

Biokemijska i funkcionalna karakterizacija enzima auksin-amidohidrolaze BrILL2 iz kineskoga kupusa (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*)

Smolko, Ana

Doctoral thesis / Disertacija

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:487660>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

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





University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Ana Smolko

**BIOCHEMICAL AND FUNCTIONAL
CHARACTERIZATION OF AN AUXIN
AMIDOHYDROLASE ENZYME BRILL2 FROM
CHINESE CABBAGE (*BRASSICA RAPA* L. SSP.
PEKINENSIS)**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2019



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Ana Smolko

**BIOKEMIJSKA I FUNKCIONALNA
KARAKTERIZACIJA ENZIMA
AUKSIN-AMIDOHIDROLAZE BRILL2
IZ KINESKOGA KUPUSA
(*BRASSICA RAPA* L. SSP. *PEKINENSIS*)**

DOKTORSKI RAD

Mentor: dr. sc. Branka Salopek-Sondi

Zagreb, 2019.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Ana Smolko

**BIOCHEMICAL AND FUNCTIONAL
CHARACTERIZATION OF AN AUXIN
AMIDOHYDROLASE ENZYME BRILL2 FROM
CHINESE CABBAGE (*BRASSICA RAPA* L. SSP.
PEKINENSIS)**

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Dr. Branka Salopek-Sondi

Zagreb, 2019

Ova disertacija izrađena je u Laboratoriju za kemijsku biologiju Instituta Ruđer Bošković, pod mentorstvom dr. sc. Branke Salopek Sondi, u sklopu sveučilišnog poslijediplomskog (dokorskog) studija kemije pri Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

*Davidu i Juliji,
da uvijek budete oduševljeni svijetom i životom,
jednako kao i našim znanstvenim čarolijama...*

Zahvale

...mentorici dr. sc. Branki Salopek-Sondi na podršci, prenesenom znanju, savjetima i vodstvu tijekom izrade ove doktorske disertacije.

...svim članovima Povjerenstva za ocjenu doktorske disertacije, kao i zamjenskom članu Povjerenstva dr. sc. Ivani Leščić Ašler, na svim sugestijama, komentarima i ispravcima koji su pomogli da disertacija izađe u ovom obliku.

...prof. dr. Jutti Ludwig-Müller na ukazanoj prilici za dolazak u njen laboratorij, kao i na pruženoj podršci i prenesenom znanju.

...prof. dr. sc. Sanji Tomić te dr. sc. Marini Grabar Branilović na izvođenju modeliranja, Marini na prijateljstvu i zajedničkim druženjima na Institutu.

...doc. dr. sc. Filipu Šupljiki na izvođenju izotermalne titracijske te diferencijalne pretražne kalorimetrije, te dr. sc. Mariji Matković i dr. sc. Ivi Crnolatu na savjetima i pomoći oko izvođenja spektropolarimetrije te kalorimetrije.

...dr. sc. Ivi Pavlović na pripremi analize auksinskog metaboloma na klijancima B. rapa u Laboratoriju za biljne regulatore rasta u Olomoucu, Češka, kao i dr. Alešu Penćiku na provođenju analiza u istoimenom laboratoriju.

...izv. prof. dr. sc. Nataši Bauer na zaraznom entuzijazmu, savjetima i prenesenom znanju kojima me je uvela u kloniranje te transformaciju biljaka.

...svim članovima Laboratorija za kemijsku biologiju na kolegijalnosti, podršci, druženjima i smijehu.

...svim članovima Laboratorija za biokemiju proteina i molekulsko modeliranje za sve naše dobrosusjedske suradnje, razglabanja i diskusije, Zrinki na susretljivosti, volji da odgovori na sva pitanja i prijateljskim savjetima, te Ani na riječima ohrabrenja.

...mojim roditeljima bez kojih ne bih bila niti ostvarila ovaj svoj put, mojoj braći na podršci.

... na koncu zahvaljujem suprugu Tihomiru na manevriranju života oko pisanja ove doktorske disertacije, na ljubavi, trudu da sve funkcionira i pruženoj potpori u svakom trenu.

Sadržaj

SAŽETAK.....	XVII
ABSTRACT	XIX
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	4
2.1. Auksini	4
2.2. Homeostaza auksina	5
2.2.1. Biosinteza auksina.....	5
2.2.2. Reverzibilna i ireverzibilna konjugacija auksina.....	7
2.2.3. Transport auksina	7
2.2.4. Razgradnja auksina.....	9
2.2.5. Pretvorba IBA u IAA.....	10
2.2.6. Genska ekspresija regulirana auksinima	10
2.3. Auksin-amidohidrolaze	12
2.3.1. Homologija auksin-amidohidrolaza.....	13
2.3.2. Moguće uloge auksin-amidohidrolaza	14
2.3.3. Poznate informacije o auksin-amidohidrolazi AtILL2	16
2.3.4. Karakterizacija enzima BrILL2.....	19
2.4. Kineski kupus (<i>Brassica rapa</i> L. ssp. <i>pekinensis</i>) kao modelni organizam	20
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	23
3.1. Materijali	23
3.1.1. Standardne kemikalije.....	23
3.1.2. Boje	23
3.1.3. Enzimi i ostali proteini.....	24
3.1.4. Biljezi molekulskih veličina.....	24
3.1.5. Hranjive podloge za uzgoj	25
3.1.6. Komercijalni kompleti.....	25
3.1.7. Supstrati enzimskih reakcija	26
3.1.8. Bakterijski sojevi.....	26
3.1.9. Plazmidni vektori	27
3.1.10. Biljni materijal.....	28
3.1.11. Oprema	29
3.2. Bioinformatičke metode	30

3.2.1. Pretraživanje baza podataka.....	30
3.2.2. Model BrILL2.....	31
3.2.3. Filogenetska analiza	31
3.2.4. Analiza javno dostupnih podataka transkriptomike i bioloških čipova za gen BrILL2 i druge gene uključene u auksinsku homeostazu	31
3.3. Biokemijske metode	32
3.3.1. Priprema elektrokompetentnih stanica	32
3.3.2. Transformacija bakterija elektroporacijom i izolacija plazmidne DNA	33
3.3.3. Ciljana mutagenaza	33
3.3.4. Proizvodnja rekombinantnih proteina, divljeg tipa i mutanti BrILL2 heterolognom ekspresijom u <i>E. coli</i>	36
3.3.5. Pročišćavanje rekombinantnih proteina, divljeg tipa i mutanti BrILL2, afinitetnom kromatografijom	36
3.3.6. Mjerenje koncentracije proteina	38
3.3.7. Elektroforeza proteina u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima	39
3.3.8. Western-hibridizacijska analiza.....	40
3.3.9. Cirkularni dikroizam.....	41
3.4. Biofizičke metode	42
3.4.1. Izotermalna titracijska kalorimetrija (ITC)	42
3.4.2. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC).....	43
3.5. Analitičke metode.....	44
3.5.1. Enzimske reakcije i mjerenje specifične aktivnosti	44
3.5.2. Analiza produkata enzimske reakcije metodom HPLC	45
3.5.3. Određivanje specifične aktivnosti i kinetičkih parametara enzima.....	45
3.5.4. ICP-MS analiza omjera N(manganov ion) : N(protein)	45
3.5.5. GC-MS identifikacija auksina	46
3.5.6. UHPLC-MS/MS analiza auksinskog metaboloma	48
3.6. Metode rada s biljkama.....	50
3.6.1. Selekcija transgenih biljaka nadekspresora BrILL2.....	50
3.6.2. Sterilizacija sjemena	51
3.6.3. Uzgoj biljnog materijala	51
3.6.4. Tretman konjugatima auksina.....	52
3.6.5. Prikupljanje i homogenizacija biljnog materijala	52
3.6.6. Provjera prisutnosti transgena u selekcioniranim linijama nadekspresora <i>A. thaliana</i>	53
Izolacija ukupnih staničnih proteina iz klijanaca <i>A. thaliana</i>	54
3.6.7. Test inhibicije rasta korijena	54
3.7. Mikroskopske metode.....	54

3.7.1. Konfokalna mikroskopija	54
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	56
4.1. Bioinformatičke analize	56
4.1.1. Analiza primarnog slijeda BrILL2 te homologije s auksin-amidohidrolazama i metalopeptidazama iz drugih vrsta	56
4.1.2. Identifikacija važnih aminokiselinskih ostataka u BrILL2	61
4.1.3. Model BrILL2	64
4.1.4. Filogenetski odnosi auksin-amidohidrolaza iz <i>B. rapa</i>	68
4.1.5. Analiza javno dostupnih podataka o ekspresiji gena uključenih u auksinsku homeostazu	71
4.2. Biokemijske i biofizičke analize	77
4.2.1. Uvođenje točkastih mutacija u enzim BrILL2 ciljanom mutagenезom	77
4.2.2. Proizvodnja i pročišćavanje rekombinantnih proteina, divljeg tipa i mutanti BrILL2 heterolognom ekspresijom u <i>E. coli</i>	78
4.2.3. Cirkularni dikroizam - očuvanost strukture mutanti BrILL2 u odnosu na divlji tip enzima	79
4.2.4. Određivanje specifične aktivnosti i kinetičkih parametara enzima divljeg tipa i mutanti	81
4.2.5. Uloga cisteinskih ostataka u oligomerizaciji enzima	84
4.2.6. Aktivacija enzima BrILL2 uz prisustvo različitih prirodno prisutnih redukcijskih agenasa	87
4.2.7. Mjerenje stabilnosti enzima diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom (DSC)	88
4.2.8. Vezanje metalnih iona u BrILL2	91
4.3. Selekcija nadekpresorskih linija te provjera prisutnosti transgena za BrILL2 u <i>A. thaliana</i>	96
4.4. Analize auksina u biljnom materijalu <i>B. rapa</i> i <i>A. thaliana</i>	97
4.4.1. GC-MS identifikacija auksina	97
4.4.2. UHPLC-MS/MS analiza auksinskog metaboloma u klijancima <i>B. rapa</i>	100
4.4.3. UHPLC-MS/MS analiza auksinskog metaboloma u klijancima <i>A. thaliana</i>	103
4.5. Praćenje distribucije auksina u reporterskoj liniji DR5rev::GFP konfokalnom mikroskopijom	109
§ 5. ZAKLJUČAK	112
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICÂ I SIMBOLA	114
§ 7. LITERATURNI IZVORI	119
§ 8. DODATAK	XXII
§ 9. ŽIVOTOPIS	XXIII



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

Biokemijska i funkcionalna karakterizacija enzima auksin-amidohidrolaze BrILL2 iz kineskoga kupusa (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*)

Ana Smolko
Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb

Auksin-amidohidrolaza ILL2 biljni je enzim iz porodice metalopeptidaza M20, koji specifično hidrolizira amidnu vezu u inaktivnim konjugatima auksina s aminokiselinama oslobađajući slobodan aktivan auksin. Homolog ILL2 iz kineskoga kupusa (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) biokemijski je okarakteriziran te je objašnjena uloga očuvanih aminokiselinskih ostataka Cys139, Cys320, Phe385, Arg295 i Met367 u enzimskoj aktivnosti i stabilnosti proteina te vezanju metala. Predložena je aktivacija BrILL2 *in vivo* disocijacijom oligomernih formi enzima uz prisustvo prirodnih reducensa. Supstratna specifičnost enzima BrILL2 prema konjugatima dugolančanih auksina, kao i hidroliza tih konjugata *in vivo* potvrđena je koristeći tzv. „feeding“ eksperimente. Auksinski metabolom po prvi put je opisan za mutante s disfunkcionalnim amidohidrolazama. Utvrđena je preraspodjela slobodnog auksina u biljkama po tretmanu konjugatima dugolančanih auksina, izražena kroz pojačanu konjugaciju auksina te oksidaciju suviška auksina. Akumulacija auksina u korijenu klijanaca reporterske linije uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) DR5rev::*GFP* ukazuje na rani odgovor biljaka na tretman auksinima.

(125 stranica, 46 slika, 16 tablica, 154 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: auksin-amidohidrolaza/ *Brassica rapa*/ auksinska homeostaza

Mentor: dr. sc. Branka Salopek-Sondi, zn. savj. trajno zvanje

Rad prihvaćen: 28. lipnja 2019.

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Marko Močibob
2. dr. sc. Branka Salopek-Sondi, znanstvena savjetnica u trajnom zvanju
3. izv. prof. dr. sc. Nataša Bauer



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

Biochemical and functional characterization of an auxin amidohydrolase enzyme BrILL2 from Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*)

Ana Smolko
Ruđer Bošković Institute, Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb

Auxin-amidohydrolase ILL2 is a plant enzyme from the M20 metallopeptidases family, which specifically hydrolyses amide bond in inactive auxin conjugates with amino acids thereby releasing free active auxin. Homologue ILL2 from Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) was biochemically characterized and the role of preserved amino acid residues Cys139, Cys320, Phe385, Arg295 and Met367 in enzymatic activity, protein stability and metal binding was explained. Activation of BrILL2 was proposed by dissociation of oligomeric forms of the enzyme *in vivo* in presence of natural reductants. Substrate specificity of BrILL2 enzyme towards long-chain auxin conjugates, as well as hydrolysis of these conjugates *in vivo*, has been confirmed using feeding experiments. Auxin metabolome was described for mutants with dysfunctional amidohydrolases. A change in auxin distribution was determined in plants upon treatment with long-chain auxin conjugates, expressed through enhanced auxin conjugation, and oxidation of surplus of auxin. Accumulation of auxin in the root of *Arabidopsis thaliana* reporter line *DR5rev::GFP* suggests an early plant response to auxins' treatment.

(125 pages, 46 figures, 16 tables, 154 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: auxin amidohydrolase/ *Brassica rapa*/ auxin homeostasis

Supervisor: Dr. Branka Salopek-Sondi, Senior Scientist Tenured

Thesis accepted: 28th of June 2019

Reviewers:

Dr. Marko Močibob, Assistant Professor
Dr. Branka Salopek-Sondi, Senior Scientist Tenured
Dr. Nataša Bauer, Associate Professor

§ 1. UVOD

Za pravilan razvoj biljaka ključna je kontrola razine hormona auksina, tzv. homeostaza auksina, a ostvaruje se kroz sljedeće procese: biosintezu, transport, degradaciju te reverzibilnu i ireverzibilnu konjugaciju auksina s aminokiselinama ili šećerima^{1,2}. Pored procesa biosinteze koji predstavljaju glavni način proizvodnje aktivnog hormona indol-3-octene kiseline (IAA), IAA se također prema potrebi oslobađa iz amidnih konjugata djelovanjem enzima auksin-amidohidrolaza koje cijepaju amidnu vezu između auksina i aminokiseline. Ti enzimi pripadaju M20 porodici peptidaza (podporodici M20D)³. Nekoliko auksin-amidohidrolaza je izolirano iz uročnjaka *Arabidopsis thaliana*⁴⁻⁷. Prva otkrivena auksin-amidohidrolaza iz *A. thaliana* nazvana je kraticom ILR1 od engl. „*IAA-Leucine Resistant*“, budući da se mutanta u ILR1 pokazala otpornijom na djelovanje konjugata IAA-Leu (IAA konjugirana s aminokiselinom leucinom) u testu inhibicije rasta korijena, za razliku od divljeg tipa *A. thaliana* kojemu se tretmanom s IAA-Leu inhibira produžni rast primarnog korijena⁴. Auksin-amidohidrolaze iz *A. thaliana* imaju različitu, ali preklapajuću supstratnu specifičnost⁶. Na primjer, dok auksin-amidohidrolaza ILL2 iz *A. thaliana* (AtILL2) najefikasnije hidrolizira IAA-Ala, druga auksin-amidohidrolaza AtILR1 je specifična za IAA-Leu⁶. Ortolozni auksin-amidohidrolaza izolirani iz kineskog kupusa (*Brassica rapa*) (BrILL2 i BrIAR3)⁸, pšenice (*Triticum aestivum*) (TaIAR3)⁹ i djeteline (*Medicago truncatula*)¹⁰ (MtIAR3) preferiraju dugolančane auksinske konjugate indol-3-maslačne kiseline (IBA) i indol-3-propionske kiseline (IPA) u odnosu na IAA konjugate. Nova saznanja o preferiranoj supstratnoj specifičnosti prema IBA i IPA mogla bi ukazivati na različite uloge tih enzima te se čine zanimljivim nalazom za daljnje istraživanje. Uloga auksin-amidohidrolaza u biljkama povezana je s mehanizmom odgovora na abiotske stresore¹¹, kao i kod obrane od patogena¹², a u vidu kontrole i održavanja fiziološke razine IAA.

Sve istraživane auksin-amidohidrolaze trebaju nužno za aktivnost prisutnost metala Mn^{2+} kao kofaktora te prisutnost redukcijskog sredstva, poput β -merkaptioetanola ili ditiotreitola⁸. Riješena je kristalna struktura AtILL2 enzima iz uročnjaka, ali kao apoenzima, tako da ključni podaci o aktivnom mjestu, kao i o pojedinim aminokiselinskim ostacima važnim za supstratnu specifičnost još uvijek nisu razjašnjeni¹³. Predloženi su model aktivnog mjesta AtILL2¹³, te dodatni načini vezanja preferiranog supstrata IPA-Ala u aktivno mjesto BrILL2⁸. Enzim

BrILL2 prema predloženim modelima ima dvije domene, katalitičku domenu koja veže metalni ion/ione, te „satelitnu“ domenu koja pretpostavljeno ima ulogu u stvaranju kompleksa istog enzima, tj. u stvaranju homooligomera enzima⁸, međutim sposobnost oligomerizacije ovih enzima nije još poznata u literaturi.

Cilj ovog doktorskog rada bio je biokemijski i funkcionalno istražiti auksin-amidohidrolazu BrILL2 iz kineskoga kupusa (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) interdisciplinarnim pristupom koji je uključivao raznovrsne molekularne, biokemijske, analitičke, kao i fiziološke metode.

S nastojanjem da se objasni odnos strukture i funkcije enzima, odabrani su aminokiselinski ostaci kandidati za ciljanu mutagenezu i postavljeno je nekoliko hipoteza, a na osnovu detaljnog sravnjivanja sekvence BrILL2 s drugim biljnim auksin-amidohidrolazama, kao i sa strukturnim homolozima objavljene kristalne strukture. **Prva hipoteza** bila je da je aminokiselinski ostatak cisteina na položaju 139 (Cys139) u primarnom slijedu enzima važan za vezanje / koordinaciju metala u aktivnom mjestu. **Druga hipoteza** glasila je da je aminokiselinski ostatak cisteina 320 (Cys320) važan za stabilnost enzima i ima ulogu u sposobnosti enzima da stvara homopolimerne forme, dok je prema **trećoj hipotezi** aminokiselinski ostatak fenilalanin 385 (Phe385) važan u pozicioniranju dugolančanog supstrata u šupljinu aktivnog mjesta. Ove hipoteze postavljene su na početku izrade doktora, međutim kasnije su istraživanja ostataka bitnih za funkciju i svojstva enzima biokemijskim i biofizičkim metodama proširena i na aminokiselinske ostatke arginina 295 (Arg295) i metionina 367 (Met367). Ujedno su obavljene detaljne filogenetske analize auksin-amidohidrolaza u viših biljaka, nižih biljaka i bakterija. Koristeći dostupne baze podataka i alate, detaljno su analizirane ekspresije gena uključenih u metabolizam auksina, s posebnim osvrtom na gene za auksin-amidohidrolaze.

Kako je na početku izrade ovog doktorskog rada objavljeno da auksin-amidohidrolaze BrILL2 i BrIAR3 preferiraju IPA-Ala i IBA-Ala kao supstrate *in vitro*⁸, postavljena je i **četvrta hipoteza** da je inhibitorni efekt IBA-Ala i IPA-Ala na rast korijena rezultat hidrolize tih konjugata u slobodne auksine *in vivo*. Stoga je provedena analiza sadržaja auksina u klijancima *B. rapa* analitičkim metodama.

S dostupnošću novih i osjetljivih metoda za analizu auksinskog metaboloma^{14,15}, funkcionalna istraživanja BrILL2 provedena su u vidu generiranja nadekspresorskih linija A.

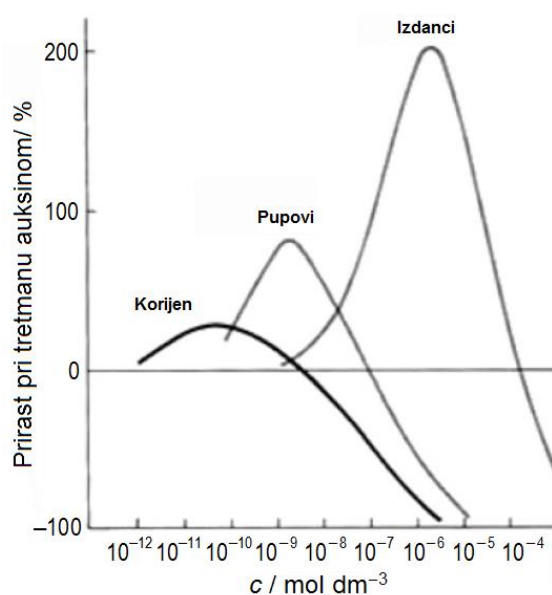
thaliana s konstitutivnom ekspresijom transgena *35S::BrILL2-His₆* te su promjene u auksinskom metabolomu izmjerene u nadekspresorskim linijama *A. thaliana*, kao i u mutantama s disfunkcionalnim auksin-amidohidrolazama. Konačno, **peta hipoteza** bila je da tretmani konjugatima auksina koji rezultiraju inhibicijom rasta korijena također utječu i na distribuciju auksina u vršku korijena što je ispitano konfokalnom mikroskopijom u reporterskim linijama uročnjaka.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Auksini

Charles Darwin i njegov sin Francis su još 1880. godine prepostavili postojanje transportiranog signala koji posreduje u fototropizmu biljke proučavajući rast koleoptila prema izvoru svjetlosti¹⁶. Prvi spojevi za koje se otkrilo da moduliraju biljni rast izolirani su iz ljudskog urina (1931.) i nazvani auksini A i B, prema grčkoj riječi *auxein*, što znači rasti¹⁷, a 1934. godine auksin A je identificiran i kemijski okarakteriziran kao indol-3-octena kiselina (IAA)¹⁸.

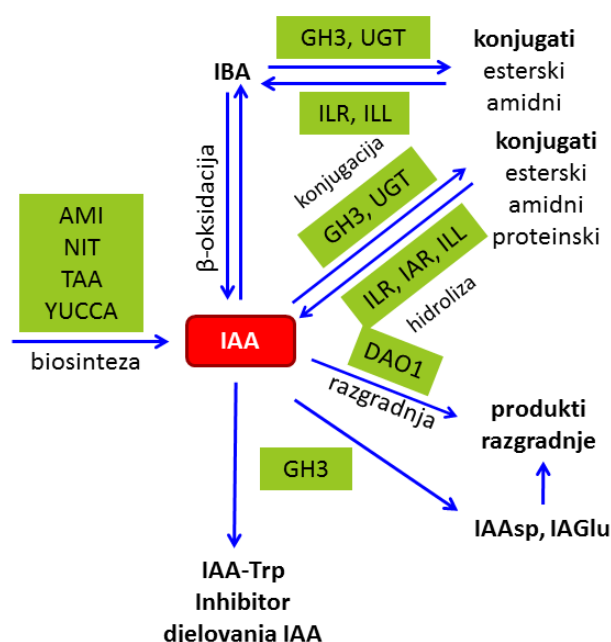
Auksini su skupina biljnih hormona koji reguliraju ekspresiju gena, diobu i proliferaciju stanica, te diferencijaciju biljnog tkiva. Njihovo djelovanje u konačnici se manifestira razvojnim i morfološkim promjenama u biljci, poput produžnog rasta stabljike i koleoptile, tropizama, stanične diobe u stabljici i vaskularnom kambiju, stvaranja adventivnog korijenja (na reznjoj plohi), rasta plodova¹⁷. Ukoliko su auksini, od kojih je najzastupljeniji prirodni auksin IAA, prisutni u niskim koncentracijama, mogu regulirati gore navedene procese, međutim u visokim koncentracijama djeluju inhibitorno i toksično. Tako je npr. optimalna razina auksina za poticanje rasta za pet redova veličina niža u korijenu biljaka, nego u izdanku biljaka (slika 1)¹⁹.



Slika 1. Učinak različitih koncentracija auksina na rast biljnog tkiva.
Preuzeto i preuređeno iz ref. 19.

2.2. Homeostaza auksina

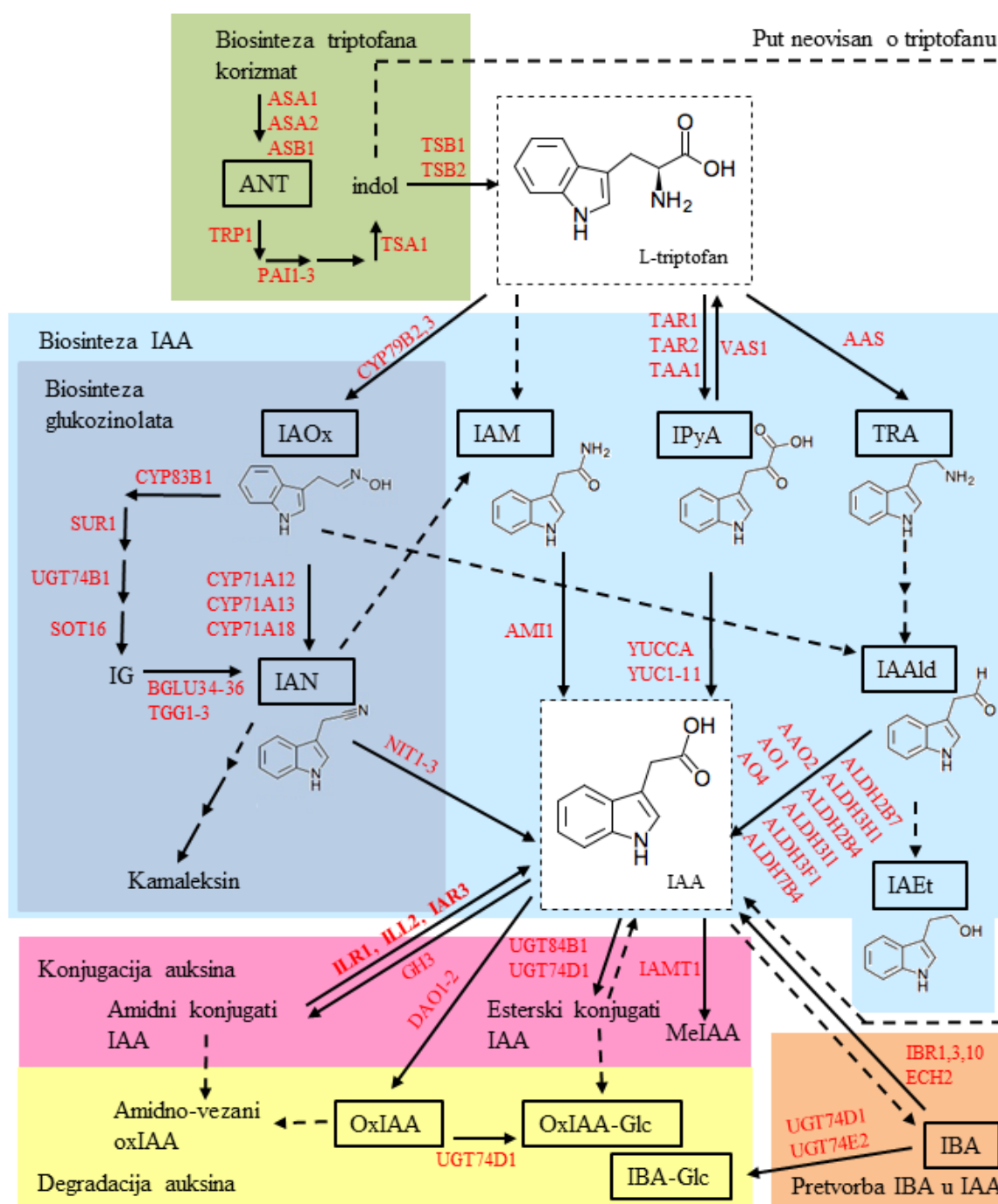
U metabolizmu auksina još uvijek je nedovoljno razjašnjena regulacija odgovarajuće koncentracije auksina na mjestima fiziološkog djelovanja, budući da se javljaju kao slobodni (aktivne forme) i konjugirani s aminokiselinama, peptidima ili šećerima (skladišne i transportne forme). U biljkama postoji manja količina slobodnog auksina, oko 25% ovisno o biljnoj vrsti i istraživanom tkivu, dostupnoga za stimulaciju i kontrolu staničnog rasta, dok preostali udio hormona dolazi u konjugiranoj skladišnoj formi². Za pravilan razvoj biljaka ključna je kontrola razine auksina, tzv. homeostaza auksina, a ostvaruje se kroz sljedeće procese: biosintezu, transport, degradaciju te reverzibilnu i ireverzibilnu konjugaciju auksina (slika 2)^{1,2,20}.



Slika 2. Homeostaza auksina. Na strelicama su neki od poznatih proteina koji sudjeluju u procesima reguliranja koncentracije slobodne IAA. Preuzeto i prilagođeno iz ref. 21.

2.2.1. Biosinteza auksina

U biosintezi IAA definirana su dva glavna puta: put neovisan o aminokiselini triptofanu (Trp) te put koji ovisi o Trp, tzv. Trp-ovisan put^{1,22}. Put biosinteze auksina neovisan o Trp je slabo istražen, dok put biosinteze auksina ovisan o Trp podrazumijeva četiri međusobno povezana biosintetska puta (slika 3): a) put indol-3-acetamida (IAM), b) put indol-3-piruvatne kiseline (IPyA), c) triptaminski put (TAM) te d) put indol-3-acetaldoksima (IAOx)²².



Slika 3. Detaljni prikaz homeostaze auksina. Biosinteza auksina koja uključuje Trp ovisne puteve kao i Trp neovisan put biosinteze prikazana je na plavoj pozadini. Shema je napravljena prema dosad okarakteriziranim poznatim biosintetskim putevima iz ref. 1, 2, 20, 22-26. Crveno i punom strelicom obilježeni su geni i poznate reakcije s okarakteriziranim enzimima, a isprekidanom strelicom zasad nedefinirane reakcije. Doprinos reverzibilne konjugacije auksina sadržaju slobodne IAA prikazan je na roznoj pozadini, a doprinos pretvorbe indol-3-maslačne kiseline (IBA) u IAA na narančastoj pozadini. Na žutoj pozadini prikazani su procesi degradacije IAA.

2.2.2. Reverzibilna i ireverzibilna konjugacija auksina

Konjugirani oblici IAA čine značajnu količinu ukupne IAA u većini biljnih tkiva te uključuju amidne konjugate (IAA je amidnom, tj. pseudopeptidnom vezom konjugirana na aminokiseline ili peptide), te esterske konjugate (IAA je esterskom vezom vezana na šećere) poput *mio*-inozitola ili *mio*-inozitol-šećera². Esterski konjugati pronađeni su u endospermu jednosupnica i dvosupnica, dok amidni konjugati (oblika IAA-L-aminokiselina) prevladavaju u zrelih sjemenkama dvosupnica i u zelenom vegetativnom tkivu većine jednosupnica i dvosupnica²⁷. U različitim biljnim vrstama identificirani su različiti konjugati, a uključuju IAA-leucin (IAA-Leu), IAA-alanin (IAA-Ala), IAA-aspartat (IAA-Asp), IAA-glutamat (IAA-Glu) i IAA-triptofan (IAA-Trp)^{28,29}. Konjugati s valinom (IAA-Val) te s fenilalaninom (IAA-Phe) pretpostavljeno nastaju na osnovu identifikacije oksidativnih metabolita 6-OH-IAA-Phe and 6-OH-IAA-Val u uročnjaku *Arabidopsis thaliana*³⁰. Konjugati IAA-Ala, IAA-Leu, IAA-Phe, te IAA-Val biološki su aktivni i oponašaju učinak slobodne IAA u induciranju razvojnih odgovora biljaka, kao što su inhibicija rasta korijena i hipokotila⁴. Direktni dokaz povezanosti biološke aktivnosti konjugata i njihove hidrolize evidentiran je u ranim istraživanjima na tkivu stabljike graha, gdje je detektirana slobodna IAA porijeklom od egzogeno dodanih obilježenih konjugata³¹. Konjugati IAA s Asp i Glu sintetiziraju se nakon tretmana biljaka visokom koncentracijom IAA²⁸ te se smatraju ireverzibilnim kataboličkim konjugatima obilježenima za daljnu detoksifikaciju iz biljaka, dok se gore spomenuti ostali konjugati smatraju sporo-otpuštajućim izvorom slobodne IAA². IAA-Trp djeluje kao endogeni inhibitor koji interferira s nekoliko fizioloških odgovora na auksin². Konjugatu IAA-Trp potreban je auksinski receptor TIR1 za aktivnost, međutim mehanizam te reakcije još nije do kraja razjašnjen³².

2.2.3. Transport auksina

Distribucija auksina kroz biljku može se odvijati nepolarnim transportom kroz floem, ili aktivnim međustaničnim polarnim transportom, koji se pak može odvijati bazipetalno (od vrška prema bazi) ili lateralno (slika 4)³³. Polarni transport jedinstven je za hormon auksin te je rezultat asimetrične stanične lokalizacije transportera koja određuje smjer gibanja auksina³³. Tako npr., tijekom gravitropizma ili fototropizma dolazi do akumuliranja auksina na izduženijoj, vanjskoj strani savijenog hipokotila te upravo lateralni transport auksina potiče asimetričnu lokalnu distribuciju auksina i asimetričan rast³³. Većina transportera auksina stoga

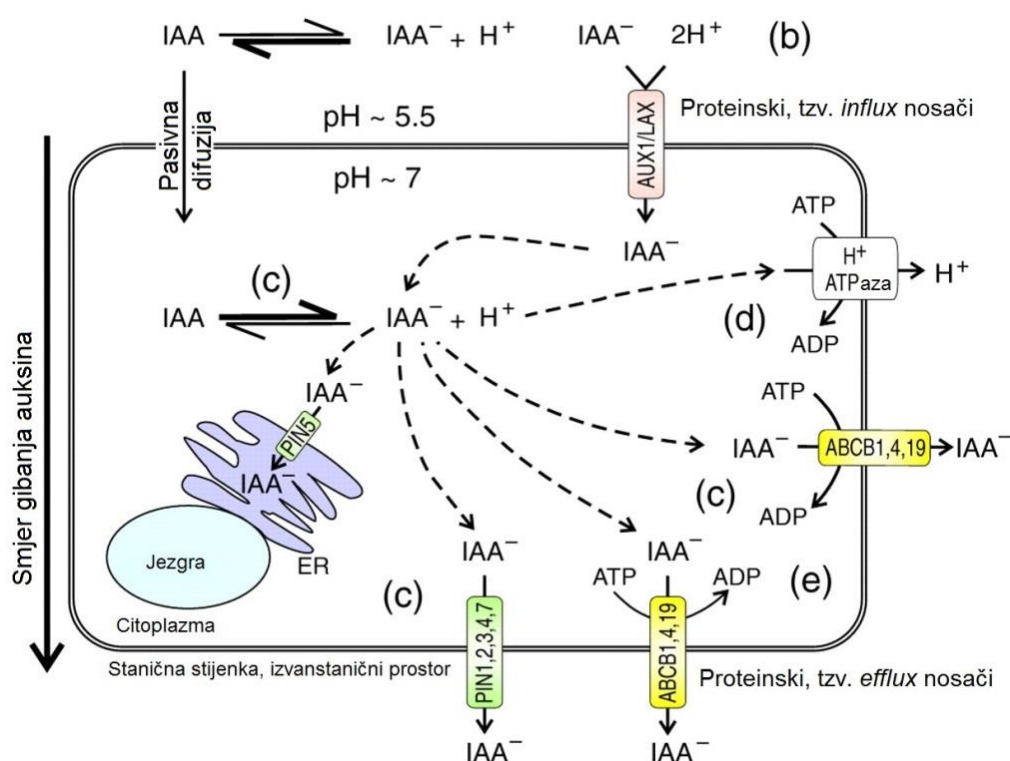
su stanično i tkivno specifični. U aktivan transport uključeni su porodica proteina AUX1/LAX (od engl. *AUXIN1/like-AUX1*) za unos auksina te porodica PIN proteina (od engl. *PIN-FORMED protein*) i ABCB proteina (od engl. *ATP-binding cassette protein* potporodice B transportera) za izlazak auksina iz stanica putem plazma membrane (slika 5).



Slika 4. Auksinski odgovor i transport u hipokotilu uročnjaka *A. thaliana* stimuliranom gravitacijom. Nepolarni transport floemom obilježen je isprekidanim linijama, dok je aktivan međustanični transport obilježen rozim strelicama kao bazipetalan transport te narančastim kao lateralni transport. Plavo obojenje dolazi od aktivnosti β -glukoronidaze koja se aktivira putem *DR5::GUS* promotora. Preuzeto i prilagođeno iz ref. 33.

U transport auksina u biljne stanice preko plazma membrane uključeni su pasivna difuzija nedisocirane (nenabijene) IAA (slika 5A) te aktivan transport putem specifičnih auksinskih nosača, $2H^+ - IAA^-$ simportera porodice AUX1/LAX kojima se preko plazma membrane prenose disocirani anioni IAA^- , koji su manje lipofilni od nedisocirane IAA (slika 5B)³⁴. Unutar stanice, zbog lužnatijeg okruženja citoplazme, IAA disocira te je potreban aktivan transport pomoću proteina PIN ili ABCB da bi izašla iz stanice (slika 5C)³⁴. Aktivnost proteinskih nosača PIN regulirana je stvaranjem gradijenta H^+ iona putem H^+ -ATPaze u plazma membrani (slika 5D), a i ABCB proteini imaju ATPaznu aktivnost (slika 5E). U lumen endoplazmatskog retikuluma (ER) IAA se prenosi putem proteina PIN5 te je ER pretpostavljeno, barem u uročnjaku *A. thaliana*, važan stanični odjeljak za konjugate auksina³⁵. Odjelivanje konjugacije auksina od njihove hidrolize unutar različitih staničnih

odjeljaka jedan je od pretpostavljenih mehanizama kojim se događa unutarstanična regulacija auksinskih gradijenata².



Slika 5. Transport auksina. Detaljan opis slike nalazi se u poglavlju 2.2.3.
Preuzeto i prilagođeno iz ref. 34.

2.2.4. Razgradnja auksina

Kako je već spomenuto, neki konjugati auksina služe kao skladišne forme auksina i mogu se ponovno mobilizirati u aktivnu IAA, dok drugi ulaze u mehanizam inaktivacije i ne mogu se povratiti u slobodnu IAA²⁴. Npr. kako je već spomenuto, konjugati IAA-Asp i IAA-Glu, te IAA-glukoza (IAA-Glc), imaju ulogu u inaktivaciji IAA¹⁸. Klasičnim obilježavanjem stabilnim izotopima i kvantifikacijom metabolita utvrđena je u uročnjaku oksidacija IAA u 2-oksindol-3-octenu kiselinu (oxIAA) kao najzastupljeniji mehanizam inaktivacije IAA³⁶. Konjugati s oxIAA imaju važnu ulogu u razgradnji IAA²⁶. Eksperimenti na linijama koje imaju prekomjernu akumulaciju sadržaja IAA (35S::*YUCCA1*, *sur1-3* i *sur2-1*) ukazali su da oxIAA ima nisku biološku aktivnost te da se brzo i ireverzibilno formira kao odgovor na povećane razine IAA³⁶. Zaključeno je da je oksidacija IAA u oxIAA važan mehanizam održavanja auksinske homeostaze kojim se moduliraju auksinski gradijenti i razina auksina u

biljaka³⁶. Funkcija dioksigenaze 1 (AtDAO1) u oksidaciji auksina u uročnjaku nedavno je opisana³⁷⁻³⁹.

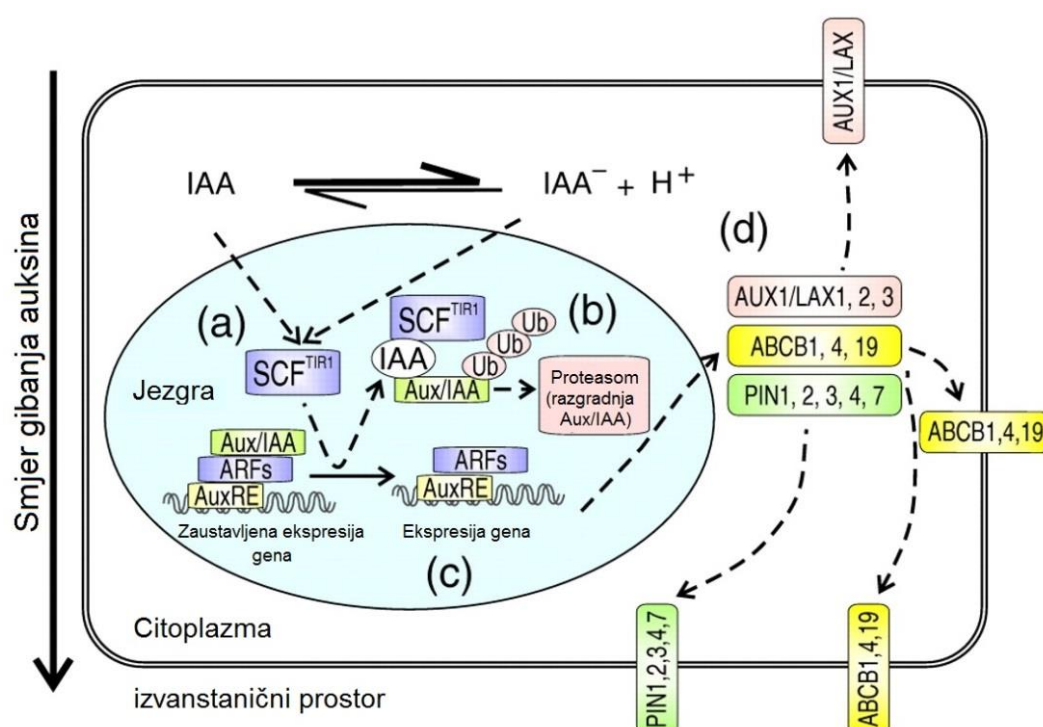
2.2.5. Pretvorba IBA u IAA

Indol-3-maslačna kiselina (IBA) je često bila opisivana kao sintetski auksin, s biološkom aktivnošću sličnom IAA, u vidu poticanja zakorijenjivanja, savijanja stabljike te epinastije listova⁴⁰. Međutim, pokazano je da postoji kao endogeni hormon u raznim biljnim vrstama²⁴. Bočni lanac IBA na poziciji 3 u indolnom prstenu ima četiri ugljikova atoma, za razliku od bočnog lanca IAA sa samo dva ugljikova atoma, te je predloženo da vjerojatno IBA kao takva ne može zauzeti konformaciju pogodnu za vezanje na TIR1-Aux/IAA receptor⁴⁰. Opisano je da se IBA pretvorbom prevodi u IAA u peroksisomima biljaka u procesu sličnom β -oksidaciji masnih kiselina⁴¹. U trostrukoj mutanti *ibr1 ibr3 ibr10* s disfunkcijom triju enzima koji sudjeluju u β -oksidaciji, javlja se otpornost na tretman s IBA, dok je zadržana osjetljivost na IAA. Te mutante pokazuju fenotip s manje bočnog korijenja i manjim kotiledonama od divljeg tipa, a ti su defekti u rastu stanica povezani s niskim razinama IAA u tkivima⁴¹. Dodatak auksina IAA trostrukoj mutanti vraća fenotip korijena u razine divljeg tipa. Slični mehanizmi kao u regulaciji razina IAA u biljkama, postoje i za regulaciju razine IBA, a uključuju sintezu konjugata IBA, kao i transport²⁴. IBA tako formira i amidne i esterske konjugate, baš kao i IAA². Zanimljivo je da neki članovi GH3 porodice auksin-amidosintetaza posjeduju adenilacijsku aktivnost i prema IBA i prema IAA^{42,43}. S druge strane, enzimi BrILL2 i BrIAR3⁸ te TaIAR3⁹, pokazuju veću specifičnost za auksinske konjugate s IBA, nego s IAA, što ukazuje na potencijalno postojanje endogenih konjugata IBA s aminokiselinama. Također su otkriveni enzimi uridin difosfat-glikoziltransferaze (skraćeno UGT), koji konjugiraju IBA na glukozu (enzimi UGT74E2⁴⁴ i UGT75D1⁴⁵). Nedavno je također dokazano u mutanti *ech2 ibr10* da IBA može djelovati mimo pretvorbe u IAA, kao samostalan hormon⁴⁶.

2.2.6. Genska ekspresija regulirana auksinima

Dvije su razine na kojima djeluje auksin, a koje se nazivaju zajednički auksinskim odgovorom. Prvu čine signalne transdukcijske kaskade koje dovode do percepcije auksina i ekspresije gena potaknute auksinima. Auksin inicira nizvodne signalne puteve vezanjem na jezgri auksinski receptor TIR1/AFB u sklopu kompleksa SKP1-CUL1-F-box ubikvitin

ligaze (skraćeno kompleks $SCF^{TIR1/AFB}$)⁴⁷ (slika 6A). Ovo vezanje auksina povećava afinitet kompleksa ubikvitin ligaze za njegove supstrate– proteine Aux/IAA. Proteini Aux/IAA (od engl. *auxin/indole-3-acetic acid proteins*) svojim vezanjem inhibiraju aktivnost transkripcijskih faktora ARF (skraćeno od engl. *auxin response factors*) koji prepoznaju specifične nukleotidne slijedove AuxRE (od engl. *auxin response elements*) u promotorskim regijama nizvodnih gena. Razgradnja proteina Aux/IAA događa se ubikvitinacijom i posredovana je proteasomom (slika 6B), nakon čega se oslobađaju transkripcijski faktori ARF (slika 6C), te je omogućena aktivacija ili represija nizvodnih gena posredovana ARF faktorima (preglednije opisano u literaturnom izvoru 48).



Slika 6. Ekspresija gena regulirana auksinom. Detaljan opis nalazi se u poglavlju 2.2.6.
Preuzeto i prilagođeno iz ref. 34.

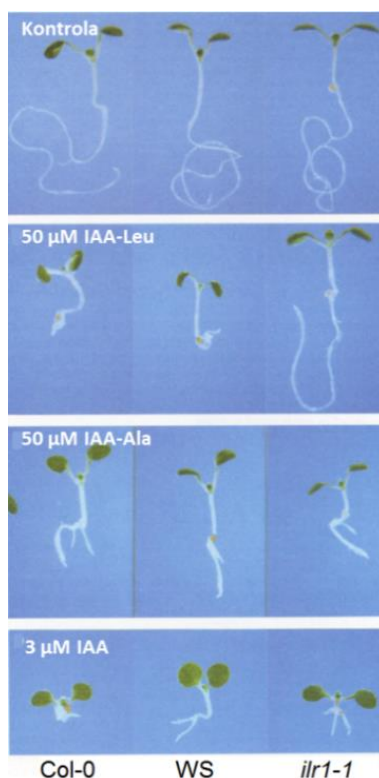
Sljedeća razina regulacije auksinskog odgovora su tri razreda gena induciranih auksinima, koji se nazivaju genima ranog odgovora. Ovu razinu regulacije čine geni za Aux/IAA transkripcijske represore, geni za auksin-amidosintetaze GH3 kao enzime odgovorne za konjugaciju IAA, te geni SAUR (od engl. *small auxin-up RNA*), a koji čine zajedno mehanizam povratne sprege u slučaju povišene koncentracije IAA¹⁸. Mnogi geni uključeni u ekspresiju potaknutu auksinom, dijele motiv u nukleotidnom slijedu uzvodno od gena u regulatornim regijama, oblika TGTCTC ili slično, koji je prvi puta identificiran u

promotorskoj regiji gena *IAA4/5* u grašku⁴⁹. Regije koje uključuju takav motiv, nazivaju se AuxRE elementima (od engl. *auxin response elements*) te omogućuju ekspresiju induciranu auksinom u sintetskim konstruktima poput DR5 promotora⁵⁰. Reporterski konstrukt sa sintetskim DR5 promotorom, koji sadrži nekoliko nukleotidnih slijedova za vezanje transkripcijskih faktora ARF, od njegovog kreiranja⁵⁰ do danas je u širokoj upotrebi kao alat za praćenje distribucije auksina u biljkama. Sintetski promotor DR5 sastoji se od 7-9 AuxRE nukleotidnih slijedova (TGTCTC)⁵⁰ i obilježava mjesta transkripcijskog odgovora potaknutog prisutnošću auksina, aktiviranjem proteina biljega poput β -glukoronidaze⁴⁷, fluorescentnih proteina^{51,52}, ili luciferaze⁵³. Mjesta ekspresije aktiviranog DR5 promotora su mjesta s auksinskim maksimumima⁵⁴.

2.3. Auksin-amidohidrolaze

Pretraga mutanti uročnjaka sa smanjenom osjetljivošću prema biološki aktivnim konjugatima IAA s aminokiselinama u testu inhibicije rasta korijena, dovela je do identifikacije auksin-amidohidrolaza^{4,6}. Prva identificirana bila je mutanta *ilr1*⁴, koja je pri tretmanu s IAA-Leu pokazivala povećanu otpornost u produžnom rastu korijena u odnosu na divlji tip biljaka⁴ (slika 7) te je stoga nazvana skraćeno *ilr1* mutantom (od engl. *IAA-leucine resistant 1*). Rekombinantna auksin-amidohidrolaza AtILR1 u enzimskim testovima pokazivala je visoki afinitet za IAA-Leu i IAA-Phe kao supstrate⁴.

U uročnjaku se u porodicu proteina sličnih ILR1 ubraja 7 članova: ILR1, ILL1, ILL2, ILL3, IAR3 (ILL4), ILL5 i ILL6. Za AtILR1, AtILL1, AtILL2 i AtIAR3 određena je u enzimskim testovima *in vitro* aktivnost prema konjugatima IAA s aminokiselinama te supstratna specifičnost^{6,55}. AtIAR3 i AtILL2 imaju najveću katalitičku aktivnost prema IAA-Ala kao supstratu, dok je AtILR1 najefikasnija u hidrolizi IAA-Leu i IAA-Phe. Prema prvim mjerenjima enzimске aktivnosti ILL3 i ILL6 ne pokazuju hidrolitičku sposobnost prema aminokiselinskim konjugatima IAA *in vitro*⁶, odnosno kasnije je zabilježena tek vrlo niska aktivnost prema aminokiselinskim konjugatima IAA *in vitro*⁵⁵. ILL5 je opisan kao pseudogen^{6,55}. Nijedna od opisanih hidrolaza u uročnjaku ne hidrolizira efikasno IAA-Asp i IAA-Glu⁶. Nedavno je u uročnjaku pokazano da AtILL6 i AtIAR3 mogu hidrolizirati konjugate jasmonske kiseline i izoleucina (JA-Ile), čime je dokazana veza između puta jasmonske kiseline kao hormona stresa i auksina⁵⁵.



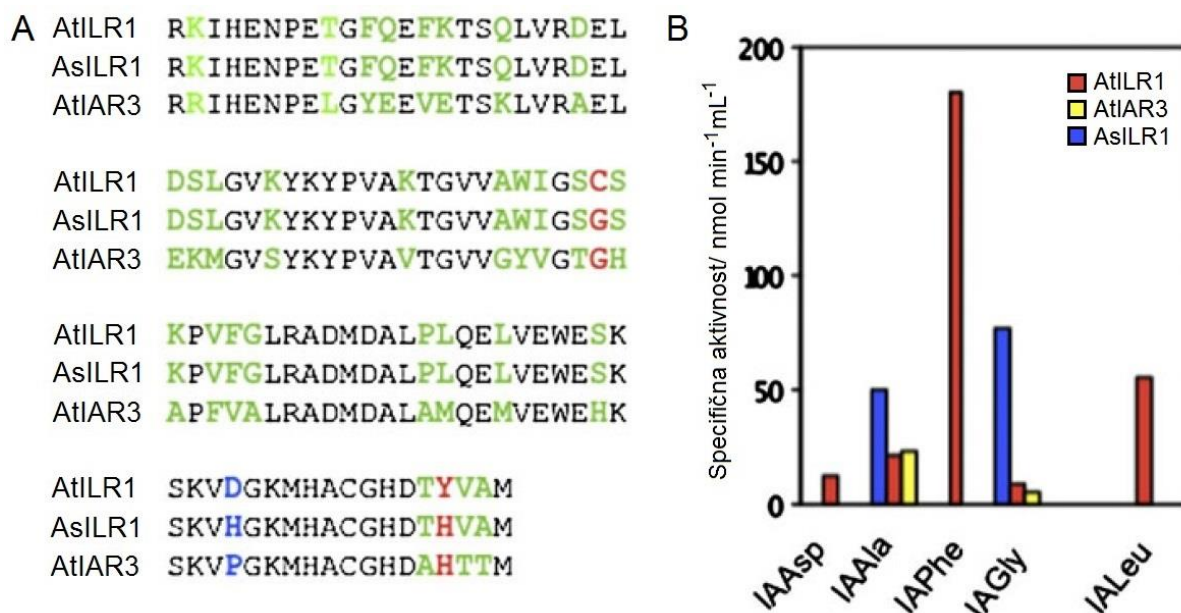
Slika 7. Identifikacija prve mutante s disfunkcionalnom auksin-amidohidrolazom u uročnjaku (*A. thaliana*). Preuzeto iz ref. 4.

Kako je već spomenuto, mutante *A. thaliana* sa samo jednom disfunkcionalnom auksin-amidohidrolazom (kao što su opisane mutante *ilr1*, *ill2* i *iar3*) imaju povećanu otpornost na biološki aktivne aminokiselinske konjugate auksina, dok je npr. nadekspresija *AtIAR3* dovela do pojačane osjetljivosti na određene konjugate auksina⁵. Trostruka mutanta *ilr1 ill2 iar3* je manje osjetljiva na tretman s IAA-Phe i IAA-Ala, te potpuno neosjetljiva na tretman s IAA-Leu⁷. S druge strane, jednostruka mutacija u genu *ill2* ima vrlo slabo izraženi efekt inhibicije rasta korijena u prisutnosti različitih IAA-konjugata, ukazujući na zalihost (engl. *redundancy*) funkcije s druge dvije izoforme auksin-amidohidrolaza u *A. thaliana*⁷. Otpornost na određeni konjugat auksina i aminokiseline vidljiva na fenotipskoj razini, odražava se kao supstratna specifičnost prema istim konjugatima u enzimatskim testovima *in vitro*⁶. Stoga je predloženo da je hidrolazna aktivnost proteina sličnih ILR1 direktno vezana s biološkom aktivnošću aminokiselinskih konjugata IAA.

2.3.1. Homologija auksin-amidohidrolaza

Sljedeća izolirana i djelomično okarakterizirana auksin-amidohidrolaza bila je homolog ILR1 iz vrste *Arabidopsis suecica* (AsILR1), bliskog srodnika *A. thaliana*⁵⁶. Zanimljivo otkriće bilo

je da su male promjene u slijedu aminokiselina ovog enzima dovele do promjene u supstratnoj specifičnosti enzima⁵⁷ (slika 8). Ovaj rad pokrenuo je zanimljiva pitanja o evoluciji proteina sličnih ILR1 te kako se ta porodica proteina mijenjala unutar i izvan roda *Brassicaceae*⁵⁸.



Slika 8. A) Usporedba slijedova pretpostavljenih hidrolaznih domena AtILR1 i AtIAR3 sa slijedom za AsILR1 te B) učinak promjena u slijedu aminokiselina na supstratnu specifičnost. Zeleno su obilježene slične aminokiseline između AtILR1 i AsILR1, a različite u AtIAR3; crveno su obilježene slične aminokiseline između AsILR1 i AtIAR3, a različite u AtILR1; plavo su obilježene aminokiseline različite u svim trima auksin-amidohidrolazama. Specifične aktivnosti preuzete su iz ref. 6. i 57. Crveni histogrami odgovaraju AtILR1, žuti AtIAR3, plavi AsILR1. Preuzeto i preuređeno iz ref. 2.

Na osnovu homologije slijedova za auksin-amidohidrolaze iz *A. thaliana* uspješno su izolirane hidrolaze iz drugih biljnih porodica, iz kineskog kupusa⁸, pšenice⁹, djeteline¹⁰, te iz nižih biljaka mahovine *Physcomitrella patens*⁵⁹ i jetrenke *Marchantia polymorpha*⁶⁰, te su djelomično okarakterizirane u vidu ekspresije gena i nekih biokemijskih svojstava.

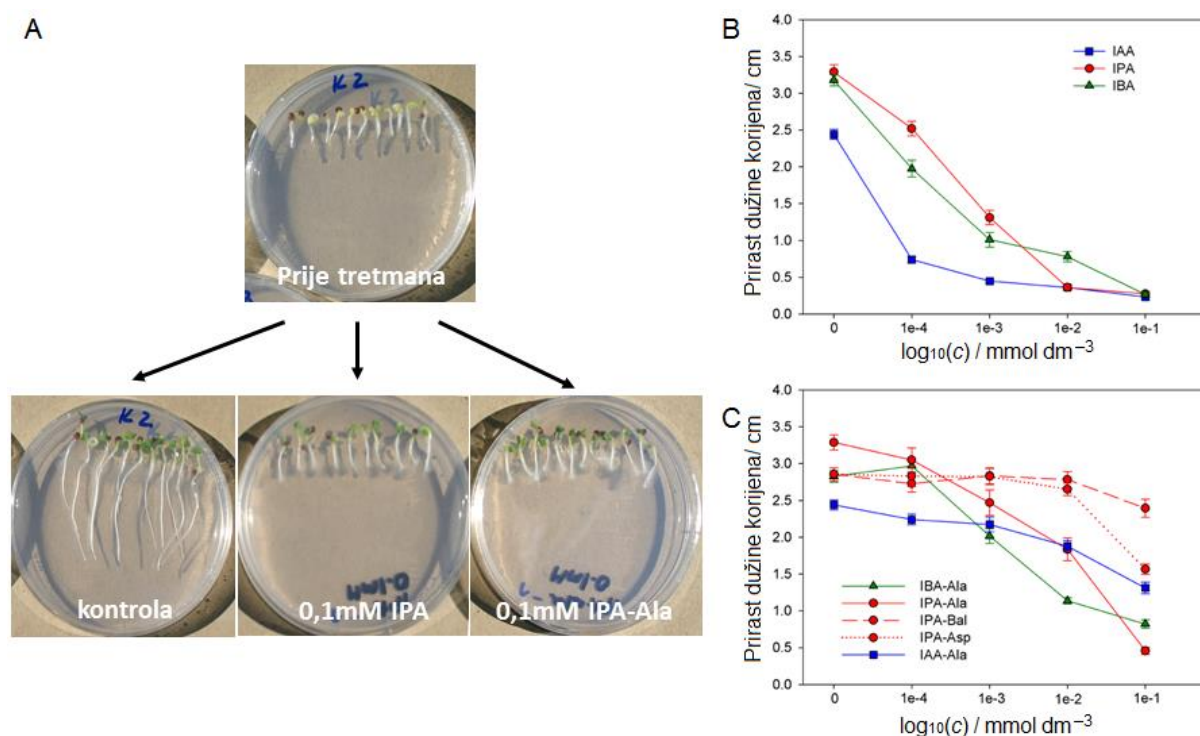
2.3.2. Moguće uloge auksin-amidohidrolaza

Uloga auksin-amidohidrolaza u biljkama nije do kraja razjašnjena. Mutante uročnjaka s jednom disfunkcionalnom auksin-amidohidrolazom ne pokazuju promijenjen fenotip, osim veće otpornosti na odgovarajući konjugat IAA kojeg bi inače funkcionalni enzim hidrolizirao⁷. Tek se u trostrukoj mutanti *ilr1 ill2 iar3* koja ima disfunkcionalne tri najzastupljenije hidrolaze događaju promjene u rastu izdanka i korijena⁵.

Ortolog uročnjakove hidrolaze ILL3 iz topole izoliran je tijekom solnog stresa, ukazujući da slobodna IAA ima ulogu u uvjetima abiotskog stresa. Nadekspresija topoline auksin-amidohidrolaze (PcILL3) u uročnjaku, učinila je transgenične biljke uročnjaka tolerantnijima od divljeg tipa na solni stres¹¹. Nedavno je pokazano da je razina transkripta IAR3 povećana u uročnjaka uslijed osmotskog stresa⁶¹. Također je dokumentirano da auksin-amidohidrolaze imaju ulogu i u biotskom stresu. Auksin-amidohidrolaze BrILL2 i BrIAR3 u kineskom kupusu (*B. rapa*) pojačano se eksprimiraju uslijed infekcije s obligatnim parazitom *Plasmodiophora brassicae*, uzročnikom kupusne kile na korijenu kupusnjača¹². Nadalje, nekoliko je gena za auksin-amidohidrolaze inducirano u ranoj fazi interakcije između *Rhizobium* sp. i djeteline *M. truncatula*¹⁰. Iako je IAR3 definiran kao auksin-amidohidrolaza na temelju enzimatskih testova *in vitro*⁵⁻⁷, taj enzim ima dvojaku ulogu te sudjeluje i u homeostazi jasmonske kiseline^{55,62}. Time se pretpostavlja da auksin-amidohidrolaza IAR3 igra ključnu ulogu u međudjelovanju auksina i jasmonata prilikom odgovora biljaka na stres. Očito je da su i procesi konjugacije auksina, kao i hidrolize konjugata auksina uključeni u odgovor biljaka na stres, ali točni mehanizmi su još uvijek nerazjašnjeni, naročito u komercijalnim kulturama.

Činjenica da neke od okarakteriziranih auksin-amidohidrolaza preferiraju kao supstrate konjugate s dugolančanim auksinima IBA i IPA^{8,9,10} mogla bi ukazivati na različite uloge tih enzima. IBA se dugo smatrala analogom auksina, zbog upotrebe za zakorijenjivanje reznica, no otkrivena je kao prirodan auksin u viših biljaka²⁴. IPA također pokazuje auksinsku aktivnost, iako nije sa sigurnošću dokazana kao endogeni prirodan hormon⁸. IPA ima antimikrobnu aktivnost, prvo je pronađena u raspadnutoj organskoj materiji kao metabolit triptofana, a proizvode je neki mikroorganizmi, dok su drugi na nju osjetljivi⁹. Iako je identificirana u korijenu klijanaca graška, hipokotilima bundeve i drugim biljnim vrstama, nije jasno je li ta identifikacija rezultat kontaminacije bakterijama, odgovora na njih ili dokaz uloge u biljnom razvoju⁹. U pšenici, npr. nisu pronađeni konjugati s IPA, dok su pronađeni konjugati s IBA, te je pretpostavljeno da je moguće da su upravo konjugati s IBA *in vivo* supstrati auksin-amidohidrolaze TaIAR3⁹. Tretman s IPA-Ala i IBA-Ala dovodi do snažne inhibicije rasta korijena klijanaca kineskog kupusa *B. rapa*, slično kao i tretman sa slobodnim IPA i IBA (slika 9)⁸. IAA je u izvedenim testovima inhibicije rasta korijena pri nižim koncentracijama uzrokovala snažniju inhibiciju rasta korijena, dok su pri višim koncentracijama ($c = 0,01$ i $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) IPA i IBA pokazale jednak inhibitorni efekt kao i

IAA (slika 9)⁸. Pri ispitivanju učinka konjugata auksina u istome testu, IPA-Ala i IBA-Ala pokazuju najizraženiju inhibiciju rasta korijena, dok su IAA-Ala, IPA-Asp i IPA-β-Ala značajno manje efikasni⁸. S obzirom na supstratnu specifičnost enzima BrILL2 i BrIAR3, predloženo je da je uočena biološka aktivnost konjugata IPA-Ala i IBA-Ala, barem dijelom rezultat hidrolize tih konjugata te oslobođenja aktivnih auksina (IPA i IBA)⁸.



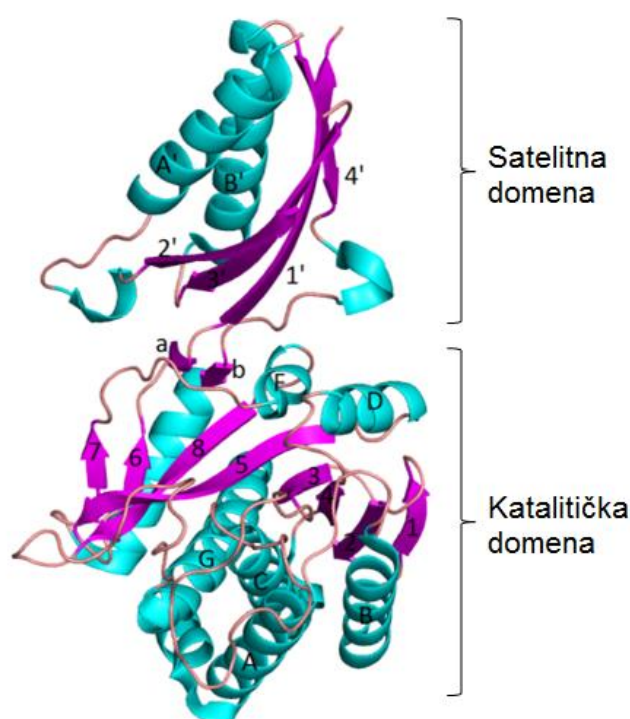
Slika 9. A) Inhibicija rasta korijena klijanaca kineskoga kupusa *B. rapa* pri tretmanu slobodnim auksinom IPA, ostvaruje se analogno i pri tretmanu konjugatom IPA-Ala (slika grupe dr. Salopek-Sondi). B) Krivulje inhibicije rasta korijena klijanaca *B. rapa* po tretmanu sa slobodnim auksinima IAA, IBA i IPA te C) auksinskim konjugatima s aminokiselinama. Prirasti su prikazani kao srednje vrijednosti $\pm$ standardne pogreške. Preuzeto i preuređeno iz ref. 8.

2.3.3. Poznate informacije o auksin-amidohidrolazi AtILL2

Struktura auksin-amidohidrolaze AtILL2 iz *A. thaliana* u formi apoenzima riješena je 2009. godine pri rezoluciji od 2.0 Å¹³. Enzim AtILL2 sastoji se od dvije domene: katalitičke i satelitne (slika 10). Veća katalitička domena uključuje aminokiselinske ostatke 1-217 te 333-439 počevši od N-kraja te ima arhitekturu troslojnog $\alpha\beta\alpha$ -sendviča s amino-peptidaznom topologijom. Ovakva topologija karakteristična je za bakterijske egzo-peptidaze s dva cinkova iona u aktivnom mjestu¹³. U katalitičkoj domeni je središnja osmostrana β -ploča smještena u

sendviču između pet α -uzvojnica s jedne te dvije α -uzvojnice s druge strane (slika 10, narančasto obojane α -uzvojnice i tirkizno obojane β -ploče).

Satelitna domena prema riješenoj strukturi AtILL2, smata se slično feredoksinu, u arhitekturu dvoslojnog $\alpha\beta$ -sendviča te je umetnuta između β -vrpce 6 i α -uzvojnice E katalitičke domene. Četverostrana β -ploča satelitne domene sastavljena je od četiri β -vrpce (slika 10, zeleno) te dvije α -uzvojnice (slika 10, žuto). U nekoliko strukturnih homologa enzima AtILL2 satelitna domena može poslužiti za dimerizaciju enzima¹³, međutim sposobnost stvaranja oligomera do sada nije uočena u biljnim auksin-amidohidrolazama te AtILL2 kristalizira kao monomer.

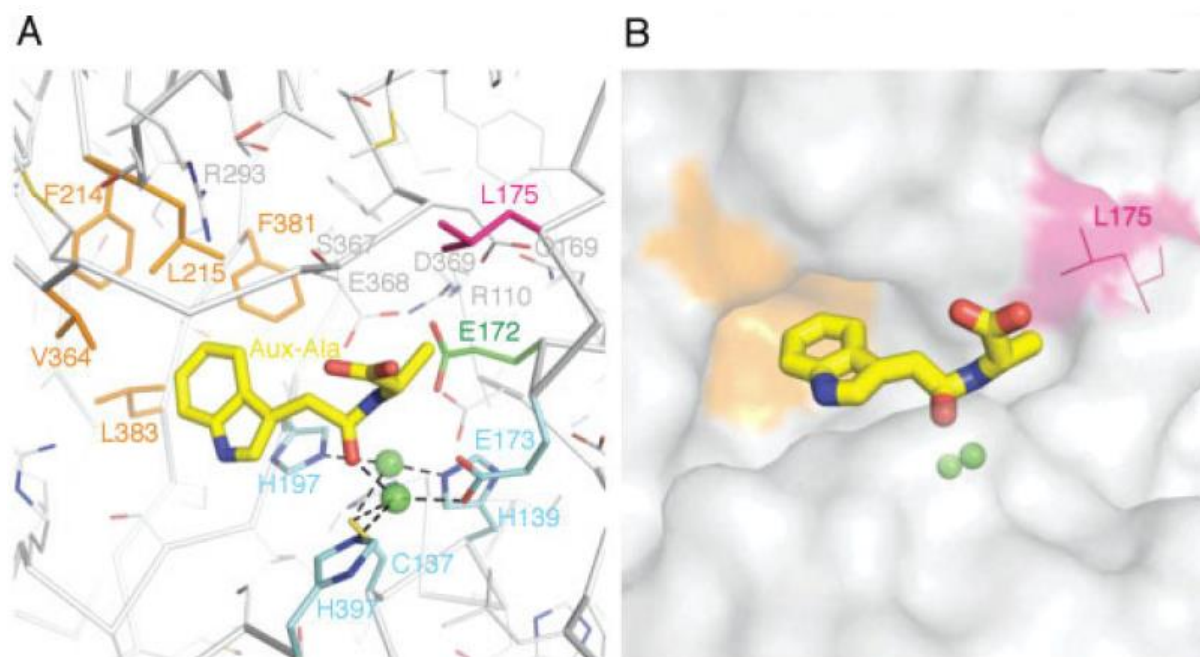


Slika 10. Kristalna struktura AtILL2. Slovim su označene α -uzvojnice, a brojevima β -vrpce¹³. Katalitička i satelitna domena obilježene su vitičastim zagradama.

Vezno mjesto metalnih iona u AtILL2 predloženo je na osnovu usporedbe sa strukturama drugih M20 peptidaza, budući da je kristalna struktura AtILL2 određena u formi apoenzima, tj. jer se kristalizacija odvijala bez dodatka mangana. U koordinaciju metalnog iona u aktivnom mjestu enzima uključeno je pet aminokiselinskih ostataka: Cys137, Glu173 i His397 koordiniraju metal 1, a Cys137, His139 i His197 koordiniraju metalni ion 2. Cys137 koordinira oba metalna iona te je očuvan samo u enzimima M20D potporodice peptidaza, za

razliku od ostalih enzima M20 porodice peptidaza, kod kojih se umjesto cisteina nalazi očuvani aspartat (npr. Asp141 u karboksipeptidazi G2 iz *Pseudomonas* sp.)¹³.

Također, predloženo je mjesto vezanja supstrata te model kojim se objašnjava supstratna specifičnost AtILL2 prema IAA-Ala. Pozicioniranjem IAA-Ala u aktivno mjesto enzima *in silico* predložen je aminokiselinski ostatak Leu175 kao ključan za selektivnost, tj. oblikovanje afiniteta ovog enzima prema konjugatima IAA s aminokiselinama čiji su bočni ogranci dulji od konjugata s alaninom ili serinom (slika 11, rozo). Međutim, Leu175 nije očuvan ostatak, već se pojavljuje samo kod AtILL2 te njegovog najbližeg homologa AtILL1. U AtILL1 umjesto leucina, dolazi ostatak Tyr176, koji pretpostavljeno stabilizira π - π interakcijama aromatske bočne lance preferiranih supstrata IAA-Phe i IAA-Tyr. Nadalje, u aktivnom mjestu AtILL2 smješten je očuvani glutamat (Glu172, slika 11, zeleno), koji djeluje kao kiselo-bazni ostatak tijekom katalize. On može djelovati kao bazni katalizator koji dovodi do deprotonacije molekule vode koordinirane metalom 2, čime sudjeluje u nukleofilnom napadu na amidni karbonil IAA-aminokiselinskog konjugata. Nastali negativno nabijeni tetraedarski intermedijer stabilizira se elektrostatskim interakcijama s ionima metala Mn^{2+} . Protonirani Glu172 može djelovati kao kiselinski katalizator donirajući proton dušiku amidne veze IAA-aminokiselinskog konjugata kako bi se olakšalo cijepanje amidne veze formiranjem bolje izlazne skupine. Predložen je i hidrofobni džep pored katalitičkog dimetalnog centra koji prepoznaje indolilni dio supstrata i stabilizira ga aminokiselinama Leu215, Val364, Leu383, Phe381 i Phe214 (slika 11, narančasto), dok Ser367 prepoznaje i veže terminalni karboksilat iz IAA-Ala i stabilizira ga vodikovim vezama.



Slika 11. Aktivno mjesto enzima AtILL2 s usidrenim supstratom IAA-Ala (N-(indol-3-acetil)-alanin, žuto obojan): A) Predloženi važni aminokiselinski ostaci prikazani su modelom štapića: ostaci koji sudjeluju u koordinaciji metalnih iona – obojani tirkizno, ostaci koji formiraju hidrofobnu šupljinu u koju se veže indolni prsten supstrata – obojani narančasto, bočni lanac Leu175 pretpostavljeno ključan za selektivnost, tj. supstratnu specifičnost enzima – obojan ružičasto, ostatak Glu172 predložen kao kiselo-bazni ostatak – obojan zeleno, te ostali sačuvani ostaci uključeni u mrežu vodikovih veza u aktivnom mjestu enzima – sivo. B) Prikaz površina aktivnog mjesta prilikom smještanja supstrata. Hidrofobna šupljina (narančasto) prihvaća i smješta indolni prsten supstrata. Karbonilna skupina amidne veze supstrata koordinirana je jednim metalom (zelene sfere), dok se C-terminalna karboksilna skupina supstrata usmjerava prema površini proteina. Leu175 ograničava dužinu aminokiselinskog bočnog lanca supstrata koji može sjesti u šupljinu te je stoga najzaslužniji za supstratnu specifičnost ILL2. Slika je preuzeta iz ref. 13.

2.3.4. Karakterizacija enzima BrILL2

Auksin-amidohidrolaze iz kineskog kupusa, BrILL2 i BrIAR3, pokazuju visoku homologiju s IAA-amidohidrolazama iz *A. thaliana*⁸. Prema ranije objavljenim istraživanjima⁸ Laboratorija za kemijsku biologiju, enzimi BrIAR3 i BrILL2 cijepaju IAA-Ala, a BrILL2 dodatno hidrolizira i IAA-Val i IAA-Leu¹². Definirana je supstratna specifičnost tih enzima prema konjugatima dugolančanih auksina IBA i IPA⁸. Optimalni uvjeti za aktivnost enzima uključuju dodatak manganskih iona kao metalnih kofaktora te redukcijskog sredstva, poput β -merkaptioetanol ili ditiotreitola (DTT)⁸. Mn^{2+} se pokazao kao jedini metal s kofaktorskom aktivnošću za ova dva enzima. Reducirajući agensi (DTT ili β -merkaptioetanol) su neophodni za aktivnost ovih enzima prema analiziranim supstratima⁸. Prema do sada objavljenim

mjerenjima enzimske aktivnosti, BrIAR3 i BrILL2 pokazuju najveću specifičnu aktivnost s IPA-Ala kao supstratom i to brzinom 200 i 3000 nmol razvijenog produkta (IPA) po mg proteina po minuti. Mjerenju enzimske kinetike enzima BrILL2 pristupilo se jer je enzim pokazivao u prosjeku 10 puta veće brzine hidrolize (tj. specifične aktivnosti) u usporedbi s BrIAR3⁸.

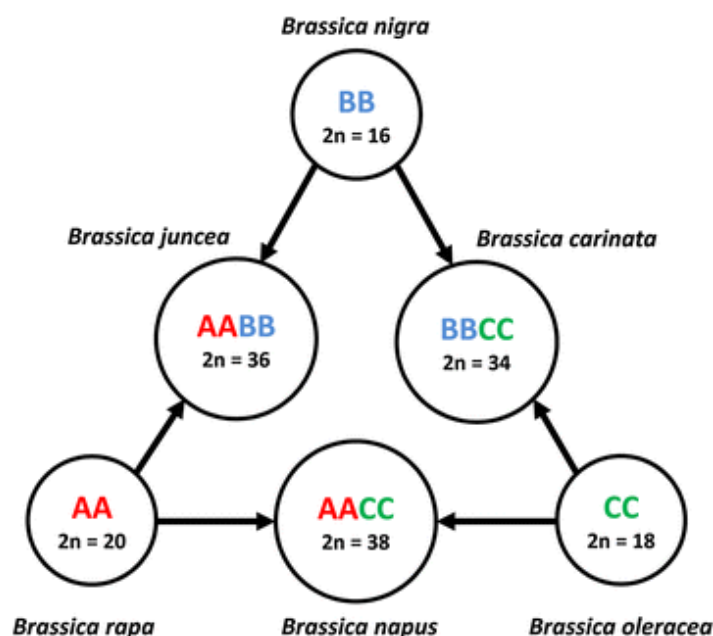
Kinetički parametri određeni za enzim BrILL2 divljeg tipa ukazali su na jače vezanje i značajno veću katalitičku efikasnost prema IPA-Ala ($K_m = 2,03 \text{ mmol L}^{-1}$, $k_{cat}/K_m = 3,28 \times 10^{-6} \text{ mol}^{-1} \text{ L min}^{-1}$) i prema IBA-Ala ($K_m = 1,14 \text{ mmol L}^{-1}$, $k_{cat}/K_m = 1,25 \times 10^{-6} \text{ mol}^{-1} \text{ L min}^{-1}$), u usporedbi s IAA-Ala ($K_m = 6,25 \text{ mmol L}^{-1}$, $k_{cat}/K_m = 0,33 \times 10^{-6} \text{ mol}^{-1} \text{ L min}^{-1}$). Zaključeno je da BrILL2 preferira konjugate dugolančanih auksina, IPA-Ala i IBA-Ala, kao supstrate u odnosu na IAA-Ala⁸.

Slična promjena u supstratnoj specifičnosti prema konjugatima dugolančanih auksina uočena je i kod auksin-amidohidrolaze TaIAR3 iz pšenice⁹ te MtIAR3¹⁰ iz djeteline. TaIAR3 je specifična za IBA-Ala, IBA-Gly i IPA-Ala, dok MtIAR3 homolozi (MtIAR3-1 do MtIAR3-4) pokazuju hidrolitičku aktivnost prema konjugatima IAA-Asp i IBA-Ala^{9,10}. U usporedbi s tim enzimima, auksin-amidohidrolaza AtILL2 pokazuje specifičnost prema IAA-Ala⁶.

2.4. Kineski kupus (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) kao modelni organizam

Porodica krstašica ili kupusnjača, Brassicaceae, je monofilogenska grupa od 338 rodova i otprilike 3700 vrsta rasprostranjenih po čitavom svijetu^{63,64}. Uključuje mnoge ekonomski važne usjevne biljke, ali u porodicu spada i uročnjak (*Arabidopsis thaliana* L. Heynh.), poznata modelna vrsta koja je i danas standardna referenca u eksperimentalnoj biljnoj biologiji. Usjevne biljke iz ove porodice su komercijalno široko rasprostranjeno povrće koje se konzumira širom svijeta i među najstarijim su poznatim kultiviranim biljkama. Kupusnjače pokazuju veliku raznolikost u morfologiji lista i cvijeta te razvojnih oblika, koja se odražava kroz postojanje mnogih podvrsta unutar iste vrste, a koje se često nazivaju „morfotipovima“ ili „varijetetima“⁶⁵. Vrste *Brassica rapa* uključuju poznate morfotipove poput kineskog kupusa, pak choi kupusa, repe, uljane repice, dok su najpoznatiji morfotipovi vrste *Brassica oleracea* brokula, kupus, cvjetača, kelj i kelj pupčar⁶⁵. Prema statistici Organizacije za hranu i poljoprivredu UN-a (FAOStat) prosječna godišnja proizvodnja kupusa

i drugih kupusnjača od 2013. do 2017. godine činila je 7%, 12% i 3% ukupne godišnje proizvodnje povrća u svijetu, Europi i u Hrvatskoj⁶⁶. Povrće se konzumira i zbog bogatstva fitokemikalijama, poput polifenola, glukozinolata, karotenoida i vitamina C, koji pokazuju antioksidativno, antitumorsko i potencijalno druga pozitivna svojstva za zdravlje^{67,68}. Šest usjevnih kultura iz porodice kupusnjača su klasičan primjer važnosti poliploidije u evoluciji biljaka, opisane kao „U trokut“⁶⁹. „U trokut“ (slika 12) čine diploidne vrste *B. rapa* (AA genom, $n=10$), *Brassica nigra* (BB genom, $n=8$) te *B. oleracea* (CC genom, $n=9$) čija je međusobna hibridizacija dovela do pojave alotetraploidije u vrsta *Brassica juncea* (AABB genom, $n=18$), *Brassica napus* (AACC genom, $n=19$), i *Brassica carinata* (BBCC genom, $n=17$)⁶⁹.



Slika 12. Vrste roda *Brassica* unutar „U trokuta“. Prikazane su tri diploidne vrste (*B. rapa*, *B. nigra* i *B. oleracea*) koje predstavljaju osnovne genome AA, BB i CC, te tri alotetraploidne vrste (*B. juncea*, *B. napus* i *B. carinata*) koje su se razvile hibridizacijom ovih osnovnih genoma. Prikazan je diploidni broj kromosoma (2n). Slika je preuzeta iz ref. 70.

Kineski kupus (*B. rapa* ssp. *pekinensis*) bila je prva komercijalno važna kupusnjača čiji je genom sekvenciran, te je pokazano da se u zajedničkom pretku *B. rapa* i *B. oleracea* dogodila triplikacija genoma kojom je nastupila divergencija od *A. thaliana* prije barem 13-17 milijuna godina^{69,71}. Takva triplikacija genoma smatra se, uz druge rearanžmane u genomu poput kasnijih duplikacija, gubitka funkcije i frakcinacije genoma, razlogom morfološke raznolikosti, kao i zalihosti funkcije pojedinih grupa gena, uključujući gene povezane s hormonom auksinom⁷¹. U usporedbi s genomom *A. thaliana* veličine 120 Mpb koji sadrži oko

20000 gena na 5 kromosoma, veličina genoma *B. rapa* iznosi oko 485 Mpb te se odražava na razini broja gena uključenih u biosintezu, signalizaciju, transport i inaktivaciju auksina, 347 gena u *B. rapa* u odnosu na 187 sličnih gena u *A. thaliana*⁷¹. Kineski kupus predstavlja osjetljiviju vrstu pod utjecajem abiotskih stresora u odnosu na otpornije vrste *B. oleracea* te je stoga zanimljiv modelni organizam za usporedbu s drugim kupusnjačama u uvjetima stresa. Izuzev složenije transformacije u odnosu na *A. thaliana*, moguće je producirati veliku biomasu u kratkom generacijskom vremenu što je pogodno za istraživanja auksinskog metaboloma, kao i drugih biljnih hormona.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Standardne kemikalije

Agar, ekstrakt kvasca, tripton (*Becton, Dickinson and Company*); higromicin B, plant agar, Murashige-Skoog (MS) soli s vitaminima, saharoza (*Duchefa Biochemie*); amonijev persulfat (APS), Triton X-100 (*Fischer Biotech*); fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF), 2-merkaptotetanol (*Fluka*); etanol (p.a.) (*Gram-mol*); kloramfenikol (Chl) (*International Biotechnologies, Inc.*); acetonitril (p.a.), borna kiselina (p.a.), etil-acetat (p.a.), fosfatna kiselina (min. 85%), glicerol (p.a.), glicin (p.a.), heksan, kloridna kiselina (min. 99,5%), natrijev hidroksid (p.a.), di-natrijev hidrogenfosfat dihidrat (p.a.), natrijev dihidrogenfosfat dihidrat (p.a.), manganov klorid, metanol (p.a.), natrijev acetat (p.a.) (*Kemika*); standardi 2-oksoindol-3-octena kiselina (oxIAA) i 2-oksoindol-3-acetil-1-glukozil ester (oxIAA-Glc) (*Olchemim Ltd.*); izosan G (*Pliva*); niklova nitrilotrioctena kiselina agaroza (Ni-NTA) (*Qiagen*); akrilamid-bisakrilamid (AA/Bis) smjesa (30%, 29:1), ampicilin (Amp), imidazol, izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG), Luria-Bertani (LB) podloga (Lennox), lizozim, mlijeko u prahu, mravlja kiselina (min. 98%), natrijev kakodilat trihidrat ($\geq 98\%$), natrijev klorid (p.a.), octena kiselina, 2-propanol (p.a.) (*Roth*); agaroza, cisteamin hidroklorid, 1,4-ditiotreitol (DDT), natrijeva sol dietilditiokarbaminske kiseline, etilendiaminotetraoctena kiselina (EDTA) 98,5%-101,5%, 2-(N-morfolino)etansulfonska kiselina (MES), natrijev dodecilsulfat (SDS), $\geq 98,5\%$, N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (TEMED) (*Serva*); askorbinska kiselina, cistein, glutation, jodov acetamid, propidijev jodid, standardi za analizu auksina (indol-3-octena kiselina (IAA), antranilat (ANT), indol-3-acetamid (IAM), indol-3-acetonitril (IAN), indol-3-piruvatna kiselina (IpyA) i triptofan (Trp)), sulfadiazin, Tris(hidroksimetil)-aminometan (TRIS) min. 99,9%, Tween 20 (*Sigma-Aldrich*).

3.1.2. Boje

Bromfenol modriilo (*Fisher Scientific Company*), Coomassie Brilliant Blue G 250 (*Merck*), Coomassie Brilliant Blue R 250 (*Merck*), etidijev bromid (*Sigma*), ksilencijanolo fluorofosfat (*Serva*), Ponceau S (*Sigma*)

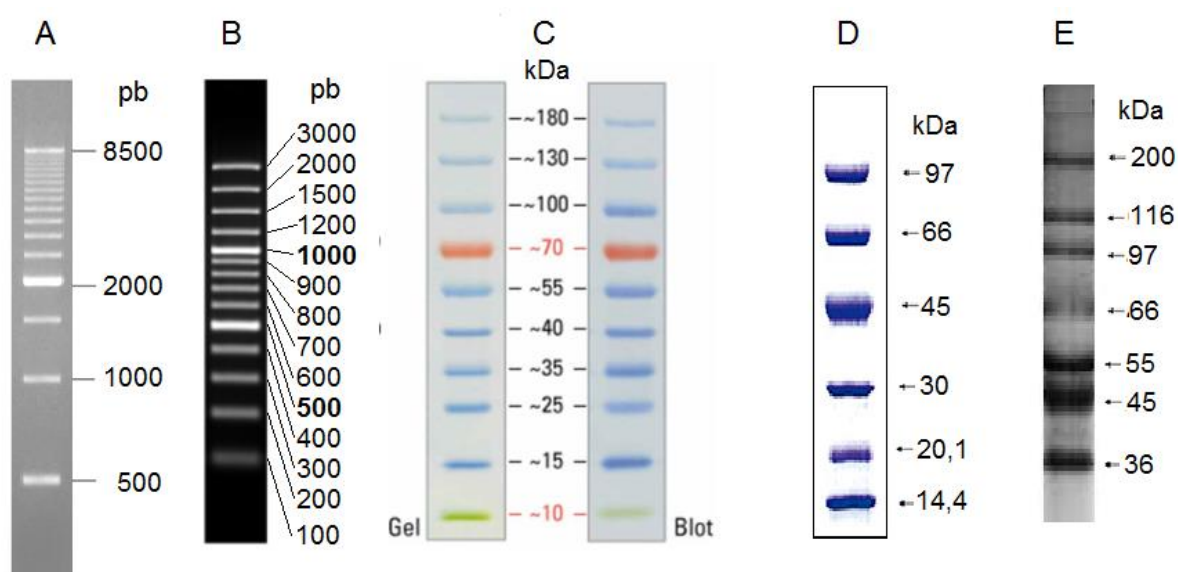
3.1.3. Enzimi i ostali proteini

Anti-His₆ mišje monoklonsko protutijelo (*Roche*), anti-mišje poliklonalno IgG protutijelo konjugirano s peroksidazom iz hrena (*Sigma Aldrich*), deoksiribonukleaza I (DNaza) iz goveđeg pankreasa (*Sigma*), DreamTaq DNA-polimeraza s odgovarajućim 10× DreamTaq puferom (*Thermo Scientific*), goveđi serumski albumin (*Sigma*), inhibitori proteaza (*Sigma*), lizozim (*Sigma*).

3.1.4. Biljezi molekulskih veličina

DNA standardi veličina za agaroznu gel-elektroforezu: 500 bp DNA Ladder (*Invitrogen*); GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (*Fermentas/Thermo Scientific*).

Proteinski standardi veličina za elektroforezu u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima (SDS-PAGE): PageRuler Prestained Protein Ladder (*Thermo Scientific*); Low Molecular weight standards (*Pharmacia*); SigmaMarker High Range (*Sigma Aldrich*). Korišteni DNA i proteinski biljezi molekulskih masa prikazani su na slici 13.



Slika 13. Standardi veličina korišteni u radu. DNA markeri: A) 500 bp DNA Ladder (*Invitrogen*); B) GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (*Fermentas/Thermo Scientific*); Proteinski markeri: C) PageRuler Prestained Protein (*Thermo Scientific*); D) Low Molecular weight standards (*Pharmacia*); E) SigmaMarker High Range (*Sigma Aldrich*).

3.1.5. Hranjive podloge za uzgoj

Hranjive podloge za uzgoj bakterija

Tekuća hranjiva podloga *Luria-Bertani* (LB): tripton $\gamma = 10 \text{ g L}^{-1}$, ekstrakt kvasca $\gamma = 5 \text{ g L}^{-1}$, NaCl $\gamma = 5 \text{ g L}^{-1}$ ili LB medij (Lennox) $\gamma = 20 \text{ g L}^{-1}$.

Kruta hranjiva podloga LB: tripton $\gamma = 10 \text{ g L}^{-1}$, ekstrakt kvasca $\gamma = 5 \text{ g L}^{-1}$, NaCl $\gamma = 5 \text{ g L}^{-1}$, agar $\gamma = 15 \text{ g L}^{-1}$.

Podloge su autoklavirane 20 minuta na 121°C pri tlaku 1,5 atm, a nakon hlađenja do otprilike 55°C dodani su antibiotici: ampicilin do konačne koncentracije $\gamma = 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ ili kloramfenikol do konačne koncentracije $\gamma = 0,020 \text{ mg mL}^{-1}$ ili sulfadiazin do konačne koncentracije $\gamma = 0,0125 \text{ mg mL}^{-1}$. Radne otopine antibiotika sterilizirane su kroz PES filter veličine pora $0,2 \mu\text{m}$ (*Millipore*).

Hranjive podloge za uzgoj biljaka

Kruta hranjiva podloga Murashige-Skoog⁷² (MS): MS soli sa vitaminima $\gamma = 4,4 \text{ g L}^{-1}$, saharoza $\gamma = 10 \text{ g L}^{-1}$, MES monohidrat $\gamma = 0,5 \text{ g L}^{-1}$, agar za biljne kulture (Plant agar) $\gamma = 10 \text{ g L}^{-1}$, pH = 5,7.

Agar podloga za naklijavanje sjemena kineskog kupusa (*B. rapa*): agar za biljne kulture (Plant agar) $\gamma = 10 \text{ g L}^{-1}$.

Podloge su autoklavirane 20 minuta na 121°C pri tlaku 1,5 atm, a nakon hlađenja do otprilike 55°C dodani su antibiotici u MS podloge za selekciju mutanata: higromicin B do konačne koncentracije $\gamma = 50 \text{ mg L}^{-1}$. U MS podloge i agar podloge za određene tretmane auksinima i konjugatima auksina dodane su vodene otopine konjugata auksina IAA-Ala, IPA-Ala, IBA-Ala početnih koncentracija $c = 10 \text{ mmol L}^{-1}$, tj. u rasponu konačnih koncentracija od $c = 0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ do $c = 100 \mu\text{mol L}^{-1}$. Radne otopine antibiotika i auksina sterilizirane su kroz PES filter veličine pora $0,2 \mu\text{m}$.

3.1.6. Komercijalni kompleti

Komplet za ciljanu mutagenezu (QuikChange[®] II XL Site-Directed Mutagenesis Kit, *Stratagene*); komplet za izolaciju plazmidne DNA (GenElute[™] Plasmid Miniprep Kit, *Thermo Scientific*); komplet za izolaciju genomske DNA (DNeasy[®] Plant Mini Kit, *Qiagen*); komplet za detekciju proteina u *western-hibridizacijskoj* analizi (Amersham ECL Prime Western Blotting System, *GE Healthcare*).

3.1.7. Supstrati enzimskih reakcija

Supstrate je sintetizirao dr. sc. Volker Magnus u Laboratoriju za kemijsku biologiju Instituta Ruđer Bošković. Korišten je N-[3-(indol-3-il)acetil]-L-alanin (IAA-Ala), konjugat aminokiseline alanina s auksinom indolil-3-octenom kiselinom (IAA)⁸; N-[3-(indol-3-il)propionil]-L-alanin (IPA-Ala), konjugat alanina s indolil-3-propionskom kiselinom (IPA)⁹ te N-[4-(indol-3-il)butiril]-L-alanin (IBA-Ala), konjugat alanina s indolil-3-maslačnom kiselinom (IBA)⁸.

3.1.8. Bakterijski sojevi

Escherichia coli, soj DH10B

Bakterijski soj DH10B (*Invitrogen*), genotipa: F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *endA1* *araD139* Δ (*ara*, *leu*)7697 *galU* *galK* λ^- *rpsL* *nupG*, korišten je za umnažanje i čuvanje plazmida. Pogodan je za kloniranje prokariotskih i eukariotskih genomskih DNA (gDNA) te proizvodnju knjižnica plazmidne DNA. Mutacije u genima *mrcA*, *mrcBC* i *mrr* omogućuju lako kloniranje DNA koja sadrži metilirane citozine i adenine. Marker ϕ 80*lacZ* Δ M15 osigurava α -komplementaciju gena za β -galaktozidazu te plavo/bijelu selekciju transformiranih stanica.

Escherichia coli, soj XL10-Gold

Stanice ovog bakterijskog soja, genotipa: Tet^r Δ (*mcrA*)183 Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1* *supE44* *thi-1* *recA1* *gyrA96* *relA1* *lac* Hte [F' *proAB* *lacI*^qZDM15 *Tn10* (Tet^r) Amy Cam^r], ultrakompetentne su stanice korištene u sklopu kompleta za ciljanu mutagenezu (QuikChange[®] II XL Site-Directed Mutagenesis Kit, *Stratagene*). Deficijentnost u homolognoj rekombinaciji (mutacija u genu *recA*) ovih stanica doprinosi stabilnosti ukloniranog inserta, dok deficijentnost u endonukleaznoj aktivnosti (mutacija u genu *endA1*) povećava kvalitetu izoliranih plazmidnih DNA. Mutacijama u sustavima za restrikciju McrA, McrCB i Mrr spriječeno je cijepanje rekombinantne DNA koja sadrži metilirani citozin i/ili adenin. Metilacija adenina ili citozina česta je pojava u eukariotskoj cDNA ili DNA. Cijepanje (razgradnja) rekombinantne DNA spriječena je u stanicama i mutacijom endonukleaznog sustava EcoK (*hsdR*). Stanice stoga mogu transformacijom primiti velike molekule DNA s visokom efikasnošću te su pogodne za konstruiranje knjižnica plazmidnih DNA. Otporne su na antibiotike tetraciklin i kloramfenikol.

Escherichia coli, soj BL21-CodonPlus (DE3) RIL

Ovaj soj bakterija *E. coli* (proizvođač *Stratagene*), genotipa: *E. coli* B F⁻ *ompT hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *dcm*⁺ Tet^r *gal* λ(DE3) *endA Hte* [*argU ileY leuW Cam*^r], korišten je za heterolognu ekspresiju enzima auksin-amidohidrolaza iz *B. rapa*. Soj je prikladan za prekomjernu ekspresiju rekombinantnih eukariotskih proteina pod kontrolom inducibilnog promotora T7 RNA polimeraze. Indukcija ekspresije T7 RNA polimeraze s *lacUV5* promotora postiže se dodatkom IPTG-a. Soj je deficijentan za OmpT i Lon proteaze koje mogu razgraditi proteine tijekom pročišćavanja. Stanice sadrže pomoćni plazmid pACYC s dodatnim kopijama gena za tRNA koje prepoznaju kodone arginin, izoleucin i leucin (geni *argU*, *ileY* i *leuW*) te najčešće njihova dostupnost u stanici može ubrzati heterolognu ekspresiju rekombinantnih proteina u *E. coli*⁷³.

Agrobacterium tumefaciens, soj GV3101::pMP90

Soj agrobakterija korišten je za transformacije biljaka. Stanice sadrže gen za rezistenciju na antibiotik rifampicin na kromosomskoj DNA te gen za rezistenciju na antibiotik gentamicin na pomoćnom plasmidu pMP90 (sa *vir* regijom)^{74,75}.

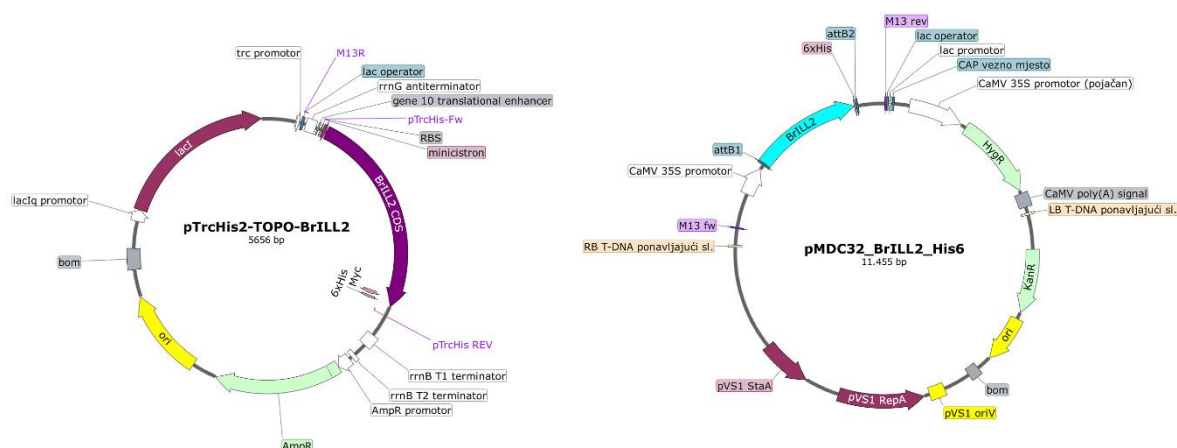
3.1.9. Plazmidni vektori

Plazmidni vektor pTrcHis2-TOPO-BrILL2

Plazmidni vektor *pTrcHis2-TOPO-BrILL2*¹² (slika 14A) s prethodno ukloniranom cDNA za auksin-amidohidrolazu BrILL2 iz *B. rapa* (EnsemblPlants⁷⁶: *Bra002800.1*) dobiven je ljubaznošću prof. dr. sc. Jutte Ludwig-Müller s Tehničkog Sveučilišta Dresden, Njemačka te je korišten za heterolognu ekspresiju divljeg tipa proteina BrILL2 i mutanti, kao i za ciljanu mutagenezu. Vektor s insertom cDNA za BrILL2 veličine je 5656 pb, dok je prazan vektor veličine 4381 pb, sadrži gen za rezistenciju na antibiotik ampicilin te je ekspresija kodirajućeg slijeda za BrILL2 pod kontrolom inducibilnog *trc* promotora⁷⁷. Kloniranje inserta u plazmid omogućilo je ekspresiju proteina s His-privjeskom na C-kraju proteina te je kodirajućoj sekvenciji transkripta *Bra02800.1* odstranjeno prvih 19 nukleotida koji odgovaraju signalnome slijedu¹².

Plazmidni vektor *pMDC32-BrILL2-His₆*

Plazmidni vektor *pMDC32-BrILL2-His₆* (slika 14B) s prethodno ukloniranom cDNA za auksin-amidohidrolazu BrILL2 iz kineskog kupusa (*Brassica rapa* L.) (EnsemblPlants¹²: *Bra002800.1*), dobiven je ljubaznošću prof. Jutte Ludwig-Müller (Tehničko Sveučilište Dresden, Njemačka). Vektor *pMDC32* binarni je vektor kompatibilan s tehnologijom tzv. Gateway™ kloniranja^{78,79}. Vektor s insertom cDNA za BrILL2 korišten je za transformaciju biljke *A. thaliana* posredovanu agrobakterijom *A. tumefaciens*, veličine je 11455 pb, sadrži gen za rezistenciju na antibiotik kanamicin za selekciju u bakterijama. Unutar T-DNA regije omeđene lijevom i desnom granicom (LB i RB) sadrži gen za rezistenciju na antibiotik higromicin B pod kontrolom pojačanog konstitutivnog promotora 35S iz mozaičnog virusa cvjetače (CaMV, od engl. *Cauliflower Mosaic Virus*) za selekciju u biljaka, te insert za ekspresiju BrILL2 s His-privjeskom na C-kraju proteina. Transgen *BrILL2* je pod kontrolom konstitutivnog promotora 35S i nalazi se unutar kazete omeđene *attB* regijama.



Slika 14. Mape plazmidnih vektora. A) Mapa plazmida *pTrcHis2-TOPO[®]-BrILL2* B) Mapa plazmida *pMDC32-BrILL2-His₆*. Mape su nacrtane u programu SnapGene.

3.1.10. Biljni materijal

Uročnjak (*Arabidopsis thaliana*)

Sjeme divljeg tipa uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) ekotipa Wassilewskija (Ws) i sjeme *DR5rev::GFP* linije^{51,52} (komercijalno ime N9361) kupljeno je od Europskog centra za pohranu linija uročnjaka (Nottingham Arabidopsis Stock Centre, NASC). Sjeme mutanti s

disfunkcionalnim genima za auksin-amidohidrolaze⁷ dobiveno je ljubaznošću prof. Bonnie Bartel, Rice University, Houston, Texas, SAD.

Kineski kupus (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*)

Sjeme kineskog kupusa (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt cv. Cantonner Witkrop) kupljeno je od proizvođača sjemena (ISP International Seed Processing GmbH, Quedlinburg, Njemačka).

3.1.11. Oprema

- uređaj za ultračistu vodu: MilliporeSigma™ Sinergy™ Water Purification System (*Millipore Sigma*) za dobivanje pročišćene, UV-svjetlošću tretirane vode s otpornošću 18,2 MΩ cm kod 25 °C filtrirane kroz Millipore filter veličine pora 0,2 μm.
- uređaj za autoklaviranje: NÜVE Steam Art OT 90L (*NÜVE*)
- uređaj za elektroporaciju: Gene Pulser Xcell™ (*Bio-Rad*) te kivete za elektroporaciju: Gene Pulser®/MicroPulser™ Electroporation Cuvettes, 0,2 cm otvor, (*Bio-rad*)
- uređaji za elektroforezu: vodoravna elektroforeza - RunOne™ Electrophoresis Cell (*Embi Tec*); Mini-PROTEAN® Tetra Cell (*Bio-Rad*)
- uređaj za usitnjavanje i homogenizaciju biljnog tkiva: Mixer Mill MM 400 (*Retsch*) te keramičke cirkonijeve kuglice promjera 2 mm (*Next Advance*)
- uređaj za liofilizaciju: Lyovac GT 2 (*Steris*)
- spektrofotometri: BioSpec-1601 E Dna/Protein/Enzyme analyzer (*Shimadzu*); Microplate Reader (*Labsystems Multiskan MS*); NanoDrop 1000 i NanoDrop 2000 (*Thermo Fisher Scientific*); spektropolarimetar J-715 (*JASCO*)
- uređaj za Western prijenos proteina: Mini Protean II Electrophoresis Cell (*Bio-Rad*)
- uređaj za detekciju kemiluminiscencije: UVItec Cambridge Alliance 4.7 (*Uvitec Ltd*)
- uređaj za lančanu reakciju polimerazom (*Polymerase Chain Reaction*, PCR): GeneAmp® PCR Applied Biosystem 2700 (*Applied Biosystems Inc*)
- uređaj za vizualizaciju DNA: G:Box Syngene Transiluminator (*Syngene*)
- skener: HP ScanJet G3010 (*HP*)
- uređaji za kalorimetriju: izotermalni titracijski kalorimetar VP ITC, (*Microcal*); diferencijalno pretražni kalorimetar NANO DSC (*TA Instruments*)

- laserski pretražni konfokalni mikroskop: Leica TCS SP2 AOBS (*Leica Microsystems GmbH*)
- uređaji za analitičke metode: HPLC Varian, GC-MS maseni spektrometar Varian Saturn 2100 ion-trap s Varian CP-3900 plinskom kromatografijom i CP-8400 skupljačem frakcija (*Varian, Darmstadt, Germany*);
- termoblok: Biosan Dry Block Heating Thermostat Bio TBD-100 (*Biosan*)
- rotacijske platforme: Biosan Mini-rotator BioR5-24 (*BioSan*), BioSan Orbital Shaker PSU-10i (*Biosan*); Shaking incubator (*Shel Lab*), Innova 4300 Incubator Shaker (*New Brunswick Scientific*)
- centrifuge: Eppendorf Centrifuge 5415 R (*Eppendorf*), Heraeus Multifuge 3S-R (*Heraeus*); Sorvall RC-5B (*Sorvall*)
- vrtložna miješalica: Heidolph MR 3001 K (*Heidolph*)
- vodena kupelj (*Sutjeska*)
- pribor za filtriranje: PES i CA filtri za šprice veličine pora 0,22 μm i 0,45 μm (*Carl Roth*); nitrocelulozne membrane za filtriranje, veličine pora 0,45 μm - Whatman (*GE Healthcare*)
- poliviniliden difluorid (PVDF) membrane za prijenos proteina Western-hibridizacijskom metodom: Millipore Immobilon-P PVDF transfer Membranes, 0,45 μm (*Millipore*)

3.2. Bioinformatičke metode

3.2.1. Pretraživanje baza podataka

Za pronalazak sekvenci homolognih auksin-amidohidrolazi BrILL2 u drugim biljnim vrstama, pretražena je prvotno baza Ensembl Plants⁷⁶. Za pretragu su korišteni integrirani parametri, dok je sužavanje pretrage postignuto unosom naziva „ILR1“ kao okosnice pretrage te imena roda i vrste od interesa. Baze NCBI GenBank⁸⁰ i UniProtKB⁸¹ korištene su za pronalazak UniProt i GenBank brojeva već opisanih auksin-amidohidrolaza. Za pronalaženje homologa BrILL2 korištena je sekvenca BrILL2 (GenBank⁸⁰: ABB60092.1) i algoritam PSI-BLAST bez promjene osnovnih parametara. Bakterijske hidrolaze preuzete su iz radova⁸²⁻⁸⁴ dok su strukturni homolozi s najvišim VAST brojem (engl. *VAST score*) preuzeti s VAST servera^{85,86} unosom oznake za kristalnu strukturu hidrolaze AtILL2 iz baze Protein Data Bank

(<https://www.rcsb.org/pdb/>)⁸⁷ (pdb: 1XMB¹³). Postotak homologije (sličnosti, odnosno identičnosti) između sravnjenih sekvenci izračunat je u programu MatGAT⁸⁸.

3.2.2. Model BrILL2

Trodimenzijski model strukture BrILL2 napravljen je koristeći on-line dostupan alat Phyre² (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>)⁸⁹, na osnovu homolognog modeliranja sa strukturno sličnim proteinima. Korišten je intenzivan način pretraživanja⁹⁰, polazeći od postavke da protein ima dvije domene, prema dostupnoj kristalnoj strukturi homologa iz *A. thaliana* AtILL2 (pdb: 1XMB^{13,24}). Za modeliranje u alat Phyre² unesena je primarna sekvenca proteina BrILL2 prema radu Schüller i Ludwig-Müller¹² (GenBank: ABB60092.1⁸¹). Vizualizacija modela BrILL2 načinjena je u programu PyMOL (<http://www.pymol.org>). Konzerviranost domena proteina BrILL2 u odnosu na ostale proteine iz porodice M20D provjerena je pretraživanjem *Conserved Domain Database* (CCD)⁹¹ unosom gore navedene primarne sekvence proteina BrILL2. Odvedenija modeliranja izvele su dr. sc. Marina Grabar-Branilović te prof. dr. sc. Sanja Tomić s Instituta Ruđer Bošković^{8,92}.

3.2.3. Filogenetska analiza

Za filogenetsku analizu biljnih auksin-amidohidrolaza te srodnih bakterijskih homologa, pripadnika porodice M20 proteina sa zabilježenom aktivnošću prema IAA-Asp i IAA-Ala, primarni slijedovi proteina preuzeti su iz UniProt baze⁸⁰. Sekvence su sravnjene u programu Jalview2.10.5⁹³ uz pomoć MUSCLE⁹⁴ sravnjivanja. Filogenetsko stablo napravljeno je u programu Jalview metodom spajanja susjeda (engl. *neighbor-joining*) ili prosječne udaljenosti (engl. *average distance*) na regijama iz MuscleWS sravnjivanja koristeći BLOSUM62 parametre, ili u programu MEGA7⁹⁵ upotrebom metode spajanja susjeda ili najveće parsimonije (engl. *maximum parsimony*). Za filogeniju auksin-amidohidrolaza korišteno je 20 sekvenci odabranih iz biljaka te 4 sekvence iz bakterija. Vizualizacija filogenetskog stabla napravljena je pomoću programa FigTree v1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

3.2.4. Analiza javno dostupnih podataka transkriptomike i bioloških čipova za gen BrILL2 i druge gene uključene u auksinsku homeostazu

Javno dostupni podaci dobiveni s bioloških čipova (engl. *microarray*) i transkriptomike (RNA-seq) ujedinjene u bazi *Arabidopsis eFP Browser* (<http://bar.utoronto.ca/>)^{96,97} korišteni

su za pretraživanje ispoljavanja i promjena u ekspresiji gena za auksin-amidohidrolaze u različitim uvjetima. Ekspresija gena izražena je u bazi eFP Browser⁹⁸ kao omjer ekspresije u tretiranim biljkama u usporedbi s kontrolom ili kao vrijednost $\log_2$ toga omjera. Korišteni su podaci AtGenExpress inicijative iz tretmana hormonima (AtGenExpress *Hormone series*)⁹⁹ i iz tretmana abiotiskim stresorima (AtGenExpress *Stress series*)¹⁰⁰. Popis gena dobiven je pretraživanjem literature^{1,22-26} te uključivanjem u pretragu većine gena uključenih u auksinsku homeostazu (poznatih gena čiji produkti sudjeluju u biosintezi, reverzibilnoj konjugaciji, transportu i signalnim putevima). Omjeri ekspresije gena u tretmanu u odnosu na kontrolu, izraženi kao $\log_2$ vrijednosti, uneseni su u online alat Morpheus¹⁰¹ za izradu toplinske karte ekspresije. Svrstavanje gena prema sličnom obrascu ekspresije u grupe (engl. *cluster*), učinjeno je u alatu Morpheus upotrebom integrirane opcije hijerarhijsko grupiranje (engl. *hierarchical clustering*) uz metodu „euklidske udaljenosti“.

3.3. Biokemijske metode

3.3.1. Priprema elektrokompetentnih stanica

Priprema kompetentnih stanica za transformaciju tekla je kroz tri dana. Stanice *E. coli*, iz trajne kulture čuvane u glicerolu ($\varphi = 0,10$) na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, prvoga su dana nanese na krutu LB podlogu bez dodatka antibiotika za stanice DH10B, odnosno uz dodatak antibiotika kloramfenikola do konačne koncentracije $\gamma = 20\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ (LB/Chl) za stanice BL21-CodonPlus(DE3)RIL. Bakterije su uzgajane preko noći (12 - 16h) na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sljedećeg dana s krute LB ili LB/Chl podloge jedna je bakterijska kolonija prenesena u 5 mL tekuće LB podloge bez dodatka antibiotika. Bakterijska kultura u tekućoj LB podlozi zatim je uzgajana preko noći u termostatoranoj tresilici na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 250 okretaja u minuti (rpm) te je trećeg dana dodana u 200 mL tekuće LB podloge. Stanice su se pod istim uvjetima umnažale dok ne dosegnu optimalnu optičku gustoću pri valnoj duljini $\lambda = 600\text{ nm}$, OD_{600} između 0,4-0,6. Bakterijska kultura zatim je hlađena na ledu 20 minuta te su potom stanice oborene centrifugiranjem na $1000 \times g$, 15 min na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cijeli daljnji postupak obavljen je na ledu radi čuvanja osjetljivih stanica. Talog bakterija ispran je sterilnom hladnom redestiliranom vodom u četiri uzastopna koraka centrifugiranja po 15 min na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $1000 \times g$ te resuspendiranja, svaki puta u sve manjem volumenu vode, počevši od 200, 150, 100 do 50 mL vode. Bakterijski talog potom je ispran s 20 mL hladnog, sterilnog glicerola ($\varphi = 0,10$), te su stanice resuspendirane u 2 mL glicerola ($\varphi = 0,10$). Resuspendirane stanice razdijeljene su u alikvot

od 40 μL , brzo su zaleđene u tekućem dušiku ili na suhom ledu te su čuvane na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do upotrebe.

3.3.2. Transformacija bakterija elektroporacijom i izolacija plazmidne DNA

Radi umnažanja i čuvanja plazmidne DNA, plazmidni vektori uneseni su elektroporacijom u DH10B stanice. U alikvot od 40 μL elektrokompetentnih stanica dodan je na ledu 1 μL otopine plazmidne DNA te je otopina plazmida i stanica prenesena u ohlađene elektroporacijske kivete (*Gene Pulser®/MicroPulser™ Electroporation Cuvettes*, Biorad) s razmakom elektroda 0,2 cm. Elektroporacija je izvedena u uređaju za elektroporaciju Gene Pulser Xcell™ (Bio-Rad) pri naponu od 2500 V. Po završetku elektroporacije u kivetu je dodan 1 mL tekuće LB podloge bez antibiotika te je smjesa inkubirana 1 h u termostatiranoj tresilici na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 250 rpm. Zatim je 100-200 μL suspenzije bakterijskih stanica rašireno na LB krutu podlogu s dodatkom ampicilina do konačne koncentracije $\gamma = 0,1\text{ mg mL}^{-1}$ (LB/Amp) te su inkubirane preko noći na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Jedna bakterijska kolonija prenesena je s LB/Amp ploče u 5 mL tekuće LB podloge uz dodatak ampicilina do konačne koncentracije $\gamma = 0,1\text{ mg mL}^{-1}$ te je inkubirana preko noći na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 250 rpm. Iz prekonoćne bakterijske kulture u tekućoj LB/Amp podlozi napravljena je trajna kultura dodavanjem 300 μL sterilnog glicerola ($\varphi = 0,50$) na alikvot od 700 μL bakterijskih stanica te je pohranjena na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Iz ostatka bakterijske kulture izolirana je plazmidna DNA korištenjem kompleta za izolaciju plazmidne DNA (*GenElute™ Plasmid Miniprep Kit*) prema uputama proizvođača. Plazmidna DNA eluirana je s 50 μL sterilne redestilirane vode te pohranjena na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do upotrebe.

3.3.3. Ciljana mutageneza

Za provođenje specifične ciljane mutacije u kodirajućoj sekvenci enzima BrILL2 unutar plazmidnog vektora *pTrcHis2-TOPO-BrILL2* korišten je komplet za ciljanu mutagenezu (*QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit*) prema uputama proizvođača te set komplementarnih početnica. Uvođenje točkastih mutacija cisteina u serin na položajima 139 i 320 dalo je varijante BrILL2 označene Cys139Ser te Cys320Ser. Za uvođenje mutacije u oba cisteina u enzimu BrILL2 i dobivanje dvostruke mutante Cys139,320Ser, na varijanti Cys139Ser (tj. na plazmidu *pTrcHis2-TOPO-Cys139Ser*) provedena je dodatna mutageneza s početnicama za mutantu Cys320Ser. Napravljene su još jednostruke mutacije: mutacija aminokiseline fenilalanin na položaju 385 u leucin (mutanta Phe385Leu), mutacija

aminokiseline arginin na položaju 295 u alanin (mutanta Arg295Ala), te mutacija aminokiseline metionin na položaju 367 u alanin (mutanta Met367Ala). Početnice korištene za uvođenje točkastih mutacija u divlji tip enzima BrILL2 navedene su u tablici 1. Sve početnice sintetizirane su putem komercijalnog proizvođača (Macrogen Inc., Nizozemska).

Tablica 1. Nukleotidni slijedovi početnica za ciljanu mutagenezu te provjeru uspješnosti mutageneze. Izmjenjeni kodon je podebljan i potcrtan.

Naziv	Slijed početnice
Cys139Ser-F	5'-GGTAAAATGCACGCT <u>TCT</u> GGACACGACGG-3'
Cys139Ser-R	5'-CCGTCGTGTCC <u>AGA</u> AGCGTGCATTTTACC-3'
Cys320Ser-F	5'-GCAACAGTTCAGAGG <u>TCCA</u> ATGCATCCG-3'
Cys320Ser-R	5'-CGGATGCATT <u>GGA</u> CCTCTGAACTGTTGC-3'
Phe385Leu-F	5'-CCTGGCCATTTCGCT <u>CTG</u> CTTGAATGCAAGATG-3'
Phe385Leu-R	5'-CATCTTGCATTCCAAG <u>CAG</u> AGCGAAATGGCCAGG-3'
Arg295Ala-F	5'-CAATAGGAGGAAGTCTC <u>GCC</u> GCCTTCACCAGTTTTTC-3'
Arg295Ala-R	5'-GAAAAACTGGTGAAGGC <u>GGC</u> GAGAGTTCCTCCTATTG-3'
Met367Ala-F	5'-GGAAGCATCGCCTATT <u>GCA</u> GGAGGAGAAGACTTC-3'
Met367Ala-R	5'-GAAGTCTTCTCCTCCT <u>TGC</u> AATAGGCGATGCTTCC-3'
pTrc-F	5'-GAGGTATATATTAATGTATCG-3'
pTrc-R	5'-GATTTAATCTGTATCAGG-3'

Početnice su otopljene u sterilnoj mili Q vodi do konačne koncentracije $\gamma = 100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ i pohranjene na $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Reakcijska smjesa za lančanu reakciju polimeraze (engl. polymerase chain reaction, skraćeno PCR) pripremljena je prema tablici 2 te su uvjeti PCR-a izvedenog u uređaju Applied Biosystems, GeneAmp[®], PCR System 2700 dati u tablici 3.

Tablica 2. Sastav reakcijske smjese za provođenje ciljane mutageneze.

Komponente reakcijske smjese	Radna koncentracija	V/ μL
Plazmid pTrcHis2-TOPO-BrILL2	$5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$	2
Reakcijski pufer	$10\times$	5
Početnica F	$\gamma = 100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$	1,25
Početnica R	$\gamma = 100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$	1,25
Smjesa dNTP	10 mmol L^{-1}	1
PfuUltra [™] DNA polimeraza	$2,5 \text{ j } \mu\text{L}^{-1}$	1
QuikSolution [™] reagens		3
Sterilna ultračista voda		do $50 \mu\text{L}$

Tablica 3. Uvjeti PCR-a za izvođenje ciljane mutageneze.

Faza PCR-a	Broj ciklusa	$t / ^\circ\text{C}$	t / s
Početna denaturacija	1	95	60
Faza denaturacije, vezivanja početnica i elongacije	18	95	50
		60	50
		68	340 (60/ kb plazmida)
Finalna elongacija	1	68	420

Po završetku reakcije u PCR smjesu dodan je 1 μL otopine restrikcijskog enzima DpnI te je smjesa inkubirana na 37 $^\circ\text{C}$ 1 sat. DpnI endonukleaza, čija je ciljna sekvenca u DNA 5'-Gm⁶ATC-3', specifična je za metiliranu i djelomično metiliranu DNA. Budući da većina laboratorijskih sojeva *E. coli* ima metiliranu DNA, DpnI razgrađuje plazmidnu DNA porijeklom iz *E. coli*, dok u reakcijskoj smjesi ostaje nosintetizirana DNA s uvedenom mutacijom. Produkt reakcije PCR provjeren je elektroforezom u agaroznom gelu (1%) u TBE puferu (Tris $c = 0,089 \text{ mol L}^{-1}$, borna kiselina $c = 0,089 \text{ mol L}^{-1}$, EDTA $c = 2 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 8,0). Vizualizacija vrpce DNA učinjena je nakon bojanja agaroznog gela u vodenoj otopini etidijevog-bromida konačne koncentracije $\gamma = 0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ te kratkog ispiranja u redestiliranoj vodi, pomoću Syngene G:Box transiluminatora.

PCR smjesa tretirana s DpnI (2 μL) korištena je za transformaciju XL-10 Gold ultrakompetentnih stanica (20 μL) prema protokolu kompleta QuikChange[®] metodom toplinskog šoka. Nakon transformacije XL-10 Gold stanica metodom toplinskog šoka, postupilo se sa stanicama kao u poglavlju 3.3.2. nakon elektroporacije. Daljnji postupak izolacije plazmidne DNA s mutiranim sekvencama za BrILL2 isti je kao u poglavlju 3.3.2. Alikvot prekonoćne bakterijske kulture XL-Gold stanica s izmjenjenim plazmidima (*pTrcHis2-TOPO-Cys139Ser*, *pTrcHis2-TOPO-Cys320Ser*, *pTrcHis2-TOPO-Cys139/320Ser*, *pTrcHis2-TOPO-Phe385Leu*, *pTrcHis2-TOPO-Arg295Ala*, *pTrcHis2-TOPO-Met367Ala*) sačuvan je kao trajna kultura, u 300 μL stanica dodano je 700 μL glicerola ($\varphi = 0,50$) te je svaki alikvot pohranjen su na -80°C .

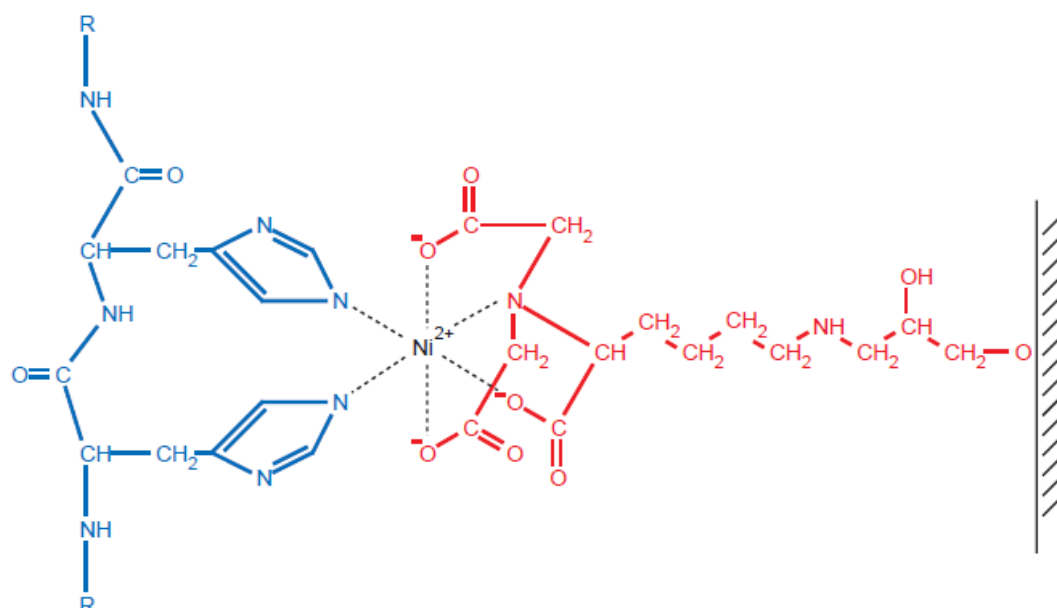
Uspješnost mutageneze provjerena je cijelom dužinom gena uslugom sekvenciranja plazmidne DNA (Standard-Seq, Macrogen) korištenjem pTrc-FW i pTrc-R početnica karakterističnih za plazmidne vektore izvedene iz plazmida pTrcHis2-TOPO (tablica 2) ili putem servisa za sekvenciranje Instituta Ruđer Bošković.

3.3.4. *Proizvodnja rekombinantnih proteina, divljeg tipa i mutanti BrILL2 heterolognom ekspresijom u E. coli*

Proizvodnja rekombinantnih proteina BrILL2 i mutanti provedena je trodnevnim postupkom. Prvi dan izvedena je transformacija prethodno pripremljenih kompetentnih stanica *E. coli*, soj BL21-CodonPlus(DE3)RIL s divljim tipom plazmida ili plazmidom koji je sadržavao mutaciju od interesa, elektroporacijom kao u poglavlju 3.3.2. Sljedeći dan nekoliko kolonija s krutih LB/Amp podloga inokulirano je u 10 mL tekuće LB/Amp podloge. Suspenzija bakterijskih stanica koje su se umnažale preko noći na 37 °C i 250 rpm, treći je dan dodana u 500 mL tekuće LB/Amp podloge. Bakterijama je rast praćen spektrofotometrijski mjerenjem optičke gustoće pri valnoj duljini $\lambda = 600$ nm, sve dok OD₆₀₀ nije dosegla vrijednost apsorbancije od 0,6-0,8. Bakterijska suspenzija zatim je kratko ohlađena na 20 °C te joj je dodan IPTG, kao induktor T7 polimeraze, do konačne koncentracije $c = 0,5$ mmol L⁻¹. Proizvodnja rekombinantnog proteina u *E. coli* inducirana dodatkom IPTG-a odvijala se kroz daljna 3-4 sata, inkubiranjem bakterijske suspenzije na 20 °C i 130 rpm. Stanice su zatim oborene u talog centrifugiranjem 10 min na 5000 × *g* te je bakterijski talog pohranjen na -20 °C do upotrebe.

3.3.5. *Pročišćavanje rekombinantnih proteina, divljeg tipa i mutanti BrILL2, afinitetnom kromatografijom*

Budući da sadrže privjesak od šest histidinskih ostataka na svome C-kraju, rekombinantni proteini BrILL2 i mutante izolirane su i pročišćene afinitetnom kromatografijom na koloni Ni-NTA agaroze (Qiagen). Ni-NTA agarozu sadrži kation Ni²⁺ u kompleksu s nitrilotriocetnom kiselinom (NTA) vezanom na agarozu. Četiri od ukupno 6 veznih mjesta za ligande u koordinacijskoj sferi iona Ni²⁺ zauzeta su s NTA-om, dok su preostala dva koordinacijska mjesta slobodna za dušike imidazolnih prstena dvaju susjednih histidinskih ostataka (slika 15). Rekombinantni proteini s His- privjeskom mogu se vezati na kolonu te eluirati povećanjem koncentracije imidazola.



Slika 15. Prikaz interakcije susjednih ostataka u His-privjesku i Ni-NTA agaroznog nosača u afinitetnoj kromatografiji. Slika je preuzeta iz ref. 102.

Pročišćavanje proteina započeto je lizom bakterijskih stanica. Na 1 g bakterijskog taloga, dobivenog prema opisu u poglavlju 3.3.4., dodano je 10 mL pufera za lizu stanica sastava: NaH_2PO_4 ili Tris, $c = 50 \text{ mmol L}^{-1}$, NaCl $c = 300 \text{ mmol L}^{-1}$, imidazol $c = 10 \text{ mmol L}^{-1}$, PMSF $c = 1 \text{ mmol L}^{-1}$, lizozim $\gamma = 1 \text{ mg mL}^{-1}$, Triton-X 100 $\varphi = 0,001$, pH 8,0. Bakterijski talog je resuspendiran u puferu za lizu stanica i ostavljen na ledu 30 minuta uz povremeno okretanje. Potom su izvršena 3 ciklusa smrzavanja suspenzije bakterijskog taloga u tekućem dušiku te odmrzavanja na približno 30°C . Otopini je zatim dodano 4-6 μL radne otopine DNaze I ($\gamma = 5 \text{ mg mL}^{-1}$, NaCl $c = 0,15 \text{ mol L}^{-1}$) te je inkubirana 20 minuta na rotacijskoj platformi na sobnoj temperaturi i na 45 rpm. Otopina je zatim centrifugirana 30 minuta na $14500 \times g$ pri 4°C . Talog je resuspendiran u 20 mL redestilirane vode za provjeru nastanka inkluzijskih tijela, dok je nadtalog, odnosno stanični lizat nakon centrifugiranja profiltriran kroz CA filter (veličine pora $0,45 \mu\text{m}$) i sačuvan na 4°C do nanošenja na kolonu Ni-NTA.

Kolona je priređena od 500 μL do 1 mL suspenzije Ni-NTA agaroze punjenjem staklenog stupca promjera 8 mm. Volumen upotrebene suspenzije prilagođen je s obzirom na volumen bakterijskog lizata i očekivani prinos proteina. Kapacitet vezanja proteina na Ni-NTA agarozu iznosi 5-10 mg proteina na 1 mL suspenzije Ni-NTA. Prije nanošenja staničnog lizata, kolona je isprana redestiliranom vodom i uravnotežena s tri volumena pufera za lizu stanica. Nakon propuštanja staničnog lizata kroz kolonu, ista je isprana s 10 volumena stupca s puferom za ispiranje Ni-NTA agaroze sastava: NaH_2PO_4 ili Tris, $c = 50 \text{ mmol L}^{-1}$, NaCl $c = 300 \text{ mmol}$

L^{-1} , imidazol $c = 20 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 8,0. Proteini su eluirani s kolone puferom za eluciju proteina sastava: NaH_2PO_4 ili Tris, $c = 50 \text{ mmol L}^{-1}$, NaCl $c = 300 \text{ mmol L}^{-1}$, imidazol $c = 250 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 8,0. Alikvoti po $20 \mu\text{L}$ uzeti su pri svakom koraku izolacije i pročišćavanja proteina te su analizirani elektroforezom u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima, kako je opisano u poglavlju 3.3.7. Frakcije elucija s najvećom zastupljenošću i čistoćom proteina spojene su u jednu otopinu proteina kojoj je određena koncentracija metodom po Bradfordu¹⁰³ (poglavlje 3.3.6.). Takva otopina dijalizirana je preko noći kako bi se odstranio imidazol iz otopine, na 4°C u tubicama za dijalizu (*Tube-O-Dyalizer*, *MWCO 8 kDa MED*, *G-Biosciences*) u puferu sastava: Tris $c = 50 \text{ mmol L}^{-1}$, NaCl $c = 300 \text{ mmol L}^{-1}$, uz lagano miješanje na magnetskoj mješalici. Izmjene pufera provedene su tri puta, u volumenu pufera 200 puta većem od volumena uzorka proteina, 1 i 3 sata nakon početka dijalize te je jedna izmjena pufera provedena nakon prekonoćne dijalize. Ovisno o metodi kojom se dalje analizirao protein, uzorci su po potrebi dodatno dijalizirani (opisano u poglavljima 3.4.1., 3.4.2. te 3.5.4.). Dijaliziranim uzorcima proteina izmjerena je koncentracija metodom po Bradfordu¹⁰³ te su čuvani na 4°C do daljnje upotrebe.

3.3.6. Mjerenje koncentracije proteina

Koncentracija proteina određena je spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije otopine proteina pri valnoj duljini $\lambda = 595 \text{ nm}$, metodom po Bradfordu¹⁰³. Koncentracija proteina proporcionalna je intenzitetu plavog obojenja nastalog pri reakciji proteina u uzorku s Bradfordovim reagensom sastava: Coomassie Brilliant Blue G-250 ($\gamma = 0,1 \text{ g L}^{-1}$), etanol $\varphi = 0,047$, H_3PO_4 $\varphi = 0,085$. Otopine proteina nanosene su u mikrotitarske pločice, nanošenjem otopine proteina do konačnog volumena $10 \mu\text{L}$ te $200 \mu\text{L}$ Bradford reagensa. Inkubacija uzorka s reagensom trajala je 10 minuta, nakon čega su uzorcima izmjerene koncentracije u spektrofotometrijskom čitaču pločica *Microplate Reader* (*Labsystems Multiskan MS*). Kao slijepa proba, čija će apsorbancija biti oduzeta od apsorbancije uzorka, uzet je pufer u kojem je provedena dijaliza proteina. Mjerenje je provedeno u triplikatu. Koncentracija proteina izračunata je pomoću prethodno kreirane baždarne krivulje pri čemu je korišten goveđi serumski albumin poznatih koncentracija (raspona koncentracija od $\gamma = 0,02\text{--}0,5 \text{ mg mL}^{-1}$).

3.3.7. Elektroforeza proteina u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima

Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (PAGE) u denaturirajućim uvjetima korištena je za provjeru čistoće uzoraka proteina tijekom pročišćavanja te za provjeru homogenosti eluiranih proteina nakon afinitetne kromatografije. Učinak modifikacije proteina djelovanjem oksidacijskih, redukcijskih ili alkilirajućih agenasa također je evaluiran ovom metodom.

Elektroforetsko razdvajanje proteina izvedeno je pripremom diskontinuiranog puferskog sistema po Laemmliju¹⁰⁴ u vertikalnom sustavu za elektroforezu Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Biorad). Uzorcima proteina pripremljenim u poglavlju 3.3.5. dodan je pufer za denaturaciju uzoraka sastava: Tris/HCl $c = 62 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 6,8; SDS $\gamma = 20 \text{ g L}^{-1}$; glicerol $\varphi = 0,10$; β -merkaptetoanol $\varphi = 0,05$; bromfenol modriilo $\gamma = 0,5 \text{ g L}^{-1}$, u omjeru 1:1. Za Western-hibridizacijsku analizu uzorci proteina svedeni su na jednaku koncentraciju od $\gamma = 0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ dodatkom odgovarajućeg volumena pufera za dijalizu (poglavlje 3.3.5.) te im je zatim dodat pufer za denaturaciju u omjeru 1:1. Uzorci su denaturirani zagrijavanjem u termobloku 5 minuta na 95°C .

Denaturirani proteini razdvojeni su elektroforezom u SDS-poliakrilamidnim 12% T (2,67% C) gelovima debljine 0,75 mm. Smjesa za izradu 12%-tnog poliakrilamidnog gela za razdvajanje pripremljena je pipetiranjem 3,35 mL redestilirane vode, 2,5 mL otopine Tris ($c = 1,5 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8,8), 4,0 mL otopine akrilamid/ bisakrilamid (AA/Bis) u omjeru 29:1 ($\varphi = 0,30$), 100 μL SDS-a ($\gamma = 100 \text{ g L}^{-1}$), 50 μL APS-a ($\gamma = 100 \text{ g L}^{-1}$), te 5 μL TEMED-a, dajući konačni udio AA/Bis $\varphi = 0,12$. Smjesa je izlivena između dviju staklenih pločica, nadslojena redestiliranom vodom te ostavljena da polimerizira 45 minuta. Nakon polimeriziranja gela za razdvajanje, nadslojena voda je izlivena te je iznad gela za razdvajanje izlivena smjesa za gel za sabijanje, s konačnim udjelom φ (AA/Bis) = 0,04, izrađena pipetiranjem 3,05 mL redestilirane vode, 1,25 mL otopine Tris ($c = 0,5 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,8), 660 μL otopine akrilamid/ bisakrilamid u omjeru 29:1 ($\varphi = 0,30$), 50 μL SDS-a ($\gamma = 100 \text{ g L}^{-1}$), 50 μL APS-a ($\gamma = 100 \text{ g L}^{-1}$), te 5 μL TEMED-a. Između stakalaca je u smjesu za gel za sabijanje postavljen češalj te se gornji gel polimerizirao dodatnih 30 minuta.

Razdvajanje denaturiranih proteina za daljnju Western-hibridizacijsku analizu provedeno je u gelovima s linearnim koncentracijskim gradijentom poliakrilamida (4 – 20% T, 2,67% C) prema Bollagu i Edelsteinu¹⁰⁵. Gelovi su bili kontinuirani s obzirom na pH (pH 8,8) te je u gušćem 20%-tnom gelu (φ (AA/Bis) = 0,20) otopljena saharoza ($\gamma = 140 \text{ g L}^{-1}$). Otopine monomera izlivena su iz posebne komorice spojenih posuda, a koncentracijski gradijent se

formirao između staklenih ploča pri direktnom miješanju jednakih volumena rijetke i guste otopine pomoću peristaltičke pumpe. Rjeđi 4%-tni gel (φ (AA/Bis) = 0,04) je bio stoga pri vrhu, na mjestu nanošenja uzoraka proteina.

Nakon nanošenja denaturiranih uzoraka u jažice gela, elektroforeza je provedena u puferu za elektroforezu proteina sastava: Tris/HCl $c = 25 \text{ mmol L}^{-1}$, glicin $\gamma = 14,4 \text{ g L}^{-1}$ i SDS $\gamma = 1 \text{ g L}^{-1}$, pH 8,3, pri 180 V, 45 minuta. Nakon elektroforeze proteinske vrpce vizualizirane su inkubacijom gela uz lagano ljuljanje 15 minuta u otopini sastava: boja Coomassie Brilliant Blue R-250 ($\gamma = 1 \text{ g L}^{-1}$), metanol ($\varphi = 0,40$) i octena kiselina ($\varphi = 0,10$). Višak boje uklonjen je u otopini sastava: metanol ($\varphi = 0,20$) i octena kiselina ($\varphi = 0,10$) uz lagano ljuljanje ili uranjanjem u kipuću redestiliranu vodu. Gelovi su skenirani te prema potrebi tretirani otopinom za konzerviranje gelova sastava: metanol ($\varphi = 0,40$) i glicerol ($\varphi = 0,10$), i posušeni na zraku između listova celofana (Biorad).

3.3.8. Western-hibridizacijska analiza

U svrhu detekcije proteina osjetljivijom metodom, upotrebljena je Western-hibridizacijska metoda. Proteini su s gela preneseni su na PVDF membranu mokrim prijenosom po završetku SDS-PAG elektroforeze. PVDF membrana (Millipore) izrezana je prema veličini gela, inkubirana 5 minuta u 100%-tnom metanolu uz lagano ljuljanje te je zatim isprana kratko u ultračistoj vodi. Potom su gel s razdvojenim uzorcima proteina (12% gel u slučaju razdvajanja proteina u diskontinuiranom sustavom po Laemmliju ili 4-20% gradijent gel sastava opisanog u poglavlju 3.3.7.), te PVDF membrana ekvilibrirani u puferu za prijenos proteina sastava: Tris baza $c = 25 \text{ mmol L}^{-1}$, glicin $c = 192 \text{ mmol L}^{-1}$, SDS $\gamma = 1 \text{ g L}^{-1}$, metanol $\varphi = 0,2$. U puferu je složena kazeta za prijenos u koju se redom od njezine tamne stranice stavljaju spužvica, filter papir, gel, PVDF membrana, filter papir te spužvica. Zatim je kazeta stavljena u nosač za prijenos proteina u sklopu sustava Mini Protean II Electrophoresis Cell (Bio-Rad) te je cijeli nosač uronjen u pufer za prijenos. Prijenos proteina se odvijao 1 sat pri stalnom naponu od 80 V, uz hlađenje ledom i lagano miješanje da bi se osigurala jednolika distribucija iona i spriječilo pregrijavanje pufera.

Po završetku prijenosa, gel je obojen bojom *Coomassie Brilliant Blue* R-250 kako je opisano u prethodnom poglavlju (3.3.7.) radi provjere uspješnosti prijenosa, a membrana je provedena kroz protokol za blokiranje i vezanje protutijela. Membrana je inkubirana na sobnoj temperaturi uz lagano ljuljanje 15 minuta u puferu sastava: Tris-HCl (pH 7,5) $c = 20$

mmol L⁻¹, NaCl $c = 150$ mmol L⁻¹, Tween 20 $\varphi = 0,001$ (skraćeno, pufer TTBS). Svi daljnji koraci ispiranja provedeni su s prethodno opisanim puferom. Blokiranje membrane, radi sprječavanja nespecifičnog vezanja, provelo se s 0,5 mL pufera za blokiranje po cm² membrane. Pufer za blokiranje bio je sastava: pufer TTBS te nemasno mlijeko u prahu $\gamma = 50$ g L⁻¹. Nakon 1 sat blokiranja uz lagano ljuljanje, membrana je isprana tri puta po 5 minuta u puferu TTBS.

Zatim je provedena inkubacija membrane s primarnim protutijelom (anti-His₆ mišje monoklonsko protutijelo, *Roche*) u svježe pripremljenom puferu za blokiranje (0,25 mL cm⁻² membrane). Primarno protutijelo je razrijeđeno u 13,5 mL pufera za blokiranje 2000 puta te je membrana inkubirana preko noći na 4 °C uz lagano ljuljanje.

Nakon inkubacije u primarnom protutijelu membrana je isprana 3 puta po 5 min u puferu TTBS te je zatim inkubirana u otopini sekundarnog protutijela. Otopina sekundarnog protutijela bila je sastava: pufer TTBS, mlijeko u prahu $\gamma = 50$ g L⁻¹, anti-mišje poliklonalno IgG protutijelo konjugirano s peroksidazom iz hrena (*Sigma Aldrich*). Sekundarno protutijelo je u inkubacijskom puferu razrijeđeno 10000 puta te je membrana inkubirana 2 h na sobnoj temperaturi uz lagano ljuljanje. U Petrijevu zdjelicu dodano je zatim 13,2 mL svježe pripremljenog pufera za blokiranje i otapanje proteina (sastav: pufer TTBS s mlijekom u prahu koncentracije $\gamma = 20$ ili 50 g L⁻¹) i sekundarno protutijelo u omjeru 1:10000. Membrane su inkubirane približno 2 h na sobnoj temperaturi uz lagano potresanje te nakon inkubacije isprane 3 puta po 5 min s puferom TTBS. Nakon zadnjeg ispiranja s membrane je uklonjen višak pufera TTBS te je po njoj ravnomjerno raspodijeljeno 1 mL otopine za detekciju kemiluminiscencije prethodno pripremljene miješanjem 500 μ L otopina 1 i 2 iz komercijalnog kompleta (Amersham ECL Prime Western Blotting System, *GE Healthcare*) prema uputama proizvođača. Nakon 1 min membrana je prenesena u uređaj *UVItec Cambridge Alliance 4.7*. Vrijeme ekspozicije podešeno je ovisno o jačini kemiluminiscentnog signala. Detekcijom signala kemiluminiscencije predvidivo su detektirani proteini koji su sadržavali His privjesak.

3.3.9. Cirkularni dikroizam

Cirkularni dikroizam (CD) korišten je za provjeru pertubacija u sekundarnoj strukturi proteina nastalih uvođenjem mutacije od interesa. CD spektri (divljeg tipa BrILL2 i mutanti) snimljeni su u UV području (raspon valnih duljina od 190 – 260 nm) na spektropolarimetru JASCO J-

715 pri 20 °C. Uzorci proteina dijalizirani su u fosfatnom puferu (NaH_2PO_4 $c = 50 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 8,0), svedeni na koncentraciju $\gamma = 0,3 \text{ mg mL}^{-1}$ te nanjeni u kvarcnu kivetu optičkog puta 0,1 mm. Parametri snimanja su bili: razlučivanje 0,2 nm, širina puta zrake 2,0 nm, vrijeme mjerenja u jednoj točki 1 s, brzina snimanja 50 nm min^{-1} . Konačan spektar bio je rezultat usrednjavanja 3 spektra. Analiza sekundarne strukture proteina iz CD spektara provedena je upotrebom CDSSTR programa na DICHROWEB serveru (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>)¹⁰⁶.

3.4. Biofizičke metode

3.4.1. Izotermalna titracijska kalorimetrija (ITC)

Za proučavanje vezanja metalnih iona Mn^{2+} na enzim BrILL2 i mutantu Cys139Ser korištena je metoda izotermalne titracijske kalorimetrije (ITC) koju je izveo doc. dr. sc. Filip Šupljika na Institutu Ruđer Bošković na mikrokolorimetru MicroCal VP-ITC (*MicroCal, Inc.*). U tu svrhu eluat proteina pripremljen afinitetnom kromatografijom kako je opisano u poglavlju 3.3.5., dodatno je dijaliziran 3 h u puferu za dijalizu sastava: EDTA $c = 10 \text{ mmol L}^{-1}$, Tris-HCl $c = 50 \text{ mmol L}^{-1}$, NaCl $c = 100 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 8,0; radi uklanjanja endogenih metalnih iona. Višak EDTA je uklonjen dijalizom otopine enzima u puferu sastava: Tris-HCl $c = 50 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 8,0 kroz tri izmjene kako je opisano u poglavlju 3.3.5. te je zatim dijaliza provedena kroz tri izmjene u konačan pufer sastava: natrijev kakodilat $c = 50 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 7,4. Sve otopine su odzračene pod vakuumom 10 min pri tlaku $p = 0,64 \text{ bar}$ prije početka eksperimenata. Za titraciju enzima BrILL2 metalom, otopina manganovog klorida ($c = 2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) titrirana je u alikvotima (1 alikvot od 2 μL i 28 alikvota od 10 μL) u otopinu enzima BrILL2 ili mutante koncentracije $c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Volumen otopine enzima unesen u izotermalnu ćeliju, održavanu na temperaturi 25 °C, bio je $V = 1,4406 \text{ mL}$. Titracija je provedena s razmakom od 240 - 300 sekundi između dodavanja alikvota otopine metalnih iona. Početna odgoda prvog alikvota bila je 600 sekundi.

Iz mikrokolorimetrijskog eksperimenta direktno su dobivena tri parametra: konstanta vezanja K_a , reakcijska entalpija $\Delta_r H$ te stehiometrijski omjer N . Reakcijska Gibbsova energija izračunata je prema formuli: $\Delta_r G = -R \times T \times \ln K_a$, gdje je opća plinska konstanta $R = 8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, dok je reakcijska entropija $\Delta_r S$ izračunata prema formuli: $\Delta_r S = (\Delta_r H - \Delta_r G) / T$. Za analizu eksperimentalnih podataka korišten je softver Origin 7.0.

3.4.2. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC)

Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC) korištena je za utvrđivanje temperaturne stabilnosti enzima BrILL2 divljeg tipa i mutanti na uređaju Nano DSC (*TA Instruments*) te su je izveli doc. dr. sc. Filip Šupljika i dr. sc. Marija Matković na Institutu Ruđer Bošković. DSC mjeri promjenu toplinskog kapaciteta otopine (C_p) u ovisnosti o temperaturi, odnosno prati razlike toplinskog kapaciteta ($\Delta_r C_p$) prilikom promjena termodinamičkog stanja proteina, npr. nastalih razmatanjem proteina¹⁰⁷. Promjene toplinskog kapaciteta proizlaze iz činjenice da je potrebno dovesti veću toplinu za povišenje temperature otopine razmotanih proteina, u odnosu na toplinu potrebnu za povišenje temperature otopine pravilno smotanih proteina. Mjerenjem DSC termograma posredno se mjeri temperatura mekšanja, T_m , kao mjera temperaturne stabilnosti proteina, dok se direktno iz dobivene krivulje ovisnosti C_p o temperaturi dobiva $\Delta_r C_p$ kao pomak u baznoj liniji te entalpija prijelaza ($\Delta_r H$) integracijom iste krivulje¹⁰⁷. Entalpija prijelaza $\Delta_r H$ korelira sa sadržajem uređenih sekundarnih struktura u proteinu¹⁰⁸.

DSC termogrami enzima su snimljeni u puferu natrijevom kakodilatu ($c = 50 \text{ mmol L}^{-1}$ pH 8,0) od 10°C do 100°C uz zagrijavanje brzinom 1°C min^{-1} do 2°C min^{-1} pri tlaku $p = 3 \text{ atm}$. Korištene su otopine proteina pripremljene kao i za ITC mjerenja, kako je opisano u prethodnome poglavlju. Termogrami razmatanja proteina dobiveni su normalizacijom i analizom, nakon oduzimanja termograma dobivenog snimanjem bazne linije (zagrijavanjem sustava s dvjema ćelijama ispunjenim samo puferom). DSC je također korišten i za utvrđivanje stabilnosti proteina u reducirajućim, odnosno nereducirajućim uvjetima, za što su rabljene otopine proteina koncentracija od $0,2 - 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$. Temperaturna stabilnost monomernih formi proteina utvrđena je uz dodatak β -merkaptetanola koncentracije $c = 5 \text{ mmol L}^{-1}$. Za ispitivanje temperaturne stabilnosti proteina prilikom vezanja metala, korištene su otopine proteina BrILL2 divljeg tipa (BrILL2wt) koncentracija $0,25 - 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$, otopine kompleksa BrILL2wt i mangana dobivene nakon titracije metalom u ITC-u koncentracija $0,2 - 0,4 \text{ mg mL}^{-1}$, otopina mutante Cys139Ser koncentracije $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ te otopine kompleksa Cys139Ser i mangana dobivene nakon titracije metalom u ITC-u koncentracija $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$. Za snimanja termograma ostalih mutanti korišteno je po $700 \mu\text{L}$ otopina proteina koncentracija $0,3 - 0,4 \text{ mg mL}^{-1}$.

3.5. Analitičke metode

3.5.1. Enzimske reakcije i mjerenje specifične aktivnosti

Za određivanje specifične aktivnosti proteina provedene su enzimske reakcije s divljim tipom enzima i mutantama. Reakcijska smjesa bila je sastava: Tris $c = 100 \text{ mmol L}^{-1}$ pH 8,0, MnCl_2 $c = 0,2 \text{ mmol L}^{-1}$, DTT $c = 1 \text{ mmol L}^{-1}$, supstrat $c = 0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, te $1 \text{ }\mu\text{g}$ pročišćenog proteina. Kontrolne reakcije su umjesto proteina sadržavale jednaki volumen pufera za dijalizu ili protein denaturiran visokom temperaturom ($100 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 min). Enzimatske reakcije provedene su u vodenoj kupelji na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ u vremenu od 2 min. Kao supstrat korišten je prema radu Savić i sur. preferirani supstrat IPA-Ala⁸, a reakcija je trajala 2 minute. Za određivanje oksidacijskog stanja SH grupa aminokiseline Cys potrebnog za aktivnost enzima, enzimatske reakcije su modificirane tako da u reakcijskoj smjesi nije bio prisutan DTT. Za određivanje učinka oksidacijsko-redukcijskog stanja enzima na njegovu aktivnost, enzimske reakcije provedene su uz dodatak redukcijskih agenasa β -merkaptotetanola, reduciranog glutationa, cisteina, i askorbinske kiseline ($c = 1$ ili 10 mmol L^{-1}). Ispitivanje učinka modifikacije cisteina alkiliranjem na aktivnost enzima, provedeno je predinkubacijom enzima s jodovim acetamidom ($c = 0,05 \text{ mmol L}^{-1}$) na sobnoj temperaturi 2 h prema Lundbladu¹⁰⁹ prije provođenja enzimske reakcije, te je zatim tretirani enzim korišten za standardne enzimatske reakcije sa i bez prisustva DTT-a. Kod ispitivanja aktivnosti mutante F385L u enzimskoj reakciji korišteno je $2 \text{ }\mu\text{g}$ proteina za reakcije s IPA-Ala, $5 \text{ }\mu\text{g}$ proteina za reakcije s IBA-Ala te $10 \text{ }\mu\text{g}$ proteina za reakcije s IAA-Ala. Za mjerenje enzimske kinetike divljeg tipa enzima i mutante Cys320Ser, u enzimskim reakcijama korišten je supstrat IPA-Ala u rasponu koncentracija od $c = 0,2 - 2 \text{ mmol L}^{-1}$, te u vremenskom rasponu od 2 do 10 min.

Enzimske reakcije prekinute su dodatkom kloridne kiseline ($c = 1 \text{ mol L}^{-1}$) uz podešavanje pH vrijednosti reakcije do pH 2,0 te dodatkom $200 \text{ }\mu\text{L}$ etil-acetata. Zatim su smjese enzimske reakcije i etil-acetata dobro promiješane te kratko centrifugirane na $500 \times g$ radi učinkovitijeg odvajanja organske i vodene faze te smrznute u tekućem dušiku. Organska faza zatim je odijeljena i uparena u struji dušika, a talog organske faze ispran je sa $100 \text{ }\mu\text{L}$ heksana te ponovno uparen u struji dušika. Postupak ispiranja taloga organske faze heksanom ponovljen je dva puta. Talog je konačno otopljen u $60 \text{ }\mu\text{L}$ redestiliranog metanola ($\varphi = 1,0$) te profiltriran kroz filter Millex-LH (PTFE, Hydrophilic, Millipore) veličine pora $0,45 \text{ }\mu\text{m}$. Uzorci su do kromatografske analize pohranjeni na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Sva korištena otapala bila su redestilirana ili komercijalna otapala visoke čistoće.

3.5.2. Analiza produkata enzimske reakcije metodom HPLC

Produkti enzimske reakcije detektirani su tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti (HPLC) na instrumentu Knauer, uz korištenje programa Chromgate prema radu Savić i sur.⁸ Za razdvajanje produkata reakcije korištena je kolona Luna C18(2) (*Phenomenex*) (250 × 4,6 mm, veličine čestica 5 μm, veličine pora 100 Å) na HPLC instrumentu (*Knauer*) opremljenom uređajem za automatsko iniciranje uzoraka (*Autosampler Knauer*). Po 30 μL uzorka pripremljenog kao u prethodnome poglavlju (3.5.1.) injektirano je na kolonu održavanu na 21 °C pri protoku od 1 mL min⁻¹. Mobilna faza se sastojala od otopine A sastava: mravlja kiselina ($\varphi = 0,004$), metanol ($\varphi = 0,05$) te otopine B koju je činio redestilirani metanol ($\varphi = 1,0$). Razdvajanje analita izvršeno je uz gradijent kako slijedi: 0-1 min, 75:25 A:B; 1-11 min, do 50:50 A:B; 11-26 min, do 40:60 A:B; 26-36 min, do 0:100 A:B; 36-50 min, 0:100 A:B; 50-60 min 75:25 A:B. Produkti enzimskih reakcija eluirani su porastom koncentracije organske faze (otopina B) formiranjem gradijenta. Tijek pročišćavanja praćen je detektorom DAD K-2800 (*Knauer*) pri valnoj duljini 284 nm. Kromatogrami su analizirani integriranim programom ChromGate 2.8 (*Knauer*).

3.5.3. Određivanje specifične aktivnosti i kinetičkih parametara enzima

Postotak dobivenih produkata enzimskih reakcija određen je na osnovu integrirane površine pika analita u HPLC kromatogramu. Specifična aktivnost enzima izračunata je prema formuli:

$$S. A. = \frac{n(S) \times \%P}{m \times t}$$

gdje je S.A. specifična aktivnost enzima (μmol mg⁻¹ min⁻¹), t vrijeme reakcije (min), $n(S)$ početna količina supstrata u reakcijskoj smjesi (μmol), %P – udio dobivenog produkta pri vremenu reakcije t i m masa proteina u reakcijskoj smjesi (mg).

Kinetički parametri izračunati su nelinearnom regresijom Michaelis-Menten krivulja pomoću GraphPad programa, nakon izračuna početne brzine reakcije v_0 pri svakoj koncentraciji supstrata u reakcijskoj smjesi.

3.5.4. ICP-MS analiza omjera $N(\text{manganov ion}) : N(\text{protein})$

Za analizu omjera iona mangana (Mn²⁺) i proteina u otopinama dobivenim pročišćavanjem proteina nakon heterologne ekspresije, korištena je metoda masene spektrometrije s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS) u kojoj se induktivno spregnuta plazma koristi

kao ionizacijski izvor, a detekcija vrši masenim spektrometrom. Za ICP-MS analizu, protein divljeg tipa BrILL2 pripremljen je u tri forme: 1) forma holoenzima dobivena odmah nakon pročišćavanja na Ni-NTA koloni, dijalizom kako je opisano u poglavlju 3.3.5. u puferu sastava: Tris $c = 50 \text{ mmol L}^{-1}$ pH 8,0; 2) forma apoenzima dobivena nakon pročišćavanja na Ni-NTA koloni, dijalizom 3 sata u puferu sastava: Tris $c = 50 \text{ mmol L}^{-1}$ pH 8,0, EDTA $c = 10 \text{ mmol L}^{-1}$, NaCl $c = 100 \text{ mmol L}^{-1}$ te zatim dijaliziranjem kao u 1); te 3) forma holoenzima zasićena manganom priređena je kao u 2) uz dvije dodatne faze dijalize: dijalizom u konačnom puferu uz zasićenje s MnCl_2 $c = 1 \text{ mmol L}^{-1}$, nakon čega je višak manganovih iona uklonjen dodatnom dijalizom u konačnom puferu kao pod 1). Mjerenja je obavio dipl. ing. Niko Bačić servisno na Institutu Ruđer Bošković na instrumentu HR ICPMS Element 2 (*Thermo Finnigan*) opremljenom automatskim injektorom uzoraka ESI SC-2 DX FAST (*Elemental Scientific*) prema radu Fiket i suradnika¹¹⁰. Za utvrđivanje koncentracije manganovih iona izvršena je usporedba sa standardnom krivuljom dobivenom uz dodatak otopine standarda za elemente u tragovima (*Analitika*, Češka).

3.5.5. GC-MS identifikacija auksina

Identifikacija auksina provedena je metodom plinske kromatografije spregnute masenom spektrometrijom (GC-MS) na Tehničkom sveučilištu Dresden pod vodstvom prof. dr. sc. Jutte Ludwig-Müller. Liofilizirani biljni materijal (kojeg su činili klijanci *B. rapa* priređeni kako je opisano u poglavljima 3.6.3. i 3.6.4.) mase $m = 9 - 130 \text{ g}$ usitnjen je u tarioniku do finoga praha, dodano je 2 mL po g biljnog tkiva ekstrakcijskog pufera sastava: 2-propanol ($\varphi = 0,65$), imidazol $c = 200 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 7,0), ohlađenog na $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Zatim su homogenati inkubirani u ekstrakcijskom puferu 2 h na $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ uz miješanje te centrifugirani 10 min na $13000 \times g$. Supernatanti su upareni u rotacijskom evaporatoru do vodene faze te zatim centrifugirani 20 min na $15600 \times g$. Supernatantima je podešen pH do 7,0 te su ekstrahirane primjese proteina i pigmenata dodavanjem tri puta po 2 volumena etil-acetata ($\varphi = 1,0$) te odstranjivanjem organske faze. Zatim je otopini vodene faze podešen pH do 2,0 te su auksini ekstrahirani dodavanjem 3 puta po 2 volumena etil-acetata ($\varphi = 1,0$). Sve frakcije prikupljene u etil-acetatu, nakon podešavanja pH na 2,0 s kloridnom kiselinom, spojene su te uparene do suha u rotacijskom evaporatoru. Osušeni talozi resuspendirani su s 2 mL ekstrakcijskog pufera te razrijeđeni 10 puta s destiliranom vodom. Takvi ekstrakti dodatno su pročišćeni na

SPE (engl. *Solid Phase Extraction*) BAKERBOND spe™ Amino (NH₂) kolonama metodom obrnutih faza. Kolone su ekvilibrirane s po 2 mL heksana ($\varphi = 1,0$), acetonitrila ($\varphi = 1,0$), destilirane vode, imidazola ($c = 200 \text{ mmol L}^{-1}$ pH 7,0) te zatim s 10 mL destilirane vode. Zatim su ekstrakti nanieseni na kolone. Nevezani spojevi su isprani s kolone s po 2 mL heksana ($\varphi = 1,0$), 2 mL etil-acetata ($\varphi = 1,0$), 2 mL acetonitrila ($\varphi = 1,0$) te 2 mL metanola ($\varphi = 1,0$). Uzorci su eluirani s kolone u 6 mL otopine octene kiseline ($\varphi = 0,05$) u metanolu i upareni u rotacijskom evaporatoru. Osušeni talozi resuspendirani su dva puta u 300 μL metanola, upareni u struji dušika i dodatno ukoncentrirani otapanjem u 100 μL metanola.

Zatim su uzorci pripremljeni za GC-MS, uparavanjem u struji dušika, resuspendiranjem u 50 μL etil-acetata, te podvrgavanjem metilaciji auksina djelovanjem 950 μL diazometana. Nakon 15 minuta tretmana, uzorci su osušeni u struji dušika, resuspendirani u 50 μL etil-acetata te su injektirani na GC-MS. Na isti način metilirane su otopine standarda; neobilježene IAA, IBA i IPA priređene otapanjem 100 μg hormona u 50 μL etil-acetata te metiliranjem u diazometanu kako je prethodno opisano. GC-MS analiza provedena je na masenom spektrometru Varian Saturn 2100 ion-trap povezanom s kromatografom Varian CP-3900 opremljenim s automatskim injektorom CP-8400 (*Varian*), elektronskom ionizacijom (engl. *electron impact ionization*) pri 70 eV. Identifikacija je provedena usporedbom vremena zadržavanja auksina u kromatogramu uzorka s vremenom zadržavanja auksina u kromatogramu standardne otopine neobilježene IAA, IPA i IBA pripravljene u čistom otapalu. Za analizu, 1 μL metiliranog uzorka otopljenog u etil-acetatu injektirano je (engl. *splitless mode*) na ZB-5 kolonu (30 m $\times$ 0,25 mm $\times$ 0,25 μm , *Phenomenex*). Protok plina nosioca bio je 1 mL min⁻¹. Temperatura injektora bila je 250 °C, a temperaturni program 60 °C 1 min, do 180 °C s porastom od 25 °C min⁻¹, do 250 °C s porastom od 5 °C min⁻¹, do 280 °C s porastom od 25 °C min⁻¹, te 5 min izotermalno na 280 °C. Temperatura međuspoja plinskog kromatografa i spektrometra masa bila je 280 °C, te ionske stupice 200 °C. U primjenjenim uvjetima, vrijeme zadržavanja IAA bilo je 16,68 min, IPA 17,57 min, te IBA 18,63 min. Za veću osjetljivost korišten je μSIS način rada, praćenjem iona dobivenih ionizacijom metilnih estera auksina: kvinolinijevog iona pri vrijednosti m/z 130 te molekularnih iona pri vrijednosti m/z 189 (za metilni ester IAA), pri vrijednosti m/z 203 (metilni ester IPA) te pri vrijednosti m/z 217 (za metilni ester IBA).

3.5.6. UHPLC-MS/MS analiza auksinskog metaboloma

Analizu sadržaja auksina u biljnim uzorcima provela je dr. sc. Iva Pavlović u suradnji s dr. sc. Alešem Pěnčíkom u Laboratoriju za biljne regulatore rasta u Olomoucu, Češka. Analiza je provedena prema metodi Nováka i sur.¹⁴ u sustavu tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti spregnutom s tandemskom spektrometrijom masa s trostrukim kvadripolom (engl. *Ultra High Performance Liquid Chromatography, UHPLC-MS/MS*) koristeći interne standarde (IS) obilježene stabilnim izotopima kao referencama. Liofilizirani biljni materijal za analizu auksinskog metaboloma (klijanci *A. thaliana* priređeni kao u poglavlju 3.6.3. i 3.6.4.) usitnjen je u tarioniku do finog praha pomoću tekućeg dušika. Uzorci (2 mg dobivenog praha) homogenizirani su u kugličnom mlinu (5 min, 27 Hz, Retsch GmbH, Haan, Njemačka) uz dodatak tri keramičke kuglice (cirkonijev oksid, 2 mm) u 1 mL hladnog ekstrakcijskog pufera (natrijev fosfat $c = 50 \text{ mmol L}^{-1}$ pH 7,0, DEDTCA $\varphi = 0,001$) koji je sadržavao stabilne deuterirane ^2H - ili ^{13}C - obilježene interne standarde hormona: [$^{13}\text{C}_6$]-ANT, [$^{13}\text{C}_6$]-IAA, [$^{13}\text{C}_1$]-IBA, [$^{13}\text{C}_6$]-IAM, [$^2\text{H}_5$]-IAOx, [$^2\text{H}_4$]-IPyA, [$^{13}\text{C}_6$]-oxIAA, [$^{13}\text{C}_6$]-IAA_{sp}, [$^{13}\text{C}_6$]-IAGlu, [$^{13}\text{C}_6$]-IAA-glc, [$^{13}\text{C}_6$]-oxIAA-glc, [$^{13}\text{C}_6$]-IAA_{ala}, [$^{13}\text{C}_6$]-IAA-Leu (5 pmol po uzorku); [$^{13}\text{C}_6$]-IAN (10 pmol po uzorku) i [$^2\text{H}_5$]-TRP (50 pmol po uzorku). Pola volumena dobivenog ekstrakta zakiseljeno je do pH 2,7 s kloridnom kiselinom ($c = 1 \text{ mol L}^{-1}$). Druga polovica volumena ekstrakta (oko 0,5 mL) tretirana je cisteaminom ($c = 0,25 \text{ mol L}^{-1}$ pH 8,0 podešen s NH_3) da bi se labilan metabolit IPyA derivatizacijom preveo u stabilan tiazolinidinski derivat IPyA-TAZ te je zatim podešen pH do 2,7 uz dodatak kloridne kiseline ($c = 3 \text{ mol L}^{-1}$). Ekstrakti su pročišćeni na SPE (eng. *Solid Phase Extraction*) ili HLB kolonama metodom obrnutih faza (1 cc/30 mg Oasis[®], Waters, Milford, MA, SAD). Kolone su kondicionirane s po 1 mL metanola ($\varphi = 1,0$), 1 mL vode i 0,5 mL pufera natrijevog fosfata ($c = 50 \text{ mmol L}^{-1}$ pH 2,7). Nakon nanošenja uzorka na kolonu, nevezani spojevi uklonjeni su ispiranjem kolone s 2 mL metanola ($\varphi = 0,05$), a analiti su eluirani s 2 mL metanola ($\varphi = 0,8$). Eluati su upareni do suha u vakuum uparivaču i pohranjeni na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ do analiza. Analiza hormona započeta je otapanjem uzoraka eluata u 40 μL mobilne faze te njihovim injektiranjem na kolonu Kinetex (C18 100 Å; $2,1 \times 50 \text{ mm}$, $1,7 \text{ }\mu\text{m}$; Phenomenex) zagrijanu na $30 \text{ }^\circ\text{C}$ pri protoku $0,2 \text{ mL min}^{-1}$. Metaboliti (indolni prekursori biosinteze IAA, aktivan auksin IAA te IAA konjugati u uzorku) su analizirani na sustavu Acquity UPLC[®] System (Waters) spregnutim s masenim spektrometrom Xevo[™] TQ-S MS (Waters) uz optimizirane parametre (tablica 4) u programu MassLynx[™] (verzija 4.1, Waters) koristeći metodu razrijeđenja stabilnog izotopa¹¹¹ za

izračun koncentracija analita. Za svaki metabolit analizirane su četiri nezavisne replike uzoraka.

Baždarna krivulja za izračun koncentracija analita dobivena je mjerenjem ovisnosti odziva (os y - odgovara umnošku koncentracije IS i omjeru (površina ispod pika analita)/(površina ispod pika IS)) o koncentraciji analita (os x). Koncentracija analita auksinskog metaboloma izračunata je pomoću baždarnog pravca i poznate koncentracije IS u uzorku prema formulama:

$$\text{koncentracija analita (pmol)} = 10^{\frac{\log_{10}(y)-b}{a}}, \text{ gdje je } y = A_a \times \frac{IS_c}{IS_a}$$

pri čemu je A_a površina ispod pika analita; IS_c koncentracija IS u uzorku; IS_a površina ispod pika IS u uzorku; b odsječak na osi y baždarne krivulje; te a nagib pravca.

Tablica 4. Optimizirani UHPLC-MS/MS parametri prema Nováku i sur.¹⁴ za kvantifikaciju prekursora biosinteze IAA, IAA i konjugata: vrijeme zadržavanja (R_t), MRM prijelazi, kolizijska energija (CE), granične vrijednosti detekcije (LOD) i linearnosti u pozitivnom ESI načinu rada.

Analit	MRM prijelazi (m/z) Prekursor > Produkt	CE (V)	R_t (min)	LOD (fmol)	Linearnost (pmol)/ R^2
TRP	205,2 > 146,1	14	2,075 ± 0,050	5,0	0,025-500/0,9989
[² H ₅]-TRP	210,2 > 150,1				
oxIAA-Glc	192,2 > 146,1	14	3,400 ± 0,130	50	0,100-100/0,9991
[¹³ C ₆]-oxIAA-Glc	198,2 > 152,1				
IPyA-TAZ	263,1 > 132,1	11	3,606 ± 0,012	5,0	0,01-100/0,9988
[² H ₄]-IPyA-TAZ	267,1 > 136,1				
ANT	138,1 > 120,1	4	4,227 ± 0,047	2,5	0,005-500/0,9997
[¹³ C ₆]-ANT	144,1 > 126,1				
IAM	175,2 > 130,1	10	4,378 ± 0,043	5,0	0,01-500/0,9996
[¹³ C ₆]-IAM	181,2 > 136,1				
IAA-Glc	176,2 > 130,1	16	4,481 ± 0,027	50	0,100-100/0,9976
[¹³ C ₆]-IAA-Glc	182,2 > 136,1				
IAAsp	291,2 > 130,1	20	4,903 ± 0,028	2,5	0,005-500/0,9994
[¹³ C ₆]-IAAsp	297,2 > 136,1				
oxIAA	192,2 > 146,1	9	5,011 ± 0,023	1,0	0,005-500/0,9998
[¹³ C ₆]-oxIAA	198,2 > 152,1				
IAA-Glu	305,2 > 130,1	22	5,492 ± 0,025	2,5	0,005-500/0,9999
[¹³ C ₆]-IAA-Glu	311,2 > 136,1				

IAAla	247,2 > 130,1	20	6,411 ± 0,013	2,5	0,005-500/0,9997
[¹³ C ₆]-IAAla	253,2 > 136,1				
IAA	176,2 > 130,1	11	7,198 ± 0,014	5,0	0,01-500/0,9994
[¹³ C ₆]-IAA	182,2 > 136,1				
IAN	157,2 > 130,1	6	7,988 ± 0,014	5,0	0,025-500/0,9991
[¹³ C ₆]-IAN	163,2 > 136,1				
IPA	190,2 > 130,1	10	8,170	2,5	0,005-500/0,998
[2',2'- ² H ₂]-IPA	192,2 > 130,1				
IBA	204,2 > 186,2	8	10,531 ± 0,023	1,0	0,005-500/0,998
[¹³ C ₆]-IBA	213,2 > 195,2				
IAA-Leu	289,2 > 130,1	31	11,415 ± 0,032	2,5	0,005-500/0,9994
[¹³ C ₆]-IAA-Leu	295,2 > 136,1				

3.6. Metode rada s biljkama

3.6.1. Selekcija transgenih biljaka nadekspresora *BrILL2*

Selekcija transgenih biljaka nadekspresora *BrILL2* napravljena je u sklopu HRZZ projekta PhytoBraCro u suradnji s izv. prof. dr. sc. Natašom Bauer na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Biljke *Arabidopsis thaliana* ekotipa Wassilewskija (Ws) transformirane su sojem *A. tumefaciens* GV3101::pMP90 kojem je elektroporacijom unesen plazmid *pMDC32-BrILL2-His6*. Transformacija biljaka *A. thaliana* provedena je tehnikom floral dip¹¹². Nakon sabiranja sjemeni T0 generacije biljaka, sjemenke su sterilizirane i nasadene na krutu MS podlogu uz dodatak higromicina B koncentracije $\gamma = 50 \text{ mg L}^{-1}$. Klijanci koji su pokazivali normalan rast korijena i izduženi hipokotil otporni su na higromicin te su regenerirani kao primarni transformanti T1 generacije. Nakon presađivanja klijanaca T1 generacije u zemlju te samooprašivanja, sakupljeno je sjeme svake linije T2 generacije da bi se utvrdilo u kojim je linijama prisutna samo jedna T-DNA insercija. Sjemenke primarnih transformanata (T2 sjeme) sterilizirane su i ravnomjerno nasadene na hranjivu podlogu MS uz dodatak 50 mg L^{-1} higromicina B. Linije koje daju 25% klijanaca divljeg tipa (bez sposobnosti rasta na selektivnoj podlozi jer ne stvaraju korijen niti prave listove) određene su kao linije s jednom T-DNA insercijom. Po 6 klijanaca svake linije koja je sadržavala samo jednu T-DNA inserciju presađeno je u zemlju, te su od svake biljke nakon samooprašivanja skupljene sjemenke. Homozigotne biljke detektirane su na selekcijskoj

podlozi s higromicinom, a homozigotno sjeme za daljnja istraživanja prikupljeno od T3 i T4 generacije biljaka. Iz listića klijanaca T4 generacije izolirana je genomna DNA (gDNA) te je reakcijom PCR ispitano prisustvo transgena. Također, iz klijanaca T4 generacije izolirani su ukupni stanični proteini te je nadekpresija proteina s His-privjeskom pod kontrolom konstitutivnog promotora 35S iz virusa CaMV ispitana *Western*-hibridizacijskom analizom.

3.6.2. Sterilizacija sjemena

Prije nanošenja na hranjive podloge provedena je sterilizacija sjemena svih istraživanih linija *A. thaliana* te sjeme *B. rapa*. Sterilizacija sjemena provedena je radi sprečavanja zagađenja od potencijalno zaostalih mikroorganizama na površini sjemena. Sterilizacija sjemena i nanošenje na hranjive podloge provedeni su u laminaru. Sterilizirano je po 2 mg sjemena svake istraživane linije *A. thaliana*. Sjeme *A. thaliana* sterilizirano je na način da je uronjeno 1 min u otopinu etanola ($\varphi = 0,70$), zatim je tretirano 10 minuta pri 45 rpm otopinom izosana G koncentracije $\gamma = 10 \text{ g L}^{-1}$, te isprano pet puta u sterilnoj destiliranoj vodi.

Sjeme *B. rapa* sterilizirano je inkubacijom u otopini izosana G koncentracije $\gamma = 30 \text{ g L}^{-1}$, te ispiranjem pet puta u sterilnoj destiliranoj vodi. Sjeme *A. thaliana* te *B. rapa* zatim je korišteno za uzgoj biljnog materijala i tretman konjugatima auksina.

3.6.3. Uzgoj biljnog materijala

Za selekciju i provjeru homozigotnih linija sterilizirano sjeme *A. thaliana* nanoseno je na selekcijske hranjive podloge (MS uz dodatak higromicina B koncentracije $\gamma = 50 \text{ mg L}^{-1}$) te je radi ujednačavanja klijanja ostavljeno 48 h u mraku na 4 °C. Nakon toga su klijanci rasli u klimatiziranoj komori (16 h dan, 8 h noć), na 22 °C na pločama postavljenim u okomitom položaju. Za tretman auksinskim konjugatima klijanci su rasli na MS hranjivim podlogama bez dodatka antibiotika 3-4 dana u uvjetima dugog dana.

Sjeme reporterske linije *DR5rev::GFP* (N9361) nakon sterilizacije nasadeno je na selekcijsku MS podlogu uz dodatak $12,5 \text{ mg L}^{-1}$ sulfadiazina. Klijanci su sa selekcijskih ploča presađeni u zemlju i sakupljeno je sjeme za daljnja istraživanja. Za potrebe konfokalne mikroskopije, sjeme *DR5rev::GFP* linije je sterilizirano, nasadeno na MS hranjive podloge bez dodatka antibiotika te stratificirano 48 h u mraku na 4 °C, nakon čega je uzgajano u uvjetima dugog dana, kako je prethodno navedeno 3 - 4 dana.

Sjeme *B. rapa* nakon sterilizacije nasađeno je na ploče koje su sadržavale agar u koncentraciji $\gamma = 10 \text{ g L}^{-1}$ te ostavljeno u mraku 24 h na $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ radi ujednačavanja klijanja. Nakon toga su klijanci *B. rapa* uzgajani 1 dan u klimatiziranoj komori (16 h dan, 8 h noć), na $22 \text{ }^{\circ}\text{C}$ na pločama postavljenim u okomitom položaju te su takvi klijanci proslijeđeni u tretman auksinskim konjugatima.

3.6.4. Tretman konjugatima auksina

Klijanci linije *DR5rev:GFP* stari 3-4 dana upotrebljeni su za istraživanje učinka egzogenih konjugata auksina na distribuciju auksina u korijenu. Klijanci su uronjeni 3 sata u MES pufer, $c = 2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ pH 5,7 uz dodatak konjugata auksina IAA-Ala, IPA-Ala ili IBA-Ala do konačne koncentracije $c = 1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ili $c = 10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Nakon 3 sata tretmana klijanci su analizirani konfokalnim mikroskopom.

Klijanci *B. rapa*, klijanci *A. thaliana* divljeg tipa ekotipa WS te klijanci mutanti u auksin-amidohidrolazama upotrebljeni su za ispitivanje učinka egzogenih auksinskih konjugata u tzv. *feeding* eksperimentima. U tu svrhu, klijanci *B. rapa* stari jedan dan preseljeni su na krute 1% agarske podloge koje su sadržavale konjugate auksina IAA-Ala, IPA-Ala, IBA-Ala u konačnoj koncentraciji $c = 10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, te su zatim rasli u uvjetima dugog dana 24 h nakon čega su sakupljeni i liofilizirani. Klijanci *A. thaliana* stari 3-4 dana preseljeni su na MS hranjive podloge koje su sadržavale konjugate auksina IAA-Ala, IPA-Ala, IBA-Ala u konačnoj koncentraciji $c = 10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, te su zatim rasli u uvjetima dugog dana 5 dana nakon čega su sakupljeni i liofilizirani. Liofilizirani materijal *A. thaliana* i *B. rapa* poslan je u Laboratorij za biljne regulatore rasta Olomouc, Češka za analize auksinskog metaboloma.

3.6.5. Prikupljanje i homogenizacija biljnog materijala

Za analizu gDNA i ukupnih staničnih proteina svježi biljni materijal *A. thaliana* sakupljen je u tekućem dušiku te homogeniran bez dodatka pufera pomoću *Mixer Mill* homogenizatora 2 min pri frekvenciji od 30,0 Hz u nosačima prethodno ohlađenima na $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Za UHPLC-MS/MS analizu auksinskog metaboloma biljni materijal *A. thaliana* i *B. rapa* sakupljen je u tekućem dušiku te odmah liofiliziran u liofilizatoru Steris Lyovac GT2.

3.6.6. Provjera prisutnosti transgena u selekcioniranim linijama nadekspresora *A. thaliana*Izolacija genomske DNA iz klijanaca *A. thaliana* i provjera prisutnosti transgena *BrILL2*

Genomska DNA (gDNA) izolirana je iz 1-3 klijanaca nadekspresorskih linija *A. thaliana* starih 5 dana. Uzorci su homogenirani 2 minute u homogenizatoru Retsch, frekvencijom 30 Hz uz 3 cirkonijske kuglice promjera 2 mm te 100 μL staklenih kuglica promjera 0,5 mm. Homogeniranom tkivu dodat je pufer za izolaciju gDNA (Tris- HCl $c = 200 \text{ mmol L}^{-1}$ pH 8,0, NaCl $c = 250 \text{ mmol L}^{-1}$, EDTA $c = 25 \text{ mmol L}^{-1}$, SDS $\gamma = 5 \text{ g L}^{-1}$) te su uzorci zagrijani 10 minuta na 95°C . Nakon centrifugiranja 5 minuta na $15600 \times g$, supernatantu je dodano 2,5 volumena etanola ($\varphi = 1$) i 0,1 volumena natrijevog acetata ($c = 3 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,2). Uzorci su precipitirani 1 h na -20°C ili 30 min na -80°C te potom centrifugirani 20 minuta na $15600 \times g$. Talozi uzoraka isprani su s etanolom ($\varphi = 0,70$), posušeni u termobloku na 37°C 5-10 min, te je konačni talog gDNA otopljen u 50 μL redestilirane vode. Tako priređena otopina gDNA (2 μL) korištena je za provjeru prisutnosti transgena u homozigotnim linijama metodom PCR. Reakcijska smjesa i uvjeti PCR reakcije dati su u tablicama 5 i 6.

Tablica 5. Sastav reakcijske smjese za provođenje PCR reakcije.

Komponente reakcijske smjese	Radna koncentracija	V/ μL
gDNA iz <i>A. thaliana</i>	n.d.	2
DreamTaq pufer	10 $\times$	2
Napredna početnica FwBrILL2 5'- ATGGCTATTCTCAACAACCTTTTGCTC- 3'	$c = 10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$	0,6
Povratna početnica RevHis6JLM 5'- GTGGTGGTGGTGGTGGTG - 3'	$c = 10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$	0,6
Smjesa dNTP	2,5 mmol L^{-1} (svaki)	2
DreamTaq DNA polimeraza	5 j μL^{-1}	0,1
Sterilna ultračista voda		do 20 μL

Tablica 6. Uvjeti PCR-a.

Faza PCR-a	Broj ciklusa	$t / ^\circ\text{C}$	t / s
Početna denaturacija	1	95	60
Faza denaturacije, vezivanja početnica i elongacije	40	95	30
		60	30
		72	60
Finalna elongacija	1	72	450

Izolacija ukupnih staničnih proteina iz klijanaca A. thaliana

Ukupni stanični proteini izolirani su iz 5 klijanaca (7 dana starih). Uzorci su homogenirani 2 minute u homogenizatoru Retsch, frekvencijom 30 Hz uz 3 cirkonijske kuglice promjera 2 mm te 100 μL staklenih kuglica promjera 0,5 mm. Homogeniranom tkivu dodat je pufer za izolaciju ukupnih staničnih proteina (Tris-HCl $c = 50 \text{ mmol L}^{-1}$ pH 6,8, SDS $\gamma = 40 \text{ g L}^{-1}$, glicerol $\varphi = 0,2$, bromfenol modriilo $\gamma = 10 \text{ g L}^{-1}$, β -merkaptetanol $\varphi = 0,03$) te su uzorci podvrgnuti denaturaciji na 99°C , 5 minuta. Potom su centrifugirani 5 minuta na 13200 okretaja te je 10 μL supernatanta nanoseno na SDS-poliakrilamidni gel. Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima provedena je kako je opisano u poglavlju 3.3.7. Nakon elektroforeze, ukupni stanični proteini preneseni su na PVDF membranu mokrim prijenosom 1,5 h, te analizirani kako je opisano u poglavlju 3.3.8. Western hibridizacijskom analizom i detekcijom kemiluminiscencije.

3.6.7. Test inhibicije rasta korijena

Za ispitivanje učinka konjugata auksina IPA-Ala, IBA-Ala i IAA-Ala na prirast i arhitekturu korijena, proveden je test inhibicije rasta korijena. Klijanci, stari 3-4 dana, preseljeni su na MS krute podloge s MES puferom ($c = 2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ pH 5,7) i s dodatkom jednog od konjugata auksina (IPA-Ala, IBA-Ala ili IAA-Ala) u rasponu koncentracija od $c = 0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ do $c = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$. Za odgovarajuće kontrole klijanci su preseljeni na MS podloge s puferom MES, bez konjugata auksina u podlozi. Klijanci su zatim uzgajani 10 dana na okomito postavljenim pločama u uvjetima dugog dana (16 h dan / 8 h noć) na 22°C te su nakon toga skenirani ili fotografirani.

3.7. Mikroskopske metode*3.7.1. Konfokalna mikroskopija*

Za konfokalnu mikroskopiju, klijanci linije *DR5rev::GFP* stari 3-4 dana preneseni su u pufer MES ($c = 2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ pH 5,7) uz dodatak konjugata auksina ili bez konjugata auksina za odgovarajuću kontrolu (kako je opisano u poglavlju 3.6.4.). Klijanci su izloženi tretmanu konjugatima auksina ili kontrolnim uvjetima u trajanju 1,5 do 3 sata.

Nakon tretmana, klijanci su obojeni 1 minutu u otopini propidijevog jodida (PI) $\gamma = 50 \mu\text{g mL}^{-1}$, isprani u destiliranoj vodi i postavljeni na mikroskopska stakalca. Slike su dobivene u

8-bitnom formatu pomoću Leica TCS SP2 laserskog pretražnog konfokalnog mikroskopa imerzijskim objektivom s povećanjem 60× numeričke aperture $NA = 1,30$ ili objektivom s povećanjem 20× numeričke aperture $NA = 0,9$. Sustav je kontroliran pomoću softvera Leica Confocal Software LCS (Leica Microsystems, Njemačka). GFP i PI su pobuđeni pri 488 nm pomoću argonskog lasera. GFP emisija je detektirana na 500 - 563 nm, dok je PI detektiran na 597 - 670 nm. Sve konfokalne slike su dobivene korištenjem konstantnog skupa mikroskopskih, detekcijskih i ekscitacijskih parametara. Analizirano je najmanje deset neovisnih kljanaca po tretmanu, a za izradu slika odabrane su reprezentativne slike tretmana.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom poglavlju pregled rezultata prati organizaciju poglavlja 3. Materijali i metode, odnosno dati su rezultati bioinformatičkog, biokemijskog, analitičkog i fiziološkog pristupa proučavanju uloge i funkcije auksin-amidohidrolaze BrILL2. Diskusija rezultata slijedi neposredno nakon pojedinih grupa rezultata. Prvo je u okviru bioinformatičkog pristupa razmotrena uloga potencijalno važnih aminokiselinskih ostataka dobivenih sravnjivanjem i izradom modela strukture BrILL2, te filogenetskih odnosa unutar porodice metalopeptidaza M20, kao i biljnih auksin-amidohidrolaza. Zatim su dati rezultati pregleda javno dostupnih podataka o ekspresiji BrILL2 i drugih gena auksinske homeostaze u *A. thaliana* pri različitim uvjetima. Biokemijski dio rezultata uključuje objašnjenje učinka ciljane mutageneze odabranih aminokiselinskih ostataka te važnosti istih za aktivnost enzima, stabilnost, vezanje metala i potencijalnu regulaciju aktivnosti enzima *in vitro* i *in vivo*. Rezultati analitičkog pristupa sagledaju tzv. *feeding* eksperimente i analize auksinskog metaboloma u klijancima *B. rapa*, a zatim slijede rezultati analize auksinskog metaboloma i usporedbe auksinske homeostaze mutanti i nadeskpresorskih linija za BrILL2 s divljim tipom *A. thaliana* pri tretmanu konjugatima dugolančanih auksina IPA-Ala i IBA-Ala u odnosu na IAA-Ala.

4.1. Bioinformatičke analize

4.1.1. Analiza primarnog slijeda BrILL2 te homologije s auksin-amidohidrolazama i metalopeptidazama iz drugih vrsta

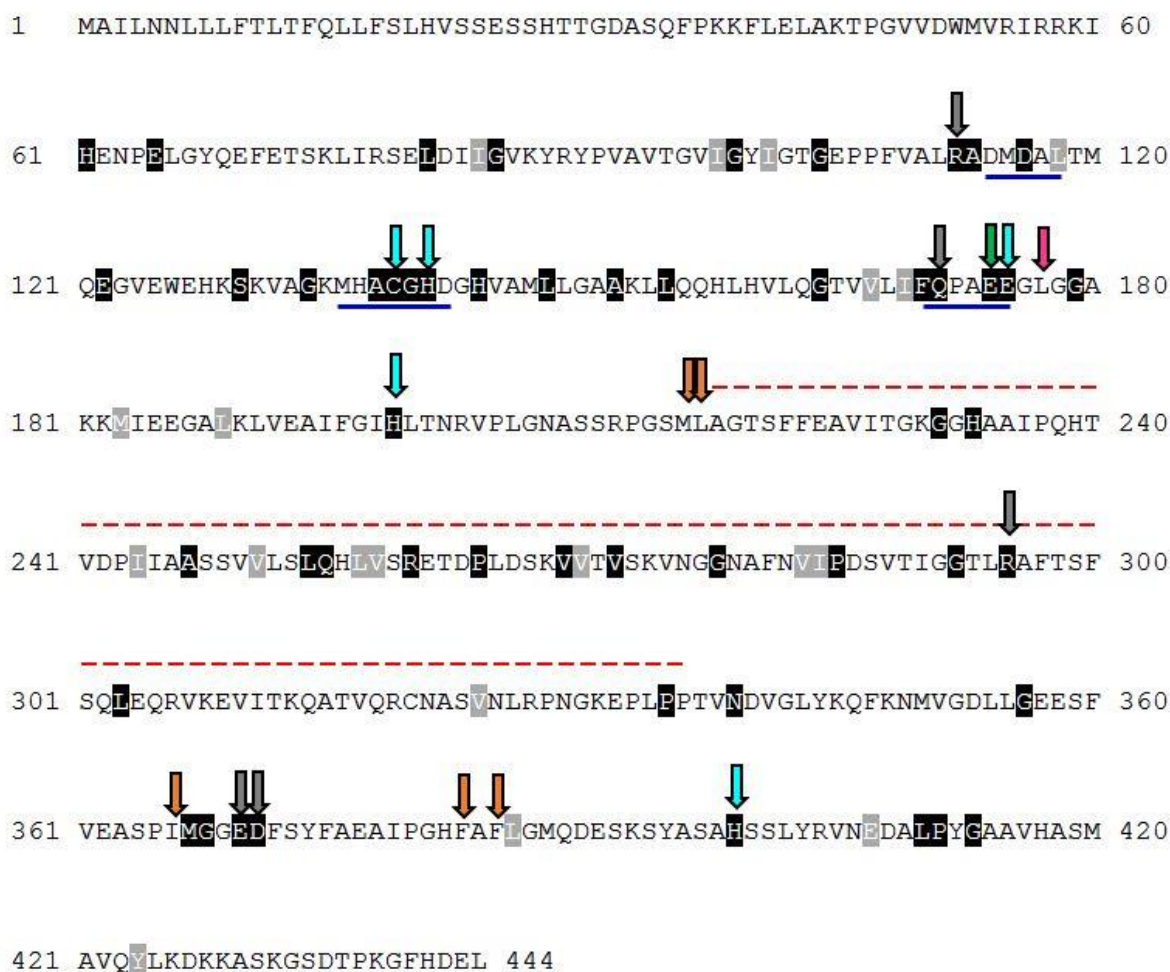
Slijed aminokiselina za auksin-amidohidrolazu BrILL2 (Ensembl Plants: Bra002800.1, GenBank: ABB60092.1) sravnjen je sa slijedovima auksin-amidohidrolaza iz drugih biljnih vrsta te bakterija. Kriterij za uključivanje enzima u sravnjivanje bila je objavljena i definirana enzimska aktivnost prema određenim konjugatima auksina ili strukturna homologija s AtILL2 čija je kristalna struktura riješena 2009. godine¹³ (PDB šifra 1xmb¹³; 2q43¹¹³). Uključene su i prokariotske hidrolaze koje mogu hidrolizirati IAA-Asp kao supstrat (hidrolaza iz *Enterobacter agglomerans* i iz *Arthrobacter ilicis*, skraćeno EaIAAH te AiIAAH)⁸²⁻⁸⁴. Radi određivanja karakterističnih aminokiselinskih ostataka ključnih za aktivnost enzima BrILL2 učinjena je usporedba slijeda BrILL2 i sa strukturnim homolozima poznate kristalne strukture.

Strukturni homolozi odabrani su nakon unosa oznake za kristalnu strukturu AtILL2 u VAST server prema najvišem VAST rezultatu (tablica 7).

Tablica 7. Odabrani strukturni homolozi s VAST servera.

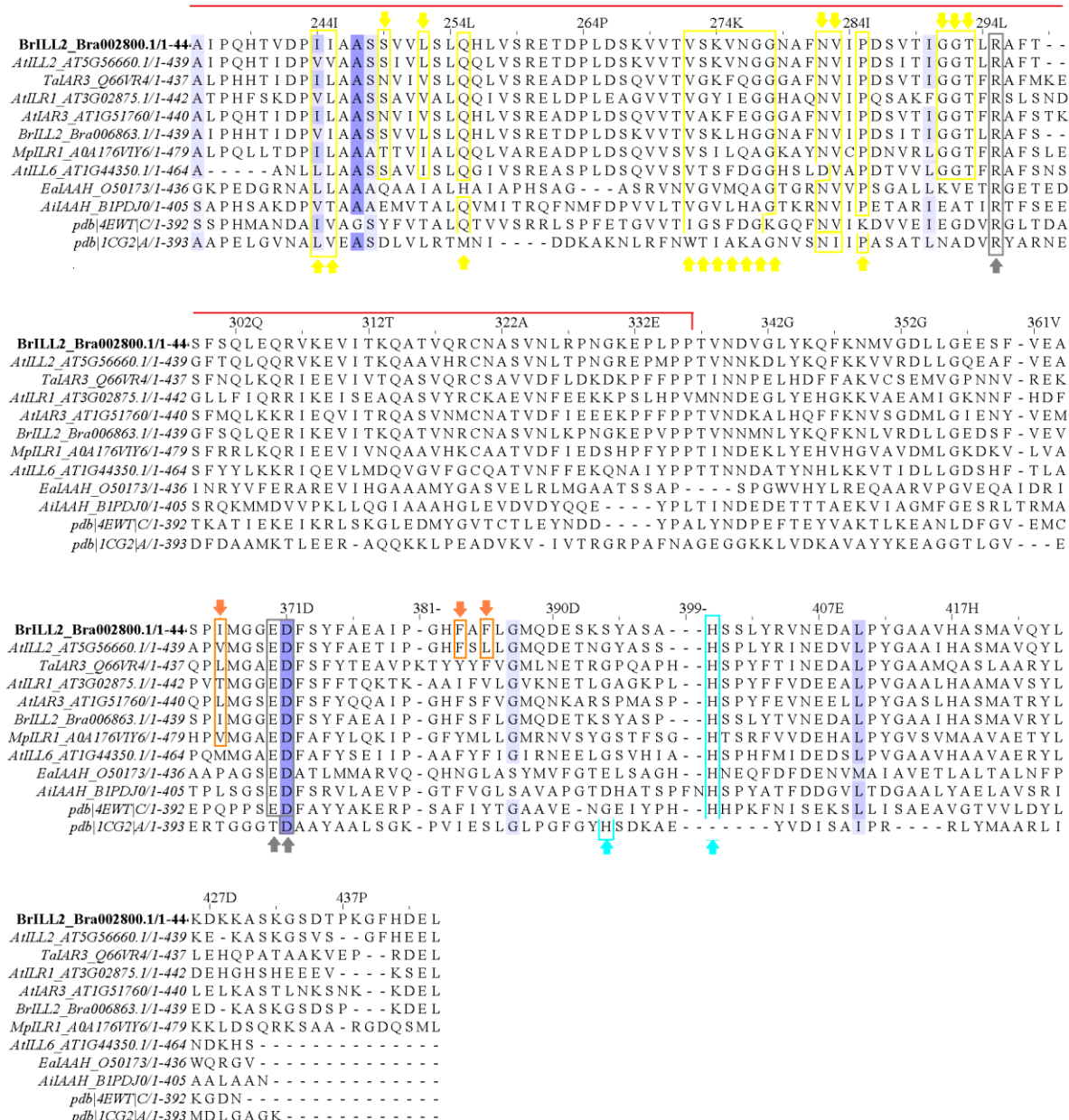
PDB ŠIFRA	Dužina sravnjenja	VAST rezultat	E vrijednost	RMSD	Identičnost s 1xmb/ %	Opis
4EWTC	358	36,2	10e-34,1	2,0	31,0	pretpostavljena amidohidrolaza iz <i>Staphylococcus aureus</i> otporne na meticilin
1CG2A	346	27,5	10e-16,6	3,5	15,6	Karboksipeptidaza G2 iz <i>Pseudomonas sp.</i> soj RS- 16

Odabrani su karboksipeptidaza G2 iz *Pseudomonas sp.* soja RS-16 (CPG2, PDB šifra 1cg2_a)¹¹⁴ te amidohidrolaza SACOL0085 iz *Staphylococcus aureus* COL (4EWT, PDB šifra 4ewt_c)¹¹⁵. Usporedba strukture AtILL2 sa CPG2 daje VAST rezultat 36,2, dok sa 4EWT daje VAST rezultat 27,5 potvrđujući visoku strukturnu homologiju. Na temelju usporedbe s gore navedenim slijedovima, utvrđeno je da BrILL2 zadržava u svome slijedu visoko očuvane motive DMDAL, MHACGHD, te FQPAEE karakteristične za M20D porodicu metalopeptidaza⁸²⁻⁸⁴ (slika 16). BrILL2 posjeduje i HDEL sekvencu na C-kraju specifičnu za zadržavanje enzima u endoplazmatskom retikulumu¹¹⁶. Nastavljajući se na sliku 16, na slici 17 prikazano je sravnjenje odabranih M20 peptidaza na kojemu su označeni aminokiselinski ostaci pretpostavljeno važni za funkciju BrILL2. Dodatak 1 uključuje prošireno sravnjivanje.



Slika 16. Sekvenca proteina BrILL2 (Ensembl: *Bra002800.1*) s prikazanim visoko očuvanim ostacima (100% očuvanosti) na crnoj podlozi te očuvanim ostacima (preko 70% očuvanosti) na sivoj podlozi. Crvenom isprekidanom linijom obilježena je pretpostavljena dimerizacijska (oligomerizacijska) domena prema Phyre² poslužitelju od ostatka Ala218 do ostatka Pro336. Plavim punim linijama označena su 3 očuvana motiva koja nalazimo u svim metalopeptidazama M20D (DMDAL, MHACGHD, FQPAEE). Strelicama su označeni ostaci pretpostavljeno važni za funkciju proteina prema Bitto i sur.¹³ Tirkiznim strelicama obilježeni su predloženi ostaci koji sudjeluju u koordinaciji metala (Cys139, His141, Glu175, His199 i His399), narančastim strelicama predloženi hidrofobni ostaci koji sudjeluju u vezanju indolnog prstena (Met216, Leu217, Ile366, Phe383, Phe385), katalitički ostatak koji djeluje u općoj kiselo-baznoj katalizi označen je zelenom strelicom (Glu174), rozom strelicom označen je ostatak pretpostavljeno važan za selektivnost prema bočnom lancu supstrata (Leu177), dok su sivim strelicama označeni visoko očuvani ostaci u blizini aktivnog mjesta. Očuvanosti su prikazane prema rezultatu sravnjivanja Muscle algoritmom u programu Jalview.

BrIL2_Bra002800.1/1-44 LGGAKKMIIEGAL - K - - - LVEAIFGIHLTNRV - PLGNASSRPGSMLAGTSFFEAVITGKGGH - A
AtIL2_AT5G56660.1/1-439 LGGAKKMIIEGAL - K - - - NVEAIFGIHLSARI - PFGKASRAGSFLAGAGVFEAVITGKGGH - A
TaILR3_Q66V74/1-437 GGGAKKMVEAGAV - V - - - NIEIMFGLHVADSV - PIGVLASRPGPIMAGSGFVEAVISGKGGH - A
AtILR1_AT3G02875.1/1-442 YAGAYEMLKDEIL - D - - - DLDGILSVHVFPSI - PSGGIGSRPGTVLAGAGLFTVTVHGGQSH - A
AtILR3_AT1G31760/1-440 GGGAKKIVEAGVL - E - - - NVSAIFGLHVTNLQ - ALGVSSRAGSFLAGSGFFFAKISGKGGH - A
BrIL2_Bra006863.1/1-439 FGGAKKMIIEGAL - K - - - HVEAIFGIHLTNQV - PLGTASRAGSLLAGSGFVEAVITGKGGH - A
MpILR1_A04176V1Y6/1-479 NAGQVMVEEGAL - G - - - NAESIFGLHVTTPS - ETGTVALKPGLMAGSGMFEALIMGKGGH - A
AtIL6_AT1G44350.1/1-464 GNGAKMIEEGAL - D - - - DVEAIFAVHSHIH - PTGVIGSRSGPLAGGCI FRAVITSEDSR - G
EaIAAH_O50173/1-436 TRGARAMEVAGVV - D - - - DVDYFTHIGITGV - PAGTVGSGSDNFMATTK - FDALFTVGAHAAG - G
AtIAAH_BIPDJ0/1-405 FDGASYMINEGVL - DAAGRADTAYGMHVVFSSLEPHGQFVTKNGVMLSSSDGLVTVTLGAGGH - G
pdf4EW7/C1-392 PGGAKTIENGVL - D - - - GDVHVLGVHVMSTM - KTGKVIYVRPGYQVTGRAFFLKVKQKGGH - G
pdf1JCG24/1-393 SFGSRDLIQEEAK - - - - - LADYVLSFE - - - - PTSAGDEKLSLGTSGIAYVQVNITGKASHA - G



Slika 17. Svrnjivanje odabranih sekvenci auksin-amidohidrolaze (At - *Arabidopsis thaliana*, Ta - *Triticum aestivum*, Br - *Brassica rapa*, Mp - *Marchantia polymorpha*, Ea - *Enterobacter agglomerans*, Ai - *Arthrobacter ilicis*) iz biljaka i bakterija te strukturnih homologa odabranih prema VAST rezultatima. Uz At i Br auksin-amidohidrolaze date su odgovarajuće Ensembl oznake, uz ostale auksin-amidohidrolaze UniProt oznake, dok je za strukturne homologe data pdb oznaka. Sekvence su numerirane prema slijedu ostataka BrILL2 kao referentnoj sekvenci. Oznake na slici (tirkizna, roza, narančasta, siva i zelena) identične su kao na slici 16, pune plave linije ukazuju na očuvane motive u M20D metalopeptidazama, dok puna crvena linija označuje predloženu polimerizacijsku domenu prema Phyre² serveru. Žutom bojom označeni su predloženi ostaci prema CDD serveru koji sudjeluju u pretpostavljenom formiranju dimerizacijskog sučelja prilikom stvaranja dimera (ili oligomera) u auksin-amidohidrolazama. Osjenčanost ostataka odgovara očuvanosti sekvenci većoj od 60% prema Jalview programu. Svrnjivanje je izvedeno u programu Jalview algoritmom Muscle uz korištenje integriranih parametara.

4.1.2. Identifikacija važnih aminokiselinskih ostataka u BrILL2

Važnost pojedinih aminokiselinskih ostataka u BrILL2 protumačena je iz odnosa strukture i funkcije koje su Bitto i sur.¹³ predložili za AtILL2, s obzirom da BrILL2 s AtILL2 dijeli 78,7% identičnosti, odnosno 91,9% sličnosti u svojstvima aminokiselina. Međutim, potrebno je istaknuti da je struktura AtILL2 riješena u obliku apoenzima, bez dodatka metalnih iona prilikom kristalizacije te je učinjeno modeliranje supstrata (engl. *molecular docking*) u aktivno mjesto¹³.

Sličnosti/ identičnosti između pojedinih sekvencija izračunate su i za ostale M20 peptidaze uzete za sravnjivanje u programu MatGAT (tablica 8 te dodatak 2). S drugim biljnim hidrolazama (označene zeleno u tablici 8) BrILL2 dijeli od oko 30 - 80% identičnosti (od oko 47 - 90% sličnosti). Unatoč tome što je identičnost BrILL2 s bakterijskim M20 peptidazama niska (ispod 30%), s auksin-amidohidrolazama iz *Enterobacter agglomerans* te *Arthrobacter ilicis* dijeli 45,7, tj. 48,9% sličnosti, dok sa strukturnim homolozima CPG2 te 4EWT dijeli visokih 41, tj. 46,6% sličnosti.

Sravnjivanje je pokazalo svega nekolicinu u potpunosti očuvanih aminokiselinskih ostataka u BrILL2; i to ostatke Gly140, Glu174, Glu175, Gly179, Arg295, Asp371 te His399. Funkcija Glu174 kao katalitičkog aminokiselinskog ostatka opisana je već u CPG2¹¹⁴ te u 4EWT¹¹⁵, kao i AtILL2¹³. Glu175 u istim se M20 metalopeptidazama opisuje kao ostatak potreban za koordinaciju metalnog iona. Neki aminokiselinski ostaci važni za funkciju enzima opisani su u literaturi u mutantama s gubitkom ili promjenom funkcije enzima te su njihovi odgovarajući aminokiselinski ostaci u BrILL2 dati u tablici 9. Na primjer, nekoliko dodatnih mutacija s gubitkom funkcije (engl. *loss-of-function*) opisano je u homolozima BrILL2 u *A. thaliana*^{4,6}. Mutacije Glu69Lys (Glu70 u BrILL2) te Gly139Asp (Gly140 u BrILL2) u AtILR1 vjerojatno uzrokuju narušavanje geometrije bimetalnog veznog mjesta^{4,13}. Ranije je izvješteno da neki aminokiselinski ostaci sudjeluju u koordinaciji metalnih iona u aktivnom mjestu M20D metalopeptidaza. Mutacija His405 u bakterijskoj auksin-amidohidrolazi iz *Enterobacter agglomerans* specifičnoj za IAA-Asp, koji u BrILL2 odgovara His399, dovodi do potpunog gubitka enzimske aktivnosti⁸³. Ovo opažanje potvrdilo je ulogu tog histidinskog ostatka u koordinaciji metalnog iona u aktivnom mjestu. Zanimljivo, Bitto i sur.¹³ utvrdili su da između AtILL2 i CPG2 postoje dodatne razlike u koordinaciji metalnih iona. Tako AtILL2, sadrži očuvani His197 (His199 u BrILL2), kojemu u CPG2 odgovara Glu200. Osim

toga, CPG2 koordinira drugi metalni ion s His112, koji se nalazi u elementu sekundarne strukture različitom od njegovog ekvivalenta His139 u AtILL2¹³.

Tablica 8. Sličnost/ identičnost sravnjenih proteinskih sekvenci s aminokiselinskim slijedom za BrILL2 izračunata u programu MatGAT. Biljne auksin-amidohidrolaze označene su zeleno. E – oznaka za Ensembl Plants šifru, P – oznaka za Phytozome šifru, U – oznaka za UniProt šifru, pdb – oznaka za PDB šifru.

	M20 metalopeptidaza	Oznaka u bazama*	Sličnost s 1. / %	Identičnost/ %
1.	BrILL2 /1-444	E - Bra002800	100	100
2.	BrILL2 /1-439	E - Bra006863	91,9	81,8
3.	AtILL2 /1-439	E - AT5G56660	89,2	78,7
4.	TaIAR3 /1-437	U - Q66VR4	74,3	55,7
5.	AsILR1 /1-442	U - Q946K0	66,9	47,2
6.	AtILR1 /1-442	E - AT3G02875	66,4	46,5
7.	BrILR1 /1-437	E - Bra040608	67,1	46,7
8.	AtIAR3 /1-440	E - AT1G51760	79,3	62,2
9.	BrIAR3 /1-442	E - Bra018932	79,1	61,7
10.	BrIAR3 /1-444	E - Bra030419	79,7	62,2
11.	AtILL5 /1-435	E - AT1G51780	76,4	58,4
12.	AtILL1 /1-438	E - AT5G56650	86,9	76,4
13.	AtILL3 /1-428	E - AT5G54140	64,9	44,5
14.	AtILL6 /1-464	E - AT1G44350	64,7	44,7
15.	BrILL3 /1-428	E - Bra003012	64,2	43,7
16.	BrILL6 /1-293	E - Bra036946	47,1	32,6
17.	MtIAR31 /1-452	E - AES67900	76,5	59,3
18.	MtIAR33 /1-420	E - AES72661	64,4	44,1
19.	PpIAR33 /1-383	P - Pp3s34_741V3.1	48,4	28,9
20.	MpILR1 /1-479	U - A0A176VIY6	65,3	44,5
21.	AiIAAH /1-405	U - B1PDJ0	48,9	28,9
22.	EaIAAH /1-436	U - O50173	45,7	25,6
23.	4EWT_C /1-392	pdb - 1cg2_a	46,6	30,5
24.	CPG2_A /23-415	pdb - 4ewt_c	41,0	22,6

Tablica 9. Specifične mutacije aminokiselinskih ostataka koje uzrokuju gubitak ili promjenu funkcije enzima auksin-amidohidrolaza, odnosno M20 peptidaza te odgovarajući aminokiselinski ostaci u BrILL2.

Opisani aminokiselinski ostatak / Mutacija	Odgovarajući aminokiselinski ostatak u BrILL2	Postoji očuvanost ostatka?	Učinak mutacije na aktivnost enzima
Glu69Lys u AtILR1 ⁴	Glu70	Da	Gubitak funkcije
Gly139Asp u AtILR1 ⁴	Gly140	Da	Gubitak funkcije
Gly415Glu u AtILR ⁴	Gly413	Ne	Gubitak funkcije
Ser206Leu u AtIAR3 ⁵	Ser211	Ne	Gubitak funkcije
Leu244Ser u MpILR1 ⁵⁹	Ser211	Ne	Značajno povećanje hidrolazne aktivnosti prema IBA-Ala i IPA-Ala
His405Asp u EaIAAH ⁸³	His399	Da	Gubitak aktivnosti
His404Asp u EaIAAH ⁸³	Ala398	Ne	Promjena supstratne specifičnosti (prema IAA-Asp zadržava aktivnost, prema IAA-Glu i IAA-Asn gubi aktivnost)

Sravnjivanje izvedeno u ovom doktorskom radu pokazalo je da BrILL2 sadrži tri visoko očuvana aminokiselinska ostatka, Cys139, His141, His199 te u potpunosti očuvane ostatke Glu175 i His399, a koji zajedno čine karakterističan motiv CHEHH. Iste ostatke prepoznaje i CDD baza kao vezna mjesta za metale prilikom unosa PDB šifre za AtILL2 (1xmb¹³) (neprikazani podaci). Ovi ostaci pretpostavljeno su važni za vezanje metala i prema literaturnim podacima karakteriziraju eukariotske M20D metalopeptidaze¹¹⁷. Sravnjivanje izvedeno u ovom doktorskom radu međutim, pokazalo je da sve sravnjene sekvence, uključujući bakterijsku 4EWT, ali ne i CPG2, sadrže isti motiv CHEHH čiji su bočni ogranci ligandi za koordinaciju dva metalna iona (slika 17 i dodatak 1- tirkizne oznake). Strukturni homolozi 4EWT i CPG2 vežu dva metalna iona u aktivnom mjestu^{114,115}. Dostupni biokemijski dokazi ukazuju da je hidroliza IAA-konjugata kod auksin-amidohidrolaza iz *A. thaliana* ovisna o prisutnosti metala. Ovi enzimi preferiraju ione Mn^{2+} kao kofaktor, a AtILR1 može koristiti i Cu^{2+} ^{4,6}. S druge strane, karboksipeptidaza G2 (predstavnik potporodice M20A metalopeptidaza) preferira ione Zn^{2+} , a za koordinaciju dva iona cinka koristi kao ligande aminokiselinske ostatke motiva HDEEH¹¹⁴. M20D potporodica proteaza, kao što je nađeno kod AtILL2¹³, kod proteina yxeP iz *Bacillus subtilis*¹¹⁸ i 4EWT¹¹⁵, razlikuje se od ostalih M20 potporodica upravo po vrlo očuvanom cisteinu koji sudjeluje u koordinaciji oba iona metala.

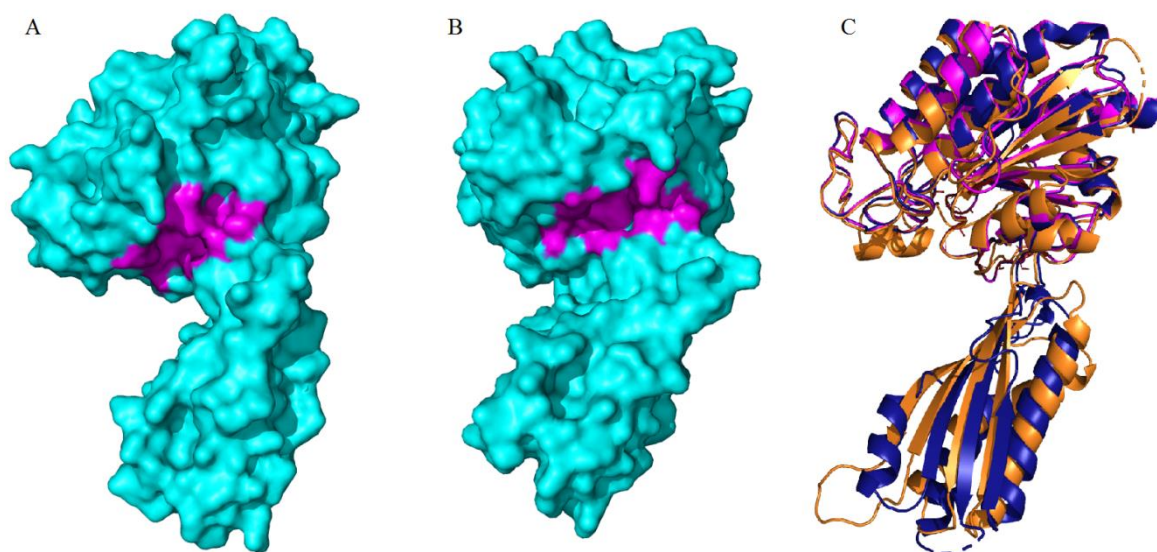
U članovima ostalih M20 potporodica očuvani aspartat služi kao bidentatni ligand za koordinaciju dva metala (npr., Asp141 u CPG2¹¹⁴).

Zaključeno je da se proteini M20D potporodice razlikuju od ostalih M20 peptidaza po zanimljivom remodeliranju aktivnog mjesta koje mu je promijenilo preferenciju od cinka prema manganu. Pretpostavka da je upravo cisteinski ostatak, koji u BrILL2 odgovara Cys139, jedan od ostataka zaslužnih za koordinaciju metala istražena je i u ovom doktorskom radu.

Važnost pojedinih aminokiselinskih ostataka za aktivnost enzima BrILL2, vezanje metala, stabilnost enzima, smještanje konjugata dugolančanih auksina u aktivno mjesto u odnosu na IAA-Ala biti će razmatrane dalje u okviru rezultata biokemijskih metoda.

4.1.3. Model BrILL2

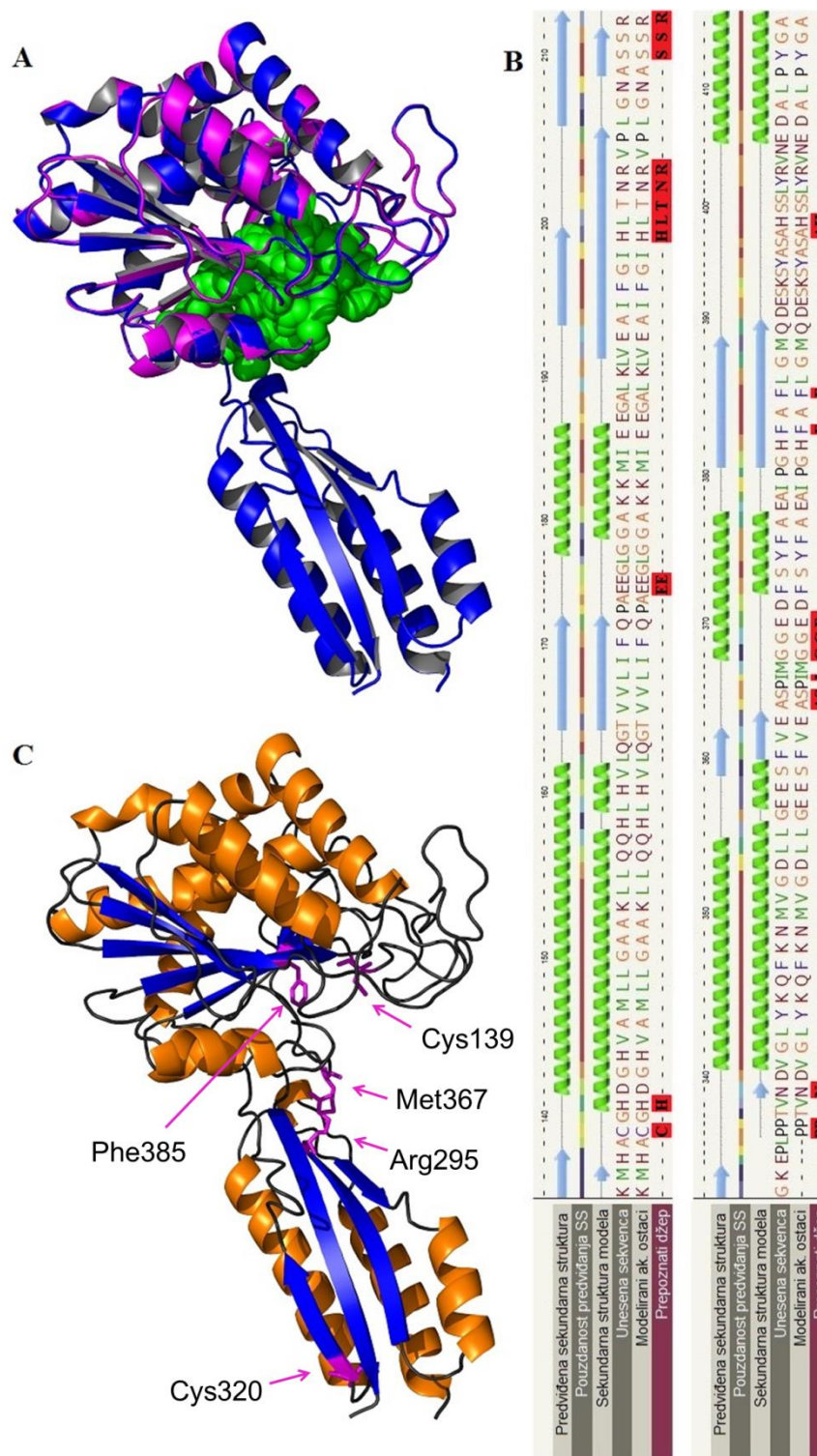
Model BrILL2 izrađen je na javno dostupnome serveru za predviđanje strukture proteina Phyre² (slika 18)⁸⁵. Server Phyre² odabran je jer se radi o vrlo jednostavnom i intuitivnom alatu za određivanje homologije u strukturama unosom sekvence od interesa. Server nudi niz drugih alata kojima se može pretpostaviti struktura aktivnog mjesta, kao i dobiti uvid u homologne ostatke prikazivanjem sravnjenja unesene sekvence i proteina kalupa na osnovu kojega je priređen model. Intenzivnim načinom pretrage s unesenom sekvencom za auksin-amidohidrolazu BrILL2 izrađen je model prema strukturama auksin-amidohidrolaze AtILL2 (PDB šifra 1XMB¹³ i 2Q43¹¹³) kao najboljim kalupima. Model je ustanovljen s najvećom pouzdanošću (engl. *confidence*, 100%) cijelom ili djelomičnom dužinom sekvence. Kao dobre kalupe za homologno modeliranje server Phyre² iznosi još i strukturu predložene amidohidrolaze iz *Staphylococcus aureus* (PDB šifra 4EWT) s kojom BrILL2 dijeli 31% identičnih aminokiselinskih ostataka, te strukturu dosada neokarakteriziranog proteina YXEP iz *Bacillus subtilis* (PDB šifra 1YSJ¹¹⁸) s kojim BrILL2 dijeli u sravnjenju na serveru Phyre² 42% identičnih aminokiselinskih ostataka. Zanimljivo, YXEP je u serveru Phyre² okarakterizirana kao bakterijska cink-ovisna egzopeptidaza, iako u katalitičkoj domeni ima smještena dva iona nikla prema PDB strukturi, a Bitto i sur.¹³ razmatrali su da veže manganove ione kao i ostali primjeri M20D proteina. Uočeno je da postoji podudarnost između predloženih struktura za modeliranje na Phyre² serveru i strukturnih homologa dobivenih na VAST serveru (neprikazani podaci), te da općenito većina modela podržava karakteriziranu dvodomensku arhitekturu opisanu kod AtILL2¹³ i drugih homologa^{114,115,118}.



Slika 18. Model strukture BrILL2 izrađen na serveru Phyre² i vizualiziran u programu PyMOL. A) Kalotni model strukture BrILL2 s bočne strane te B) isti model zakrenut prema naprijed s rozo označenim veznim mjestom supstrata. C) Vrpčasti model strukture BrILL2 izrađen na kalupu AtILL2 (plave boje, PDB šifra 4Q23); na kalupu proteina YXEP (narančaste boje, PDB šifra 1YSJ); te na kalupu AtILL2 gdje je modelirana samo katalitička gornja domena (roze boje, PDB šifra 1XMB).

Enzim BrILL2 prema generiranim modelima ima strukturu građenu od dviju domena, gornje veće katalitičke domene u kojoj je predviđeno vezno mjesto supstrata, a koje uključuje očuvane ostatke Cys139, His141, Glu174, Glu175 te His399 (slika 18), te donju satelitnu domenu koja je u Phyre² serveru prepoznata kao oligomerizacijska domena, a nalazi se umetnuta između N- i C- kraja proteina od 218. do 336. aminokiselinskog ostatka. Ista je domena označena i na slikama 16 i 17. Iako u bakterijskim predstavnicima M20 porodice postoji sposobnost oligomerizacije/ polimerizacije, npr. spomenuta amidohidrolaza 4EWT kristalizirana je kao homotetramer, protein YXEP kristalizira kao homodimer¹¹⁸, CPG2 kristalizira kao homotetramer¹¹⁹, kod biljnih auksin-amidohidrolaza do sada takva sposobnost nije zabilježena¹³. Moguća sposobnost stvaranja oligomera predstavlja zanimljiv nalaz za daljnja biokemijska istraživanja u ovom doktorskom radu.

Proučavanjem rezultata na Phyre² serveru dobivena je predodžba o aktivnom mjestu enzima te aminokiselinskim ostacima koji sudjeluju u formiranju džepa ili šupljine u koju ulazi supstrat. Predloženi model s obilježenim aktivnim mjestom i aminokiselinskim ostacima dat je na slikama 19A i 19C, dok je na slici 19B dato pripadno sravnjenje radi bolje preglednosti.



Slika 19. A) Model BrILL2 s predloženim aminokiselinskim ostacima u šupljini, tj. džepu aktivnog mjesta izrađen na serveru Phyre² te vizualiziran programom Pymol. B) Svrnjenje sekvence BrILL2 s predviđenim elementima sekundarne strukture i obilježenim aminokiselinskim ostacima (Prepoznati džep) iz A). C) Model BrILL2 s prikazanim aminokiselinskim ostacima koji su bili u fokusu biokemijskih istraživanja u ovom doktorskom radu.

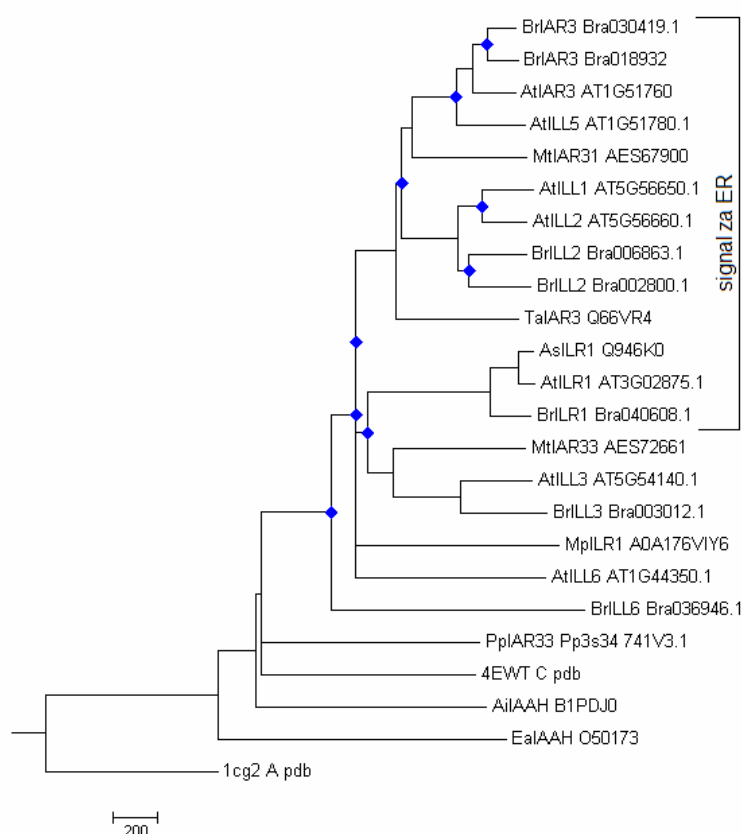
U literaturi nije još opisano ulazi li neki aminokiselinski ostatak iz predložene polimerizacijske domene u interakcije s ostacima aktivnog mjesta ili doprinosi veznim energijama oko aktivnog mjesta. Jedino se u potpunosti očuvan aminokiselinski ostatak koji u BrILL2 odgovara Arg295 iz satelitne domene u literaturi pretpostavlja kao ostatak koji interagira s α -karboksilatom aminokiselinskog supstrata u S1' mjestu te pomaže orijentaciji supstrata u aktivnom mjestu¹²⁰, ili kao stabilizator arhitekture aktivnog mjesta vodikovim vezama s karbonilima proteinske okosnice Gly366 i Ala216¹³. Međutim, uloga Arg295 nije sasvim razjašnjena, budući je gvanidinopentanolna skupina bočnog ogranka Arg295 udaljena 7Å od karboksilne skupine supstrata IAA-Ala modeliranog u aktivno mjesto AtILL2, što bi uvjetovalo potrebu značajne konformacijske promjene enzima da bi se ostvarila stabilizacija karboksilne skupine supstrata IAA-Ala¹³. Nedavno je napravljena simulacija molekularne dinamike radi proučavanja strukturnih i termodinamičkih svojstava prilikom vezanja liganda u BrILL2¹²¹. Pri tome je predložena konformacijska promjena između dviju domena BrILL2 te istaknuto da se vjerojatno ključna interakcija prilikom vezanja liganda u enzimu u simulaciji ostvaruje interakcijom između ostataka Arg295 i omče neposredno do aktivnog mjesta koju čine ostaci od Pro365 do Glu370, pretpostavljeno s Met367 u spomenutoj omči¹²¹. Vezanjem liganda u aktivno mjesto, pomiče se konformacijska ravnoteža prema zatvorenoj formi enzima. Arg295 impliciran je također kao ostatak u vodenom tunelu na ulazu supstrata u aktivno mjesto, te je predložen i kao ostatak važan ne samo za vezanje supstrata, nego i za reakcijski mehanizam enzima¹²¹. Stoga je uloga Arg285, kao i predložena interakcija s Met367 u katalitičkoj domeni ispitana u ovom doktorskom radu biokemijskim metodama.

Bitto i sur.¹³ predložili su aminokiselinski ostatak Leu175 u AtILL2 odgovornim za selektivnost prema IAA-konjugatima s bočnim lancem većim od Ala ili Ser, međutim taj ostatak nije očuvan u ostalim biljnim hidrolazama, npr. TaIAR3 na odgovarajućem mjestu ima Gly168, dok BrILL2 sadrži Leu177 (slika 16 i 17 te dodatak 1- roze oznake i strelice). Za promjene u supstratnoj specifičnosti uočeno je da mogu biti odgovorne ciljane mutacije drugih aminokiselinskih ostataka, ili čak delecije dijela katalitičke domene. Auksin-amidohidrolaza iz vrste *Marchantia polymorpha* MpILR1 može hidrolizirati IAA-Leu i IPA-Ala u vrlo maloj mjeri, međutim mutacija samo jedne aminokiseline Leu244 u Ser (tablica 9) dovodi do pojave znatne hidrolitičke aktivnosti prema IBA-Ala i povećanja aktivnosti prema IAA-Ile, IAA-Leu, ali i IPA-Ala⁵⁹. U MtIAR3 homologima, ciljanom delecijom cijelog N-

kraja proteina do prvog sljedećeg metionina, ustanovljeno je da enzimi ne gube aktivnost, već da također mogu promijeniti supstratnu specifičnost, npr. skraćena verzija MtIAR3-1 je gotovo izgubila hidrolitičku aktivnost prema IBA-Ala, dok joj se značajno poveća aktivnost prema IAA-Ala¹²². Leu174 u MtIAR3, odgovarajući Leu175 u AtILL2, nije deletiran u kraćenim verzijama enzima MtIAR3. Budući da se supstratna specifičnost ipak mijenja unatoč deleciji gotovo 30% katalitičke domene enzima, pretpostavljeno je da na prepoznavanje supstrata utječe smatanje cijele katalitičke domene, a ne isključivo promjene u samome aktivnome mjestu ili nekom očuvanom ostatku istog. U ovome doktorskom radu također je ispitana i uloga aminokiselinskog ostatka Phe385 u BrILL2 koji prema rezultatima Phyre² modeliranja, kao i u ranije predloženim modelima^{8,121} sudjeluje u formiranju hidrofobnog džepa za smještanje indolnog dijela supstrata. Svi do sada opisani aminokiselinski ostaci odabrani za istraživanje biokemijskim metodama, prikazani su na slici 19C.

4.1.4. Filogenetski odnosi auksin-amidohidrolaza iz *B. rapa*

Radi usporedbe evolucijskih odnosa auksin-amidohidrolaza iz *B. rapa* s članovima ILR1 porodice proteina iz drugih biljnih vrsta, kao i članova M20 porodice proteina iz bakterija, provedena je filogenetska analiza metodom spajanja susjeda na sravnjenim sekvencama iz poglavlja 4.1.1. u programu Jalview. Filogenetsko stablo proizvedeno sa sekvencom CPG2 kao vanjskom grupom (slika 20) ukazuje da se biljne auksin-amidohidrolaze jasno odvajaju od bakterijskih hidrolaza, izuzev pretpostavljene auksin-amidohidrolaze iz *P. patens* PpIAR3. Ova hidrolaza pokazuje se kao vrlo primitivna sekvenca s obzirom na evolucijski odnos s drugim biljnim hidrolazama, što potvrđuju novija istraživanja⁶⁰. Biljne auksin-amidohidrolaze odjeljuju se u više grupa, vidljivo je međusobno grupiranje enzima koji posjeduju signal za zadržavanje u endoplazmatskom retikulumu (npr. HDEL sekvenca kod BrILL2) ili ga nemaju. Također, vidljiva je duplikacija hidrolaza BrILL2 i BrIAR3 u *B. rapa* kao odvedenijeg predstavnika porodice Brassicaceae u odnosu na *A. thaliana*, te su u čvorištima filogenetskog stabla predloženi dodatni duplikacijski događaji u programu MEGA (slika 20- plavo). U vrsti *B. rapa* prema podacima baze podataka Ensembl Plants⁷⁶ postoji deset auksin-amidohidrolaza, od koji su duplicirani geni za ILL2, IAR3 te ILL3, dok ih u *A. thaliana* ima sedam.



Slika 20. Filogenetsko stablo biljnih auksin-amidohidrolaza i bakterijskih pripadnika M20 porodice proteina dobiveno metodom udruživanja susjeda upotrebom BLOSUM62 parametara u programu Jalview te vizualizacijom u programu FigTree v1.4.3. Duplikacijski događaji (obilježeni plavim dijamantima) dobiveni su u programu MEGA7. Sekvence biljnih auksin-amidohidrolaza su obilježene imenom roda i vrste organizma iz kojeg potječu: Br – *Brassica rapa*, At – *Arabidopsis thaliana*, As – *Arabidopsis suecica*, Mt – *Medicago truncatula*, Ta – *Triticum aestivum*, Pp – *Physcomitrella patens*. Bakterijske auksin-amidohidrolaze obilježene su oznakom IAAH i imenom roda i vrste iz koje potječu: Ai – *Arthrobacter ilicis*, Ea – *Enterobacter agglomerans*, dok su strukturni homologe auksin-amidohidrolaza iz bakterija, amidohidrolaza iz *Staphylococcus aureus* te karboksipeptidaza G2 iz *Pseudomonas* sp. soja RS-16 obilježene svojim pripadajućim PDB šiframa (1cg2_A te 4ewt_C).

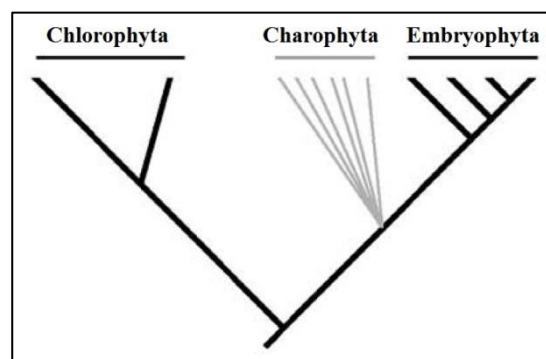
Ove rezultate potvrđuju nedavni dokazi da su ortolozi PpIAR3 iz *P. patens* sličniji prokariotskim hidrolazama i, kao takvi, rezultat horizontalnog transfera gena iz bakterija koji se dogodio recentnije u evolucijskoj prošlosti, dugo nakon odvajanja zajedničkog pretka mahovina i vaskularnih biljaka⁶⁰. Kao što je ilustrirano na slici 20. mnogi prokarioti eksprimiraju hidrolaze koje su članovi M20 porodice peptidaza, unutar koje su grupirane i ILR1-slične amidohidrolaze kao podtip. Prisutnost homologa ILR1 u bakterijskim vrstama predložena je kao direktan dokaz vrloavnog porijekla porodice proteina sličnih ILR1, budući da auksin-amidohidrolaze slične određenim razredima bakterijskih hidrolaza, poput

aminoacilaza ili hipurikaza⁶. Međutim, neki autori smatraju da su u auksin-amidohidrolazama vrlo davnog porijekla upravo očuvane peptidazne domene, koje se mogu naći u različitim hidrolazama⁶. Budući da sekvence biljnih auksin-amidohidrolaza dijele s bakterijskim hidrolazama vrlo nizak postotak homologije (kao primjer prikazano za neke članove M20 porodice u tablici 8 i u dodatku 2), predloženo je da su se biljne auksin-amidohidrolaze razvile konvergentnom evolucijom, a ne iz bakterija⁵⁸.

Evolucijski najraniji homolog auksin-amidohidrolaza koji je biokemijski okarakteriziran poznat je iz jetrenke (*Marcanthia polymorpha*), jedne od najranijih kopnenih biljaka. MpILR1 ima vrlo malu hidrolitičku aktivnost prema IAA-Leu i IPA-Ala, ali nema hidrolitičku aktivnost prema konjugatima IAA-Gly i IAA-Val prirodno prisutnima u *M. polymorpha*⁵⁹. Stoga je opisana kao neefikasna hidrolaza iako sadrži specifičnu očuvanu strukturu za vezanje iona mangana te je autori razmatraju kao preteču auksin-amidohidrolaza u vaskularnim biljkama⁵⁹. Promatranje filogenetskih odnosa homologa auksin-amidohidrolaza, kao i mjesno-specifična mutageneza važnih aminokiselinskih ostataka, dvije su strategije pomoću kojih se nastoji objasniti promiskuitetnost auksin-amidohidrolaza u prepoznavanju i smještanju strukturno različitih supstrata u šupljini aktivnog mjesta, npr. kako je enzim razvio specifičnost prema IBA-Ala, tj. IPA-Ala (kod *B. rapa*⁸, *T. aestivum*⁹, *M. truncatula*¹²²), u odnosu na IAA-Ala (kao kod *A. thaliana*⁶). Zanimljivo je i pitanje kako se tijekom evolucije odvijalo remodeliranje aktivnog mjesta auksin-amidohidrolaza, a koje je omogućilo promjenu preferencije od cinkovih prema manganovim ionima¹³. Iz sravnjenja sekvenci predstavnika M20 porodice peptidaza, odnosno biljnih auksin-amidohidrolaza (slika 17), vidljivo je nekoliko očuvanih motiva.

Promiskuitetnost auksin-amidohidrolaza vjerojatno je proizašla iz promjena u aminokiselinskom slijedu u šupljini aktivnog mjesta i/ili u očuvanim strukturnim motivima, prisutnima u svim predstavnicima M20 porodice, a koje su dovele do finog podešavanja sposobnosti ancestralne auksin-amidohidrolaze za cijepanje različitih supstrata u različitim porodicama kopnenih biljaka².

Zelene biljke (*Viridiplantae*) dijele se na koljeno *Chlorophyta* i infracarstvo *Streptophyta*,

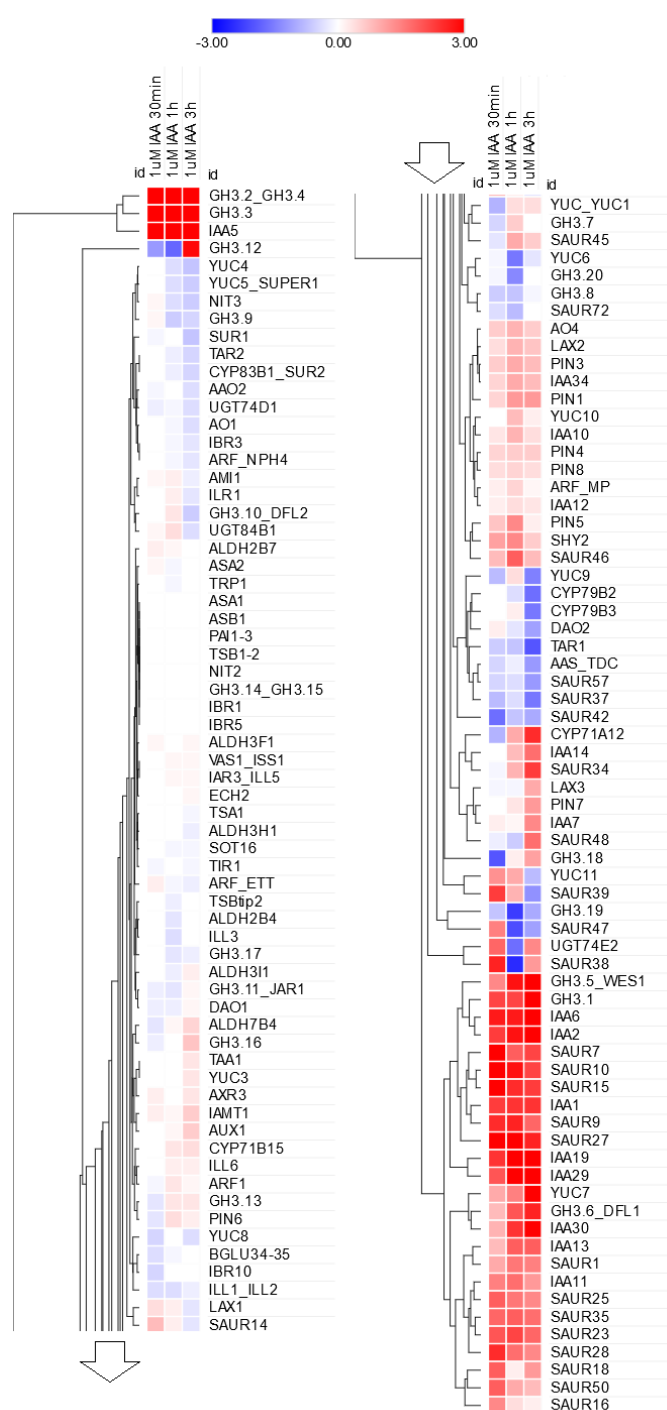


Slika 21. Podjela zelenih biljaka¹¹¹.

koje se sastoji od koljena *Embryophyta* (kopnene biljke) i *Charophyta* (parožine, slatkovodne alge) (slika 21)^{123,124}. Nedavno je opisan genom predstavnika parožina, alge *Klebsormidium flaccidum*¹²⁵ te je zaključeno da sadrži mnoge od gena potrebnih za evoluciju kopnenih biljaka, uključujući gen za auksin-amidohidrolazu, homolog MpILR1 s kojim dijeli 59,5% sličnosti⁵⁹. Pretragom homologa MpILR1 pronađen je čak i homolog enzima ILR1 u cijanobakteriji *Hassalia byssoidea*⁵⁹. Dodatne filogenetske analize zelenih biljaka bit će potrebne da se objasni aktivnost i funkcija pretka auksin-amidohidrolaze. Predloženo je ranije i da je ancestralna auksin-amidohidrolaza bila peptidaza sa sposobnošću cijepanja dipeptida Trp-Asp, strukturno sličnog konjugatu auksina, kao supstrata², međutim reakcija hidrolize dipeptida Trp-Ala u BrILL2 razmatrana modeliranjem čini se nepovoljnom¹²¹. S obzirom da su danas u bazama podataka i druge biljne vrste (npr. projekt analize transkriptoma tisuću biljaka^{126,127}), čini se zanimljivim u budućnosti napraviti filogenetsku analizu drugih biljnih auksin-amidohidrolaza s ciljem uvida u promjene u supstratnoj specifičnosti i vezanju metala, kao i evoluciju te porodice enzima unutar kopnenih biljaka.

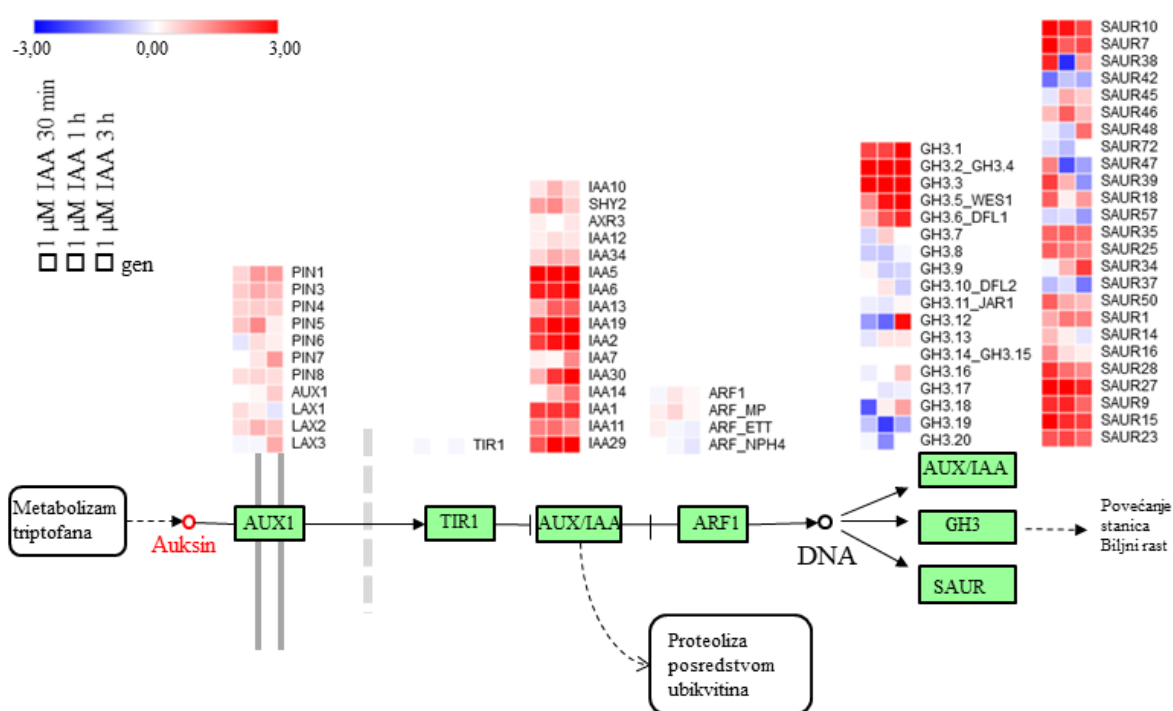
4.1.5. Analiza javno dostupnih podataka o ekspresiji gena uključenih u auksinsku homeostazu

S ciljem uvida u auksinsku homeostazu te promjene u ekspresiji gena *BrILL2* u različitim uvjetima, pretražena je eFP *Expression Browser* baza podataka⁹⁶⁻⁹⁸. Ustanovljeno je da eFP baza sadrži podatke o ekspresiji gena prilikom tretmana različitim biljnim hormonima⁹⁹ i različitim stresorima¹⁰⁰. Naročito je zanimljivo bilo dobiti sliku ekspresije gena uključenih u održavanje auksinske homeostaze pri tretmanu s IAA koncentracije ($c = 1 \mu\text{mol L}^{-1}$) u odnosu na odgovarajuće kontrole. Za pretraživanje eFP *Expression Browser* baze podataka generirana je lista gena prikazana u Dodacima (dodatak 3). Unosom liste gena i odabirom serije podataka za tretmane hormonima (AtGenExpress Hormone Series) u eFP pretraživač, moglo se vrlo jednostavno dobiti podatke očitane s bioloških čipova, koji su za tretman s IAA izvedeni u duplikatu, na 7 dana starim cijelim biljkama (stadij 1¹²⁸). Rezultati su izraženi kao $\log_2$ vrijednosti omjera ekspresije gena od interesa u tretmanu u odnosu na kontrolu u dodatku 3, a iste vrijednosti unesene su u Morpheus alat radi produciranja toplinske mape ekspresije. Dobivena mapa ekspresije prikazana je na slici 22.



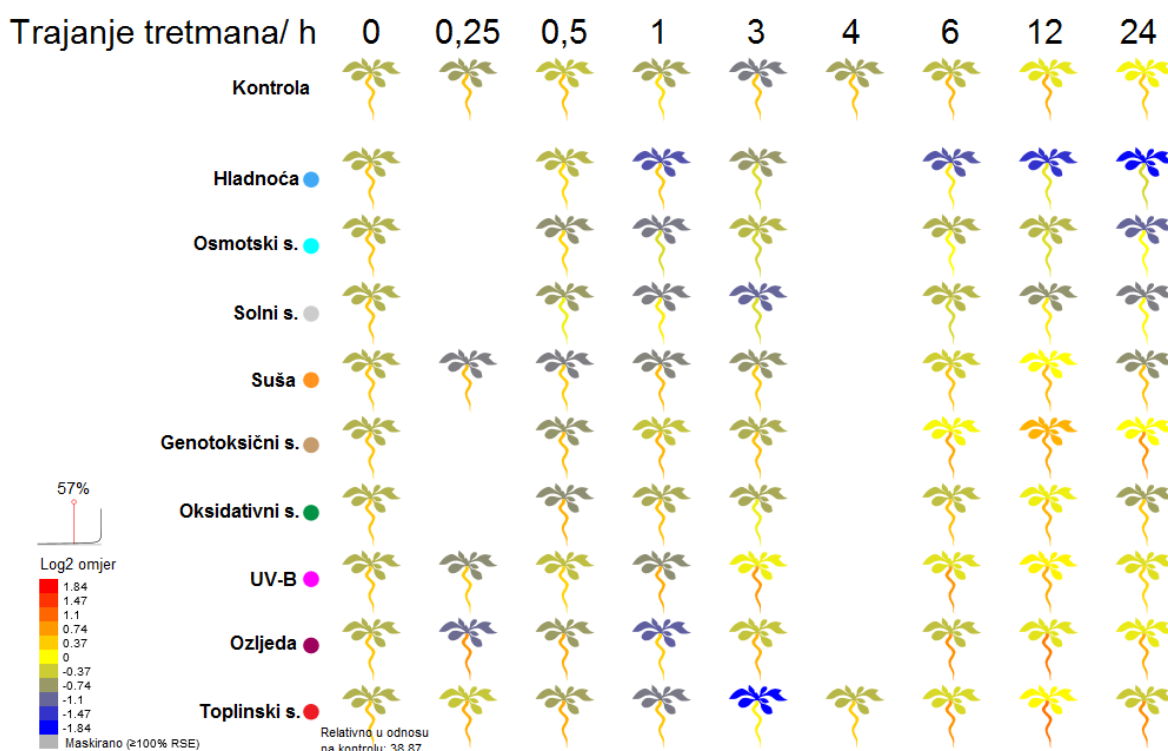
Slika 22. Toplinska mapa ekspresije gena uročnjaka *A. thaliana* uključenih u auksinsku homeostazu pri tretmanu s IAA koncentracije $c = 1 \mu\text{mol L}^{-1}$ u trajanju 30 minuta, 1 h i 3 h. Razina ekspresije obilježena je gradacijom intenziteta boja od jarko plave za smanjenje ekspresije, preko bijele (za nepromijenjenu ekspresiju), do jarko crvene za povećanje ekspresije kao u kazalu. Odgovarajuće vrijednosti $\log_2$ omjera ekspresije gena u tretmanu u odnosu na kontrolu date su u dodatku 3. Ukoliko je $\log_2 = 3$, ekspresija gena je osam puta povećana, a ukoliko je vrijednost $\log_2 = -3$, ekspresija gena je osam puta smanjena. Mapa je generirana u alatu Morpheus uz hijerarhijsko grupiranje metodom „euklidske udaljenosti“.

Radi lakšeg snalaženja također je ista mapa prenesena u shemu auksinske homeostaze prikazanu u uvodu ovog rada (slika 23 i 24). Prilikom pregleda omjera ekspresija, uočeno je da tretman IAA mijenja ekspresiju gena za homeostazu auksina već pri ranom odgovoru u prvih 30 minuta od tretmana. Kao izrazito brzo aktivirani geni pokazali su se geni za auksin-amidosintetaze *GH3.2*, tj. *GH3.4* (*GH3.2* i *GH3.4* detektira ista proba u biološkom čipu) i *GH3.3* čija je ekspresija pri 3 sata tretmana povećana 60,1, tj. 41,1 puta. Ekspresija *GH3.6*, *GH3.5* i *GH3.12* povećava se 6,3, 10,8 i 7,9 puta pri 3 sata tretmana. Ove auksin-amidosintetaze (izuzev *GH3.12*) pripadaju grupi II enzima GH3 za koje je dokazano da koriste IAA kao supstrat^{42,43}. Ovakav mehanizam regulacije putem ekspresije gena *GH3* rezultirao bi u biljkama relativno visokim koncentracijama stanične konjugirane IAA u odnosu na slobodnu IAA¹⁸, što je predloženi mehanizam za održavanje lokalnih auksinskih maksimuma, odnosno auksinskih gradijenata. Zanimljivo, geni za auksin-amidosintetaze grupiraju se zbog sličnog obrasca ekspresije s genima za transkripcijske faktore IAA, npr. *GH3.3* s *IAA5* i s genima za SAUR proteine. Pretraživač eFP (tj. alat *Arabidopsis Genetic Uniqueness and Redundancy Revealer*⁹⁸) navodi da su gen *GH3.3* te gen *IAA5* međusobno zalihosni (redundantni), budući da imaju isti obrazac ekspresije (slika 22, gore lijevo). *IAA5* se eksprimira 94,2 puta više u odnosu na kontrolu pri 1 h tretmana te 46,5 puta više pri 3 h tretmana. Ekspresija gena za biosintezu IAA je ili vrlo blago inducirana pri 30 min i 1 h tretmana ili utišana pri 3 h tretmana. Tretman s IAA prema ovim rezultatima dovodi do utišavanja biosintetskih puteva preko IAOx, IAM i IPyA, jedino se genu *YUC7* povećava ekspresija 8,7 puta pri 3 sata tretmana, dok se ekspresija ostalih gena većinom smanjuje, i to većinom tek pri 3 h tretmana. Može se uočiti da gen *ILL2* ima neznatno smanjenje ekspresije, tj. sve auksin-amidohidrolaze imaju gotovo isti odgovor pri tretmanu, kao i u kontrolnim uvjetima. Hidroliza konjugata auksina očito nema značajan utjecaj na gradijent koncentracija IAA koji se u biljci regulira prilikom djelovanja egzogene IAA. S druge strane, ekspresija gena čiji produkti omogućuju transport IAA van stanice (*PIN1* - *PIN8*) je većinom blago povećana (slika 24), najviše transkripcija gena *PIN5* 2,6 puta, dok je transkripcija gena *LAX* (*AUX1*, *LAX2*, *LAX3*) povećana, ali u maloj mjeri, najviše je uvećana za *LAX2*, 1,86 puta pri 1 h tretmana s IAA.



Slika 24. Učinak tretmana s IAA ($c = 1 \mu\text{mol L}^{-1}$) na gensku ekspresiju nakon 30 min, 1 ili 3 sata tretmana u uročnjaku *A. thaliana*. Porast ekspresije gena za „influx“ te „efflux“ transportere auksina prati porast ekspresije gena za auksin-amidosintetaze GH3 te transkripcijske faktore IAA, kao i većinu prikazanih SAUR proteina.

Utjecaj tretmana IAA na povećanje ekspresije ne samo transportnih proteina za izlazak IAA iz stanica, već i transportnih proteina za ulazak IAA u stanice, ukazuje da se kontrola sadržaja IAA ne događa samo na razini stanice, već i porastom ukupnog transporta auksina kroz tkiva (tzv. auksinske fluktuacije, engl. *auxin flux*). Ova analiza transkripcije gena uključenih u auksinsku homeostazu potvrđuje objavljena zapažanja na analizama transkriptoma *A. thaliana*¹²⁹. Ipak, treba imati u vidu da jedino slika tkivno specifične ekspresije gena ili čak stanične regulacije može dati uvid u pravi odnos procesa koji sudjeluju u održavanju koncentracije IAA na mjestu fiziološkog djelovanja, budući da su ovdje obrađeni podaci genske ekspresije na razini cijele biljke. Ekspresija gena *AtILL2* data u eFP pretraživaču (*Expression angler*) u različitim uvjetima stresa (slika 25) pokazuje jasno razlikovanje odgovora korijena u odnosu na izdanak prilikom primjene različitih stresora.

Abiotiski stres eFP: *At5g56660* / *ILL2*

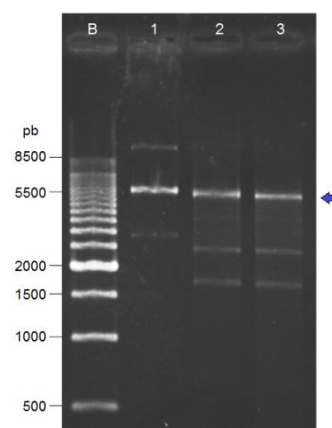
Slika 25. Ekspresija gena *AtILL2* pri različitim uvjetima stresa dobivena u pretraživaču eFP. Ekspresije su prikazane kao $\log_2$ omjeri ekspresije gena u tretmanu u odnosu na kontrolu.

Zaključeno je da se mehanizam održavanja stalne koncentracije endogene IAA prilikom tretmana s IAA ispoljava kroz porast konjugacije IAA s preferencijalnim supstratima gore spomenutih enzima GH3 kao najbrži odgovor na IAA, te kroz utišavanje biosinteze i hidrolize konjugata (konkretno, transkripcija gena za auksin amidohidrolaze *ILL2*, kao i *ILL1*, *ILR1* i *IAR3* je utišana) kao kasniji odgovor na tretman s IAA.

4.2. Biokemijske i biofizičke analize

4.2.1. Uvođenje točkastih mutacija u enzim BrILL2 ciljanom mutagenезom

S ciljem proučavanja uloge aminokiselinskih ostataka Cys139, Cys320, Phe385, Arg295 i Met367 enzima BrILL2, u cDNA enzima divljeg tipa BrILL2 zamijenjeni su kodoni za gore navedene aminokiseline kodonima za Ser139, Ser320, Leu385, Ala295 te Ala367 kreiranjem komplementarnih početnica za uvođenje pripadnih točkastih mutacija te provođenjem reakcije PCR prema uputama kompleta za ciljanu mutagenезu (*QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit*). Produkti reakcije PCR tretirani su restrikcijskim enzimom *DpnI*, koji specifično cijepa metiliranu DNA uklanjajući originalni, nemutirani kalup, tj. plazmid BrILL2, te su provjereni kontrolnim elektroforezama u agaroznom gelu radi potvrde uspješnosti reakcije PCR i tretmana restrikcijskim enzimom (slika 26).

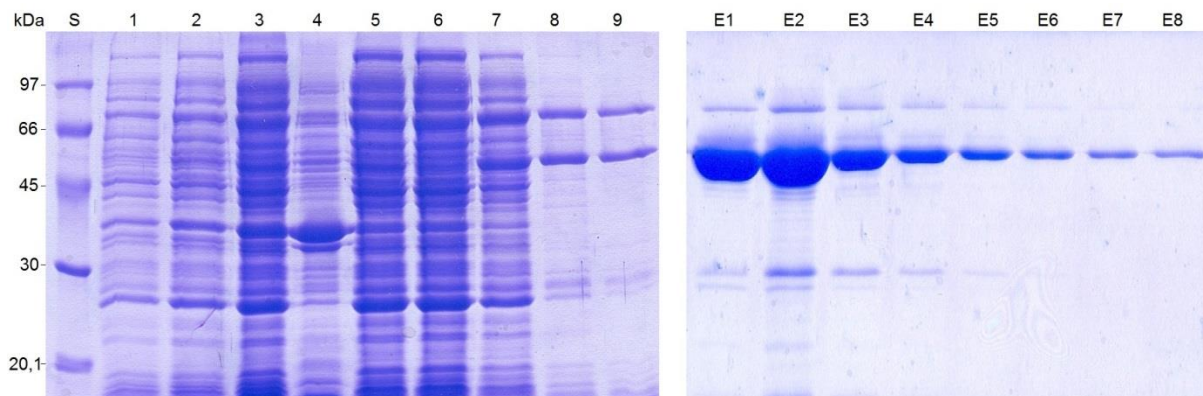


Slika 26. Reprezentativna elektroforeza produkata PCR u 1%-agaroznom gelu. B: Biljezi molekulskih masa (500 bp DNA Ladder, Invitrogen); 1: plazmid s divljim tipom BrILL2; 2: PCR produkt prije tretmana s *DpnI* endonukleazom; 3: PCR produkt nakon tretmana s *DpnI* endonukleazom.

Nakon transformacije bakterijskih stanica XL-10 Gold te izolacije plazmidne DNA, svi plazmidi poslani su u servis za sekvenciranje (Macrogen) te je jednoznačno utvrđeno postojanje mutacije u genu za BrILL2 za svaku od uvedenih točkastih mutacija. Kod proizvodnje dvostruke mutante Cys139,320Ser, za uvođenje točkaste mutacije u Cys320, korišten je za isti postupak ciljane mutageneze već produciran plazmid s uvedenom mutacijom Cys139Ser. Dakle, ukupno je sintetizirano pet plazmida sa mutacijom BrILL2 u jednoj aminokiselini, te jedan plazmid sa mutacijom BrILL2 u dvije aminokiseline.

4.2.2. Proizvodnja i pročišćavanje rekombinantnih proteina, divljeg tipa i mutanti BrILL2 heterolognom ekspresijom u *E. coli*

Tijekom izrade ovog rada, napravljeno je nekoliko uzgoja i pročišćavanja rekombinantnih proteina BrILL2 i mutanti. Rekombinantni protein prilikom svakog uzgoja je prekomjerno eksprimiran u *E. coli* te pročišćen afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu te dijalizom, a uzorci su analizirani elektroforezom u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima (slika 27). Utvrđeno je da su uvjeti ekspresije povoljni te da ne dolazi do taloženja proteina u inkluzijska tijela (slika 27, linija 4). Prosječan prinos proteina BrILL2 iznosio je 1,63 mg po 1 g biomase bakterija, odnosno 4,24 mg po litri ekspresijske kulture bakterija. Eluiranim uzorcima proteina provjerena je čistoća denzitometrijom upotrebom programa Syngene GeneTools te je utvrđeno da je sadržaj proteina specifične mase oko 48 kDa od 85-95% ukupnih proteina u eluatu. Nešto proteina zaostajalo je u ispiranjima, ali to nije utjecalo na konačan ishod afinitetne kromatografije. Uočeno je da se gotovo u svim uzorcima s proteinom odgovarajuće mase od oko 48 kDa, koeluira protein mase oko 80 kDa.

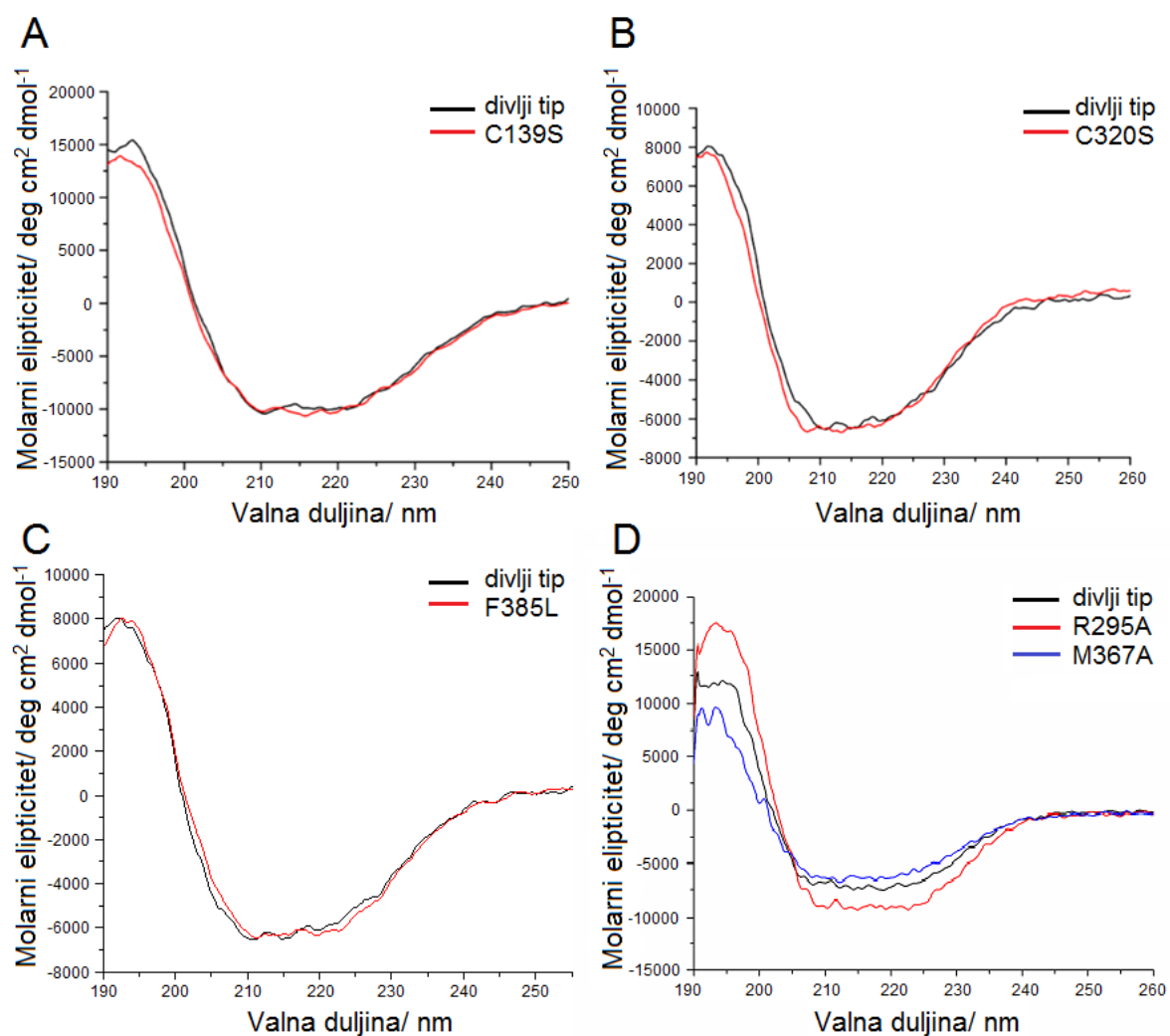


Slika 27. Elektroforetska slika tijeka pročišćavanja rekombinantnog proteina BrILL2 divljeg tipa dobivena elektroforezom u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima. S - standardi molekulskih masa, 1 - kultura *E. coli* prije indukcije sinteze proteina IPTG-om, 2 - kultura *E. coli* nakon indukcije IPTG-om, 3 - lizat *E. coli* po djelovanju DNazom I, 4 - talog lizata *E. coli* nakon tretmana DNazom I i centrifugiranja, 5 - nadtalog lizata *E. coli* nakon tretmana DNazom I i centrifugiranja, 6 - nadtalog iz 5 propušten kroz kolonu Ni-NTA agaroze, 7-9 - ispiranja kolone, E1-E8 - sakupljeni eluati s proteinom. Analogna slika dobivena je za pročišćavanje mutanti.

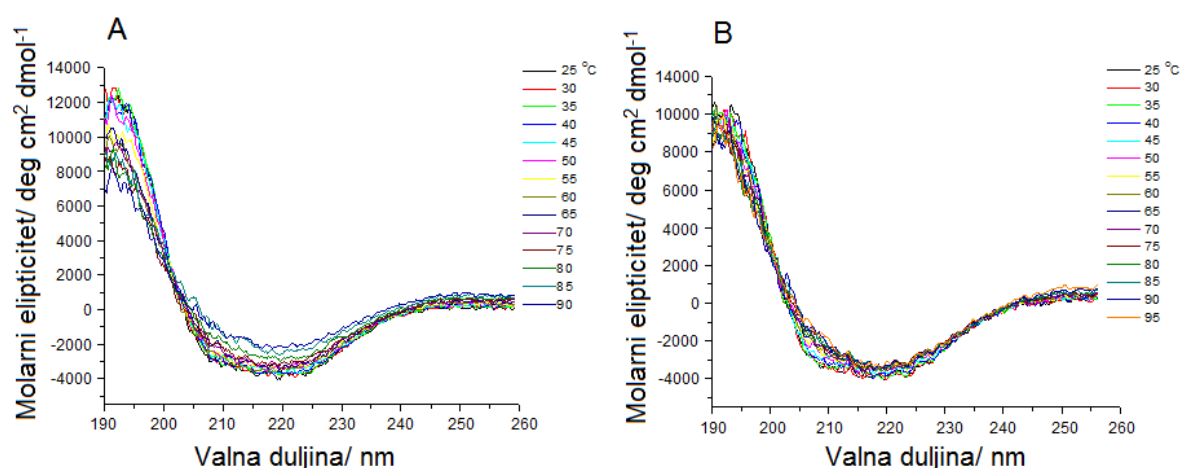
4.2.3. Cirkularni dikroizam - očuvanost strukture mutanti BrILL2 u odnosu na divlji tip enzima

Očuvanost sekundarne strukture proizvedenih mutanti u odnosu na divlji tip enzima BrILL2 provjerena je mjerenjem cirkularnog dikroizma. Uočeno je da mutacije Cys139Ser, Cys320Ser te Phe385Leu ne dovode do promjena sekundarne strukture proteina u odnosu na divlji tip enzima BrILL2 (slika 28A, B i C). U ovim mutantama zadržava se gotovo istovjetan udio α -uzvojnica kao i kod divljeg tipa enzima. Zaključeno je da promjene u aktivnosti mutanti stoga vjerojatno nisu rezultat pertubacije strukture enzima. Mutante Met367Ala te Arg295Ala pokazuju promjene u sekundarnoj strukturi po kojima se razlikuju od divljeg tipa enzima, i to u Arg295Ala dolazi do povećanja udjela α -uzvojnica, dok kod Met367Ala dolazi do smanjenja udjela α -uzvojnica (slika 28D). Stoga u mutantama Arg295Ala i Met367Ala nije očuvana sekundarna struktura u odnosu na divlji tip enzima. Eventualne promjene u stabilnosti tih mutanti dodatno su ispitane diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom. Udio α -uzvojnica uzet je na osnovu procjene odziva pri 208 nm, kao i pri drugom minimumu karakterističnom za α -uzvojnice pri 222 nm¹³⁰. Zbog ograničenja instrumenta, mjerenje cirkularnog dikroizma nije obavljeno u dalekom dijelu UV-spektra od 170 - 190 nm, a koji bi bilo potrebno razmotriti radi preciznijeg određivanja odnosa sekundarnih struktura¹³⁰.

Uočene su neke diskrepancije između procijenjenih odnosa sekundarnih struktura BrILL2 i mutanata s jedne strane, te objavljenih udjela u strukturama homologa AtILL2 (PDB šifre 1xmb¹³ i 2q43¹¹³) s druge strane. Udio α -uzvojnica u strukturi AtILL2 (1xmb) je 35%, a udio β -ploča 24%, (33% i 24% u strukturi 2q43). Udjeli α -uzvojnica u BrILL2 iznosili su 19,1 – 28,7% te je uočeno da udio α -uzvojnica opada, dok udio β -ploča raste s vremenom čuvanja pročišćenog proteina na 4 °C. Zapažanje se podudaralo i s eksperimentalnim nalazima analize aktivnosti enzima koji su pokazali da BrILL2 dugotrajnim pohranjivanjem na 4 °C postupno gubi aktivnost i precipitira u talog. Ovakva nestabilnost proteina te uočena precipitacija čak i pri koncentracijama enzima nižima od 1 mg mL⁻¹, kao i prisutnost dvaju očuvanih cisteinskih ostataka koji su potencijalno podložni oksidaciji, navodili su na daljnje istraživanje mogućnosti stabilizacije enzima djelovanjem redukcijskih agenasa. Određivanje temperaturne stabilnosti divljeg tipa enzima sa i bez dodatka redukcijskog agensa DTT nije dalo jasne rezultate s obzirom da nije bilo moguće jednoznačno odrediti temperaturu mekšanja (slika 29). Ipak, uočeno je da dodatak DTT dovodi do stabilizacije divljeg tipa enzima pri višim temperaturama.



Slika 28. Usporedba spektara cirkularnog dikroizma BrILL2 divljeg tipa i mutanti: A) Cys139Ser, B) Cys320Ser, C) Phe385Leu, te D) Arg295Ala i Met367Ala.



Slika 29. Temperaturna stabilnost divljeg tipa enzima BrILL2 mjerena spektrometrom cirkularnog dikroizma. A) Zagrijavanje u temperaturnom rasponu od 25 do 95 °C primjenjeno na enzim BrILL2 koncentracije $\gamma = 2 \text{ mg mL}^{-1}$ te B) na enzim BrILL2 koncentracije $\gamma = 1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ uz dodatak DTT koncentracije $c = 1 \text{ mmol L}^{-1}$.

4.2.4. Određivanje specifične aktivnosti i kinetičkih parametara enzima divljeg tipa i mutanti

U Laboratoriju za kemijsku biologiju prije izrade ovog doktorskog rada ustanovljeno je da BrILL2 enzim za aktivnost treba prisutnost reduksijskog agensa, kao i metalni kofaktor⁸. Budući da je prethodno opisano sravnjivanje i modeliranje, baš kao i predloženi model aktivnog mjesta⁸, upućivalo na važnost očuvanog cisteinskog ostatka Cys139 u aktivnosti enzima, u ovome doktorskome radu ispitana je njegova uloga u regulaciji aktivnosti BrILL2 te je proizvedena mutanta u kojoj je cistein zamijenjen serinom u predloženom aktivnom mjestu katalitičke domene⁸. Još jedan cisteinski ostatak, Cys320, također je očuvan u svim biljnim auksin-amidohidrolazama, izuzev okarakterizirane PpIAR3 (slika 17 i dodatak 1).

Važnost cisteinskih ostataka u aktivnosti enzima BrILL2 prvo je uočena prilikom predtretmana enzima BrILL2 divljeg tipa jodovim acetamidom. Tim tretmanom enzim BrILL2 divljeg tipa ireverzibilno je izgubio aktivnost. Iako se prema modeliranju, Cys320 nalazi udaljen od aktivnog mjesta u manjoj satelitnoj domeni, tretman jodovim-acetamidom te posljedični gubitak aktivnosti enzima, ukazivao je da se mora proučiti uloga i tog aminokiselinskog ostatka. Kako je spektrometrija cirkularnog dikroizma pokazala da se mutacijama obaju cisteinskih ostataka nije izazvalo narušavanje strukture enzima, nadalje se odredila specifična aktivnost enzima. Enzim BrILL2 je uvođenjem mutacije Cys139Ser potpuno izgubio aktivnost. Mutanta Cys320Ser ima oko 50% manju specifičnu aktivnost od divljeg tipa BrILL2 prema preferiranom supstratu IPA-Ala (tablica 10). Nadalje, za divlji tip

enzima te aktivnu mutantu Cys320Ser provedena su mjerenja enzimске kinetike (tablica 10). Vrijednost Michaelisove konstante K_m za mutantu je gotovo ista kao i za divlji tip BrILL2, dok je katalitička konstanta k_{cat} niža od iste za divlji tip 1,6 puta. Katalitička efikasnost enzima, opisana kroz omjer k_{cat}/K_m , niža je oko 38% za mutantu Cys320Ser u odnosu na divlji tip enzima. Zaključeno je da mutacija Cys320Ser utječe na aktivnost enzima neovisno o udaljenosti od aktivnog mjesta te je nadalje istražena uloga aminokiselinskog ostatka Cys320 i rezultati su opisani u sljedećem poglavlju (4.2.5).

Tablica 10. Kinetički parametri za enzim BrILL2 divljeg tipa (BrILL2wt), mutante Cys139Ser i Cys320Ser te dvostruku mutantu Cys139,320Ser. Enzimске reakcije su izvedene sa supstratom IPA-Ala raspona koncentracija $c = 0,2$ do $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Koncentracija proteina u reakcijama bila je $c = 2,008 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija. n.d. - nije detektirano.

Protein	Specifična aktivnost/ $\text{nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$	$V_m /$ $\text{nmol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$	$K_m /$ mmol L^{-1}	$k_{cat} /$ min^{-1}	$k_{cat} / K_m /$ $\text{mmol}^{-1} \text{ L}^{-1} \text{ min}^{-1}$
BrILL2wt	2261 ± 320	$31,6 \pm 5$	$0,61 \pm 0,30$	157 ± 25	258,4
Cys139Ser	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cys320Ser	1143 ± 18	$19,5 \pm 2$	$0,59 \pm 0,18$	97 ± 11	163,7
Cys139,320Ser	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

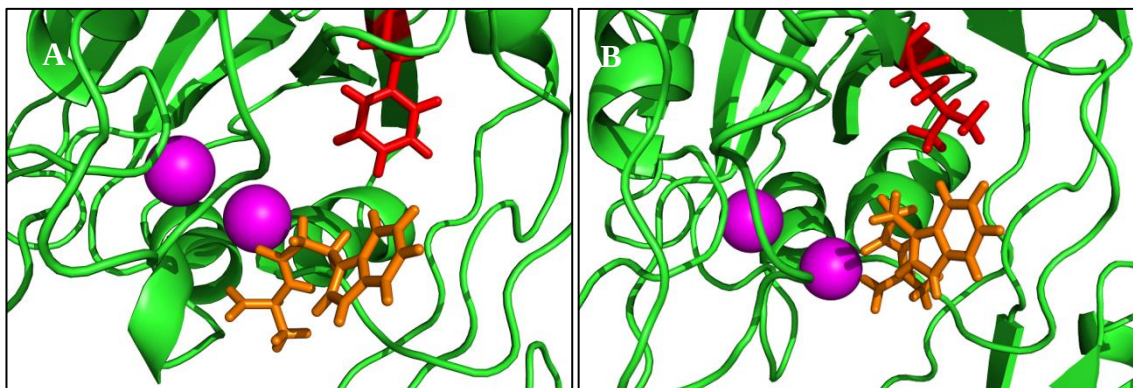
Specifične aktivnosti mutanti Phe385Leu, Arg295Ala te Met367Ala, također su određene klasičnim enzimskim testom⁸ (tablica 11). Iako se struktura mutante Phe385Leu očuvala u odnosu na divlji tip enzima, mjerenje specifične aktivnosti za tu mutantu pokazalo je da ima 27 puta slabiju aktivnost prema supstratu IPA-Ala, te 36 puta slabiju aktivnost prema IBA-Ala. Očekivano, mutante Arg295Ala i Met367Ala, s obzirom na narušavanje strukture utvrđene spektrometrijom cirkularnog dikroizma, nisu hidrolizirale navedene supstrate.

Tablica 11. Specifične aktivnosti divljeg tipa enzima (BrILL2wt) i mutanti Phe385Leu, Arg295Ala i Met367Ala. Enzimske reakcije su izvedene sa supstratom koncentracije $c = 0,5 \text{ mmol L}^{-1}$. Koncentracija proteina u reakcijama sa supstratom IPA-Ala bila je $c = 4,016 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, sa supstratom IBA-Ala bila je $c = 1,004 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, a sa supstratom IAA-Ala $c = 2,008 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška (SE). n.d. - nije detektirano.

Protein	Specifična aktivnost prema IPA-Ala/ $\text{nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$	Specifična aktivnost prema IBA-Ala/ $\text{nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$	Specifična aktivnost prema IAA-Ala/ $\text{nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$
BrILL2wt	3061 ± 260	1165 ± 750	34 ± 8
Phe385Leu	$112,5 \pm 25,0$	$32,5^*$	n.d.
Arg295Ala	n.d.	n.d.	n.d.
Met367Ala	n.d.	n.d.	n.d.

*utvrđeno jednim mjerenjem.

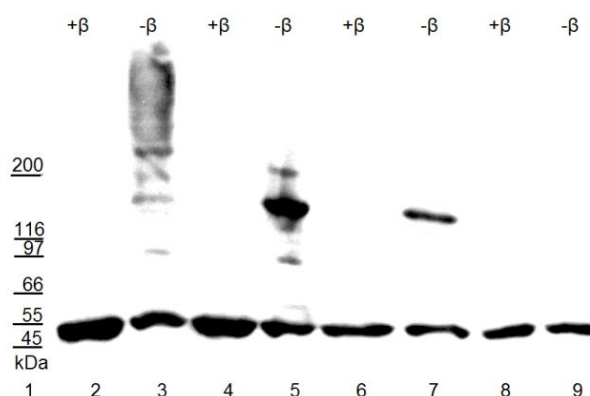
Zaključujem da aminokiselinski ostatak Phe385 ima važnu ulogu u aktivnosti enzima, vjerojatno stabilizacijom vezanja supstrata (slika 30), odnosno kako sam predložila u raspravi o važnim aminokiselinskim ostacima, stabilizacijom indolnog prstena supstrata. Modeliranje aktivnog mjesta divljeg tipa izvedeno je u radu Smolko i sur.⁹², a preliminarno modeliranje mutante Phe385Leu izvela je dr. sc. Marina Grabar-Branilović. Indolni prsten supstrata IPA-Ala najvjerojatnije ostvaruje π - π interakcije s Phe385, potencijalno je interakcija T-oblika¹³¹ prema rezultatima dosadašnje simulacije molekularne dinamike u trajanju 89 ns (neobjavljeni podaci). Ovaj rezultat potvrđuje dosadašnje pretpostavke o topologiji aktivnog mjesta¹²¹, prema kojima bi se IPA-Ala u aktivno mjesto smještao u hidrofobni džep koji čine Phe385, His199, Asn202 te Arg203. Pri tome indolna grupa supstrata ostvaruje H- π te π - π interakcije s Arg203 i Asn202 (uz iznimku IAA-Ala koji ne ostvaruje u tom načinu vezanja interakciju s Arg203). U tom pretpostavljenom načinu, indolna grupa IPA-Ala ostvaruje π - π interakcije s Phe385. Stoga zaključujem da mutacija Phe385Leu dovodi do destabilizacije pogodnih interakcija slaganja te istiskivanje supstrata iz aktivnog mjesta. Dobiveni rezultati mjerenja specifične aktivnosti mutante Phe385Leu u ovom doktorskom radu ne ukazuju da fenilalaninski ostatak ima ulogu u razlikovanju duljine alifatskog lanca supstrata, tj. u promjeni supstratne specifičnosti karakterističnoj za BrILL2⁸.



Slika 30. Interakcija supstrata IPA-Ala (narančasto) s Phe385 (crveno) u aktivnom mjestu enzima: A) divljeg tipa te B) s Leu385 (crveno) u mutanti Phe385Leu.

4.2.5. Uloga cisteinskih ostataka u oligomerizaciji enzima

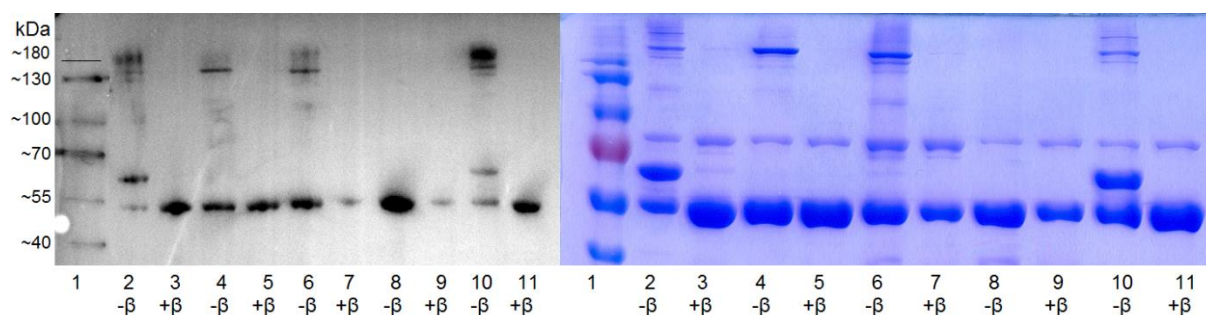
Budući da je mutacija aminokiselinskog ostatka Cys320, unatoč udaljenosti tog ostatka od aktivnog mjesta, utjecala na aktivnost enzima, istraživanje se usmjerilo na ulogu koju ima u regulaciji enzimске aktivnosti. Poznato je na osnovu prijašnjih vlastitih rezultata i rezultata ostalih autora da su auksin-amidohidrolaze aktivne u formi monomera⁶⁻⁹. U odsutnosti redukcijskog sredstva, pretpostavila sam da je enzim BrILL2 sklon stvarati dimere ili čak više oligomere, koji nisu aktivni u klasičnom enzimskom testu *in vitro*⁸. Da bi se istražila uloga cisteinskih ostataka u formiranju oligomera, primjenjena je elektroforeza u gradijentu poliakrilamidnog gela te *Western*-hibridizacijska analiza upotrebom anti-His protutijela na divljem tipu enzima, jednostrukim mutantama Cys139Ser, Cys320Ser te na dvostrukoj mutanti Cys139,320Ser. Enzimi divljeg tipa i mutante uspoređeni su na osnovu potencijala za polimerizaciju u reducirajućim nasuprot nereducirajućim uvjetima, tj. sa i bez tretmana reducirajućim sredstvom (β -merkaptetanolom) neposredno prije elektroforeze (slika 31).



Slika 31. Pročišćeni svježe pripremljeni rekombinanti enzimi BrILL2 (divljeg tipa i mutante) nakon predtretmana reducirajućim sredstvom (oznaka + β) (β -merkaptotanolom) ili bez njega (oznaka - β) te nakon razdvajanja SDS-PAGE-elektroforezom u linearnom gradijentu poliakrilamidnog gela (4 – 20%) i prijenosa na PVDF membranu. Proteini su vizualizirani kemiluminiscencijom po inkubaciji s anti-His protutijelom te sa sekundarnim protutijelom konjugiranim na peroksidazu iz hrena. 1 - standardi molekulskih masa, 2-3 - enzim BrILL2 divljeg tipa; 4-5 - mutanta Cys139Ser; 6-7 - mutanta Cys320Ser; 8-9 - mutanta Cys139,320Ser. Slika je prenesena iz rada Smolko i sur.²⁹ Naneseno je 5 μ g proteina (2-5), odnosno 4 μ g proteina (6-9).

Iz slike 31 je vidljivo da rekombinantni enzim BrILL2 divljeg tipa u nereducirajućim uvjetima stvara dimere, trimere i više oligomere. Slično tome, jednostruke mutante Cys139Ser te Cys320Ser sposobne su stvarati dimere i oligomere (trimere i tetramere) u manjoj mjeri od divljeg tipa, dok ta sposobnost kod dvostruke mutante Cys139,320Ser nije prisutna. Slični rezultati dobivani su u više neovisnih eksperimenata (slika 32). Na slici 32 prikazani su rezultati ponovljenog eksperimenta s proteinima čuvanima na -80°C , gdje je uočljivo da je udio dimera manji s vremenom pohranjivanja čak i na -80°C , dok i dalje enzim divljeg tipa i jednostruke mutante zadržavaju sposobnost stvaranja oligomera viših molekulskih masa od dimera intermolekularnim disulfidnim vezama. Interpretacija stvaranja disulfidnih veza putem stvaranja viših oligomera treba se sagledati u vidu saznanja da disulfidne veze rekombinantnih proteina izoliranih iz *E. coli* mogu nastati u tijeku pročišćavanja u aerobnim uvjetima te ih stoga treba oprezno uspoređivati s potencijalom za takvu ulogu *in vivo*¹³². Npr. istraživanje difosfomevalonat dekarboksilaze iz termofilne arheje *Sulfolobus solfataricus* ukazivalo je na formiranje intermolekularne disulfidne veze za koju je pretpostavljeno da nastaje tijekom postupka pročišćavanja proteina, te da ne može biti svojstvena samome rekombinantnom enzimu eksprimiranom u reducirajućem citosolu bakterije *E. coli*, gdje se

disulfidne veze rijetko stvaraju¹³². Ipak, uspješno su dokazali *Western*-hibridizacijskom tehnikom da se dimerizacija događa *in vivo* u lizatu stanica arheje. Tek nedavno su u sklopu HRZZ projekta PhytoBraCro proizvedene linije nadekspresora enzima BrILL2 u *A. thaliana* pod kontrolom konstitutivnog 35S promotora, te bi svakako trebalo ispitati svojstvo dimerizacije/ oligomerizacije proteina dobivenog ekspresijom u biljnom sustavu.



Slika 32. Pročišćeni rekombinanti enzimi BrILL2 (divljeg tipa i mutante), pohranjeni na -80°C te ispitani nakon predtretmana reducirajućim sredstvom (oznaka + β) (β -merkaptanolom) ili bez njega (oznaka $-\beta$) te nakon razdvajanja SDS-PAGE-elektroforezom u poliakrilamidnom gelu (12% T) - desno i prijenosa na PVDF membranu - lijevo. Proteini su vizualizirani analogno slici 31. 1 - standardi molekulskih masa, 2-3 - enzim BrILL2 divljeg tipa; 4-5 - mutanta Cys139Ser; 6-7 - mutanta Cys320Ser; 8-9 - mutanta Cys139,320Ser; 10-11 - mutanta Phe385Leu upotrebljena kao dokaz da je uočena polimerizacija isključivo vezana uz cisteinske ostatke. Naneseno je 2,5 μg proteina po uzorku.

Postojanje intramolekularne disulfidne veze u slučaju enzima BrILL2 nije izgledno. Za očekivati bi bilo da u tom slučaju pri elektroforezi proteina dolazi do retardacije reducirane forme enzima u odnosu na oksidiranu formu, kao što je npr. primjećeno u slučaju kvašćeve mitohondrijske fenilalanin-tRNA sintetaze¹³³. Da je opaženo formiranje disulfidnih veza u BrILL2 reverzibilno, ukazuje povratak aktivnosti po dodatku reducirajućeg sredstva. Ireverzibilna oksidacija cisteinskih tiolnih grupa može dovesti do inaktivacije enzima i stanične smrti¹³⁴. Stanice općenito sprječavaju disbalans u homeostazi redoks procesa koji bi doveo do oksidacije reaktivnih tiolnih skupina pomicanjem ravnoteže tiol-disulfid prema formiranju disulfida¹³³. Važno je naglasiti kako je formiranje disulfidnih veza u proteinima ovisno o vrijednosti pK_a bočnog lanca cisteina, a koja pak ovisi o redoks potencijalu okoliša, tj. medija. Budući da se BrILL2 lokalizira u endoplazmatskom retikulumu čiji je pH oko 7,5¹³⁵, za očekivati bi bilo da su tiolne skupine cisteinskih ostataka u staničnom okruženju

podložnije formiranju tiolatnih anionskih skupina (u stanju $-RS^-$), čime postaju prikladni za formiranje disulfidnih mostova¹³⁶.

4.2.6. Aktivacija enzima BrILL2 uz prisustvo različitih prirodno prisutnih redukcijskih agenasa

Da bi se dokazala učinkovitost potencijalnih prirodno prisutnih redukcijskih agenasa, poput reduciranog glutationa, askorbinske kiseline i aminokiseline cisteina, na aktivaciju enzima BrILL2, izmjerena je specifična aktivnost enzima BrILL2 i jednostrukih cisteinskih mutanti uz dodatak različitih redukcijskih agenasa (tablica 12).

Tablica 12. Specifične aktivnosti divljeg tipa enzima (BrILL2wt) i mutanti Cys139Ser, Cys320Ser te dvostruke mutante Cys139,320Ser uz dodatak odabranih redukcijskih agenasa. Enzimske reakcije su izvedene sa supstratom IPA-Ala koncentracije $c = 0,5 \text{ mmol L}^{-1}$. Koncentracija proteina u reakcijama sa supstratom IPA-Ala bila je $c = 3,012 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška. n.d. - nije detektirano.

Redukcijska sredstva	Specifična aktivnost enzima BrILL2 prema IPA-Ala/ $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$		
	BrILL2wt	Cys320Ser	Cys139Ser
bez red. agensa	n.d.	n.d.	n.d.
DTT ($c = 1 \text{ mmol L}^{-1}$)	$1,87 \pm 0,19$	$1,64 \pm 0,67$	n.d.
DTT ($c = 10 \text{ mmol L}^{-1}$)	$2,10 \pm 0,83$	$1,98 \pm 0,81$	n.d.
β -MeOH ($c = 1 \text{ mmol L}^{-1}$)	$1,55 \pm 0,70$	$1,62 \pm 1,10$	n.d.
Glutation ($c = 1 \text{ mmol L}^{-1}$)	$1,13 \pm 0,41$	$0,07 \pm 0,03$	n.d.
Askorbinska kis. ($c = 1 \text{ mmol L}^{-1}$)	$0,99 \pm 0,66$	$0,16 \pm 0,07$	n.d.
Askorbinska kis. ($c = 10 \text{ mmol L}^{-1}$)	$0,44 \pm 0,28$	$1,27 \pm 0,82$	n.d.
Cistein ($c = 1 \text{ mmol L}^{-1}$)	$1,24 \pm 0,85$	$1,63 \pm 0,38$	n.d.
Cistein ($c = 10 \text{ mmol L}^{-1}$)	$1,77 \pm 0,89$	$1,24 \pm 0,51$	n.d.
Jodov acetamid ($c = 25 \text{ mmol L}^{-1}$)	n.d.	n.d.	n.d.

Kao što je vidljivo u tablici 12, glutation, askorbinska kiselina i cistein jednako potentno aktiviraju enzim BrILL2, kao i DTT te β -merkaptotanol, koji su često korišteni rutinski u enzimskim testovima *in vitro*. Ovi rezultati su u skladu s mjerenjem enzimske kinetike

BrILL2 divljeg tipa i cisteinskih mutanti. Većina izmjerenih specifičnih aktivnosti podupire uočenu slabiju aktivnost mutante Cys320Ser u odnosu na divlji tip enzima. Oba su tipa enzima BrILL2wt i Cys320Ser reverzibilno inaktivirana u odsustvu redukcijskog agensa, te oba gube aktivnost ireverzibilno alkilacijom s jodovim acetamidom.

Prema ovim rezultatima, treba razmotriti moguću regulaciju aktivnosti auksin-amidohidrolaza *in vivo* djelovanjem reducensa u biljnim stanicama, kao što su gore spomenuti askorbat, glutation ili cistein. Primjeri za to već postoje u biljkama kod skladišnih proteina u sjemenkama koji prolaze kroz redoks izmjene tijekom razvoja i klijanja¹³⁶. Skladišni proteini u sjemenu sintetiziraju se u reduciranom obliku na ER-u, zatim se prevode u forme s disulfidnim vezama tijekom sazrijevanja i sušenja sjemenki, a prilikom klijanja opet se mobiliziraju vraćanjem u reducirano stanje¹³⁶. Stanična redoks homeostaza također je ključna za regulaciju aktivnosti P-proteina (glicin dekarboksilaze) iz cijanobakterije *Synechocystis* sp. PCC 6803¹³⁷. Pri tome, redoks status stanice regulira formiranje homodimera stvaranjem disulfidne veze, čime se izolira aktivno mjesto enzima od okolnog otapala i onemogućava vezanje supstrata. Na taj način disulfidna veza u homodimeru stabilizira zatvorenu konformaciju enzima¹³⁷.

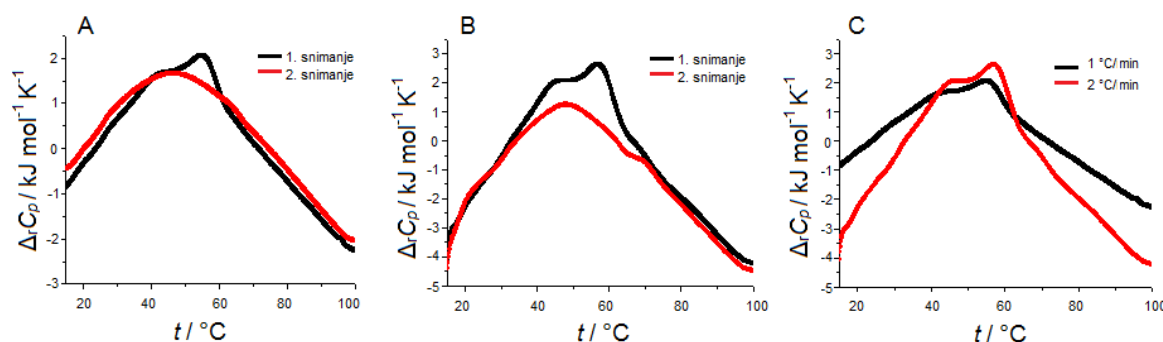
Na temelju dobivenih rezultata pretpostavljeno je da ostatak Cys320 ima ulogu u stabilizaciji enzima. Tome u prilog ide činjenica da je uočeno da mutanti Cys320Ser opada aktivnost nakon pročišćavanja s vremenom čuvanja (neprikazani podaci). Nastojeći doznati više informacija o stabilnosti enzima BrILL2 u reducirajućim, odnosno nereducirajućim uvjetima, provedena je diferencijalna pretražna kalorimetrija.

4.2.7. Mjerenje stabilnosti enzima diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom (DSC)

Da bi se provjerio utjecaj redukcijskog stanja enzima BrILL2 na promjene u njegovoj stabilnosti, provedena je diferencijalna pretražna kalorimetrija na divljem tipu enzima BrILL2 te jednostrukim cisteinskim mutantama Cys139Ser i Cys320Ser. Dodatno je ispitana stabilnost mutanti Arg295Ala i Met367Ala, budući da su mjerenja specifične aktivnosti, kao i snimanje spektara cirkularnog dikroizma pokazali da su mutante neaktivne, te da su im narušene sekundarne strukture.

Denaturacija enzima BrILL2 pokazala se termodinamički ireverzibilnom, budući da ponovljena snimanja termograma iste otopine proteina, ili pri drugoj brzini zagrijavanja, ne

daju identične krivulje (slika 33). Proces denaturacije izgledno je blago kinetički kontroliran (slika 33A), tako da je analiza termograma putem ravnotežne termodinamike isključena.



Slika 33. A) Reprezentativni DSC termogrami enzima BrILL2 divljeg tipa pri brzini zagrijavanja od 1 °C min⁻¹ te pri prvom i drugom snimanju iste otopine. B) Reprezentativni DSC termogram enzima BrILL2 divljeg tipa pri brzini zagrijavanja od 2 °C min⁻¹ te pri prvom i drugom snimanju iste otopine. C) Usporedba termograma enzima BrILL2 divljeg tipa pri brzini zagrijavanja od 1 °C min⁻¹ i 2 °C min⁻¹.

Temperature termičke tranzicije, tj. temperature mekšanja pri kojima dolazi do razmatanja 50% enzima određene su iz krivulja termograma i date u tablici 13. Temperatura mekšanja (T_m) za enzim BrILL2 divljeg tipa u nereducirajućim uvjetima iznosila je 56,4 °C. Točkasta mutacija Cys139Ser nije dovela do promjene T_m , dok je mutacija Cys320Ser dovela do smanjenja iste za oko 3 °C. Ovi rezultati potvrđuju prethodno opisane biokemijske karakterizacije enzima BrILL2, prema kojima je mutanta Cys320Ser manje stabilna od enzima divljeg tipa i mutante Cys139Ser u nereducirajućim uvjetima. Sve varijante enzima BrILL2, divlji tip i cisteinske mutante imaju niže T_m po dodatku reducirajućeg agensa, iz čega slijedi da nastupa destabilizacija proteina pri redukciji disulfidnih veza (tablica 13). Destabilizacija enzima potvrđena je *in vitro* pri brojnim pokušajima pročišćavanja enzima BrILL2 u monomernoj formi, tj. uz dodatak reducensa. Međutim, prisustvo redukcijskog sredstva u cijelom postupku izolacije i pročišćavanja enzima, što podrazumijeva da je enzim stalno u monomernoj formi, uzrokuje inaktivaciju enzima. Također, izmjerena vrijednost $\Delta_r H$ za mutantu Cys320Ser značajno je niža u odnosu na istu za divlji tip enzima i mutantu Cys139Ser, kako u reduciranoj formi monomera, tako i u formi oligomera u nereducirajućim uvjetima. Ovi rezultati u skladu su s rezultatima na enzimu alantoat amidohidrolazi koja tvori homodimere, ali je aktivna samo u monomernoj formi¹³⁸. Međutim, uz dodatak reducensa enzim je stabilan i aktivan kroz otprilike 2 h, a zatim postepeno gubi aktivnost¹³⁸.

Rezultati dobiveni u ovom radu sugeriraju da je formiranje neaktivnih polimera enzima BrILL2 disulfidnim vezama putem oba cisteinska ostatka, mehanizam kojim se regulira

enzimska aktivnost. Prema dosadašnjim opisanim rezultatima ostatak Cys139 ključan je za enzimsku aktivnost, dok je ostatak Cys320 važan za stabilnost enzima. Predložena regulacija enzimске aktivnosti također se potencijalno ostvaruje *in vivo*, jer je BrILL2 aktivan u monomernoj formi, ali takva forma je vrlo nestabilna, te ima tendenciju stabilizacije stvaranjem polimera, koji se pak po potrebi u stanici disociraju u prisutnosti prirodnih reducensa.

Tablica 13. DSC parametri izmjereni za enzim BrILL2 divljeg tipa i mutante uz dodatak (+β) ili odsustvo (-β) β-merkaptioetanol koncentracije $c = 5 \text{ mmol L}^{-1}$ kao reducirajućeg sredstva, snimljeni tijekom zagrijavanja od 25 do 90 °C brzinom od 1 °C min⁻¹. n.d. - nije detektirano, n.k. – nije kvantificirano.

Enzim	$T_m / ^\circ\text{C}$	$\Delta_r H / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta_r S / \text{J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$
divlji tip -β	56,4	60,6	183,7
divlji tip +β	54,4	89,9	273,5
Cys139Ser -β	56,8	93,8	284,3
Cys139Ser +β	55,2	n.d.	n.d.
Cys320Ser -β	53,4	59,6	182,4
Cys320Ser +β	52,2	16,8	51,6
Arg295Ala	69,64 ± 0,69	n.k.	n.k.
Met367Ala	44,49 ± 1,21	n.k.	n.k.

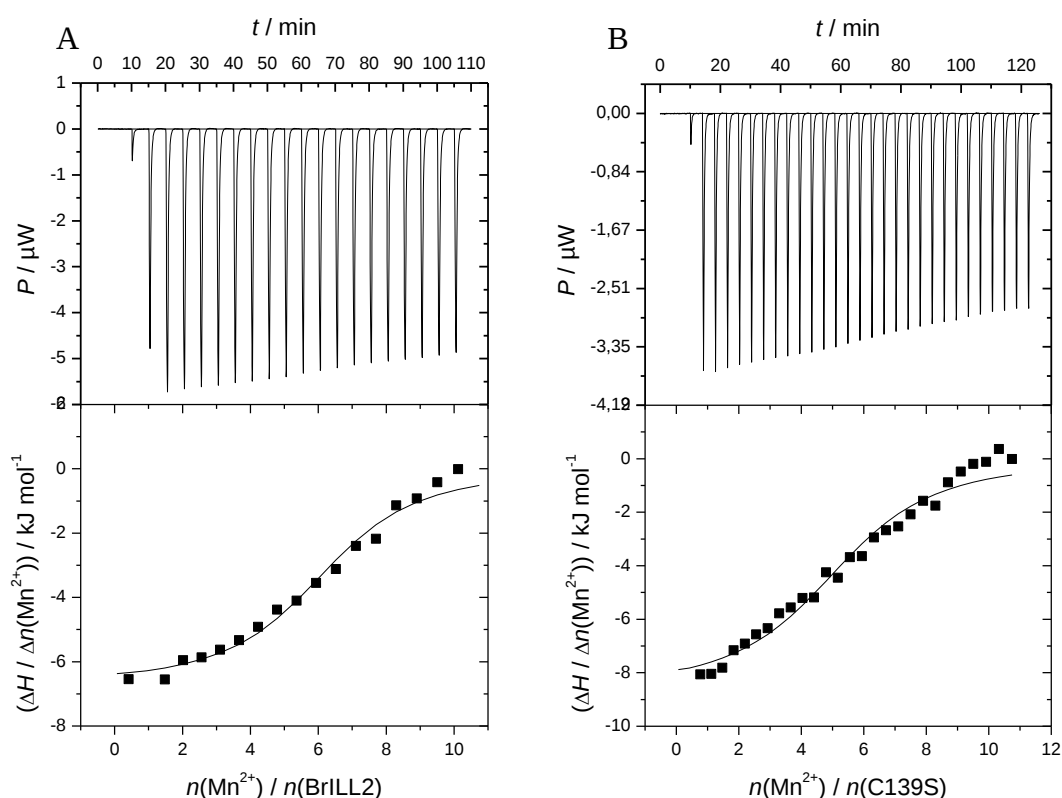
S druge strane, mutacije argininskog te metioninskog ostatka dovode do narušavanja strukture enzima BrILL2, što je potvrđeno i DSC-om (tablica 13). Pokušaji utvrđivanja T_m mutanti Arg295Ala i Met367Ala pokazali su se vrlo zahtjevnima jer su izmjerene $\Delta_r H$ i $\Delta_r S$ bile nesrazmjerne s prije ispitanim cisteinskim mutantama. Također, u više pokušaja mjerenja mutante Met367Ala pojavljivala su se dva pika u DSC termogramima, jedan koji odgovara T_m od oko 54 °C, te jedan pik pri 44,5 °C. Zapaženo je da mutanta Met367Ala prema mjerenjima ima nižu temperaturu mekšanja za oko 10 °C od divljeg tipa enzima, dok mutanta Arg295Ala ima za oko 13,2 °C višu temperaturu mekšanja od divljeg tipa. Ti su rezultati u korelaciji s opaženim mjerenjima spektara cirkularnog dikroizma, prema kojima mutanta Arg295Ala ima povećani udio α-uzvojnica, a mutanta Met367Ala manji udio α-uzvojnica u odnosu na divlji tip enzima.

Zaključeno je da aminokiselinski ostaci Arg295 i Met367 imaju ulogu u očuvanju stabilne konformacije proteina te se ne može isključiti da su potrebni za stabilizaciju zatvorene konformacije enzima kako je ranije predloženo¹²¹, ali potencijalno mogu sudjelovati i u stabilizaciji aktivnog mjesta. Slično enzimu BrILL2, u aminoacilazi-1 iz porodice peptidaza M20A, istražena je uloga analognog očuvanog aminokiselinskog ostatka Arg276 iz dimerizacijske domene enzima¹³⁹. Mutacijom Arg276 u Ala u aminoacilazi-1 smanjuje se znatno afinitet prema supstratu (K_m se poveća 157 puta), dok se k_{cat} smanji 57 puta. Stoga je predloženo da Arg267 u aminoacilazi-1 ima ulogu u katalizi i vezanju supstrata pretpostavljeno kao primarni ostatak za vezanje supstrata, te da opažena promjena u K_m odražava važnost formiranja katalitički kompetentnog aktivnog mjesta zatvaranjem konformacije enzima, tj. približavanjem dviju domena, i to tek nakon inicijalnog koraka vezanja supstrata putem Arg267. Stoga se interakcija supstrata s Arg276 u aminoacilazi-1 održava tijekom konformacijske promjene enzima i pomaže stabilizaciju prijelaznog stanja¹³⁹. Ovakve promjene u vidu promjene kinetičkih parametara aktivnosti enzima BrILL2 nisu uočene mutacijom ostatka Arg295, već je zabilježen potpuni gubitak aktivnosti.

4.2.8. Vezanje metalnih iona u BrILL2

Uvođenje mutacije Cys139Ser u BrILL2 pokazalo je da je taj cisteinski ostatak ključan za enzimsku aktivnost (tablica 10). Također, prije izrade ove disertacije u Laboratoriju za kemijsku biologiju predložen je upravo Cys139 kao dio aktivnog mjesta koji koordinira vezanje metala, te je u istome predloženo vezanje dva manganova iona. Radi istraživanja potencijalne uloge Cys139 u koordinaciji metalnih iona, kao i da bi se eksperimentalno potvrdio broj iona mangana u aktivnom mjestu, provedena je izotermalna titracijska kalorimetrija (ITC) i masena spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS).

ITC mjerenja izvedena su u načinu rada uz višestruka injektiranja (engl. *multiple injection mode*). Reprezentativni titracijski profil enzima BrILL2 i mutante Cys139Ser prilikom titracije manganovim kloridom prikazani su na slici 34.



Slika 34. Titracijski profili enzima BrILL2 divljeg tipa (A) i mutante Cys139Ser (B) koncentracija $c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ s manganovim kloridom (MnCl_2) koncentracije $c = 2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Eksperimentalni podaci koji odgovaraju gore prikazanim titracijskim profilima prikazani su u tablici 14. Pokazano je da nema značajnih razlika u titracijskom profilu vezanja mangana između divljeg tipa enzima i mutante Cys139Ser. Također, opisano vezanje MnCl_2 u oba tipa enzima favorizira male negativne entalpijske promjene i velike pozitivne entropijske promjene. Iz krivulja titracijskog profila dobiveni su stehiometrijski odnosi vezanja, odnosno omjer Mn^{2+} /enzim, te je određeno da i divlji tip enzima i mutanta Cys139Ser vežu metalne ione u omjeru jedna molekula enzima naspram 5-6 metalnih iona. Ovaj rezultat je bio neočekivan, s obzirom na isti broj vezanih metalnih iona u divljem tipu enzima i mutanti Cys139Ser. Međutim dodatno su ga potvrdila mjerenja metodom ICP-MS. U svrhu mjerenja koncentracija mangana u uzorcima proteina, pročišćeni enzim divljeg tipa podvrgnut je dijalizi kako je opisano u poglavlju 3.5.4. na dodatna dva načina. Uzorci su dijalizirani 3 sata s EDTA koncentracije $c = 10 \text{ mmol L}^{-1}$ radi odstranjivanja eventualno endogeno prisutnih metala tijekom pročišćavanja i da bi se dobila forma apoenzima; ili su dijalizirani s EDTA te je zatim forma apoenzima zasićena dodatkom manganovog klorida u suvišku koji je zatim

uklonjen dodatnom dijalizom u konačni Tris pufer ($c = 50 \text{ mmol L}^{-1}$). Iz koncentracija iona mangana utvrđenih metodom ICP-MS i koncentracija proteina izmjerenih metodom po Bradfordu, zatim je izračunat omjer $n(\text{Mn}^{2+}) / n(\text{protein})$. Dobiveni su omjeri prikazani u tablici 15. Pokazano je da netretirani rekombinantni protein već tijekom pročišćavanja bude blago zasićen manganovim ionima jer je omjer $\text{Mn}^{2+}/\text{enzim}$ iznosio 0,114. Za apoenzim, isti omjer iznosio je 0,068. Za enzim zasićen manganovim kloridom, omjer $\text{Mn}^{2+}/\text{enzim}$ iznosio je 5,4, što je u skladu s dobivenim rezultatima ITC kalorimetrije, ali opet mnogo više od očekivanih dva iona u aktivnom mjestu prema rezultatima modeliranja⁸.

Tablica 14. Podaci dobiveni usklađivanjem krivulje i modela s jednim setom veznih mjesta za ITC titraciju enzima BrILL2 divljeg tipa (BrILL2wt) i mutantu, kao i za titraciju otopine His-privjeska, manganovim kloridom (MnCl_2). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška.

Enzim	N	$\log K_a$	$\Delta_r H / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta_r S / \text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$	$T\Delta_r S / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta_r G / \text{kJ mol}^{-1}$
BrILL2wt	$5,6 \pm 0,3$	$5,5 \pm 0,1$	$-6,2 \pm 0,6$	$85,1 \pm 3,5$	26,3	$-31,06 \pm 0,8$
Cys139Ser	5,5	5,6	-8,6	78,2	23,3	-31,9
His-privjesak	2,0	$4,6 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,1$	$92,2 \pm 0,8$	27,5	$-26,1 \pm 0,3$

Tablica 15. Omjer $\text{Mn}^{2+}/\text{enzim BrILL2}$ određen metodom ICP-MS.

Enzimska forma	Omjer $\text{Mn}^{2+}/\text{protein}$
Apoenzim, EDTA	0,068
Pročišćeni enzim, netretiran	0,114
Enzim zasićen s Mn^{2+}	5,446

Pretpostavljeno je zatim da veći broj vezanih iona mangana po enzimu od očekivana dva, potječe od dodatnih iona vezanih na His-privjesak koji posjeduje enzim BrILL2 u svrhu pročišćavanja. Privjesak od šest histidinskih ostataka može vezati ne samo ione nikla, već i druge katione^{140,141}, poput Cu^{2+} i Zn^{2+} . Stoga je provedena ITC titracija otopine heksahistidina (His_6) manganovim kloridom te je utvrđeno da je omjer $\text{Mn}^{2+}/\text{His}_6$ 2:1 (tablica 14). Na temelju ovih rezultata pretpostavljeno je da su tijekom titracija enzima manganovim kloridom, dva manganova iona vezana na His-privjesak, dva u aktivno mjesto, a da se preostala dva iona vežu na nespecifična mjesta duž enzima elektrostatskim interakcijama. Na

osnovu rezultata dobivenih metodama ITC i ICP-MS može se zaključiti da mutacija ostatka Cys139Ser ne utječe na vezanje iona metala u aktivno mjesto. Pokušalo se zatim doznati dolazi li možda do strukturne promjene u aktivnom mjestu prilikom vezanja metalnih iona tijekom titracije usporedbom DSC termograma enzima po završetku titracije (tablica 16). Uočene su neznatne promjene T_m između kompleksa enzim-metal i čistog netitriranog proteina, što ukazuje da nema značajnih konformacijskih promjena tijekom vezanja metala.

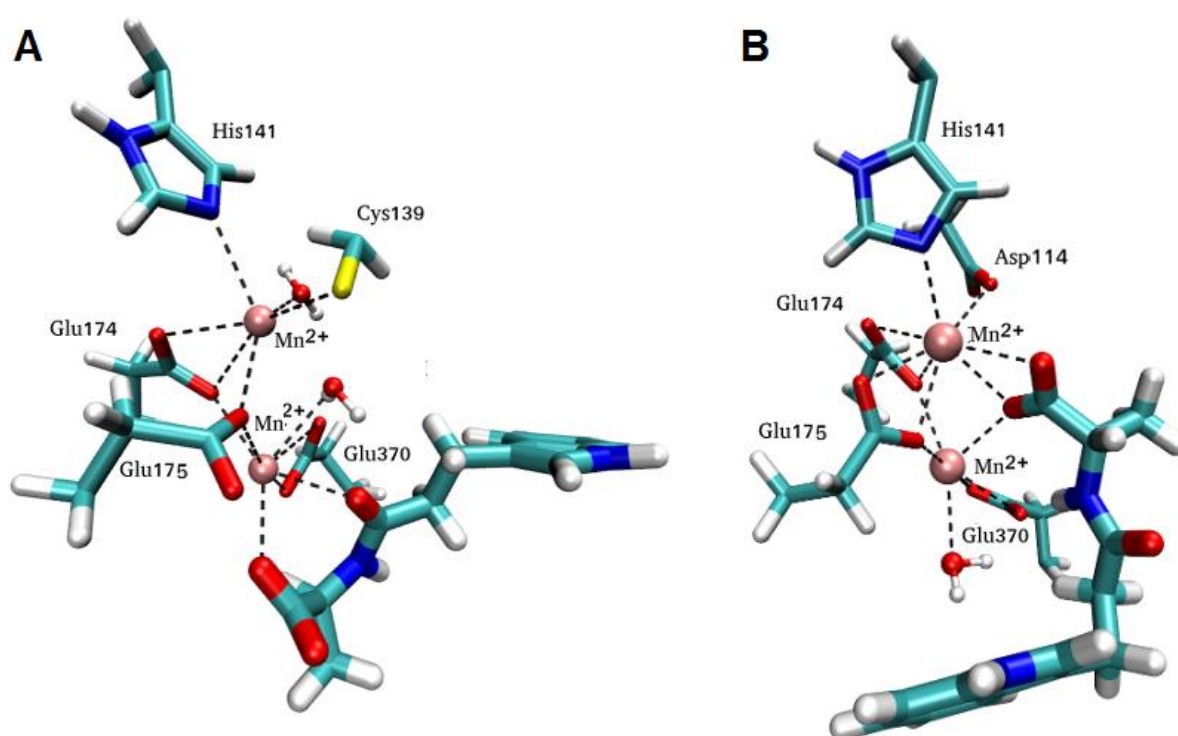
Tablica 16. DSC parametri izmjereni za čiste netitrirane enzime BrILL2 divljeg tipa (BrILL2wt) i mutantu Cys139Ser, u odnosu na njihove komplekse sa manganom dobivene nakon izotermalne titracijske kalorimetrije, snimljeni tijekom zagrijavanja od 25 do 90 °C brzinom od 1 °C min⁻¹.

Enzim	$T_m / ^\circ\text{C}$	$\Delta_r H / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta_r S / \text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
BrILL2wt	$56,5 \pm 0,1$	$54,6 \pm 6,0$	$165,7 \pm 18,1$
kompleks BrILL2wt + Mn	$56,2 \pm 0,2$	$73,9 \pm 19,4$	$224 \pm 58,9$
Cys139Ser	56,8	$93,8 \pm 2,1$	$284,3 \pm 6,5$
kompleks Cys139Ser + Mn	$57,2 \pm 0,3$	$46,7 \pm 2,6$	$141,3 \pm 7,8$

Također, titracija enzima BrILL2 i mutante Cys139Ser provedena je uz snimanje spektara cirkularnog dikroizma i nije uočena značajnija perturbacija sekundarne strukture (nije prikazano). Na temelju ovih rezultata zaključeno je da gubitak aktivnosti koji je nastupio zamjenom Cys139 u Ser nije nastupio zbog mogućih strukturnih perturbacija uzrokovanih samim vezanjem metala.

Zaključno, rezultati dobiveni kinetičkim, kalorimetrijskim i spektroskopskim mjerenjima upućuju da mutacija Cys139 u Ser dovodi do gubitka aktivnosti enzima, ali ne uzrokuje promjenu u afinitetu prema metalnim ionima, kao ni promjenu strukture enzima. Simulacije molekularne dinamike prema radu Smolko i sur.⁹², su upućivale na dva načina vezanja supstrata u aktivno mjesto enzima BrILL2 (slika 35- prikazan je jedan od predloženih načina vezanja) te da se orijentacija supstrata IPA-Ala u kompleksu s mutantom Cys139Ser razlikuje od iste u divljem tipu enzima (slika 35B). Supstrat IPA-Ala i ion Mn^{2+} udaljeni su međusobno oko 2,5 Å u prvom načinu vezanja (slika 35A) te u koordinaciji prvog manganovog iona na ulazu u aktivno mjesto sudjeluju i karboksilna i karbonilna skupina supstrata. U tom načinu vezanja, indolni prsten supstrata stabiliziran je hidrofobnim interakcijama s aminokiselinskim ostacima Arg203, Leu217, Ile366 i Phe385. NH grupa iz peptidne veze supstrata stabilizirana je vodikovom vezom s karbonilnom skupinom ostatka Gly369, dok je metilna grupa supstrata

u blizini hidrofobnog bočnog lanca Leu177. Predloženo je da u tom načinu vezanja supstrata jedna molekula vode ulazi u koordinaciju drugog manganovog iona, kao i aminokiselinski ostatak Cys139. Druga molekula vode u blizini karbonilne NH skupine supstrata bude aktivirana ili od strane karboksilne skupine katalitičkog ostatka Glu175, ili od strane karboksilne skupine samoga supstrata te kao aktivirana vrši nukleofilni napad na karbonilni C atom supstrata. Ovi rezultati MD simulacija podupiru eksperimentalne dokaze da se u članovima porodice amidohidrolaza s dinuklearnim metalnim centrom u aktivnom mjestu ostvaruje “karbonilni” način vezanja supstrata, u kojem kisikov atom karbonilne skupine supstrata mora ostvariti interakciju s manganovim ionom kao preduvjet reakcije hidrolize¹⁴².



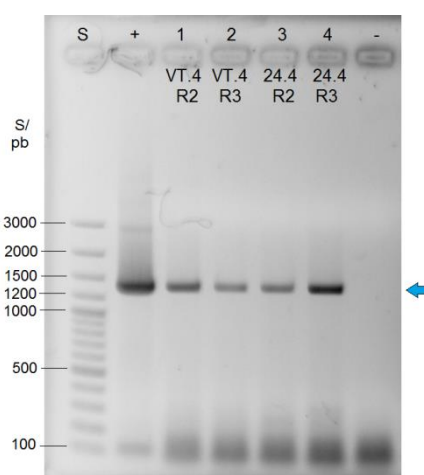
Slika 35. Koordinacija manganovih iona i vezanje supstrata IPA-Ala u enzimu BrILL2wt (A) te u mutanti Cys139Ser (B) dobivena simulacijom molekularne dinamike predložena u radu Smolko i sur.⁹² Manganovi ioni prikazani su kao ljubičaste kugle, a aminokiselinski ostaci i supstrat IPA-Ala modelom štapića (deblje označen supstrat IPA-Ala). Udaljenosti između aminokiselinskih ostataka i manganovih iona te supstrata prikazane su crnim isprekidanim linijama.

U modelu aktivnog mjesta mutante Cys139Ser supstrat IPA-Ala udaljen je od manganovih iona oko 2,6 Å te svojom karboksilnom skupinom koordinira oba manganova iona (slika 35B). Indolni prsten supstrata stabiliziran je hidrofobnim interakcijama s Phe447 i Ile366, dok karbonilna skupina ostatka Gly369 interagira s indolnim prstenom supstrata. Prema simulaciji

molekularne dinamike, u mutanti Cys139Ser za ometanje nukleofilnog napada molekule vode na supstrat ključan je aminokiselinski ostatak Arg203 koji ostvaruje elektrostatske interakcije s karbonilnom skupinom supstrata i tako sprečava odvijanje enzimske reakcije.

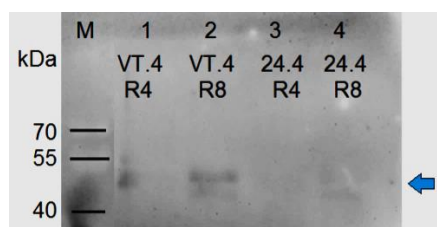
4.3. Selekcija nadekspresorskih linija te provjera prisutnosti transgena za BrILL2 u *A. thaliana*

U svrhu funkcionalnih istraživanja auksin-amidohidrolaze BrILL2 priređene su nadekspresorske linije za auksin-amidohidrolazu BrILL2 u uročnjaku (*A. thaliana*). Za transformaciju biljaka *A. thaliana* konstruktom koji nosi gen za BrILL2 pod kontrolom CaMV 35S promotora za konstitutivnu ekspresiju transgena korištena je “*floral-dip*” metoda. U svrhu selekcije potencijalnih nadekspresorskih linija *A. thaliana*, homozigotne linije uročnjaka u Ws ekotipu iz T3 ili T4 generacije provjerene su na selekcijskim podlogama s antibiotikom higromicinom B u koncentraciji $\gamma = 50 \mu\text{g mL}^{-1}$. Klijanci iz linija koje sadrže transgen *BrILL2-His₆* otporni su na higromicin, pokazivali su normalan rast korijena i prave listove te su dobro rasli na selekcijskoj podlozi, za razliku od divljeg tipa *A. thaliana* Ws ekotipa. Ukoliko su biljke homozigoti za transgen od interesa, klijavost sjemenki na selekcijskoj podlozi bila je 100%. Iz odabranih homozigotnih linija izolirana je genomska DNA (gDNA) te je metodom PCR umnožen transgen od interesa (slika 36). Također, izolirani su ukupni proteini iz klijanaca i imunodetekcijom s anti-His protutijelom detektirani su transgenični proteini (slika 37).



Slika 36. Dokaz transgena *BrILL2-His₆* u klijancima T4 generacije transgeničnih biljaka *A. thaliana*. Transgen, veličine 1350 pb, umnožen je metodom PCR korištenjem početnica *fwBrILL2* i *revHis6JLM* te su rezultati reakcije razdvojeni elektroforezom u 1% agaroznom

gelu. Kao pozitivne kontrole korišteni su pripadajući rekombinantni plazmidi koji su poslužili za transformaciju *floral-dip* metodom. Replike uzoraka gDNA obilježene su s oznakama R2-R3, ovisno o broju klijanaca (2-3) iz kojih je gDNA izolirana. S – standardi molekulskih veličina, + - pozitivna kontrola plazmid *pMDC32-BrILL2-His6*



Slika 37. Imunodetekcija transgenih proteina s anti-His protutijelom u ukupnom ekstraktu proteina homozigotnih linija. Transgenični protein BrILL2 s His₆ privjeskom (veličine 49,1 kDa) u linijama *35S::BrILL2-His₆* VT.4 i *35S::BrILL2-His₆* 24.4. Replike uzoraka proteina obilježene su s oznakama R4-R8, ovisno o broju klijanaca (4-8) iz kojih su proteini izolirani. M – biljezi molekulskih veličina

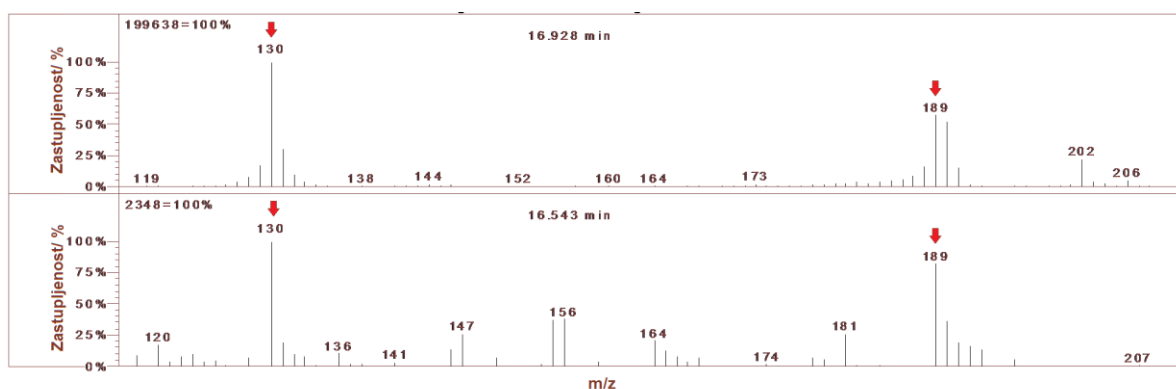
Ovim metodama potvrđena je ugradnja i ekspresija transgena *BrILL2-His₆* u odabranim nadekspresorskim linijama uročnjaka (u liniji *35S::BrILL2-His₆* VT.4 i u liniji *35S::BrILL2-His₆* 24.4). Obje linije transformiranog uročnjaka *A. thaliana* potječu od biljaka ekotipa Ws te je stoga u daljnim analizama auksinskog metaboloma linija Ws divljeg tipa služila kao kontrola.

4.4. Analize auksina u biljnom materijalu *B. rapa* i *A. thaliana*

4.4.1. GC-MS identifikacija auksina

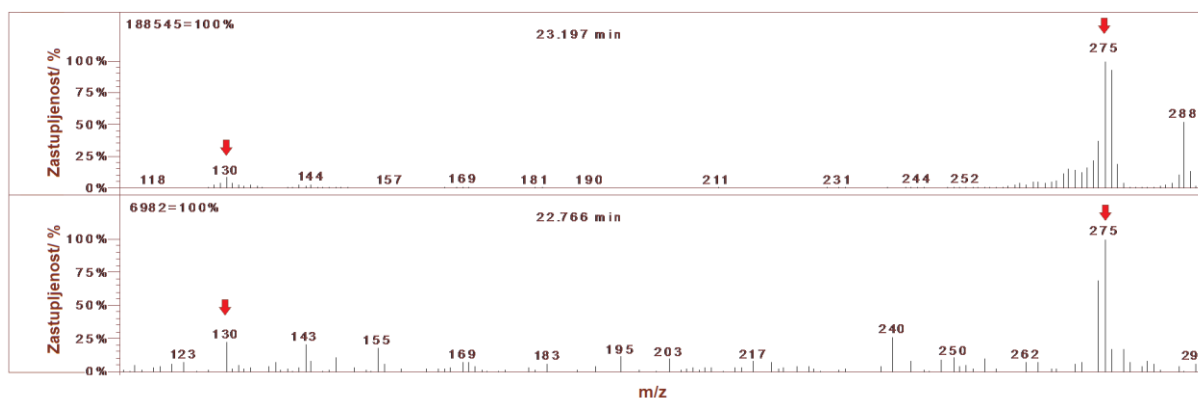
U početku izrade ove doktorske disertacije objavljeno je da auksin-amidohidrolaze BrILL2 i BrIAR3 iz *B. rapa* hidroliziraju konjugate dugolančanih auksina IPA-Ala i IBA-Ala u slobodne auksine u puno većoj mjeri od konjugata s IAA *in vitro*⁸. Dokazan je i inhibitorni efekt IBA-Ala i IPA-Ala na rast korijena te je pretpostavljeno da je uočena inhibicija rasta rezultat hidrolize tih konjugata u slobodne auksine *in vivo*⁸. Inhibicija rasta korijena ukazuje na tipično inhibitorno djelovanje auksina u produžnom rastu i takvo je dokazano za slobodne auksine (IPA, IBA, IAA) te konjugate tih auksina s aminokiselinama⁸. Posebno snažan učinak inhibicije rasta korijena postignut je konjugatima dugolančanih auksina IPA-Ala i IBA-Ala⁸. Stoga smo pokušali identificirati i izmjeriti endogene auksine IAA, IBA i IPA u kineskom kupusu (*B. rapa*). U tu svrhu klijanci *B. rapa* uzgojeni su na podlogama s različitim koncentracijama IPA-Ala, IAA-Ala ili IBA-Ala kao i pripadajuće kontrole bez tretmana, te su auksini analizirani vezanim sustavom plinske kromatografije-spektrometrije masa (GC-MS).

Analize endogenih auksina u klijancima *B. rapa* metodom GC-MS ukazale su jednoznačno na postojanje IAA u netretiranim klijancima, ali nije utvrđeno postojanje endogenih IBA i IPA derivata u tim kontrolnim klijancima (slika 38). Također je analogan spektar masa kojim je dokazana IAA, snimljen i za uzorke klijanaca *B. rapa* tretiranih s IPA-Ala i IBA-Ala (neprikazano).

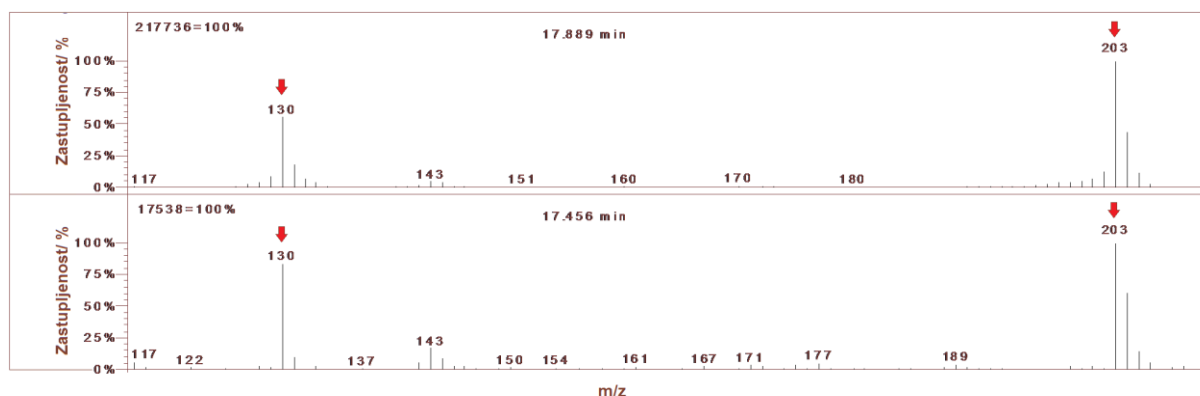


Slika 38. Identifikacija IAA snimanjem spektra masa metilnog estera IAA u rasponu m/z 50-450 u vremenu zadržavanja R_t 16,543 – 16,928 min, s karakterističnim ionima kod m/z 189 (molekularni ion) te kod m/z 130 (kvinolinijev ion). Ioni su označeni crvenim strelicama. Gornji spektar predstavlja spektar masa standarda IAA, a donji je spektar masa uzorka netretiranih, tj. kontrolnih klijanaca *B. rapa* ($m = 130$ g).

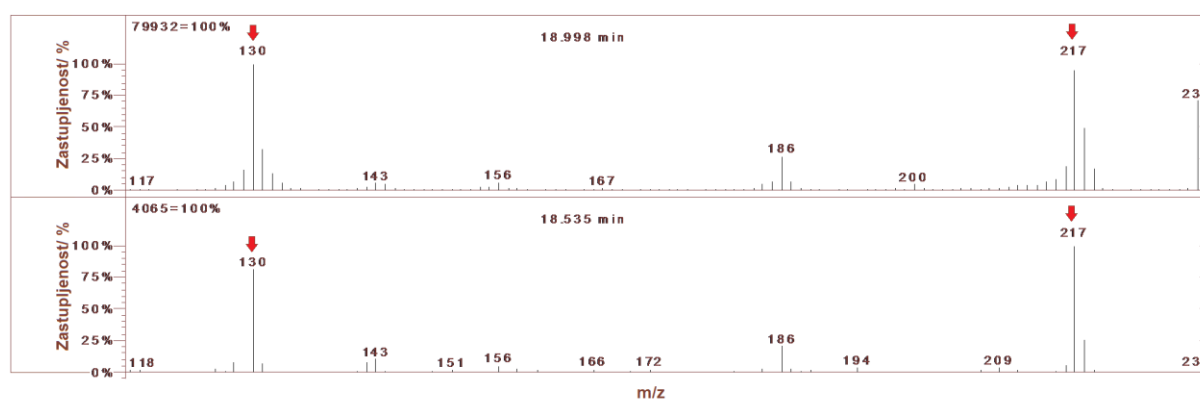
Konjugat IPA-Ala kao i odgovarajući slobodni auksin IPA identificirani su jedino u uzorcima klijanaca *B. rapa* tretiranih s IPA-Ala (slika 39 i 40), a istovrsno zapažanje bilo je i kod identifikacije IBA samo u klijancima tretiranim s IBA-Ala (slika 41).



Slika 39. Identifikacija IPA-Ala snimanjem spektra masa IPA-Ala bis metilnog estera u rasponu m/z 50-450 u vremenu zadržavanja R_t 22,766 – 23,197 min, s karakterističnim ionima kod m/z 275 (molekularni ion) te kod m/z 130 (kvinolinijev ion). Ioni su označeni crvenim strelicama. Gornji spektar predstavlja spektar masa standarda IPA-Ala, a donji je spektar masa uzorka klijanaca *B. rapa* tretiranih s IPA-Ala ($m = 9$ g).



Slika 40. Identifikacija IPA snimanjem spektra masa metilnog estera IPA u rasponu m/z 50-450 u vremenu zadržavanja R_t 17,456 – 17,889 min, s karakterističnim ionima kod m/z 203 (molekularni ion) te kod m/z 130 (kviniolinijev ion). Ioni su označeni crvenim strelicama. Gornji spektar predstavlja spektar masa standarda IPA, a donji je spektar masa uzorka kljanaca *B. rapa* tretiranih s IPA-Ala ($m = 9$ g).



Slika 41. Identifikacija IBA snimanjem spektra masa metilnog estera IBA u rasponu m/z 50-450 u vremenu zadržavanja R_t 18,535 – 18,998 min, s karakterističnim ionima kod m/z 217 (molekularni ion) te kod m/z 130 (kviniolinijev ion). Ioni su označeni crvenim strelicama. Gornji spektar predstavlja spektar masa standarda IBA, a donji je spektar masa uzorka kljanaca *B. rapa* tretiranih s IBA-Ala ($m = 9$ g).

Opažanje da nekoliko auksin-amidohidrolaza, npr. iz *B. rapa*⁸, *T. aestivum*⁹ i *M. truncatula*¹⁰ preferiraju konjugate s IBA^{9,10} i s IPA⁸, upućivalo je na dotad neobjašnjene uloge tih konjugata auksina. Iako je endogena IPA identificirana u nekim biljnim vrstama^{143,144}, do sada nije razjašnjena uloga IPA kao endogenog hormona. Jedna hipoteza je da derivati IPA mogu djelovati antimikrobno kod infekcije s biljnim patogenom *Ralstonia solanacearum* (prije poznatim kao *Pseudomonas solanacearum*)¹⁴⁵.

IBA je auksin čija je aktivnost povezana s formiranjem adventivnog i lateralnog korijenja, ali i s uspostavljanjem arbuskularne mikorize¹⁴⁶⁻¹⁴⁸. Također, pretvorba IBA u IAA putem β -

oksidacije u peroksisomima biljne stanice jedan je od predloženih mehanizama nastanka IAA²⁰, te se dosta diskusije povelu treba li se smatrati samo prekursorom IAA, budući da izgledno djeluje kao aktivan auksin⁴⁰. Kao endogeni hormon IBA je identificirana u nekim biljnim vrstama uključujući *A. thaliana*¹⁴⁸, kao slobodna IBA te u obliku konjugata sa šećerima⁴⁴ i aminokiselinama¹⁴⁹. Prema nekim istraživanjima prisutna je u puno manjim koncentracijama od IAA¹⁴⁷. Međutim, noviji neuspjeli pokušaj identifikacije IBA kao endogenog hormona osjetljivijom metodom LC-MRM-MS (engl. *liquid chromatography-multiple reaction monitoring-mass spectrometry*) u *A. thaliana*, *Populus canadensis* i *T. aestivum* doveli su u pitanje postojanje IBA u tim biljnim vrstama¹⁴. Zbog nemogućnosti identifikacije IBA čak i u trostrukoj mutanti *ibr1-2 ibr3-1 ibr10-1*, koja bi trebala akumulirati IBA zbog blokade u pretvorbi IBA u IAA putem β -oksidacije, predloženo je da je IBA ili ispod granice detekcije ili uopće nije prisutna¹⁴. U spomenutom izvještaju izražena je sumnja da je IBA uopće endogeni hormon u *A. thaliana*, te da najvjerojatnije ne služi kao značajan endogeni prekursor biosinteze IAA ili nastaje u biljci samo u određenim uvjetima rasta¹⁴. Također, predloženo je da je razlog identifikacije IBA u prijašnjim studijama^{41,150} upotreba metode GC-SIM-MS (SIM od engl. *selected ion monitoring*), koja je manje selektivna od plinske kromatografije ili tekućinske kromatografije spregnute masenom spektrometrijom, tj. od metoda GC-MS/MS ili LC-MS/MS, te da je moguće da lažni pozitivan signal za IBA dolazi od ko-eluirajućih pikova iz biljnog matriksa ili interferencijom neobilježene IBA prisutne u standardu¹⁴.

U ovom radu identifikacija IBA i IPA bila je moguća nakon rasta klijanaca *B. rapa* na podlozi s IBA i IPA konjugatima, što je potvrdilo hidrolizu tih konjugata *in vivo*. Kako je metodi GC-SIM-MS spočitnuta nedovoljna selektivnost/ osjetljivost i detekcija lažno pozitivno prisutne IBA, zbog dostupnosti osjetljivije metode UHPLC-MS/MS analiziran je cjelokupni auksinski metabolom, uključujući prekursore biosinteze auksina, slobodnu IAA, te metabolite auksina.

4.4.2. UHPLC-MS/MS analiza auksinskog metaboloma u klijancima *B. rapa*

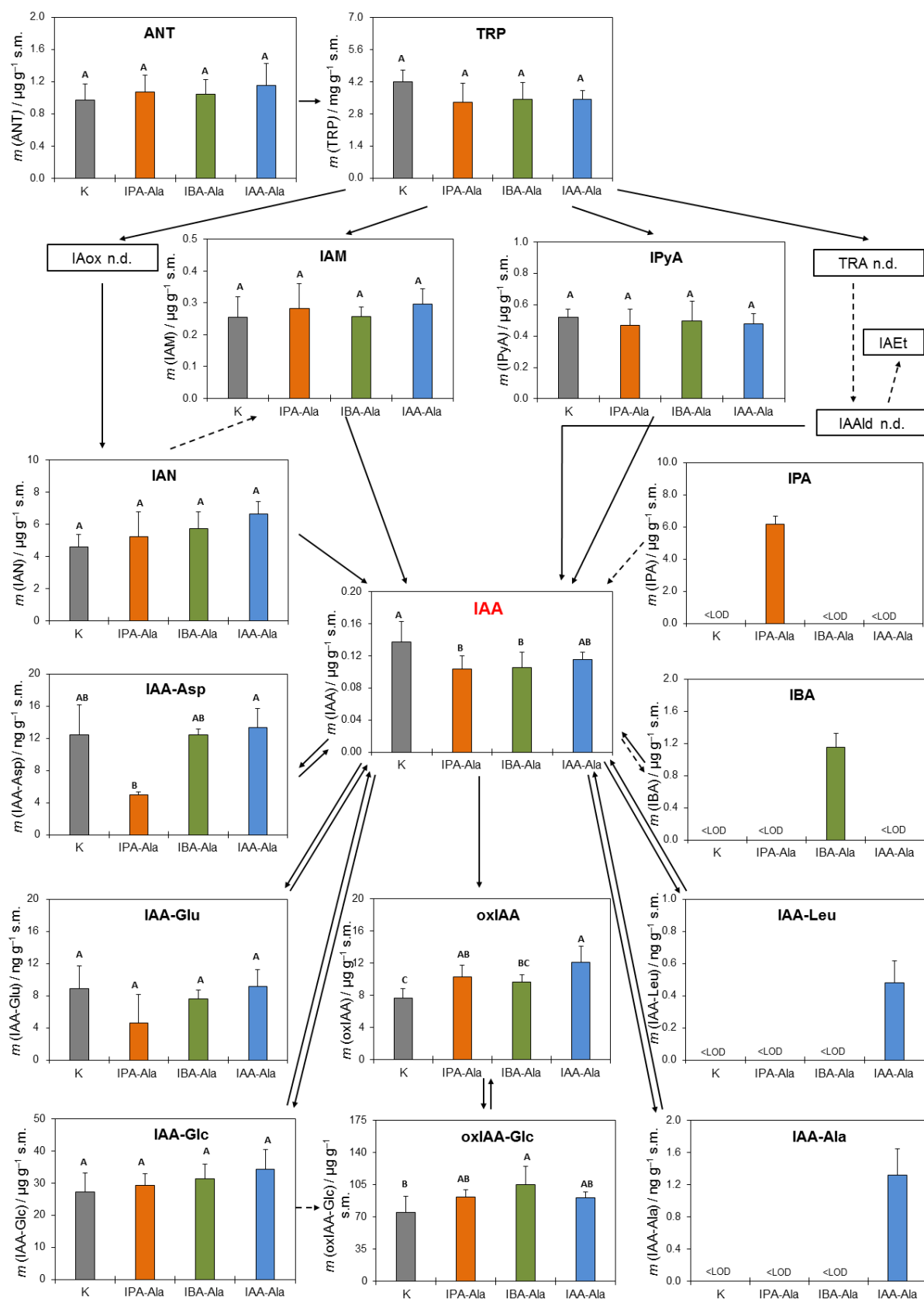
Razvoj novih osjetljivih tehnika omogućio je određivanje profila auksina iz malih količina tkiva¹⁴ te stoga pružio potencijal za razjašnjavanje razlika u homeostazi auksina po tretmanu s aminokiselinskim derivatima dugolančanih auksina. Stoga je istražen sastav i sadržaj auksina u klijancima *B. rapa* po tretmanu spomenutim konjugatima u odnosu na kontrolne netretirane

biljke, s ciljem utvrđivanja ima li hidroliza navedenih konjugata direktan učinak na zapažane promjene fenotipskih karakteristika u rastu korijena ili je rezultat drugih promjena u metabolizmu auksina, neovisnih o razgradnji konjugata. Identifikacija i kvantifikacija auksinskih prekursora i metabolita učinjena je tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti uz korištenje spektrometra masa (UHPLC-MS/MS). U klijancima *B. rapa* određeni su i kvantificirani IAA, auksinski prekursori i metaboliti kao i konjugati auksina za koje su u trenutku istraživanja postojali interni standardi (slika 42 i dodatak 4).

U klijancima *B. rapa* utvrđeno je da se sadržaj prekursora biosinteze auksina održava relativno stalnim nakon 24 h tretmana svim konjugatima, stoga je biosinteza auksina isključena kao mehanizam kontrole sadržaja slobodne IAA u ispitivanim uvjetima. Sadržaj slobodne IAA statistički značajno se smanjuje pri tretmanu s IPA-Ala i IBA-Ala, ali ne i pri tretmanu s IAA-Ala (slika 42, IAA je centrirana u središte prikaza). Zanimljivo je da se donedavno smatralo da sadržaj slobodne IAA iznosi oko 25% ukupne IAA, ovisno o biljnoj vrsti². Međutim s obzirom na rezultate analize u ovom doktoratu, kao i prijašnje analize auksinskog metaboloma^{14,15}, sadržaj konjugata u odnosu na slobodnu IAA je puno niži nego što se to ranije smatralo. Također, sadržaj triptofana vrlo je visok (na miligramskoj skali) u odnosu na većinu ostalih prekursora i metabolita, što je već utvrđeno i u *A. thaliana*¹⁴.

Sadržaj aminokiselinskih konjugata auksina IAA-Asp i IAA-Glu, koji se u literaturi spominju kao prekursori kataboličkog puta² također se ne mijenja značajno, što ukazuje da nizvodno od IAA pri 24 h tretmana nije aktivan mehanizam razgradnje putem konjugacije IAA na Asp i Glu, kao što je uočeno u “feeding” eksperimentu s visokom koncentracijom IAA u *A. thaliana*¹⁵¹. U sličnom “feeding” eksperimentu na *A. thaliana* utvrđeno je da pri tretmanu visokim koncentracijama IAA (iznad 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) dolazi do porasta konjugacije IAA na Asp i Glu te daljnje oksidacije IAA-Asp u oxIAA-Asp i u OH-IAA-Asp, dok se pri nižim koncentracijama egzogene IAA (ispod 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) većina egzogeno dodate IAA metabolizira preko oxIAA puta²⁸.

Metabolit oxIAA je određen kao glavni katabolički produkt u korijenovom vršku *A. thaliana*, te iako ima malu biološku aktivnost, formira se brzo i ireverzibilno kao odgovor na promjene razina auksina¹⁵², međutim utvrđeno je da takav odgovor varira i na staničnoj razini u vršku korijena.



Slika 42. Promjene u metabolizmu auksina u klijancima *B. rapa* po tretmanu u trajanju 24 h konjugatima auksina (IBA-Ala, IPA-Ala i IAA-Ala $c = 10 \mu\text{mol } \mu\text{mol L}^{-1}$): indol-3-octena

kiselina (IAA), indol-3-propionska kiselina (IPA), indol-3-maslačna kiselina (IBA); prekursori biosinteze: antranilat (ANT), triptofan (Trp), indol-3-acetamid (IAM), indol-3-piruvatna kiselina (IPyA), indol-3-acetonitril (IAN) i metaboliti: 2-oksoindol-3-octena kiselina (oxIAA), indol-3-acetil-L-aspartat (IAA-Asp), indol-3-acetil-L-glutamat (IAA-Glu), indol-3-acetil-L-leucin (IAA-Leu), indol-3-acetil-L-alanin (IAA-Ala), indol-3-acetil-1-glukozil ester (IAA-Glc), 2-oksoindol-3-acetil-1-glukozil ester (oxIAA-Glc). Rezultati su izraženi u $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe tvari (s.m.) ili u ng g^{-1} suhe tvari za svaki tretman ($n=4$). Statistički značajne razlike u tretmanima (IBA-Ala ili IPA-Ala ili IAA-Ala; $c = 10 \mu\text{mol } \mu\text{mol L}^{-1}$) u odnosu na kontrolu K (c (konjugat IAA) = $0 \mu\text{mol } \mu\text{mol L}^{-1}$) prikazane su različitim slovima uz razinu značajnosti od 0,05 ($p < 0,05$) u ANOVA testu uz Tukey HSD (engl. *honest significant difference*) post hoc statistički test značajnosti. <LOD – ispod granice detekcije (engl. *limit of detection*), n.d. - nije determinirano.

Analiza u ovom doktoratu ukazuje da se u klijancima *B. rapa* većina egzogeno dodatih konjugata u podlogu za uzgoj metabolizira putem oxIAA, te je statistički značajan porast sadržaja oxIAA u odnosu na kontrolu uočen kod tretmana s IPA-Ala i IAA-Ala. Naravno, treba imati u vidu da i u klijancima *B. rapa* treba uzeti u obzir tkivno-specifične fluktuacije (kao i varijacije među tipovima stanica) koje dovode do stvaranja auksinskih gradijenata¹⁵². Zanimljivo, jedino su u slučaju tretmana s IAA-Ala identificirani konjugati IAA s Ala, ali i IAA s Leu. Ipak, sadržaj IAA-Ala i IAA-Leu je na nanogramskoj skali, kao što je slučaj i s konjugatima IAA-Asp i IAA-Glu.

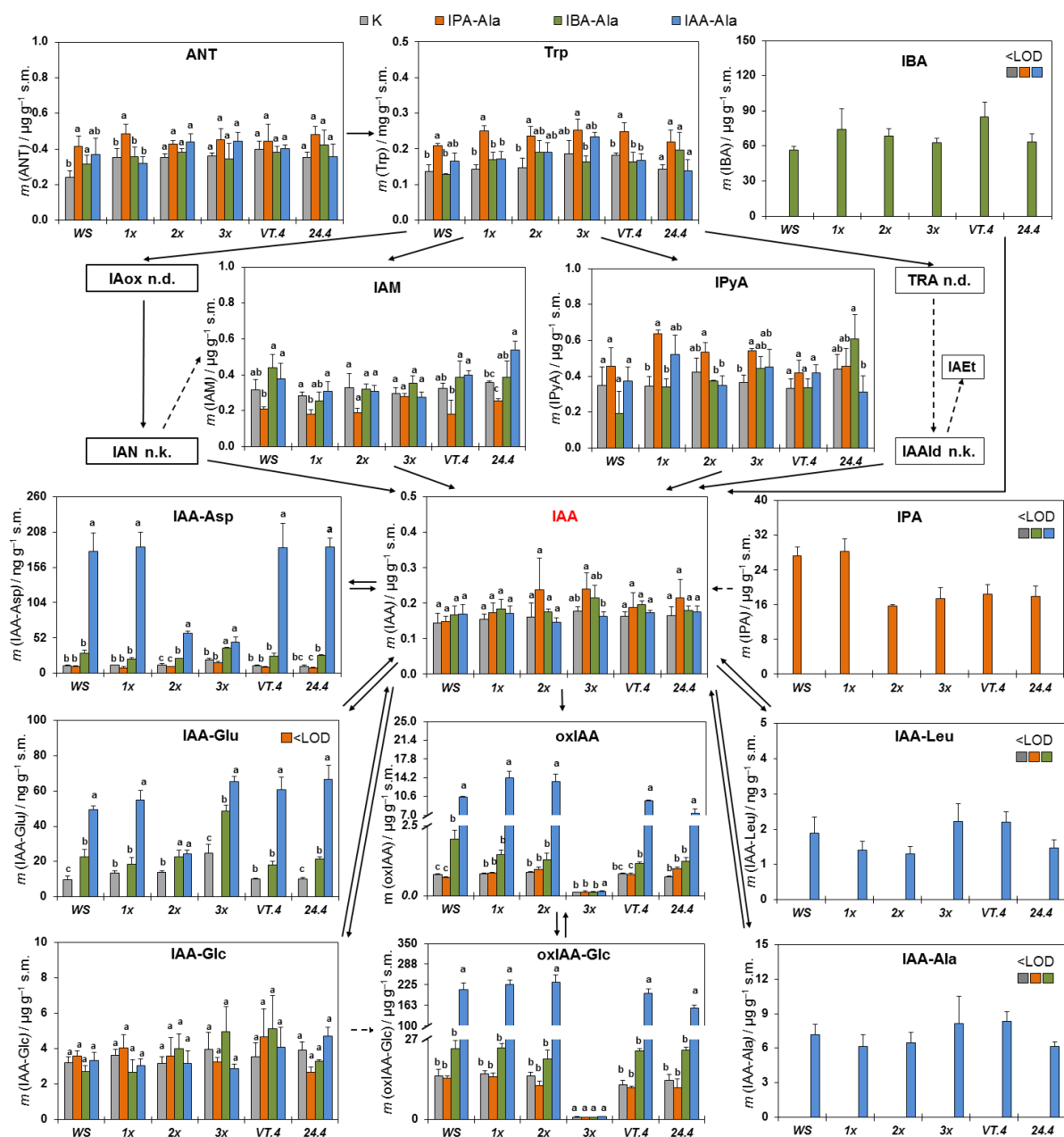
Konačno, ova analiza direktan je dokaz hidrolize konjugata IPA-Ala i IBA-Ala *in vivo*, budući da su IPA i IBA identificirane i kvantificirane samo u klijancima iz odgovarajućeg tretmana s IPA-Ala, odnosno s IBA-Ala. Također, prema ovim rezultatima, sadržaj detektirane IPA iznosi oko $6 \mu\text{g g}^{-1}$ suhe mase (s.m.), dok je sadržaj IBA oko $1,2 \mu\text{g g}^{-1}$ s.m., a IAA $0,12 \mu\text{g g}^{-1}$ s.m., što predstavlja direktnu presliku objavljene povišene katalitičke efikasnosti i supstratne specifičnosti prema IPA-Ala i IBA-Ala u odnosu na IAA-Ala⁸.

4.4.3. UHPLC-MS/MS analiza auksinskog metaboloma u klijancima *A. thaliana*

Kako bi se dobio uvid u ulogu auksin-amidohidrolaza u metabolizmu auksina, provedena je usporedba auksinskog metaboloma u nadekspresorskim linijama i u linijama mutanti s disunkcionalnim auksin-amidohidrolazama s divljim tipom uročnjaka. Linije s disfunkcionalnim hidrolazama odabrane su na osnovu mutacije u genu *ill2*⁷, kao jednostruka mutanta *ill2*, dvostruka mutanta *ill2 iar3* te trostruka mutanta *ilr1 ill2 iar3*⁷. Analizom dobivenih koncentracija analita (slika 43 i dodatak 5) uočeno je, slično kao i u klijancima *B. rapa*, da pri tretmanu konjugatima auksina koncentracije $c = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$, biljke svih linija nastoje održati sadržaj slobodne IAA stalnim te se on ne mijenja značajno (IAA je centrirana

u središte slike 43). Na slici 43 prikazani su sadržaji analita u linijama uročnjaka (uz statističku usporedbu uvjeta tretmana u odnosu na kontrolne uvjete za svaki analit posebno). Sadržaj IAA u klijancima tijekom svih tretmana je oko 0,14 do 0,24 µg po gramu suhe mase. Međutim, uočene su neke razlike u sadržaju drugih analita u odgovoru na tretmane. Npr. tretman s IPA-Ala uzrokovao je statistički značajan porast auksinskih prekursora antranilata (ANT) i triptofana (Trp) u divljem tipu i jednostrukoj mutanti *ill2*, te triptofana (Trp) u dvostrukoj mutanti i u nadekspresorskoj liniji VT.4. Općenito, tretman s IPA-Ala pokazuje pozitivan utjecaj na put biosinteze IAA putem indol-3-piruvatne kiseline (IPyA) (vidljiv kroz povećanje sadržaja analita ANT, Trp i IPyA), a negativan utjecaj na biosintezu IAA putem indol-3-acetamida (IAM). Tretmani s IBA-Ala i IAA-Ala ne ukazuju na statistički značajne razlike u sadržaju prekursora IAA u odnosu na klijance u kontrolnim uvjetima. Stoga je zaključeno da tretmani ovdje ispitanih linija uročnjaka s IBA-Ala i IAA-Ala u datim uvjetima ne utječu na homeostazu auksina uzvodno od IAA, putem utjecaja na biosintezu IAA.

Hidroliza konjugata IPA-Ala i IBA-Ala dokazano se odvija *in vivo* i u uročnjaku, što je jednoznačno utvrđeno u svim ispitivanim linijama identifikacijom IBA i IPA jedino u klijancima koji su bili tretirani s odgovarajućim konjugatom. Ovo je vrlo zanimljiv nalaz, s obzirom da do sada u literaturi nije ispitan potencijal uročnjaka da hidrolizira IPA-Ala i IBA-Ala, slično kao što nije niti ispitana mogućnost *in vitro* da bi jedna od auksin-amidohidrolaza iz uročnjaka mogla hidrolizirati te supstrate. Poznato je samo da npr. AtILL2 od svih testiranih konjugata preferira IAA-Ala⁶. Stoga, bilo bi potrebno preispitati enzimске aktivnosti barem za AtILL2 u daljnjim istraživanjima. Čini se kako u uročnjaku, s obzirom na koncentracije detektirane IPA od oko 15 – 27 µg po gramu s.m. u odnosu na oko 3,1 do 3,7 puta više koncentracije detektirane IBA (oko 56 – 85 µg po gramu s.m.) postoji preferencija prema konjugatu s IBA, što je zanimljiv nalaz za daljnja istraživanja.



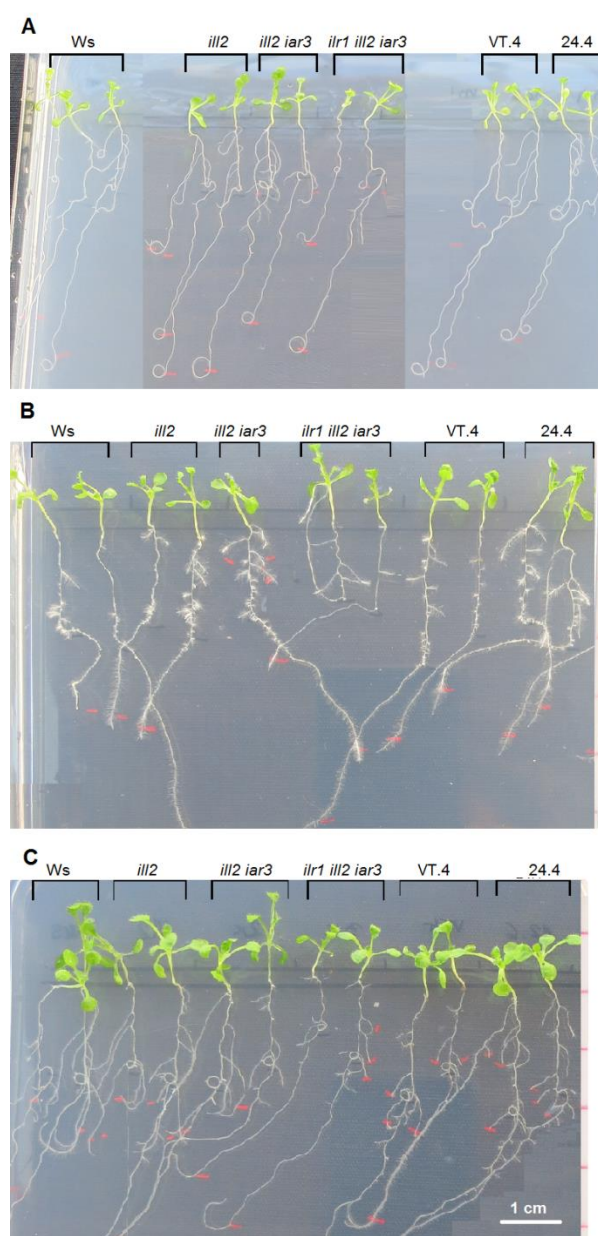
Slika 43. Promjene u metabolizmu auksina u klijancima *A. thaliana* po tretmanu u trajanju 5 dana konjugatima auksina (IBA-Ala, IPA-Ala i IAA-Ala $c = 10 \mu\text{mol } \mu\text{mol L}^{-1}$): indol-3-octena kiselina (IAA), indol-3-propionska kiselina (IPA), indol-3-maslačna kiselina (IBA); prekursori biosinteze: antranilat (ANT), triptofan (Trp), indol-3-acetamid (IAM), indol-3-piruvatna kiselina (IPyA), i metaboliti: 2-oksoindol-3-octena kiselina (oxIAA), indol-3-acetil-L-aspartat (IAA-Asp), indol-3-acetil-L-glutamat (IAA-Glu), indol-3-acetil-L-leucin (IAA-Leu), indol-3-acetil-L-alanin (IAA-Ala), indol-3-acetil-1-glukozil ester (IAA-Glc), 2-oksoindol-3-acetil-1-glukozil ester (oxIAA-Glc). Rezultati su izraženi u $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe tvari (s.m.) ili u ng g^{-1} suhe tvari za svaki tretman ($n=4$). Statistički značajne razlike u tretmanima (IBA-Ala ili IPA-Ala ili IAA-Ala; $c = 10 \mu\text{mol } \mu\text{mol L}^{-1}$) u odnosu na kontrolu ($c(\text{konjugat IAA}) = 0 \mu\text{mol } \mu\text{mol L}^{-1}$) prikazane su različitim slovima uz razinu značajnosti od 0,05 ($p < 0,05$) u ANOVA testu uz Tukey HSD (engl. *honest significant difference*) *post hoc* statistički test značajnosti. <LOD – ispod granice detekcije (engl. *limit of detection*), n.k. - nije kvantificirano, n.d. nije detektirano.

Najznačajnije vidljive promjene u auksinskom metabolomu linija uročnjaka pri tretmanu konjugatima auksina uočene su u procesima konjugacije u vidu stvaranja konjugata IAA s Asp i Glu, te u procesima oksidacije IAA u oxIAA i oxIAA-Glc (slika 43- prikazi za IAA-Glu, IAA-Asp, oxIAA te oxIAA-Glc). Statistički najznačajnije promjene u sadržaju ovih analita rezultat su tretmana s IAA-Ala. Npr., sadržaj IAA-Asp pri tretmanu s IAA-Ala značajno poraste u svim linijama; kod divljeg tipa i mutante *ill2* zabilježen je porast sadržaja IAA-Asp 16 puta, kod dvostruke mutante porast sadržaja IAA-Asp je svega 4,7 puta, dok se kod trostruke mutante sadržaj IAA-Asp poveća tek 2,3 puta. Može se zaključiti da sposobnost obilježavanja IAA za degradaciju putem konjugiranja na IAA-Asp, sukcesivno opada s porastom broja disfunkcionalnih auksin-amidohidrolaza. Nasuprot tome, jedino u dvostrukoj i trostrukoj mutanti događa se statistički značaj porast IAA-Asp pri tretmanu s IBA-Ala, dok u ostalim linijama tretman s IBA-Ala i IPA-Ala ne ukazuje na statistički značajne razlike u odnosu na kontrolne uvjete.

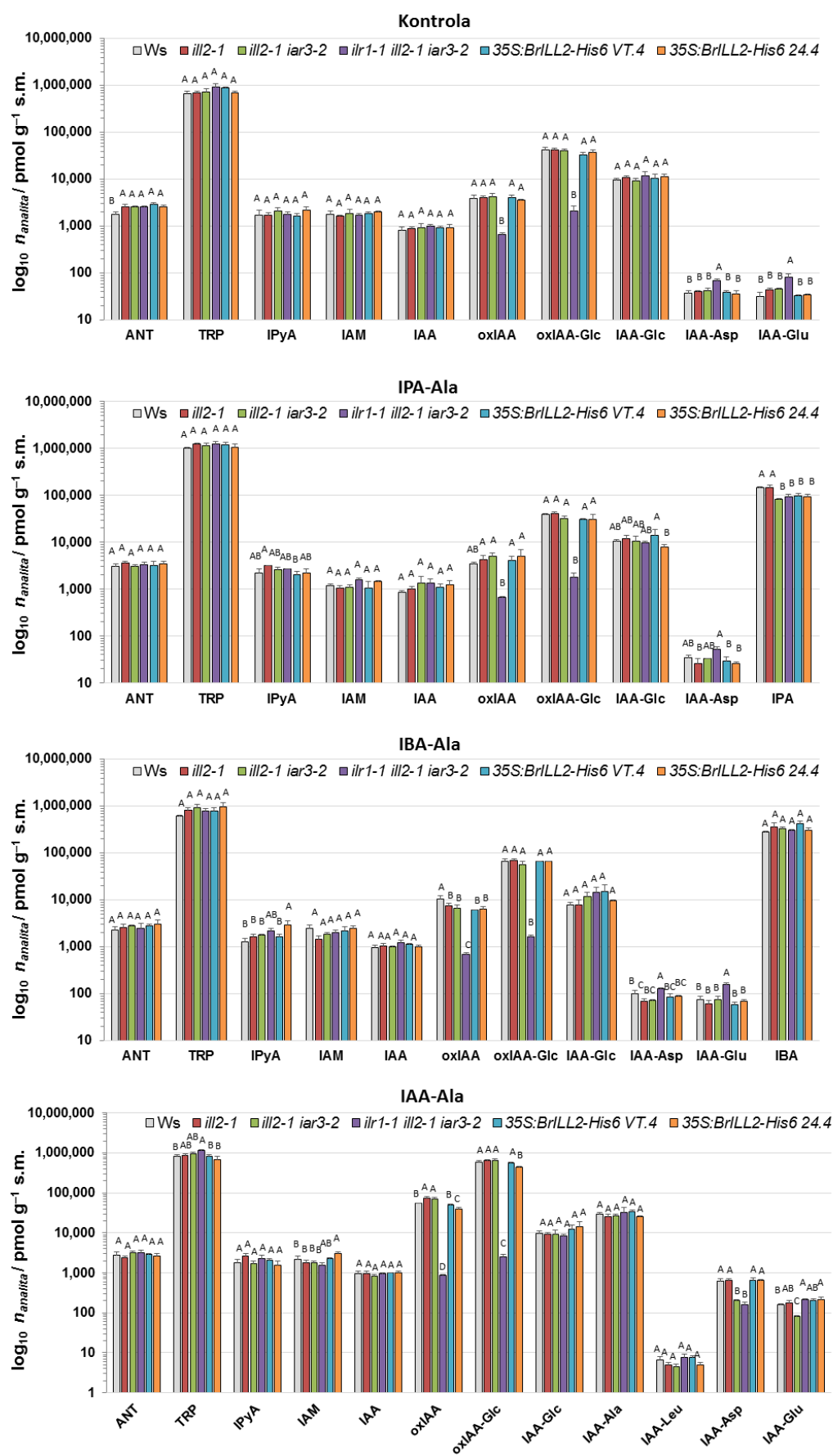
Tretman s IAA-Ala dovodi do porasta sadržaja oxIAA u svim ispitivanim linijama, čak i trostrukoj mutanti koja ima znatno niži sadržaj oxIAA od svih istraživanih linija (slika 43– prikaz oxIAA, slika 45). U ranijem istraživanju, mjerenje sadržaja IAA u trostrukoj mutanti *ilr1 ill2 iar3* ukazivalo je da ima fiziološki značajno manji sadržaj IAA u odnosu na divlji tip⁷, te biljke pokazuju fenotip povezan s deficitom sadržaja auksina, kao što je skraćen hipokotil pri uzgoju na svjetlosti, te smanjen broj lateralnog korijenja⁷. Međutim, s obzirom da je u ovom radu sadržaj IAA u trostrukoj mutanti približno jednak kao i u divljem tipu, očito se uočene promjene u fenotipu odražavaju kroz drugi mehanizam, a ne putem smanjenja sadržaja IAA. Na osnovi opažanja u ovom doktorskom radu, mutanta *ilr1 ill2 iar3* već u kontrolnim uvjetima ima značajno povišenu konjugaciju u kataboličke prekursore IAA-Asp i IAA-Glu, te smanjenu oksidaciju u oxIAA i posljedično oxIAA-Glc, a te se promjene izražavaju i fenotipski (slika 44). Uočena razlika u auksinskom metabolomu trostruke mutante u odnosu na ostale linije očituje se i u testu inhibicije rasta korijena. Linija *ilr1 ill2 iar3* već u kontrolnim uvjetima pokazuje manje lateralnog korijenja, inhibiciju rasta glavnog korijena i kraće hipokotile, a pri tretmanu s IPA-Ala i IBA-Ala (slika 44) te fenotipske karakteristike postaju još izraženije, dok sve ostale linije zadržavaju osjetljivost u rasponu divljeg tipa Ws na tretmane konjugatima auksina.

Ovi nalazi prvi su detaljan uvid u auksinski metabolom mutanti s disfunkcionalnim auksin-amidohidrolazama.

Na slici 45 prikazane su razlike među linijama u odnosu na divlji tip u sadržaju ispitivanih analita. Vidljivo je npr., kod tretmana s IPA-Ala da je sadržaj IPA u jednostrukoj mutanti *ill2* sličan istome u divljem tipu Ws (slika 45). Međutim, dvostruka *ill2 iar3* i trostruka mutanta *ilr1 ill2 iar3* imaju statistički značajno manji sadržaj IPA od divljeg tipa Ws, što upućuje da je potencijalno ili AtIAR3 ili AtILR1, a ne AtILL2 odgovorna za prepoznavanje i hidrolizu IPA-Ala u uročnjaku. Rezultat je to koji bi se trebao potkrijepiti detaljnim testom inhibicije rasta korijena i enzimatskim testovima.



Slika 44. Test inhibicije rasta korijena u ispitivanim linijama pri koncentraciji konjugata auksina $c = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$. A) Rast istraživanih linija u kontrolnim uvjetima, B) pri tretmanu s IPA-Ala, i C) pri tretmanu s IBA-Ala. Klijanci su u fazi snimanja stari 10 dana.



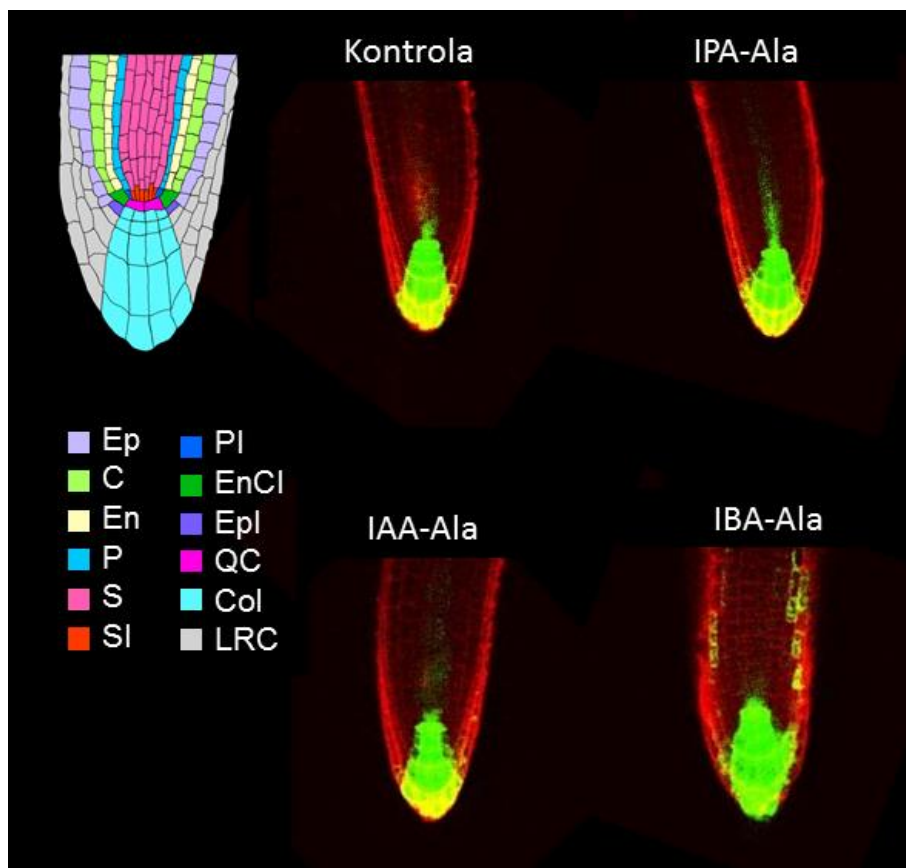
Slika 45. Usporedba linija *A. thaliana* (jednostruke mutante *ill2*, dvostruke mutante *ill2 iar3*, trostruke mutante *ilr1 ill2 iar3* i nadekspresorskih linija *35S::BrILL2-His₆* VT.4 te *35S::BrILL2-His₆* 24.4) s divljim tipom *A. thaliana* (Ws) u kontrolnim uvjetima i pri tretmanu s konjugatima auksina IPA-Ala, IBA-Ala i IAA-Ala. Rezultati su izraženi u pmol g⁻¹ suhe tvari (s.m.) (n=4). Statistički značajne razlike ispitivanih linija u odnosu na divlji tip *A. thaliana* (Ws) prikazane su različitim slovima uz razinu značajnosti od 0,05 ($p < 0,05$) u ANOVA testu uz Tukey HSD (engl. *honest significant difference*) *post hoc* statistički test značajnosti.

Usporedba ispitivanih linija s divljim tipom Ws pri svakom tretmanu (slika 45) ukazala je da sve linije, izuzev trostruke mutante, prema približno sličnim sadržajima analita kod svakog tretmana, ne pokazuju značajne razlike u odgovoru na tretmane konjugatima auksina. U potpunosti se to slaže s opažanjem da mutanta uročnjaka s defektom u samo jednom genu za auksin-amidohidrolazu ne pokazuje nikakvu promjenu fenotipa, međutim tom mutacijom postaje otpornija na onaj konjugat IAA kojeg odgovarajući defektni enzim, više ne može hidrolizirati⁷. Tek je trostruka mutanta *ilr1 iar3 ill2* u kojoj su defektne tri najzastupljenije hidrolaze, pokazala fenotip promijenjenog rasta izdanka i korijena⁷. Također, kako je odgovor na egzogene konjugate auksina ispitivan nakon 5 dana tretmana, trebalo bi ispitati raniji odgovor, tj. kraći tretman, budući da je homeostaza auksina, izražena kroz stalan sadržaj IAA u svim tretmanima i svim linijama, već postignuta.

4.5. Praćenje distribucije auksina u reporterskoj liniji *DR5rev::GFP* konfokalnom mikroskopijom

U ovom radu ispitana je promjena u distribuciji auksina u reporterskoj liniji *DR5rev::GFP* uslijed tretmana konjugatima auksina, s ciljem određivanja faze u kojoj bi se auksinski odgovor mogao ispitivati u daljnjim istraživanjima. U tu svrhu klijanci *DR5rev::GFP* linije uročnjaka tretirani su koncentracijama konjugata od $c = 1$ do $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ u vremenu od 1,5 do 3 sata. Lokalni auksinski maksimumi u vršku korijena klijanaca ispitani su zatim laserskom pretražnom konfokalnom mikroskopijom. Na slici 46 prikazane su reprezentativne slike klijanaca tretiranih 3 sata konjugatima auksina koncentracije $c = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$. Tretman sa svim konjugatima auksina doveo je do preraspodjele auksinskih maksimuma. Kod svih tretmana u zoni tihog centra i kolumele u vršku korijena zadržava se gotovo jednaka distribucija auksina, izuzev tretmana s IBA-Ala koji je doveo do pojačanja signala u toj zoni u odnosu na kontrolu. Kod tretmana s IPA-Ala pojačani signal auksina prisutan je u zoni protoksilema, tj. stele kao centralne strukture provodnih elemenata. Kod tretmana s IAA-Ala

auksin je distribuiran većinom u apikalnoj zoni vršnog meristema, dok se kod tretmana s IBA-Ala auksin redistribuira prema stanicama distalne lateralne korijenove kape (s bočne strane kolumele), ali i prema epidermalnim stanicama elongacijske zone korijena.



Slika 46. Distribucija auksina u reporterskoj liniji *DR5rev::GFP* pri tretmanu s konjugatima auksina koncentracije $c = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$ u trajanju od 3 h. Fluorescencija GFP proteina (zeleni signal) u odnosu na signal propidijevog jodida (crveni signal) snimljena je laserskim pretražnim konfokalnim mikroskopom Leica TSC SP2. Shema anatomije korijenovog vrška napravljena je ocrtavanjem signala propidijevog jodida. Ep - epiderma, C - korteks, En - endoderma, P - pericikl, S - stela, SI - inicijalne stanice stele, PI - inicijalne stanice pericikla, EnCI - inicijalne stanice C i En, EpI - inicijalne stanice Ep, QC - tihi centar (engl. *quiescent centre*), Col - stanice kolumele, LRC - lateralna korijenova kapa (engl. *lateral root cap*).

Ovi rezultati upućuju da se auksinski odgovor u reporterskoj liniji *DR5rev::GFP* događa u ranoj fazi tretmana, vidljiv je već kod 1,5 h tretmana (neprikazano). Stoga se praćenje auksinskog odgovora treba prilagoditi na ranije faze tretmana, u odnosu na 5 dana tretmana kod kojeg se promatrao auksinski metabolom različitih linija uročnjaka. Također, trebalo bi u budućim istraživanjima uzeti u obzir i lokalizaciju auksinskih transportera¹⁵³ koji omogućuju redistribuciju auksina lateralnim transportom iz kolumele prema lateralnoj korijenovoj kapi, te zatim prema elongacijskoj zoni korijena kroz epidermu, kao što je vidljivo kod tretmana s

IBA-Ala. S obzirom na razvoj novih osjetljivijih reporterskih linija za praćenje lokalnih auksinskih maksimuma^{54,154}, strategija za njihovu upotrebu u kombinaciji s produkcijom nadekspresorskih linija u auksin-amidohidrolazama pruža veliki potencijal za buduća istraživanja.

§ 5. ZAKLJUČCI

U ovom radu analizirana je auksin-amidohidrolaza BrILL2 iz kineskog kupusa *B. rapa* molekularnim, bioinformatičkim, biokemijskim, analitičkim, kao i fiziološkim metodama. Bioinformatičke analize rezultirale su sljedećim zaključcima:

- BrILL2 kao predstavnik M20D potporodice metalopeptidaza pokazuje, na osnovu sravnjivanja i izrade modela strukture, zanimljivo remodeliranje aktivnog mjesta s preferencijom prema manganovim ionima u skladu sa strukturom aktivnog mjesta homologa iz bakterija koji mogu hidrolizirati IAA-Asp kao supstrat.
- Filogenetska analiza ukazala je na vrlo rano odvajanje biljnih auksin-amidohidrolaza od njihovih strukturnih homologa u bakterijama, te na duplikaciju gena za auksin-amidohidrolazu BrILL2, vidljivu u broju ortologa u odnosu na uročnjak *A. thaliana*.
- Analiza javno dostupnih podataka razine ekspresije gena uključenih u auksinsku homeostazu ukazala je da tretmani uročnjaka s IAA mijenjaju odnos procesa koji sudjeluju u održavanju stalne koncentracije IAA na razini cijele biljke, aktiviranjem auksin-amidosintetaza GH3 kao najbrži odgovor na tretman s IAA, te utišavanjem biosintetskih gena i gena za auksin-amidohidrolaze.

Analiza BrILL2 biokemijskim i biofizičkim metodama dala je sljedeće rezultate:

- Pokazano je da je ostatak Cys139 važan za vezanje / koordinaciju metala u aktivnom mjestu, dok je Cys320 važan za stabilnost enzima i ima ulogu u polimerizaciji enzima.
- Predložena je moguća regulacija aktivnosti auksin-amidohidrolaza *in vivo* djelovanjem prirodno prisutnih reducenta u biljnim stanicama.
- Utvrđeno je da ostatak Phe385 ima ulogu u pozicioniranju indolnog prstena supstrata u šupljinu aktivnog mjesta, ali njegova uloga u raspoznavanju konjugata dugolančanih auksina u odnosu na IAA-Ala te u promjeni supstratne specifičnosti BrILL2 nije dokazana.
- Ostaci Arg295 i Met367 imaju ulogu u očuvanju stabilne konformacije proteina te potencijalno sudjeluju u stabilizaciji aktivnog mjesta.

Analize auksinskog metaboloma u klijancima *B. rapa* i *A. thaliana* analitičkim metodama dovele su do sljedećih zaključaka:

- Supstratna specifičnost enzima BrILL2 prema dugolančanim auksinskim konjugatima IBA-Ala i IPA-Ala, osim *in vitro* testovima enzimске reakcije, dokazana je i *in vivo* u tzv. „*feeding*“ eksperimentima, tretiranjem klijanaca konjugatima auksina tijekom rasta. Ujedno je dokazana hidroliza tih konjugata *in vivo* te povezana s njihovim fiziološkim djelovanjem.
- Detaljna analiza auksinskog metaboloma u klijancima kineskog kupusa *B. rapa* ukazuje da se reguliranje koncentracije slobodne aktivne IAA prilikom tretmana konjugatima auksina realizira većinom kroz oksidaciju suviška IAA u oxIAA.
- Po prvi put je detaljno opisan auksinski metabolom u modelnoj biljci *A. thaliana* uslijed disfunkcionalnih auksin-amidohidrolaza. Fenotipske promjene uočene kod trostruke mutante *ilr1 ill2 iar3* odražavaju se u auksinskom metabolomu te linije kroz puno nižu stopu oksidacije suviška auksina u oxIAA i oxIAA-Glc.
- Dokazano je da se u uročnjaku također odvija hidroliza IPA-Ala i IBA-Ala, što do sada nije utvrđeno, te je iskazana potreba za revidiranjem aktivnosti auksin-amidohidrolaza iz uročnjaka prema tim potencijalnim supstratima.

Funkcionalna istraživanja ukazala su da nadekspresija BrILL2 većinom nema učinak na metabolom auksina u odnosu na divlji tip biljaka prilikom tretmana auksinskim konjugatima.

Analizama reporterske linije *DR5rev::GFP* ukazano je na rani odgovor uročnjaka na tretman konjugatima auksina unutar prvih tri sata tretmana, te su date smjernice za buduća istraživanja.

§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ

Osim navedenih, korištene su kratice za gene uključene u homeostazu auksina, odnosno sinonimi naziva istih, te se njihov cjelokupan popis nalazi u dodatku 3. Također su korištene standardne jednoslovne i troslovne kratice za označavanje proteinogenih aminokiselina, prema nomenklaturi Međunarodne unije za čistu i primjenjenu kemiju (IUPAC) i Međunarodne unije za biokemiju i molekularnu biologiju (IUBMB).

AA/Bis	akrilamid/ bisakrilamid
ABC	engl. <i>ATP binding cassette</i>
ABCB	engl. <i>ATP binding cassette B</i>
Ai	<i>Arthrobacter ilicis</i>
AMI	amidaza
Amp	antibiotik ampicilin
ANOVA	analiza varijance, engl. <i>analysis of variance</i>
ANT	antranilat
APS	amonijev persulfat
ARF	engl. <i>auxin response factors</i>
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	adenozin trifosfat
As	<i>Arabidopsis suecica</i>
Aux/IAA	engl. <i>auxin/indole-3acetic acid proteins</i>
AUX1/LAX	engl. <i>AUXIN1/like-AUX1</i> porodica proteina
AuxRE	engl. <i>auxin response elements</i>
BLAST	engl. <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BLASTP	BLAST proteinskih sekvenci
BSA	govedi serumski albumin, engl. <i>bovine serum albumine</i>
CA	celuloza acetat
CaMV	engl. <i>Cauliflower Mosaic Virus</i>

CCD	engl. <i>Conserved Domain Database</i>
CD	cirkularni dikroizam
cDNA	komplementarna DNA
Chl	antibiotik kloramfenikol
CPG2	karboksipeptidaza G2 iz <i>Pseudomonas</i> sp.
DAO1	2-oksoglutarat i Fe(II)-ovisna oksigenaza DAO1
DNaza I	deoksiribonukleaza I iz goveđe gušterače tip IV
dNTP	deoksinukleozid trifosfat
DR5::GUS	sintetski promotor <i>DR5</i> fuzioniran s genom pokazateljem za enzim β -glukoronidazu
DSC	diferencijalna pretražna kalorimetrija, engl. <i>differential scanning calorimetry</i>
DTT	1,4-ditiotreitol
EDTA	etilendiaminotetraoctena kiselina
Ea	<i>Enterobacter agglomerans</i>
eFP	engl. <i>electronic Fluorescent Pictograph</i>
ER	endoplazmatski retikulum
4EWT	amidohidrolaza SACOL0085 iz <i>Staphylococcus aureus</i> COL
FAO	engl. <i>Food and Agriculture Organization</i>
gDNA	genomska DNA
GC-MS	plinska kromatografija spregnuta masenom spektrometrijom
GH3	auksin-amidosintetaza GH3, od engl. <i>Gretchen Hagen 3</i>
GFP	zeleni fluorescirajući protein
HPLC	tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti
HRZZ	Hrvatska zaklada za znanost
HSD	engl. <i>honest significant difference</i>
IAA	indol-3-octena kiselina, engl. <i>indole-3-acetic acid</i>
IAA-Ala	N-(indol-3-ilacetil)-L-alanin

IAA-Glc	indol-3-acetil-1-glukozil ester
IAEt	indol-3-etanol
IAAld	indol-3-acetaldehid
IAM	indol-3-acetamid
IAN	indol-3-acetonitril
IAOx	indol-3-acetaldoksim
IBA	indol-3-maslačna kiselina,
IBA-Ala	N-[4-(indol-3-il)butiril]-L-alanin
ICP-MS	masena spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom, engl. <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
ILR1	engl. <i>IAA-Leucine Resistant</i>
IPA	indol-3-propionska kiselina
IPA-Ala	N-[3-(indol-3-il)propionil]-L-alanin
IPTG	izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid
IPyA	indol-3-piruvatna kiselina
IS	interni standard
ITC	izotermalna titracijska kalorimetrija, engl. <i>isothermal titration calorimetry</i>
JA	jasmonska kiselina
kDa	kilodalton, jedinica koja odgovara 1000 g mol^{-1} , preporučena od IUPAC-a
LB	engl. <i>left border</i>
LB medij	Luria-Bertani medij
LC	tekućinska kromatografija, engl. <i>liquid chromatography</i>
LOD	granična vrijednost detekcije
LRC	engl. <i>lateral root cap</i>
MES	2-(N-morfolino)etansulfonska kiselina
MS medij	Murashige i Skoog medij

Mp	<i>Marchantia polymorpha</i>
MRM	engl. <i>multiple reaction monitoring</i>
MS	masena spektrometrija
Mt	<i>Medicago truncatula</i>
MWCO	engl. <i>molecular weight cut-off</i>
NA	numerička apertura
NCBI	engl. <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NIT	nitrilaza
NTA	nitrilooctena kiselina
OD	optička gustoća, engl. <i>optical density</i>
oxIAA	2-oksoindol-3-octena kiselina
oxIAA-Glc	2-oksoindol-3-acetil-1-glukozil ester
PAGE	poliakrilamidna gel-elektroforeza
Pc	<i>Populus canescens</i>
PCR	lančana reakcija polimeraze, engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PDB	proteinska baza podataka, engl. <i>Protein Data Bank</i>
PES	polietersulfon
PFTE	poli(tetrafluoroetilen)
PI	propidijev jodid
PIN	engl. <i>PIN-FORMED protein</i>
PMSF	fenilmetilsulfonil fluorid
Pp	<i>Physcomitrella patens</i>
PSI-BLAST	engl. <i>Position-Specific Iterative BLAST</i>
PVDF	poli(1,1-difluoroetilen)
QC	engl. <i>quiescent centre</i>
RB	engl. <i>right border</i>
rpm	broj okretaja po minuti (<i>revolutions per minute</i>)
RT	vrijeme zadržavanja
S.A.	specifična aktivnost enzima

SAUR	engl. <i>small auxin-up RNA</i>
SIM	engl. <i>selected ion monitoring</i>
SDS	natrijev dodecilsulfat, engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	elektroforeza u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima
s.m.	masa suhe tvari
SPE	engl. <i>solid phase extraction</i>
<i>sur1</i>	mutanta u tirozin transaminazi s hiperprodukcijom IAA, engl. <i>superroot1</i>
<i>sur2</i>	mutanta u P450 citokrom C-ovisnoj monooksigenazi CYP83B1 s hiperprodukcijom IAA, engl. <i>superroot2</i>
Ta	<i>Triticum aestivum</i>
TAA	triptofan aminotransferaza
TAM	triptamin
T-DNA	DNA unesena u genom iz Ti plazmida
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletilendiamin
TIR1	auksinski receptor TIR1, dio kompleksa SCF(TIR1)E3 ubikvitin ligaze
Tris	Tris-(hidroksimetil)-aminometan
UDP	uridil difostat
UGT	UDP-glikozil transferaza
UHPLC-MS/MS	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti spregnuta tandemskom spektrometrijom masa s trostrukim kvadripolom (engl. <i>Ultra High Performance Liquid Chromatography Tandem Electrospray Mass Spectrometry</i>)
VAST	engl. <i>Vector Alignment Search Tool</i>
Ws	Wassilewskija
wt	divlji tip, engl. <i>wild type</i>
YXEP	egzopeptidaza ovisna o cinku iz <i>Bacillus subtilis</i>
YUCCA	flavin-vezujuća monooksigenaza YUC

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. K. Ljung, *Development* **140** (2013) 943–950.
2. J. Ludwig-Müller, *J. Exp. Bot.* **62** (2011) 1757–1773.
3. N. D. Rawlings, A. J. Barrett i A. Bateman, *Nucleic Acids Res.* **40** (2012) D343–D350.
4. B. Bartel i G. R. Fink, *Science* **268** (1995) 1745–1748.
5. R. T. Davies, D. H. Goetz, J. Lasswell, M. N. Anderson i B. Bartel, *Plant Cell* **11** (1999) 365–376.
6. S. LeClere, R. Tellez, R. a Rampey, S. P. T. Matsuda i B. Bartel, *J. Biol. Chem.* **277** (2002) 20446–20452.
7. R. A. Rampey, S. Leclere, M. Kowalczyk, K. Ljung, B. Bartel, C. Biology i R. A. R. Texas, *Plant Physiol.* **135** (2004) 978–988.
8. B. Savić, S. Tomić, V. Magnus, K. Gruden, K. Barle, R. Grenković, J. Ludwig-Müller i B. Salopek-Sondi, *Plant Cell Physiol.* **50** (2009) 1587–1599.
9. J. J. Campanella, A. F. Olajide, V. Magnus i J. Ludwig-Müller, *Plant Physiol.* **135** (2004) 2230.
10. J. J. Campanella, S. M. Smith, D. Leib, S. Wexler i J. Ludwig-Müller, *J. Plant Growth Regul.* **27** (2007) 26–38.
11. U. Junghans, A. Polle, P. DÜchting, E. Weiler, B. Kuhlman, F. Gruber i T. Teichmann, *Plant, Cell Environ.* **29** (2006) 1519–1531.
12. A. Schuller i J. Ludwig-Müller, *New Phytol.* **171** (2006) 145–158.
13. E. Bitto, C. Bingman, L. Bittova, N.L. Houston, R.S. Boston, B.G. Fox, G.N.P. Jr i G.N. Phillips, *Proteins.* **74** (2009) 61–71.
14. O. Novák, E. Hényková, I. Sairanen, M. Kowalczyk, T. Pospíšil i K. Ljung, *Plant J.* **72** (2012) 523–536.
15. A. Pěnčík, R. Casanova-Sáez, V. Pilařová, A. Žukauskaite, R. Pinto, J. L. Micol, K. Ljung i O. Novák, *J. Exp. Bot.* **69** (2018) 2569–2579.
16. C. Darwin i F. Darwin, *Das Bewegungsvermögen der Pflanzen. u: Darwin's Gesammelte Werke*, Vol 13. Schweizer-bartsche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, 1881.
17. K.-D. Dubravec i I. Regula, *Fiziologija bilja*, Školska knjiga, Zagreb, 1995, str. 133.
18. A. W. Woodward i B. Bartel, *Ann. Bot.* **95** (2005) 707–735.
19. B. R. Glick, *Beneficial plant-bacterial interactions*, Springer International Publishing, Cham, 2015, str. 67.
20. B. Bartel, S. LeClere, M. Magidin i B. K. Zolman, *J. Plant Growth Regul.* **20** (2001) 198–216.

21. B. Salopek-Sondi, S. Pollmann, K. Gruden, R. Oelmüller i J. Ludwig-Müller, *J. Endocytobiosis Cell Res.* **26** (2015) 100–111.
22. N.D. Tivendale, J.J. Ross i J.D. Cohen, *Trends Plant Sci.* **19** (2014) 44–51.
23. A.B. Sánchez-García, S. Ibáñez, A. Cano, M. Acosta i J.M. Pérez-Pérez, *PLoS One.* **13** (2018) e0196663.
24. D.A. Korasick, T.A. Enders i L.C. Strader, *J. Exp. Bot.* **64** (2013) 2541–2555.
25. F. Devoghalaere, T. Doucen, B. Guitton i sur., *BMC Plant Biol.* **12** (2012) 7.
26. K. Tanaka, K. Hayashi, M. Natsume, Y. Kamiya, H. Sakakibara, H. Kawaide i H. Kasahara, *Plant Cell Physiol.* **55** (2014) 218–228.
27. J. Normanly, J.P. Slovin i J.D. Cohen, u: P.J. Davies (ur.) *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action*, Springer Science+ Business Media B.V., 2010, str. 36–62.
28. A. Ostin, M. Kowalczyk, R. P. Bhalerao i G. Sandberg, *Plant Physiol.* **118** (1998) 285–296.
29. M. Kowalczyk i G. Sandberg, *Plant Physiol.* **127** (2001) 1845–1853.
30. K. Kai, J. Horita, K. Wakasa i H. Miyagawa, *Phytochemistry* **68** (2007) 1651–1663.
31. K. Bialek, W. J. Meudt i J. D. Cohen, *Plant Physiol.* **73** (1983) 130–134.
32. P. E. Staswick, *Plant Physiol.* **150** (2009) 1310–1321.
33. J. Friml, *Curr. Opin. Plant Biol.* **6** (2003) 7–12.
34. J. Petrášek i J. Friml, *Development* **136** (2009) 2675–2688.
35. J. Mravec, P. Skůpa, A. Bailly, K. Hoyerová, P. Křeček, A. Bielach, J. Petrášek, J. Zhang, V. Gaykova, Y. D. Stierhof, P. I. Dobrev i sur., *Nature* **459** (2009) 1136–1140.
36. A. Pencik, B. Simonovik, S. V. Petersson, E. Henykova, S. Simon, K. Greenham, Y. Zhang, M. Kowalczyk, M. Estelle, E. Zazimalova, O. Novak, G. Sandberg i K. Ljung, *Plant Cell* **25** (2013) 3858–3870.
37. S. Porco, A. Pěnčík, A. Rashed, U. Voß, R. Casanova-Sáez, A. Bishopp, A. Golebiowska, R. Bhosale, R. Swarup, K. Swarup i sur., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113** (2016) 11016–11021.
38. N. Mellor, L. R. Band, A. Pěnčík, O. Novák, A. Rashed, T. Holman, M. H. Wilson, U. Voß, A. Bishopp, J. R. King, K. Ljung i sur., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113** (2016) 11022–11027.
39. J. Zhang, J. E. Lin, C. Harris, F. Campos Mastrotti Pereira, F. Wu, J. J. Blakeslee i W. A. Peer, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113** (2016) 11010–11015.
40. E. M. Frick i L. C. Strader, *J. Exp. Bot.* **69** (2018) 169–177.
41. L. C. Strader, A. H. Culler, J. D. Cohen i B. Bartel, *Plant Physiol.* **153** (2010) 1577–1586.
42. P. E. Staswick, B. Serban, M. Rowe i I. Tiryaki, *Plant Cell* **17** (2005) 616–627.
43. P. E. Staswick, I. Tiryaki i M. L. Rowe, *Plant Cell* **14** (2002) 1405–1415.
44. V. B. Tognetti, O. Van Aken, K. Morreel, K. Vandenbroucke, B. van de Cotte, I. De Clercq, S. Chiwocha, R. Fenske, E. Prinsen, W. Boerjan, B. Genty i sur., *Plant Cell* **22** (2010) 2660–2679.

45. G. Z. Zhang, S. H. Jin, X. Y. Jiang, R. R. Dong, P. Li, Y. J. Li i B. K. Hou, *Plant Mol. Biol.* **90** (2016) 77–93.
46. L. Fattorini, F. Della Rovere, E. Andreini, M. Ronzan, G. Falasca i M. M. Altamura, *Int. J. Mol. Sci.* **18** (2017) 1–15.
47. E. J. Chapman i M. Estelle, *Annu. Rev. Genet.* **43** (2009) 265–285.
48. R. Wang i M. Estelle, *Curr. Opin. Plant Biol.* **21** (2014) 51–58.
49. N. Ballas, L. Wong i A. Theologis, *J. Mol. Biol.* **233** (1993) 580–596.
50. T. Ulmasov, J. Murfett, G. Hagen i T. J. Guilfoyle, *Plant Cell* **9** (1997) 1963–1971.
51. E. Benková, M. Michniewicz, M. Sauer, T. Teichmann, D. Seifertová, G. Jürgens i J. Friml, *Cell* **115** (2003) 591–602.
52. J. Friml, A. Vieten, M. Sauer, D. Weijers, H. Schwarz, T. Hamann, R. Offringa i G. Jurgens, *Nature* **426** (2003) 147–153.
53. M. A. Moreno-Risueno, J. M. Van Norman, A. Moreno, J. Zhang, S. E. Ahnert i P. N. Benfey, *Science* **329** (2010) 1306–1311.
54. C.-Y. Liao, W. Smet, G. Brunoud, S. Yoshida, T. Vernoux i D. Weijers, *Nat. Methods* **12** (2015) 207–210.
55. E. Widemann, L. Miesch, R. Lugan, E. Holder, C. Heinrich, Y. Aubert, M. Miesch, F. Pinot i T. Heitz, *J. Biol. Chem.* **288** (2013) 31701–31714.
56. J. J. Campanella, V. Bakllamaja, T. Restieri, M. Vomacka, J. Herron, M. Patterson i S. Shahtaheri, *Plant Growth Regul.* **39** (2003) 175–181.
57. J. J. Campanella, J. Ludwig-Müller, V. Bakllamaja, V. Sharma, J. Ludwig-Mueller, V. Bakllamaja, V. Sharma i A. Cartier, *Plant Growth Regul.* **41** (2003) 215–223.
58. J. J. Campanella, D. Larko i J. Smalley, *Comp. Funct. Genomics* **4** (2003) 584–600.
59. J. J. Campanella, S. Kurdach, J. Bochis i J. V. Smalley, *Plant Physiol.* **177** (2018) 1595–1604.
60. J. J. Campanella, S. Kurdach, R. Skibitski, J. V. Smalley, S. Desind i J. Ludwig-Müller, *J. Plant Growth Regul.* (2019) 1–11.
61. N. Kinoshita, H. Wang, H. Kasahara, J. Liu, C. Macpherson, Y. Machida, Y. Kamiya, M. A. Hannah i N.-H. Chua, *Plant Cell* **24** (2012) 3590–3602.
62. M.G. Woldemariam, N. Onkokesung, I.T. Baldwin i I. Galis, *Plant J.* **72** (2012) 758–767.
63. A. Al-Shehbaz, M.A. Beilstein i E.A. Kellogg, *Plant Syst. Evol.* **259** (2006) 89–120.
64. M. Kiefer, R. Schmickl, D.A. German, T. Mandakova, M.A. Lysak, I.A. Al-Shehbaz, A. Franzke, K. Mummenhoff, A. Stamatakis i M.A. Koch, *Plant Cell Physiol.* **55** (2014) e3(1–9).
65. H. Tang i E. Lyons, *Front. Plant Sci.* **3** (2012) 172 (1–12).
66. <http://www.fao.org/faostat/en/#home> (Datum zadnjeg pristupa: 30. svibnja 2019.)
67. M. Björkman, I. Klingen, A.N.E. Birch, A.M. Bones, T.J.A. Bruce, T.J. Johansen, R. Meadow, J.

- Mølmann, R. Seljåsen, L.E. Smart i D. Stewart, *Phytochem.* **72** (2011) 538–556.
68. M.E. Cartea, M. Francisco, P. Soengas i P. Velasco, *Molecules* **16** (2011) 251–280.
69. F. Cheng, J. Wu, J. Liang i X. Wang, *Hortic. Res.* **1** (2014) 14024.
70. J. C. O. Koh, D. M. Barbulescu, S. Norton, B. Redden, P. A. Salisbury, S. Kaur, N. Cogan i A. T. Slater, *Plant Methods* **13** (2017) 49.
71. X. Wang, H. Wang i sur., *Nat. Genet.* **43** (2011) 1035–1039.
72. T. Murashige i F. Skoog, *Physiol. Plant.* **15** (1962) 473–496.
73. Stratagene priručnik: BL21-CodonPlus® Competent Cells, Revision #085008.
74. C. Koncz i J. Schell, *MGG Mol. Gen. Genet.* **204** (1986) 383–396.
75. R. Hellens, P. Mullineaux i H. Klee, *Trends Plant Sci.* **5** (2000) 446–451.
76. P.J. Kersey, J.E. Allen, A. Allot, M. Barba, S. Boddu, B.J. Bolt, D. Carvalho-Silva, M. Christensen, P. Davis, C. Grabmueller i sur., *Nucleic Acids Res.* **46(D1)** (2018) D802–D808.
77. InvitrogenTM, *pTrcHis* and *pTrcHis2* TOPO® TA Expression Kits, Version J (2006) 1–44.
78. Gateway® Technology, User Guide, 1. izdanje, Invitrogen Life Technologies, 2003.
79. M. D. Curtis i U. Grossniklaus, *Plant Physiol.* **133** (2003) 462–469.
80. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein> (Datum zadnjeg pristupa: 15. svibnja 2019.)
81. T.U. Consortium, *Nucleic Acids Res.* **47** (2019) D506–D515. <https://www.uniprot.org/> (Datum zadnjeg pristupa: 15. svibnja 2019.)
82. J. C. Chou, W.H. Welch i J.D. Cohen, *Plant Cell Physiol.* **45** (2004) 1335–1341.
83. J. C. Chou i Y. Huang, *J. Plant Growth Regul.* **24** (2005) 11–18.
84. S. S. Leong, W. Chiu i J. Chou, *Bot. Stud.* **50** (2009) 11–20.
85. J.F. Gibrat, T. Madej i S.H. Bryant, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6** (1996) 377–385.
86. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/VAST/vastsearch.html> (Datum zadnjeg pristupa: 15. svibnja 2019.)
87. G. Gilliland, H.M. Berman, H. Weissig, I.N. Shindyalov, J. Westbrook, P.E. Bourne, T.N. Bhat i Z. Feng, *Nucleic Acids Res.* **28** (2000) 235–242.
88. J. J. Campanella, L. Bitincka i J. Smalley, *BMC Bioinformatics* **4** (2003) 29.
89. <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2> (Datum zadnjeg pristupa: 13. svibnja 2019.)
90. L.A. Kelley, S. Mezulis, C.M. Yates, M.N. Wass i M.J.E. Sternberg, *Nat. Protoc.* **10** (2015) 845.
91. A. Marchler-Bauer, M.K. Derbyshire, N.R. Gonzales, S. Lu, F. Chitsaz i sur., *Nucleic Acids Res.* **43** (2015) D222–D226.
92. A. Smolko, F. Šupljika, J. Martinčić, N. Jajčanin-Jozić, M. Grabar-Branilović, S. Tomić, J. Ludwig-Müller, I. Piantanida i B. Salopek-Sondi, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18** (2016) 8890–8900.
93. A.M. Waterhouse, J.B. Procter, D.M.A. Martin, M. Clamp i G.J. Barton, *Bioinformatics.* **25**

- (2009) 1189–1191.
94. R.C. Edgar, *Nucleic Acids Res.* **32** (2004) 1792–1797.
95. Kumar, G. Stecher i K. Tamura, *Mol. Biol. Evol.* **33** (2016) 1870–1874.
96. D. Winter, B. Vinegar, H. Nahal, R. Ammar, G. V Wilson i N.J. Provart, *PLoS One.* **2** (2007) e718.
97. K. Toufighi, S.M. Brady, R. Austin, E. Ly i N.J. Provart, *Plant J.* **43** (2005) 153–163.
98. http://bar.utoronto.ca/affydb/cgi-bin/affy_db_exprss_browser_in.cgi (Datum zadnjeg pristupa: 1. svibnja 2019.)
99. H. Goda, E. Sasaki, K. Akiyama, A. Maruyama-Nakashita, K. Nakabayashi, W. Li, M. Ogawa, Y. Yamauchi, J. Preston, K. Aoki, T. Kiba, S. i sur., *Plant J.* **55** (2008) 526–542.
100. J. Kilian, D. Whitehead, J. Horak, D. Wanke, S. Weinl, O. Batistic, D'Angelo, E. Bornberg-Bauer, J. Kudla i K. Harter, *Plant J.* **50** (2007) 347–363
101. Morpheus, <https://software.broadinstitute.org/morpheus/> (Datum zadnjeg pristupa: 1. svibnja 2019.)
102. QIAExpressionist, QIAGEN, 2003.
103. M.M. Bradford, *Anal. Biochem.* **72** (1976) 248–254.
104. U.K. Laemmli, *Nature* **227** (1970) str. 680.
105. D. M. Bollag i S.J. Edelstein, *Protein methods* Wiley-Liss, 1991, str. 100, str. 128.
106. L. Whitmore i B. Wallace, *Nucleic Acids Res.* **32** (2004) 668–673.
<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml> (Datum zadnjeg pristupa: 1. svibnja 2019.)
107. A. Cooper, M. A. Nutley i A. Wadood, u S. E. Harding i B. Z. Chowdhry (ur.), *Protein-Ligand Interactions: hydrodynamics and calorimetry*, Oxford University Press, Oxford New York, 2000., str. 287–318.
108. P. Privalov, *Microcalorimetry of Macromolecules: The Physical Basis of Biological Structures*, Wiley, New Jersey, 2012., str. 55–63.
109. R. Lundblad, *Chemical Reagents for Protein Modification*, CRC Press, Boca Raton, 2004., str. 352.
110. Fiket, V. Roje, N. Mikac i G. Kniewald, *Croat. Chem. Acta* **80** (2007) 91–100.
111. D. Rittenberg i L. Foster, *J. Biol. Chem.* **133** (1940) 727–744.
112. A. Bent, u: K. Wang K. (ur.), *Agrobacterium Protocols. Methods in Molecular Biology*, vol 343., 2006, Humana Press.
113. E. J. Levin, D. A. Kondrashov, G. E. Wesenberg i G. N. Phillips, *Structure* **15** (2007) 1040–1052.
Protein Data Bank, www.rcsb.org/pdb/home, 2q43. DOI: 10.2210/pdb2Q43/pdb.
114. S. Rowsell, R. A. Paupit, A. D. Tucker, R. G. Melton, D. M. Blow i P. Brick, *Structure* **5** (1997) 337–347.

115. T. S. Girish, B. Vivek, M. Colaco, S. Misquith i B. Gopal, *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **69** (2013) 103–108.
116. A. P. Sanchez Carranza, A. Singh, K. Steinberger, K. Panigrahi, K. Palme, A. Dovzhenko i C. Dal Bosco, *Sci. Rep.* **6** (2016) 24212.
117. B. N. D. Rawlings i A. J. Barrett, *Methods Enzymol.* **248** (1995) 183–228.
118. G. Minasov, L. Shuvalova, J.S. Brunzelle, F.R. Collart i W.F. Anderson, *Structure of Bacillus subtilis YXEP Protein, a Dinuclear Metal Binding Peptidase from M20 Family*, 2005. Protein Data Bank, www.rcsb.org/pdb/home, 1ysj. DOI: 10.2210/pdb2211ysj/pdb.
119. www.rcsb.org/pdb/home (Datum zadnjeg pristupa: 15. svibnja 2019.)
120. S. N. Jamdar, V. N. Are, M. Navamani, S. Kumar, V. Nagar i R. D. Makde, *Arch. Biochem. Biophys.* **587** (2015) 18–30..
121. M. Šimunović, B. Žagrović i S. Tomić, *J. Mol. Recognit.* **24** (2011) 854–861.
122. J. J. Campanella, S. Sigethy i J. Ludwig-Müller, *Plant Mol. Biol. Report.* **29** (2011) 745–752.
123. R. E. Timme, T. R. Bachvaroff i C. F. Delwiche, *PLoS One* **7** (2012) e29696.
124. Z. Karačić, Biokemijska karakterizacija hidrolaze s dvojnou enzimskom aktivnošću iz mahovine *Physcomitrella patens*, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2001., str. 50.
125. K. Hori, F. Maruyama, T. Fujisawa, T. Togashi, N. Yamamoto, M. Seo, S. Sato, T. Yamada, H. Mori, N. Tajima, M. Ikeuchi, M. Watanabe i sur., *Nat. Commun.* **5** (2014) 3978.
126. D. W. Stevenson, S. Ayyampalayam, M. Barker, E. Wafula, J. G. Burleigh, M. K. Deyholos, Z. Tian, S. Mathews, T. Chen, P. S. Soltis i sur., *Gigascience* **3** (2014) 17.
127. N. J. Wickett, S. Mirarab, N. Nguyen, T. Warnow, E. Carpenter, N. Matasci, S. Ayyampalayam, M. S. Barker i sur., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111** (2014) E4859–E4868.
128. <https://www.arabidopsis.org/portals/education/growth.jsp> (Datum zadnjeg pristupa: 15. svibnja 2019.)
129. I. A. Paponov, M. Paponov, W. Teale, M. Menges, S. Chakrabortee, J. A. H. Murray i K. Palme, *Mol. Plant* **1** (2008) 321–337.
130. S. M. Kelly, T. J. Jess i N. C. Price, *Biochim. Biophys. Acta* **1751** (2005) 119–139.
131. G. B. Mcgaughey, M. Gagne i A. K. Rappe, π -Stacking Interactions **273** (1998) 15458–15463.
132. A. Hattori, H. Unno, S. Goda, K. Motoyama, T. Yoshimura i H. Hemmi, *J. Bacteriol.* **197** (2015) 3463–3471.
133. S. Chakraborty, S. Ganguli, A. Chowdhury, M. Ibba i R. Banerjee, *Biochim. Biophys. Acta* **1862** (2018) 1801–1809.
134. A. Fra, E. D. Yoboue i R. Sitia, *Front. Mol. Neurosci.* **10** (2017) 167.
135. A. Martinière, E. Bassil, E. Jublanc, C. Alcon, M. Reguera, H. Sentenac, E. Blumwald i N. Paris,

- Plant Cell* **25** (2013) 4028–4043.
136. Y. Onda, *Int. J. Cell Biol.* **2013** (2013) 585431.
137. D. Hasse, E. Andersson, G. Carlsson, A. Masloboy, M. Hagemann, H. Bauwe i I. Andersson, *J. Biol. Chem.* **288** (2013) 35333–35345.
138. A. K. Werner, I. A. Sparkes, T. Romeis i C.-P. Witte, *Plant Physiol.* **146** (2008) 418–430.
139. H. A. Lindner, A. Alary, L. I. Boju, T. Sulea i R. Me, *Byochemistry* **6** (2005) 15645–15651.
140. M. Rowinska-Zyrek, D. Witkowska, S. Potocki, M. Remelli i H. Kozłowski, *New J. Chem.* **37** (2013) 58–70.
141. T. H. Evers, M. A. M. Appelhof, E. W. Meijer i M. Merks, *Protein Eng. Des. Sel.* **21** (2008) 529–536.
142. C. Seibert i F. Raushel, *Biochemistry* **44** (2005) 6383–6391.
143. L. M. Segal i F. Wightman, *Physiol. Plant.* **56** (1982) 367–370.
144. E. A. Schneider, C. W. Kazakoff i F. Wightman, *Planta* **165** (1985) 232–241.
145. K. Matsuda, H. Toyoda, H. Nishio, T. Nishida, M. Dohgo, M. Bingo, Y. Matsuda, S. Yoshida, S. Harada, H. Tanaka, K. Komai i S. Ouchi, *J. Agric. Food Chem.* **46** (1998) 4416–4419.
146. J. Ludwig-Müller, u: H. Koltai i Y. Kapulnik (ur.), *Arbuscular mycorrhizas: Physiology and function*, Springer, Dordrecht, 2010, str. 169-189.
147. J. Ludwig-Müller, u: K. Niemi i C. Scagel (ur.), *Molecular basis for the role of auxins in adventitious rooting*. Research Signpost, Trivandrum, India, str.1–29.
148. J. Ludwig-Müller, *Plant Growth Regul.* **32** (2000) 219–230.
149. E. Epstein i J. Ludwig-Müller, *Physiol. Plant.* **88** (1993) 382-389.
150. J. Ludwig-Müller, *J. Plant Physiol.* **164** (2007) 47–59.
151. N. M. Barratt, W. Dong, D. A. Gage, V. Magnus i C. D. Town, *Physiol. Plant.* **105** (1999) 207–217.
152. M. Estelle, S. V. Petersson, M. Kowalczyk, S. Simon, K. Greenham, Y. Zhang, B. Simonovik, K. Ljung, E. Zazimalova, G. Sandberg, E. Henykova, O. Novak i A. Pencik, *Plant Cell* **25** (2013) 3858–3870.
153. I. Ottenschlager, P. Wolff, C. Wolverton, R. P. Bhalerao, G. Sandberg, H. Ishikawa, M. Evans i K. Palme, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100** (2003) 2987–2991.
154. G. Brunoud, D. M. Wells, M. Oliva, A. Larrieu, V. Mirabet, A. H. Burrow, T. Beeckman, S. Kepinski, J. Traas, M. J. Bennett i T. Vernoux, *Nature* **482** (2012) 103–106.

§ 8. DODATAK

Dodaci su zbog znatnijeg opsega pohranjeni na CD.

Dodatak 1. Srađnjivanje odabranih sekvenci biljnih i bakterijskih M20 amidohidrolaza te njihovih strukturnih homologa.

Dodatak 2. Matriks identičnosti te sličnosti izračunat u programu MatGAT.

Dodatak 3A. Ekspresija gena uključenih u homeostazu auksina pri tretmanu s IAA ($c = 1 \mu\text{mol L}^{-1}$) izvedena iz pretraživača eFP.

Dodatak 3B. Odgovarajuća toplinska mapa prema podacima iz dodatka 3A. dobivena u Morpheus alatu.

Dodatak 4. Endogene količine prekursora i metabolita IAA u klijancima kineskoga kupusa *B. rapa* pri tretmanu konjugatima auksina (IPA-Ala, IBA-Ala i IAA-Ala) koncentracije $c = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Dodatak 5. Endogene količine prekursora i metabolita IAA u klijancima uročnjaka *A. thaliana* pri tretmanu konjugatima auksina (IPA-Ala, IBA-Ala i IAA-Ala) koncentracije $c = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$.

§ 9. ŽIVOTOPIS

Ana Smolko rođena je 10. siječnja 1981. godine. Srednjoškolsko obrazovanje u programu opće gimnazije završila je 1999. godine u Sesvetama (Zagreb), a Sveučilišni diplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu 2008. godine diplomskim radom pod naslovom “Analiza proteina i glikoproteina hrena *Armoracia lapathifolia* GILIB. elektroforezom i lektinima.” pod voditeljstvom prof. dr. sc. Marijane Krsnik-Rasol i suvoditeljstvom prof. dr. sc. Biljane Balen. Tijekom diplomskog studija u sklopu IAESTE studentske razmjene boravila je jednu godinu 2002./2003. u Baselu, Švicarska u Novartis Institutu za biomedicinska istraživanja kao praktikantica na istraživanju lijekova za bolesti dišnog sustava, te također dva mjeseca 2004. godine. Od 2009. godine zaposlena je kao stručni suradnik u sustavu znanosti i visokog obrazovanja u Laboratoriju za kemijsku biologiju, Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković, te je iste godine upisala Sveučilišni poslijediplomski studij Kemije- smjer Biokemija na Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu. Dobitnica je doktorske stipendije Hrvatske zaklade za znanost 2010. godine za projekt „Analiza auksina metodom GC-MS u klijancima kineskoga kupusa *Brassica rapa* L. po djelovanju hormonima stresa, jasmonskom, salicilnom i abscizinskom kiselinom“. U sklopu te doktorske stipendije boravila je 3 mjeseca na Institutu za botaniku, Tehničkog Sveučilišta Dresden, Njemačka u grupi prof. dr. Jutte Ludwig-Müller, te jedan mjesec 2016. godine u sklopu DAAD suradnje. Sudjelovala je na 15 međunarodnih i domaćih škola i stručnih radionica. Dobitnica je nagrade Instituta Ruđer Bošković za najbolji znanstveni rad u 2016. godini u kategoriji doktoranda. Od 2016. godine zaposlena je na Institutu Ruđer Bošković kao viši stručni suradnik u sustavu znanosti i visokog obrazovanja te je do sada sudjelovala kao istraživač suradnik na deset domaćih i međunarodnih projekata. Kao prvi autor sudjelovala je na 9 domaćih i međunarodnih znanstvenih skupova, te je na dodatnih 11 doprinijela kao istraživač suradnik. Bila je neposredni voditelj triju diplomskih radova. Vanjski je suradnik - asistent Zavoda za biokemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu u izvođenju nastave u sklopu kolegija “Praktikum iz biokemije” (2008.-2011., 2017.-2019.) te “Viši praktikum biokemije” (2017.). Do sada je objavila osam znanstvenih radova, od kojih je u tri prvi autor, te je ko-autor jednog poglavlja u knjizi. Udana je i majka dvoje djece.

Izdvojena sudjelovanja na školama, treninzima i stručnim seminarima

- 2018 1st LKB MicroCal User Meeting, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb
- 2017 LKB i GE Life Sciences seminar preparativne kromatografije, Bicro BioCentar, Zagreb.
- 2016 Praktični tečaj – “Osnove proteomike”, Stručna radionica, BIOCentar- Inkubacijski centar za bioznanosti, Zagreb
- 2016 ICGEB Practical Course "Bioinformatics: Computer Methods in Molecular and Systems Biology", Stručna radionica, International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, AREA Science Park - Trst, Italija (5 dana)
- 2015 IntegraLife Workshop on Microscale Thermophoresis, Stručna radionica, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zavod za biokemiju i Nanotemper technologies, Zagreb
- 2015 qPCR Data Analysis Workflow, Stručna radionica, Technische Universitaet München i TATAA Biocenter, Freising, Njemačka (2 dana)
- 2010 Protein purification training on ÄKTA FPLC chromatography, Stručni trening, LKB Vertriebs GmbH, Institut Ruđer Bošković, Zagreb

Nagrade i priznanja

- 2017 Nagrada Instituta Ruđer Bošković za najbolji znanstveni rad u 2016. u kategoriji doktoranda
- 2016 ICGEB stipendija za sudjelovanje na radionici *ICGEB Practical Course "Bioinformatics: Computer Methods in Molecular and Systems Biology"*
- 11/2010 – 01/2011 Stipendija za doktorande Hrvatske zaklade za znanost
- 1999 – 2004 Croatian Scholarship Fund
- 2001- 2002 Državna stipendija MZOŠ

Znanstveni radovi u časopisima

1. M. Majerić Elenkov, M. Čičak, A. Knežević i **A. Smolko**, Halohydrin dehalogenase-catalysed transformations of epifluorohydrin, *Tetrahedron Lett.* **59** (2018) 406-408.
2. **A. Smolko**, J. Ludwig-Müller i B. Salopek-Sondi, Auxin Amidohydrolases – From Structure to Function: Revisited, *Croat. Chem. Acta* **91** (2018) 233-239.
3. **A. Smolko**, F. Šupljika, J. Martinčić, N. Jajčanin-Jozić, M. Grabar- Branilović, S. Tomić, J. Ludwig- Müller, I. Piantanida i B. Salopek-Sondi, The role of conserved Cys residues in Brassica rapa auxin amidohydrolase: the Cys139 is crucial for the enzyme activity and the Cys320 regulates enzyme stability, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18** (2016) 8890-8900.
4. P. Peharec Štefanić, **A. Smolko**, A. Horvatić, M. Cindrić, M. Krsnik-Rasol i B. Balen, Protein and glycoprotein patterns related to morphogenesis in horseradish tissue culture, *Croat. Chem. Acta* **86** (2013) 27-37.
5. B. Salopek-Sondi, D. Šamec, M. Mihaljević, **A. Smolko**, I. Pavlović, I. Janković i J. Ludwig- Müller, Influence of stress hormones on the auxin homeostasis in Brassica rapa seedlings, *Plant Cell Rep.* **32** (2013) 1031-1042.
6. M. Majerić Elenkov, I. Primožič, T. Hrenar, **A. Smolko**, I. Dokli, B. Salopek-Sondi i L. Tang, Catalytic activity of halohydrin dehalogenases towards spiroepoxides, *Org. Biomol. Chem.* **10** (2012) 5063-5072.
7. **A. Brcko**, A. Penčik, V. Magnus, T. Prebeg, S. Mlinarić, J. Antunović, H. Lepeduš, V. Cesar, M. Strnad, J. Rolčik i B. Salopek-Sondi, Endogenous auxin profile in the Christmas rose (*Helleborus niger* L.) flower and fruit: Free and amide conjugated IAA, *J. Plant Growth Regul.* **31** (2012), 63-78.
8. D. Perina, A. Mikoč, M. Harcet, M. Imešek, D. Sladojević, **A. Brcko** i H. Četković, Characterization of Bruton's Tyrosine Kinase Gene and Protein from Marine Sponge *Suberites domuncula*, *Croat. Chem. Acta* **85** (2012) 223-229.

Poglavlje u knjizi

1. B. Salopek-Sondi, I. Pavlović, **A. Smolko** i D. Šamec, Auxin as mediator in abiotic stress responses, u: G. Pandey (ur.), *Mechanism of Plant Hormone Signaling Under Stress*, John Wiley & Sons Inc., New Jersey, 2017, str. 3-36.

Kongresno priopćenje (sažetak) u cc časopisu

1. M. Grabar Branilović, **A. Smolko, A.**; F. Šupljika, B. Salopek-Sondi, I. Piantanida i S. Tomić, *Brassica rapa auxin-amidohydrolase: the Mn²⁺ binding affinities and the active site structure*, 10th European Biophysics Congress, Dresden, Njemačka, European Biophysics Journal 2015, Volume 46, Issue 1, Supplement S43-S248, str. S166.

Priopćenja na znanstvenim skupovima

1. I. Pavlović, **A. Smolko**, S. Johnson, A. Pěňčík, O. Novák i B. Salopek-Sondi, Early response of white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) to increased salinity: transcriptomic, hormonal and metabolic status, Pariz, Francuska, The 23rd International Conference on Plant Growth Substances, Pariz, Francuska, 2019, Abstract book str. P219-25.
2. D. Perina, M. Korolija, A. Mikoč, M. Halasz, **A. Smolko**, M. Herak Bosnar, G. Gregorović i H. Četković, Characterization of a Group II Nme protein from the red alga *Chondrus crispus*, Novo doba farmacije - spremni na izazove; New Pharmacy Era - Ready for Challenges. Dubrovnik, Hrvatska, 2019, Knjiga sažetaka str. 148-148.
3. S. Breitenbach, I. Panizel, S. Panda, A. Vainer, A. Faigenboim, A. Aharoni, **A. Smolko**, B. Salopek-Sondi, N. Bauer, H. Yasour i J. Ludwig-Müller, Auxin homeostasis in tomato and *Arabidopsis* under heat stress, ACPD 2018, Auxins and Cytokinins in Plant Development...and Interactions with Other Phytohormones, International Symposium 2018, Prag, Republika Češka, 2018, Book of Abstracts str. 54-55.
4. **A. Smolko**, N. Bauer, S. Breitenbach, J. Ludwig-Müller i B. Salopek-Sondi, Auxin homeostasis as a mechanism of abiotic stress adaptation, Plant Biology Europe Conference, University of Copenhagen, Kopenhagen, Danska, 2018, Abstract Book str. 292-292.
5. I. Pavlović, A. Pěňčík, **A. Smolko**, S. Mihaljević, N. Bauer, O. Novák i B. Salopek-Sondi, Auxins in stress response of Brassicaceae plants, International Conference Chemistry and Biology of Phytohormones and Related Substances, Olomouc, Republika Češka, 2018, Book of Abstracts str. 13-14.
6. **A. Smolko**, A. Pěňčík, I. Pavlović i B. Salopek-Sondi, (2018) Kako neaktivni konjugati auksina izazivaju inhibiciju rasta korijena: uloga auksin- amidohidrolaza i posljedična distribucija auksina u korijenu, Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2018, Knjiga sažetaka str. 10-10.
7. **A. Smolko** i B. Salopek-Sondi, Biochemical characterization of auxin amidohydrolase from *Brassica rapa*, Symposium & Workshop on Microscale Thermophoresis, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2015, Book of Abstracts str. P12.

8. M. Grabar Branilović, **A. Smolko**, F. Šupljika, B. Salopek-Sondi, I. Piantanida i S. Tomić, The active site structure of manganese-containing *Brassica rapa* auxin-amidohydrolase BrILL2, 29th European Crystallographic Meeting, Rovinj, Hrvatska, 2015, Book of Abstracts, Acta Crystallographica A71 str. 210-210.
9. **A. Smolko**, F. Šupljika, J. Martinčić, N. Jajčanin-Jozić, I. Piantanida, B. Salopek-Sondi, Possible roles of cysteine residues (Cys139 and Cys320) in the activity of auxin-amidohydrolase BrILL2 from *B. rapa*, Chemistry towards Biology 7th Central European Conference, Katowice, Poljska, 2014, Book of Abstracts str. P17-P17.
10. B. Salopek-Sondi, I. Pavlović, D. Šamec, **A. Smolko**, Š. Mihaljević, I. Šola, G. Rusak i J. Ludwig-Muller, Auxin homeostasis in *Brassica rapa* as a mechanism of plant stress response, Auxins and Cytokinins in Plant Development...and Interactions with Other Phytohormones, The Academy of Sciences of the Czech Republic, Prag, Republika Češka, 2014, Book of Abstracts str. 138-138.
11. D. Šamec, **A. Smolko**, J. Ludwig-Müller i B. Salopek-Sondi, Identification and quantification of plant hormones auxins in *Brassica rapa* seedlings using GC-MS, 13th International Chromatography School, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska, 2012, Book of Abstracts str. 47-47.
12. **A. Brcko**, Utjecaj hormona stresa (SA, JA, ABA) na homeostazu endogenih auksina u klijancima *Brassica rapa* L., Sastanak Hrvatskog društva za biljnu biologiju, Zagreb, Hrvatska, 2011, usmeno izlaganje.
13. D. Šamec i **A. Brcko**, Biljne bioaktivne molekule: od regulacije biljnog razvitka do pozitivnog učinka na zdravlje, Znanstveni susreti 3. vrste, Institut Ruđer Bošković Zagreb, 2011, Sažeci.
14. M. Majerić Elenkov, M. Čičak, I. Dokli, **A. Brcko** i B. Salopek-Sondi, Catalytic Activity of Halohydrin Dehalogenases Towards Spiroepoxides, Twelfth Tetrahedron Symposium: Challenges in organic and bio-organic chemistry, Elsevier, Sitges, Španjolska, 2011.
15. **A. Brcko**, Auxin amidohydrolases from *Brassica rapa* L. - a contribution to auxin homeostasis, Südostdeutsche Pflanzenphysiologie Tagung 2011, Institut für Biologie, Abteilung Pflanzenphysiologie, Leipzig, Njemačka, 2011, usmeno izlaganje.
16. **A. Brcko**, M. Brajlović, S. Kazazić, N. Jajčanin Jozić i B. Salopek-Sondi, A possible interplay between two conserved Cys residues of auxin-amidohydrolase BrILL2 from *Brassica rapa* L., The 5th Central European Conference - Chemistry towards Biology, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, 2010, Book of Abstracts str. 71-71.
17. I. Janković, D. Šamec, **A. Brcko** i B. Salopek-Sondi, Influence of stress-hormone treatments (ABA, SA, JA) on the *Brassica rapa* seedlings, 5th Slovenian Symposium on Plant Biology with

International Participation, Slovenian Society of Plant Biology, Ljubljana, Slovenija, 2010, Book of abstracts (2010) str. 60-60.

18. **A. Brcko**, S. Mihaljević, B. Salopek-Sondi, Characterization of the gibberellin 20-oxidase expression patterns in different developmental stages of Christmas rose (*Helleborus niger* L.) flower and seeds, 1st International Symposium of Biotech students, Student Association of Biotechnology-Helix, Zagreb, Hrvatska, 2009, Book of Abstracts str. 21-22.
19. **A. Brcko**, S. Rošić, M. Mihaljević i B. Salopek-Sondi, Detection of gibberellin-20-oxidase in Christmas rose (*Helleborus niger* L.) tissues in vitro, EMBO Young Scientists Forum, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska, 2009, Book of Abstract str. 12-12.