnosu na divlji tip enzima možemo pripisati upravo utjecaju koji uklonjeni element N-terminalne domene MtArgRS posjeduje pri vezanju MttRNA<sup>Arg</sup>, odnosno, katalizi.



Slika 5.5. Fluorescencijski spektri divljeg tipa i četiriju deletanata MtArgRS, pri čemu su vrijednosti zabilježenog intenziteta fluorescencije normalizirane s obzirom na najnižu vrijednost koja se pojavila tijekom mjerenja. Desno od samih spektara dana je legenda.<sup>3</sup>

### 5.2.2. Ravnotežne konstante disocijacije i kinetički parametri

Konstanta disocijacije se u (bio)kemiji koristi kao mjera mjera afiniteta jedne vrste prema drugoj, a jedan od primjera jest afinitet biološke makromolekule prema molekularnom partneru. Ravnotežna konstanta disocijacije (pri čemu se podrazumijeva empirijska, točnije koncentracijska konstanta) jednaka je umnošku koncentracija sudionika ravnotežne reakcije u stanju termodinamičke ravnoteže potenciranih pripadnim stehiometrijskim koeficijentom pojedinih vrsta, tj. u konkretnom slučaju:

$$K_d = \frac{[\text{MtArgRS}] \cdot [\text{MttRNA}^{\text{Arg}}]}{[\text{MtArgRS:MttRNA}^{\text{Arg}}]}$$

Njen iznos ovisi o temperaturi (kao i onaj standardne konstante ravnoteže), tlaku, ali i o sastavu (ionskoj jakosti). Promjena ionske jakosti uvjetuje promjenu koeficijentata aktiviteta, a

<sup>3</sup> Napomena: Na slici 5.5 prikazani su rezultati eksperimenta izvedenog od strane dipl. ing. biol. Ane Crnković izvan okvira ovog rada.

kako je standardna konstanta ravnoteže o njoj neovisna, posljedično se mora mijenjati koncentracijska konstanta ravnoteže. Stoga je važno u sustavu prilikom određivanja koncentracijskih konstanti imati stalnu ionsku jakost. Budući da je molekula tRNA polianion čija je koncentracija varirana prilikom titracije proteina, formiranje kompleksa se mora provesti u takvom puferu koji omogućava da promjena koncentracije tRNA istovremeno ne promijeni ionsku jakost u zamjetnoj razini. Stoga su puferi za kompleksiranje (i visoke i niske ionske jakosti, pri čemu se ovi opisni nazivi odnose na razliku u koncentraciji natrijevog klorida) tome prilagođeni. Naime, čak i pufer s potpunim izostankom natrijevog klorida sadrži druge puferske komponente u koncentraciji dostatnoj za održavanje ionske jakosti stalnom tijekom titracije. Osim ravnotežne konstante disocijacije, postoji i kinetička inačica iste čije mjerenje iziskuje posebnu opremu koja omogućava praćenje vezanja molekula u kompleks u vrlo kratkim vremenskim periodima nakon miješanja istih. Takvo se određivanje često temelji na promjeni nekog optičkog svojstva sustava poput fluorescencije, a naposljetku daje uvid u brzine pojedinačnih koraka vezanja. U kontekstu ovog rada, ravnotežna konstanta disocijacije je zanimljiva fizikalna veličina jer istraživanja ravnotežnih svojstava daje uvid u jačinu interakcija ostvarenih između MtArgRS i pripadne MttRNA<sup>Arg</sup> nakon uklanjanja elemenata N-terminalne regije proteina, neovisno o tome kakvih je koeficijenata brzine ona posljedica.

Pri određivanju ravnotežnih  $K_d$  odabrana je metoda gel-retardacijske elektroforeze u nativnim uvjetima. Ova je metoda izabrana zbog svoje jednostavnosti, niske cijene korištenih tvari (npr. kemikalija potrebnih za pravljenje poliakrilamidnih gelova) i pogodnosti u slučaju sustava proteina i nuklenskih kiselina. Pogodnost ove metode za ovakve sustave proizlazi iz razlika u pokretljivosti pojedinih vrsta koje se javljaju u ravnotežnoj smjesi (tRNA, protein i kompleks), a čiji je uzrok prethodno opisan (v. podnaslov 4.3). Prevaljena udaljenost od strane pojedine molekule na određenom gelu za vrijeme provedene elektroforeze u svrhu određivanja vrijednosti  $K_d$  posljedica je jakosti električnog polja pod kojim je provedena elektroforeza, vrijednosti pH i ionskoj jakosti pufera i stupnju umreženja gela (svi su faktori podložni manjim devijacijama uslijed nesavršenosti pri izvođenju eksperimenta), ali i o veličine molekule, njezinoj solvatiranosti i vrijednosti pI koje se razlikuju među korištenim enzimima kao posljedica učinjenih delecija. Sama priprema uzoraka uključivala je korak inkubacije smjesa pri 41 °C koji pruža mogućnost bržeg uspostavljanja ravnoteže između kompleksa i zasebnih molekula proteina i tRNA porijeklom iz termofilnog organizma. Ova je temperatura ipak niža od one na kojoj organizam *M. thermoautotrophicus* uobičajeno živi i kojoj su njegovi stanični enzimi prilagođeni, a razlog tome jest smanjena stabilnost proteina jednom kada se nalazi izvan arhejske stanice. Broj vrpce koje potječu od tRNA na pojedinom

gelu razlikuje se ovisno o korištenoj preparaciji, a intenzitet istih ovisi o njihovoj ukupnoj količini kao i o vremenu razvijanja prilikom bojenja srebrom. U tablici 4.2 i iz slika elektroforetskih gelova koji istoj prethode može se vidjeti da određivanje svih vrijednosti  $K_d$  (za sve deletante) nije bilo moguće pri uvjetima visoke ionske jakosti. S obzirom da se pufer s koncentracijom NaCl-a od  $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$  pokazao pogodnim za stvaranje kompleksa u slučaju divljeg tipa enzima, isti su uvjeti isprobani i s deletantima. Nemogućnost dobivanja stabilnih kompleksa većine deletanata s MttRNA<sup>Arg</sup> pri ovim uvjetima bila je poticaj za ispitivanje povoljne koncentracije soli. Budući da postoji mogućnost gubitka halotolerantnosti uslijed izdvajanja enzima iz organizma arheje, isprobana je inačica prethodnog pufera koja sadrži manju koncentraciju natrijevog klorida. U ovakvim je uvjetima bilo moguće odrediti  $K_d$  svih oblika enzima.

Same vrijednosti svih gel-retardacijskom elektroforezom određenih ravnotežnih konstanti disocijacije (pri uvjetima visoke i niske ionske jakosti te za sve deletante) istog su reda veličine, izuzevši vrijednost  $K_d$  za  $\Delta N39\text{MtArgRS}$  pri niskoj ionskoj jakosti, međutim niti ta vrijednost bitno ne odstupa od ostalih. Vrijednosti određenih  $K_d$  su reda veličine  $10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ . Usporedbe radi, jedna od najjačih poznatih interakcija u živom svijetu jest ona između biotina i streptavidina čija je ravnotežna konstanta disocijacije reda veličine  $10^{-14} \text{ mol dm}^{-3}$ .<sup>[62]</sup> Na temelju određenih vrijednosti  $K_d$  može se zaključiti da gubitak pojedinih elemenata N-terminalne domene ne utječe bitno na afinitet za vezanje pripadne MttRNA<sup>Arg</sup>. Ako bi elementi utjecali na vezanje pripadne tRNA, tada bi se to trebalo očitovati kroz bitno povećanje vrijednosti ravnotežne konstante disocijacije. Iako dostupni podaci u vidu riješenih kristalnih struktura drugih kompleksa ArgRS i tRNA<sup>Arg</sup> ukazuju na postojanje interakcija N-terminalne domene enzima i molekule tRNA (stoga vjerojatno prisutne i ovom sustavu uzevši u obzir sličnost MtArgRS i PhArgRS), čini se da u sustavu arginilne-tRNA-sintetaze iz *M. thermoautotrophicus* uloga N-terminalne domene nije presudna u samom prepoznavanju i vezanju MttRNA<sup>Arg</sup>.

Devijantno ponašanje kompleksa  $\Delta N21\text{MtArgRS}$  na elektroforetskom gelu pri uvjetima visoke ionske jakosti u vidu bitno različite brzine putovanja istih ovisno o koncentraciji tRNA nije razjašnjeno, međutim dodatnim provedenim analizama (gel-filtracija i western-analiza) potvrđeno je da ono nije posljedica nastanka artificijelnih dimera proteina kao posljedica uvjeta pohrane. Također je western-analizom potvrđeno da asignirani signali pripadaju kompleksima aberantne pokretljivosti.

Iz vrijednosti izmjerenih kinetičkih parametara prikazanih u tablici 4.3 vidljivo je da uslijed delecija enzimske domene dolazi do znatnijeg smanjenja vrijednosti obrtnog broja,



dok je vrijednost Michaelisove konstante u slučaju korištenja deletanata nešto veća od one za divlji tip. Obrtni broj se pritom razlikuje za red veličine između divljeg tipa i proučenih deletanata, dok je razlika u vrijednostima Michaelisove konstante bitno manja (svega nekoliko puta je veća kod deletanata). Bitno smanjenje  $k_{\text{cat}}$  odraz je smanjene mogućnosti enzima da pretvara molekule supstrata u molekule produkta u slučajevima kada enzimu nedostaju elementi N-terminalne domene. Ovakav je rezultat odraz direktnog utjecaja elemenata istražene domene na katalitičku aktivnost MtArgRS. Ukoliko se  $K_m$  shvati kao afinitet enzima prema supstratu (MttRNA<sup>Arg</sup>), tada rezultati kinetičkih eksperimenata potvrđuju one dobivene određivanjem vrijednosti  $K_d$  – uklanjanje elemenata N-terminalne domene enzima MtArgRS nema bitnijeg utjecaja na vezanje pripadne tRNA.

Usporedbom vrijednosti konstante disocijacije i Michaelisove konstante moguće je ustanoviti je li disocijacija produkta nastalog na molekuli enzima najsporiji korak u reakcijskom slijedu. Naime,  $K_d$  je pokazatelj afiniteta enzima prema MttRNA<sup>Arg</sup>. Također uvijek vrijedi da je  $K_m$  kumulativna konstanta disocijacije svih oblika u kojima enzima tvori interakcije sa supstratom, produktom ili bilo kojim oblikom između ta dva krajnja. Vrijednost  $K_m$  dakle odražava cjelokupnu kinetičku pretvorbu. Ukoliko je disocijacija produkta s enzima najsporiji korak, to znači da  $K_m$  ima nižu vrijednost od  $K_d$  upravo zbog velikog afiniteta prema produktu reakcije. U slučaju MtArgRS, vrijedi  $K_m$  (MttRNA<sup>Arg</sup>) >  $K_d$  (MttRNA<sup>Arg</sup>) gdje razlika u pravilu iznosi red veličine u slučaju divljeg tipa i proučenih inačica enzima. Zaključak koji bi se mogao izvući iz ovoga upravo je suprotan od podataka dostupnih za aaRS razreda I (v. Uvod, podnaslov 1.1.2). Ovakvo se neslaganje može objasniti činjenicom da se različitim metodama dobivaju vrijednosti različitih iznosa, zbog čega je važno pratiti trendove koje pokazuju iznosi dobiveni istom vrstom mjerenja. Stoga bi trebalo obje spomenute veličine odrediti što sličnijim metodama u slučaju donošenja vjerodostojnog zaključka na temelju njihove usporedbe.

### 5.2.3. Značaj N-terminalne domene u strukturi MtArgRS

U proučenom sustavu arginil-tRNA-sintetaze porijeklom iz metanogene arheje *M. thermoautotrophicus* skraćivanjem polipeptidnog lanca s N-kraja ispitana je uloga ove domene enzima u interakciji s pripadnom MttRNA<sup>Arg</sup>. Budući da su ravnotežne konstante disocijacije kompleksa divljeg tipa i krnjih oblika proteina s MttRNA<sup>Arg</sup> međusobno slične, može se zaključiti kako elementi ove domene nisu presudni za prepoznavanje i vezanje ovog supstrata. S druge strane, uslijed kraćenja proteina dolazi do drastičnog smanjenje katalitičke efikasnosti, pa je tako krnji oblik  $\Delta N_{89}$ MtArgRS 40 puta lošiji, a  $\Delta N_{\text{tot}}$ MtArgRS više nego

100 puta lošiji katalizator od divljeg tipa enzima (v. tablica 4.3). N-terminalnoj domeni MtArgRS može se stoga pripisati dvojna uloga s obzirom na vezanje supstrata i katalitičku reakciju, tj. prijenos informacija prema udaljenom katalitičkom mjestu enzima. Samo vezanje supstrata tRNA<sup>Arg</sup> ključno je kod ArgRS pri obavljanju katalitičkog procesa jer, kako je ranije pokazano, ArgRS ne katalizira izmjenu pirofosfata i ATP-a ukoliko nije prisutna i pripadna tRNA.<sup>[63]</sup> Stoga se može reći da tRNA, osim kao supstrat, služi i kao aktivator ArgRS.<sup>[63]</sup> Upravo iz ove činjenice proizlazi važnost razumijevanja uloge pojedinih elemenata strukture ovog proteina u vezanju tRNA.

Kristalne strukture pojedinih kompleksa aaRS:tRNA pokazale su kako je enzim u mogućnosti stvaranja mreže vodikovih veza s identitetnim elementima tRNA smještenim u antikodonskoj peteljci i petlji te akceptorskoj peteljci tRNA.<sup>[16]</sup> Ponekad također dolazi do stvaranje ove vrste intermolekulskih interakcija i s varijabilnom rukom, dok se mjesto interakcije s D-petljom i TΨC-petljom u pravilu proteže od enzima. Smještaj identitetnih elemenata u D-petlji tRNA nije učestala pojava<sup>[15]</sup>, međutim uočen je kod tRNA<sup>Arg</sup>, tRNA<sup>Phe</sup> i tRNA<sup>Ile</sup>.<sup>[16]</sup> Bez daljnjih eksperimentalnih podataka (u vidu rezultata kinetičkih i kristalografskih istraživanja) nije moguće sa sigurnošću objasniti način na koji nukleotidi D-petlje „komuniciraju” s udaljenim aktivnim katalitičkim mjestom enzima. Zanimljivo je, međutim, kako su kinetičke uloge određenog seta identitetnih elemenata D-petlje jedinstvene u slučaju svakog zasebnog izoakceptora tRNA.<sup>[16]</sup>

Na primjeru ArgRS iz *T. thermophilus* predložen je mehanizam prepoznavanja jednog od identitetnih elemenata tRNA<sup>Arg</sup> smještenog u D-petlji.<sup>[20]</sup> Riječ je o adenilatu 20 (A20) koji je očuvan u mnoštvu poznatih molekula tRNA<sup>Arg</sup> (u kvaščevom sustavu na tom je mjestu dihidrouridin).<sup>[16]</sup> Upravo usporedbom sa sustavom ScArgRS:tRNA<sup>Arg</sup>, kod TtArgRS je pretpostavljeno i kinetičkim eksperimentima dokazano da je aminokiselina N-terminalne domene (Asn79) ključna za prepoznavanje A20.<sup>[16]</sup> Naime, zamjena A20 bilo kojim drugim nukleotidom kod tRNA<sup>Arg</sup> dovodi do bitnog pada u efikasnosti aminoaciliranja u uvjetima *in vitro* i *in vivo*, a analogan učinak izaziva i mutacija Asn79.<sup>[16,20]</sup> Mutacija spomenute aminokiseline utječe na vrijednost  $V_{max}$ , dok je promjena vrijednosti  $K_m(tRNA^{Arg})$  ovisna o prirodi mutacije Asn79.<sup>[16]</sup>

Na temelju prethodno navedenog, može se zaključiti kako je maksimalnu katalitičku efikasnost kod TtArgRS moguće postići samo ukoliko je prepoznata ispravno modificirana molekula tRNA, unatoč tome što na vezanje tRNA ne utječu mutacije u području D-petlje ili mutacije područja ArgRS koje s tRNA ostvaruje interakcije.<sup>[16]</sup> Rezultat analogan ovome za sustav arginil-tRNA-sintetaze organizma *T. thermophilus* dobiven je i za sustav *M.*

## § 5. Rasprava

---

*thermoautotrophicus* (izloženo u sklopu ovog rada). Pritom nisu provedene točkaste mutacije aminokiselina odgovornih za prepoznavanje D-petlje, već su enzimu MtArgRS uklanjani čitavi elementi N-terminalne domene. Potonje nije rezultiralo smanjenom mogućnošću vezanja MttRNA<sup>Arg</sup>, nego smanjenjem katalitičke efikasnosti enzima.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Metodama afinitetne kromatografije i gel-filtracije moguće je izolirati prekomjerno eksprimirani divlji tip i četiri skraćene inačice MtArgRS u obliku varijanti s heksahistidinskim privjeskom iz stanične smjese organizma domaćina *E. coli*.
2. Propuštanjem uzorka nukleinskih kiselina obogaćenog s MttRNA<sup>Arg</sup> kroz kolonu slabog anionskog izmjenjivača i dodatnim pročišćavanjem kromatografijom obrnutih faza izvojena su tri dominantna signala koja sadrže molekule MttRNA<sup>Arg</sup> različitog stupnja posttranskripcijskih modifikacija. Dodatnim provođenjem kromatografije obrnutih faza, svaku od navedene tri populacije molekula moguće je izdvojiti od heterolognih tRNA i dobiti u stopostotnoj čistoći.
3. Vrijednosti elektroforetski određenih ravnotežnih konstanti disocijacije kompleksa divljeg tipa i svih proučenih deletanata MtArgRS s MttRNA<sup>Arg</sup> po iznosima su međusobno bliske i reda veličine  $10^{-7}$  mol dm<sup>-3</sup>.
4. Uklanjanjem elemenata N-terminalne domene enzima MtArgRS dolazi do promjene katalitičkih parametara u uvjetima ustaljenog stanja u vidu smanjenja obrtnog broja,  $k_{cat}$ , za red veličine i relativno malog povećanja Michaelisove konstante,  $K_m(\text{MttRNA}^{\text{Arg}})$ .
5. N-terminalna domena enzima MtArgRS nema presudnu ulogu u vezanju supstrata MttRNA<sup>Arg</sup> unatoč tome što između njih vjerojatno dolazi do stvaranja interakcija. Istovremeno gubitak elemenata ove domene uzrokuje pad katalitičke efikasnosti enzima, što upućuje na važnu ulogu N-terminalne domene MtArgRS u katalitičkoj reakciji ovog enzima.
6. Budući da je vezanje pripadne tRNA u slučaju arginil-tRNA-sintetaza nužno za sklapanje aktivnog mjesta, na temelju prethodnog može se pretpostaviti da je pad katalitičke efikasnosti po uklanjanju elemenata N-terminalne domene u sustavu MtArgRS posljedica uloge ove domene u prijenosu informacija o vezanju odgovarajuće tRNA udaljenom katalitičkom mjestu.

## 7. POPIS LITERATURE

- [1] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, W. H. Freeman & Company, New York, 2012, str. 133, 241, 242, 446, 447, 887, 923, 924
- [2] D. Voet, J. G. Voet, *Biochemistry*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2011, str. 255, 256, 1345, 1350, 1351
- [3] J. J. Perona, A. Hadd, *Biochemistry* **51** (2012) 8705–8729.
- [4] D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman & Company, New York, 2008, str. 1080, 1081
- [5] S. D. Banik, N. Nandi, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **30(6)** (2012) 701–715.
- [6] C. M. Zhang, J. J. Perona, K. Ryu, C. Francklyn, Y. M. Hou, *J. Mol. Biol.* **361(2)** (2006) 300–311.
- [7] A. Fersht, *Structure and mechanism in protein science*, W. H. Freeman & Company, New York, 1999, str. 103–111
- [8] K. Dalziel, *Nature* **196** (1962) 1203–1205.
- [9] D. Moras, *Trends Biochem. Sci.* **17(4)** (1992) 159–164.
- [10] M. Ruff, S. Krishnaswamy, M. Boeglin, A. Poterszman, A. Mitschler, A. Podjarny, B. Rees, J. C. Thierry, D. Moras, *Science* **252(5013)** (1991) 1682–1689.
- [11] A. S. Rodin, S. N. Rodin, C. W. Carter Jr., *J. Mol. Evol.* **69(5)** (2009) 555–567.
- [12] M. T. Boniecki, S. A. Martinis, *J. Biol. Chem.* **287** (2012) 11285–11289.
- [13] C. Liu, J. M. Sanders, J. M. Pascal, Y. Hou, *RNA* **18(2)** (2012) 213–221.
- [14] A. R. Fersht, C. Dingwall, *Biochemistry* **18(7)** (1979) 1245–1249.
- [15] E. Giegé, M. Sissler, C. Florentz, *Nucleic Acids Res.* **26** (1998) 5017–5035.
- [16] T. L. Hendrickson, *PNAS* **98(24)** (2001) 13473–13475.
- [17] B. Delagoutte, D. Moras, J. Cavarelli, *EMBO J.* **19(21)** (2000) 5599–5610.
- [18] <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> (25. ožujka 2014.)
- [19] J. Cavarelli, B. Delagoutte, G. Eriani, J. Gangloff, D. Moras, *EMBO J.* **17(18)** (1998) 5438–5448.
- [20] A. Shimada, O. Nureki, M. Goto, S. Takahashi, S. Yokoyama, *PNAS* **98(24)** (2001) 13537–13542.
- [21] K. Bi, Y. Zheng, F. Gao, J. Dong, J. Wang, Y. Wang, W. Gong, *Protein Cell* **5(2)** (2014) 151–159.

- [22] M. Konno, T. Sumida, E. Uchikawa, Y. Mori, T. Yanagisawa, S. Sekine, and S. Yokoyama, *FEBS J.* **276(17)** (2009) 4763–79
- [23] D. R. Smith i sur., *J. Bacteriol.* **179(22)** (1997) 7135–7155.
- [24] R. Geslain, G. Bey, J. Cavarelli, G. Eriani, *Biochemistry* **42** (2003) 15092–15101.
- [25] Y. N. Yao, Q. S. Zhang, X. Z. Yan, G. Zhu, E. D. Wang, *FEBS Letters* **547(1-3)** (2003) 197–200.
- [26] K. Chakraburty, *Nucleic Acids Res.* **8(19)** (1980) 4459–4472.
- [27] C. A. Aldinger, A. K. Leisinger, G. L. Igloi, *FEBS J.* **279(19)** (2012) 3622–3638.
- [28] W. Liu, Y. Huang, G. Eriani, J. Gangloff, E. Wang, Y. Wang, *Biochim. Biophys. Acta* **1473(2-3)** (1999) 356–362.
- [29] K. Tamura, H. Himeno, H. Asahara, T. Hasegawa, M. Shimizu, *Nucleic Acids Res.* **20(9)** 2335–2339.
- [30] D. C. Jeffares, A. M. Poole, D. Penny, *J. Mol. Evol.* **46(1)** (1998) 18–36.
- [31] <http://protcalc.sourceforge.net/> (01. ožujka 2014.)
- [32] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/15679444?report=fasta> (01. ožujka 2014.)
- [33] C. A. Schneider, W. S. Rasband, K. W. Eliceiri, *Nature Methods* **9** (2012) 671–675.
- [34] GraphPad Prism version 6.00, GraphPad Software, La Jolla California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)
- [35] [http://www.graphpad.com/guides/prism/6/curve-fitting/index.htm?reg\\_one\\_site\\_specific.htm](http://www.graphpad.com/guides/prism/6/curve-fitting/index.htm?reg_one_site_specific.htm) (01. ožujka 2014.)
- [36] E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M. R. Wilkins, R. D. Appel, A. Bairoch, *The Proteomics Protocols Handbook* (2005) 571–607.
- [37] JPSL of the Ludwig Institute for Cancer Research, Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, *CSH Protoc.* **2006(1)** (2006)
- [38] W. M. Holmes, R. E. Hurd, B. R. Reid, R. A. Rimerman, G. W. Hatfield, *PNAS* **72(3)** (1975) 1068–1071.
- [39] B. Lenhard, O. Orellana, M. Ibba, I. Weygand-Đurašević, *Nucleic Acids Res.* **27(3)** (1998) 721–729.
- [40] The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.6, Schrödinger, LLC.
- [41] B. H. Berg, *Biochem. Mol. Biol. Int.* **31(2)** (1993) 219–228.
- [42] V. Godinić-Mikulčić, J. Jarić, C. D. Hausmann, M. Ibba, I. Weygand-Đurašević, *J. Biol. Chem.* **286(5)** (2011) 3396–3404.
- [43] T. M. Lowe, S. R. Eddy, *Nucleic Acids Res.* **25** (1997) 955–964.

- [44] F. Sievers, A. Wilm, D. G. Dineen, T. J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert, J. Söding, J. D. Thompson, D. G. Higgins, *Molecular Systems Biology* **7** (2011)
- [45] R. P. Perry, J. La Torre, D. E. Kelley, J. R. Greenberg, *Biochim. Biophys. Acta* **262(2)** (1972) 220–226.
- [46] A. M. Kumar, S. V. Vulimiri, R. Nayak, *Biochem. Mol. Biol. Int.* **33(6)** (1994) 1081–1089.
- [47] L. E. Easton, Y. Shibata, P. J. Lukavsky, *RNA* **16(3)** (2010) 647–653.
- [48] J. Koubek, K. F. Lin, Y. R. Chen, R. P. Cheng, J. J. Huang, *RNA* **19(10)** (2013) 1449–1459.
- [49] F. H. Nelissen, E. H. Leunissen, L. van der Laar, M. Tessari, H. A. Heus, S. S. Wijmenga, *Nucleic Acids Res.* **40(13)** (2012) e102
- [50] C. S. Francklyn, E. A. First, J. J. Perona, Y. M. Hou, *Methods.* **44(2)** (2008) 100–118.
- [51] J. F. Wu, E. D. Wang, Y. L. Wang, E. Gilbert, G. Jean, *Acta Biochim. Biophys. Sinica* **31(3)** (1999) 226–232.
- [52] L. Yong, W. Enduo, W. Yinglai, *Sci. China C Life Sci.* **41(3)** (1998) 225–231.
- [53] E. Cayama, A. Yépez, F. Rotondo, E. Bandeira, A. C. Ferreras, F. J. Triana-Alonso, *Nucleic Acids Res.* **28(12)** (2000) e64
- [54] H. Dong, L. Nillson, C. G. Kurland, *J. Mol. Biol.* **260(5)** (1996) 649–663.
- [55] D. Su, C. T. Chan, C. Gu, K. S. Lim, Y. H. Chionk, M. E. McBee, B. S. Russell, I. R. Babu, T. J. Bergley, P. C. Dedon, *Nat. Protoc.* **9(4)** (2014) 828–841.
- [56] E. Madore, C. Florentz, R. Giegé, S. Sekine, S. Yokoyama, J. Lapointe, *Eur. J. Biochem.* **266(3)** (1999) 1128–1135.
- [57] M. A. Machnicka, K. Milanowska, O. Osman Oglu, E. Purta, M. Kurkowska, A. Olchowik, W. Januszewski, S. Kalinowski, S. Dunin-Horkawicz, K. M. Rother, M. Helm, J. M. Bujnicki, H. Grosjean, *Nucleic Acids Res.* **41(D1)** (2013) D262–D267
- [58] T. Cvitaš, *Fizikalna kemija*, rkp. u pripremi, poglavlje 10, str. 14, 15
- [59] C. A. Royer, *Chem. Rev.* **106(5)** (2006) 1769–1784.
- [60] P. Atkins, J. de Paula, *Atkins' Physical Chemistry*, Oxford University Press, New York, 2006, str. 1004
- [61] M. K. Gilson, B. H. Honig, *Biopolymers* **25(11)** (1986) 2097–2119.
- [62] A. Holmberg, A. Blomstergren, O. Nord, M. Lukacs, J. Lundeberg, M. Uhlén, *Electrophoresis* **26(3)** (2005) 501–510.

**§ 7. *Popis literature***

---

[63] K. Mitra, A. H. Mehler, *J. Biol. Chem.* **241(21)** (1966) 5161-5162.



## 8. SAŽETAK

Nikolina Šoštarić i Petar Šutalo

### Dvojni karakter domene arginil-tRNA-sintetaze u vezanju tRNA i prijenosu informacija prema udaljenom katalitičkom mjestu

Stanični proteini nastaju radom ribosoma koji genetičku informaciju, sadržanu u obliku molekula mRNA, prevode u slijed aminokiselina rastućeg polipeptidnog lanca. Aminokiseline dolaze na ribosom esterificirane na 3'-kraj pripadnih molekula tRNA čiji antikodon mora biti komplementaran kodonu mRNA kako bi donesena aminokiselina bila ugrađena u nastajući protein. Stvaranje kovalentne veze između aminokiseline i odgovarajuće tRNA (reakciju aminoacilacije) kataliziraju aminoacil-tRNA-sintetaze. Radom ovih enzima osiguran je vjeran prijenos genetičke informacije, zbog čega je detaljno istraživanje njihovih svojstava od iznimne važnosti.

Arginil-tRNA-sintetaza katalizira arginilaciju tRNA<sup>Arg</sup>, a reakcija je karakterizirana uzajamno uvjetovanim konformacijskim promjenama molekule tRNA i enzima. Kao posljedica, tek po vezanju tRNA dolazi do sklapanja aktivnog mjesta ovog enzima. U ovom radu ispitana je uloga pojedinih elemenata N-terminalne domene arginil-tRNA-sintetaze iz arheje *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (MtArgRS) u vezanju pripadne tRNA i reakciji aminoaciliranja. Korišteni su divlji tip i četiri krnja oblika enzima skraćena s N-kraja. Rekombinantni enzimi su izolirani iz stanica domaćina i pročišćeni afinitetnom kromatografijom te gel-filtracijom. Pripadni je supstrat, tRNA<sup>Arg</sup> iz istog arhejskog izvora (MttRNA<sup>Arg</sup>), dobiven transkripcijom u domaćinu *Escherichia coli* te pročišćen kromatografijom ionske izmjene. Dodatno je optimiran daljnji korak pročišćavanja MttRNA<sup>Arg</sup> kromatografijom obrnutih faza pri čemu su izdvojene tri populacije MttRNA<sup>Arg</sup>, različite prema količini nadodanih posttranskripcijskih modifikacija.

Nativnom elektroforezom na poliakrilamidnom gelu određene su ravnotežne konstante disocijacije kompleksa divljeg oblika i deletanata MtArgRS s MttRNA<sup>Arg</sup>. Ove su vrijednosti pokazatelji uloge elemenata N-terminalne domene u vezanju pripadne tRNA. S ciljem proučavanja uloge N-terminalne domene u katalitičkoj reakciji, određeni su kinetički parametri većine rekombinantnih enzima u uvjetima ustaljenog stanja. Ravnotežne konstante disocijacije usporedivih su vrijednosti za sve ispitane komplekse, dok je utjecaj delecija na

## **§ 8. Sažetak**

---

katalitičku efikasnost enzima drastičan. Ovakvi rezultati ukazuju na postojanje dvojne uloge ispitane domene MtArgRS u odnosu na interakciju s tRNA. Iako ova domena nema presudnu ulogu u vezanju tRNA, vrlo je važna u prijenosu informacija o njenom vezanju prema udaljenom katalitičkom mjestu.

Ključne riječi: arginil-tRNA-sintetaza, N-terminalna domena, kromatografija obrnutih faza, ravnotežna konstanta disocijacije, kinetika ustaljenog stanja

## 9. SUMMARY

Nikolina Šoštarić and Petar Šutalo

### Dual character of the arginyl-tRNA synthetase's domain in tRNA binding and information transfer to the distal catalytic site

Cellular proteins arise from the activity of the ribosome which translates the genetic information, contained in the form of mRNA molecule, into the amino acid sequence of the growing polypeptide chain. Amino acids are brought to the ribosome esterified onto the 3'-end of cognate tRNA molecules whose anticodon has to be complementary to mRNA codon in order for the delivered amino acid to be incorporated into the emerging protein. Covalent bond formation between amino acid and corresponding tRNA (aminoacylation reaction) is catalyzed by aminoacyl-tRNA synthetases. Faithful transmission of the genetic information is ensured through the activity of these enzymes, thereby making detailed investigation of their properties of exceptional importance.

Arginyl-tRNA synthetase catalyzes the arginylation of tRNA<sup>Arg</sup> and the reaction is characterized by the mutually induced conformational changes in tRNA molecule and enzyme. As a consequence, the active site of this enzyme is formed only upon tRNA binding. In this work the role of N-terminal domain's elements of arginyl-tRNA-synthetase from archeon *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (MtArgRS) was investigated both in terms of tRNA binding and aminoacylation reaction. Wild type enzyme and four truncated versions shortened from the N-end were used. Recombinant enzymes were isolated from the host cells and purified by means of affinity chromatography and size-exclusion chromatography. Cognate substrate, tRNA<sup>Arg</sup> from the same archaeal source (MttRNA<sup>Arg</sup>) was transcribed in host *Escherichia coli* and purified using ion exchange chromatography. In addition, further purification step for MttRNA<sup>Arg</sup> was optimized using reversed-phase chromatography during which three populations of MttRNA<sup>Arg</sup> were separated, differing by the amount of posttranscriptional modifications added.

Native electrophoresis on polyacrylamide gel was used for equilibrium dissociation constants determination for complexes of wild type and MtArgRS deletants with MttRNA<sup>Arg</sup>. These values indicate the role of N-terminal domain's elements in cognate tRNA binding. To examine the function of N-terminal domain in catalytic reaction, kinetic parameters for the

## ***§ 9. Summary***

---

majority of recombinant enzymes were determined in steady-state conditions. Equilibrium dissociation constants for all complexes are comparable to each other, while the effect of deletions on catalytic efficiency of the enzyme is drastic. These results indicate that the examined domain of MtArgRS has dual role considering its interaction with tRNA. Although this domain does not have a crucial role in tRNA binding, it is highly important for transmitting information about this binding to the distal catalytic site.

Keywords: arginyl-tRNA synthetase, N-terminal domain, reversed-phase chromatography, equilibrium dissociation constant, steady-state kinetics

**10. ZAHVALE**

*Na pruženoj prilici izrade ovog rada u sklopu njenog laboratorija na Zavodu za biokemiju i na pomnom odabiru neposredne voditeljice od srca se zahvaljujemo mentorici dr. sc. Ivani Weygand-Đurašević. Uvijek ćemo se sjećati njene dobronamjernosti, kao i prvih znanja iz područja biokemije koja nam je upravo ona prenijela.*

*Iskreno se zahvaljujemo dr. sc. Iti Gruić-Sovulj i dr. sc. Jasmini Rokov Plavec na danim savjetima, kritičkom čitanju rada i pomoći u njegovoj finalizaciji.*

*Zahvaljujemo dipl. ing. biol. Ani Crnković na pomoći, strpljenju, nebrojenim satima provedenim u laboratoriju, nesebičnom dijeljenju svog iskustva s nama prilikom izrade ovog rada, ugodnoj radnoj atmosferi i ljubavi prema biokemiji koju je dijelila s nama.*

*Također zahvaljujemo svim zaposlenicima Zavoda za biokemiju na ugodnoj radnoj atmosferi, savjetima i priskakanju u pomoć kad god nam je ona zatrebala.*

## 11. ŽIVOTOPISI

### **Nikolina Šoštarić**

Rođena sam 05. prosinca 1991. godine u Zagrebu. Pohađala sam osnovne škole „Medvedgrad“ i „Rudeš“ te V. gimnaziju u Zagrebu. Preddiplomski studij kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu upisala sam 2010. godine, a isti sam završila 2013. godine završnim radom naziva „Respiracijski lanac bakterija“ pod mentorstvom prof. dr. sc. Ivane Weygand-Đurašević. Diplomski studij kemije, smjer Biokemija i Fizikalna kemija, upisala sam u ak. god. 2013./14. Tijekom studija sudjelovala sam u radu volonterskog projekta „Znanstvene čarolije“, održala sam radionicu u sklopu Ljetne škole znanosti te sam tijekom tri nastavne godine održavala dodatnu nastavu iz kemije u V. gimnaziji. Dobitnica sam pohvalnice Prirodoslovno-matematičkog fakulteta 2013. godine kao student s ostvarenim najvišim uspjehom na studijskom smjeru. Od 2009. godine stipendistica sam Grada Zagreba.

### **Petar Šutalo**

Rođen sam 23. kolovoza 1991. godine u Zagrebu. Završio sam Osnovnu školu „Žuti brijeg“ i smjer kemijski tehničar u Prirodoslovnoj školi Vladimira Preloga sa završnim radom „Michaelis-Menten konstanta ureaze iz soje“. Preddiplomski studij kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu upisao sam 2010. godine. Završnim radom „Strukturne i funkcionalne posebnosti Z-DNA“ pod mentorstvom prof. dr. sc. Ivane Weygand-Đurašević 2013. godine sam završio preddiplomski studij. Iste sam godine upisao istraživački diplomski studij kemije, smjer Biokemija i Fizikalna kemija. U ak. god. 2013./2014. postao sam stipendist Zaklade Adris.