Konformacijska dinamika adenilacijske domene tirocidin-sintetaze 1 praćena metodom fluorescencijske sprektroskopije

Šprung, Matilda

Doctoral thesis / Disertacija

2014

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:615100

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
KEMIJSKI ODSJEK

Matilda Šprung

KONFORMACIJSKA DINAMIKA ADENILACIJSKE DOMENE TIROCIDIN-SINTETAZE 1 PRAĆENA METODOM FLUORESCENCIJSKE SPEKTROSKOPIJE

DOKTORSKI RAD

Mentor:

Dr. sc. Maja Pavela-Vrančić

Zagreb, 2014.



UNIVERSITY OF ZAGREB
FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

Matilda Šprung

CONFORMATIONAL DYNAMIC OF THE ADENYLATION DOMAIN IN TYROCIDINE SYNTHETASE 1 FOLLOWED BY FLUORESCENCE SPECTROSCOPY

DOCTORAL THESIS

Supervisor:

Dr. sc. Maja Pavela-Vrančić

Zagreb, 2014.

Ova je disertacija izrađena na Odjelu za kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Splitu, pod vodstvom prof. dr. sc. Maje Pavela-Vrančić.

Zahvaljujem

Mentorici prof. dr. sc. Pavela-Vrančić na ukazanom povjerenju i podršci tijekom izrade ovog rada.

Izv. prof. dr. sc. Gruić-Sovulj i prof. dr. sc. Žanić-Grubišić
na pažljivom čitanju i korisnim sugestijama koje su omogućile da ovaj rad dobije svoj konačni oblik.

Posebno hvala kolegama Odjela za kemiju Prirodoslovno matematičkog fakulteta te kolegama i prijateljima iz Laboratorija za imunologiju i medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta u Splitu na ugodnoj radnoj atmosferi i podršci koju su mi pružali za čitavo vrijeme izrade ovog rada.

Doc. dr. sc. Viljemki Bučević-Popović na stručnoj pomoći, prijateljskoj podršci i razumijevanju svih frustracija jednog mladog znanstvenika.

Neizmjerno sam zahvalna svojoj obitelji na bezuvjetnoj ljubavi, vjeri i podršci na mom životnom putu.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. LITERATURNI PREGLED 4
2.1. Strukturna raznolikost neribosomski sintetiziranih peptida (NRP) 5
2.2. Modularna građa neribosomskih peptid-sintetaza (NRPS) 6
2.3. Strukturno-funkcionalna obilježja NRPS domena 8
2.3.1. A-domena 8
2.3.2. T-domena ili protein-nosač peptidilne skupine (PCP) 9
2.3.3. C-domena 10
2.3.4. TE-domena 11
2.4. ANL-superobitelj enzima 12
2.4.1. Aktivno mjesto PheA 13
2.4.3. Reakcijski mehanizam 14
2.5. Strukture modula i didomena neribosomskih peptid-sintetaza 15
2.7. Biosintetski sustav za sintezu tirocidina 18
2.7.1. Specifičnost TycA pri odabiru aminokiseline 19
2.8. Intrinzična fluorescencija proteina 20
2.8.1. Ekstrinzična fluorescencija proteina 22
2.8.2. Fluorescencija kod proteina pripadnika ANL-superobitelji 22
3. MATERIJALI I METODE 24
3.1. Materijali 25
3.1.1. Osnovne kemikalije 25
3.1.2. Aminokiseline i nukleotidi 25
3.1.3. Boje 25
3.1.4. Proteini, enzimi i oligonukleotidi 25
3.1.5. Sastojci mikrobioloških hranjivih podloga 26
3.1.6. Kromatografske kolone 26
3.1.7. Ostali materijali 26
3.1.8. Komercijalni kompleti ("kitovi") 26
3.1.9. Sojevi bakterije *E. coli* 26
3.1.11. Mikrobiološke hranjive podloge 28
3.2. Standardne metode 28
3.2.1. Određivanje koncentracije proteina 28
3.2.2. Elektroforetske metode 29
3.2.3. Mikrobiološke metode 30
3.3. Metode rekombinantne DNA 31
3.3.1. Lančana reakcija polimeraze (PCR) 31

3.3.2. Umnažanje i kloniranje kodirajućih regija za A- i T-domenu 31
3.3.3. Probir bakterijskih kolonija s insertom 33
3.3.4. Metoda usmjerene mutageneze 34
3.4. Metode rada s proteinima 36
3.4.1. Uzgoj bakterija i priprava proteinskih ekstrakata prekomjerno eksprimiranih TycA-A i TycA-T_1 proteina 36
3.4.2. Pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom na FPLC uređaju 37
3.4.3. Pročišćavanje proteina ionsko izmjenjivačkom kromatografijom 38
3.5. Metode biokemijske karakterizacije proteina 38
3.5.1. Potrošnja ATP i standardna krivulja 38
3.5.2. Cirkularni dikroizam (CD spektri) 40
3.5.3. Ograničena proteoliza 40
3.5.4. Fluorescencijska svojstava TycA-A i TycA-T_1 proteina 40
3.6. Bioinformatičke metode 42
4. REZULTATI 44
4.1. Analiza mikrookoliša Trp u modelima proteina TycA-A 45
4.2. Heterologna ekspresija proteina TycA-A, TycA-T_1 i TycA-T_2 48
4.2.1. Kloniranje DNA za proteine TycA-A, TycA-T_1 i TycA-T_2 u ekspresijski vektor pQE60 48
4.2.2. Optimizacija uvjeta prekomjerne ekspresije proteina TycA-A, TycA-T_1 i TycA-T_2 50
4.2.3. Usmjerena mutageneza na TycA-A i TycA-T_1 proteinima 51
4.2.4. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje proteina TycA-A divljeg tipa i mutanti 51
4.2.5. Pročišćavanje TycA-T_1 divljeg tipa i mutante 53
4.3. Biokemijska karakterizacija pročišćenih proteina 55
4.3.1. Mjerenje potrošnje ATP-a za protein TycA-A divljeg tipa i mutanti 55
4.3.2. CD-spektri 57
4.5.1. Triptička digestija proteina TycA-A divljeg tipa i mutanti 59
4.4. Emisijski spektri 60
4.4.1. Emisijski spektar proteina TycA-A divljeg tipa i mutanti 60
4.4.2. FRET u proteinu TycA-A 62
4.4.3. Emisijski spektar proteina TycA-T_1 63
4.5. Utjecaj vezanja supstrata na promjenu konformacije TycA-A 63
4.5.2. Termalna denaturacija proteina TycA-A divljeg tipa i mutanti 63
4.5.3. Ekstrinzična fluorescencija s 1-anilinonaftalen-8-sulfonskom kiselinom (ANS) 65
4.5.4. Analiza valne duljine maksimuma intenziteta fluorescencije kod proteina TycA-A u prisustvu supstrata 67
4.6. Gašenje fluorescencije proteina TycA-A divljeg tipa i mutanti 67

4.6.1. Analiza dosega gašenja fluorescencije korištenjem akrilamida i KI 67
4.6.2. Gašenje fluorescencije KI 68
4.6.3. Gašenje fluorescencije proteina akrilamidom bez prisutnih supstrata 70
4.6.4. Utjecaj supstrata na gašenje fluorescencije akrilamidom 71
5. RASPRAVA 76
5.1. Intrinzična fluorescencija proteina TycA-A 78
5.2. Utjecaj vezanja supstrata na konformaciju proteina TycA-A 81
5.3. Intrinzična fluorescencija proteina TycA-T_1 82
5.4. Konformacijske promijene TycA-A u prisustvu nepripadajućih supstrata 83
5.5. Usporedba fenilalanin-aktivirajuće adenilacijske domene gramicidin-sintetaze 1 s TycA-A 85
6. ZAKLJUČCI 87
7. LITERATURA 90
8. POPIS KRATICA 102
9. ŽIVOTOPIS 106

SAŽETAK

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

KONFOMRACIJSKA DINAMIKA ADENILACIJSKE DOMENE TIROCIDIN-SINTETAZE 1 PRAĆENA METODOM FLUORESCENCIJSKE SPEKTROSKOPIJE

MATILDA ŠPRUNG

Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Odjel za kemiju,
N. Tesle 12, 21 000 Split

Neribosomske peptid-sintetaze (NRPS) su veliki multienzimski kompleksi koji nizom transpeptidacijskih reakcija kataliziraju sintezu biološki aktivnih peptidnih produkata. Proces biosinteze započinje na adenilacijskoj (A) domeni koja u prvom koraku katalizira nastanak aminoacil-adenilata, a u drugom prijenos aminokiseline na susjednu tiolacijsku (T) domenu. Kristalne strukture A-domena ukazuju na velike strukturne preinake tijekom katalitičkog ciklusa, a dovode se u vezu s usklađivanjem katalitičkih koraka i interakcijom sa susjednom T-domenom.

U ovom radu, konformacijske promijene A-domene tirocidin-sintetaze 1 (TycA-A) ispitane su u otopini metodom fluorescencijske spektroskopije. TycA-A sadrži pet triptofana u primarnoj sekvenci: W227, W301, W323, W376 i W406. Procjena dostupnosti njihovih bočnih ogranaka izrađena je na temelju homolognih modela TycA-A u dvije konformacije. Gašenje fluorescencije akrilamidom provedeno na divljem tipu i mutantama TycA-A s pojedinačno zamjenjenim triptofanima, ukazuje na dvije skupine fluorofora različite dostupnosti okolnom otapalu. Prisustvo supstrata ima utjecaja jedino na W227 koji može poslužiti kao intrinzična fluorescencijska proba. Uloga nepripadajućih aminokiselina na konformaciju TycA-A, ispitana je na mutanti sa samo jednim fluorescirajućim triptofanom te ukazuje na suboptimalnu konformaciju i slabiju zaštitu reaktivnog međuprodukta od hidrolize. Promjena konformacije kao odraz vezanja supstrata također je ispitana pokusima ograničene triptičke digestije i diferencijalne fluorimetrije.

(108 + IX stranica, 52 slike, 9 tablica, 108 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: adenilacijska domena/ neribosomske peptid-sintetaze/ konformacijska dinamika/ tirocidin-sintetaza 1

Mentor: dr. sc. Maja Pavela-Vrančić, red. prof. u trajnom zvanju

Ocjenitelji: dr. sc. Ita Gruić-Sovulj, izv. prof.
dr. sc. Tihana Žanić-Grubišić, red. prof.

Rad prihvaćen: 03. prosinca 2014.

ABSTRACT

Univrsity of Zagreb
Faculty of Science
Department od Chemistry

Doctoral Thesis

CONFORMATIONAL DYNAMIC OF THE ADENYLATION DOMAIN IN TYROCIDINE SYNTHETASE 1 FOLLOWED BY FLUORESCENCE SPECTROSCOPY

MATILDA ŠPRUNG

University of Split, Faculty of Science, Department of Chemistry
N. Tesle 12, 21 000 Split

Nonribosomal peptide synthetases (NRPS) are large multienzyme complexes that catalyze the synthesis of biologically active peptides in an array of transpeptidation reactions. The process of biosynthesis starts with the adenylation (A) domain, which in the first half reaction catalyzes the synthesis of the aminoacil-adenylate, and in the second amino acid transfer to the adjacent tiolation (T) domain. Crystal structures of various A-domains show large structural rearrangements accompanying the catalytic process that are in correlation with the coordination of catalytic steps and interaction with the adjacent T-domain.

Here we report the investigation of conformational changes in the A-domain of tyrocidine synthetase 1 (TycA-A) probed by fluorescence spectroscopy. TycA-A comprises five tryptophan residues in the primary sequence: W227, W301, W323, W376 and W406. Trp side chain accessibility was probed using TycA-A homology models in two distinctive protein conformations. Fluorescent quenching with acrylamide, carried out on the wild type and mutant TycA-A proteins caring individual Trp substitutions, revealed two independent groups of fluorophores. The Results show that the presence of reaction substrates has affected only the W227 residue which can serve as an intrinsic fluorescent probe. The effect of noncognate amino acid substrates on the TycA-A conformation was probed on mutant TycA-A bearing only one fluorescent Trp residue. The Results show a suboptimal protein conformation and reduced protection of the reaction intermediate from hydrolysis. Conformational changes induced by substrate binding were probed by limited proteolysis and differential scanning fluorimetry methods.

(108 + IX pages, 52 figures, 9 tables, 108 references, original in Croatian)

Keywords: adenylation domain/ nonribosomal peptide synthetases/ conformational dynamics/ tyrocidine synthetase 1

Mentor: dr. Maja Pavela-Vrančić, Full Professor

Reviewers: dr. sc. Ita Gruić-Sovulj, Associate Professor
dr. sc. Tihana Žanić-Grubišić, Full Professor

Thesis accepted: December 3rd, 2014

1. UVOD

Neribosomske peptid-sintetaze (NRPS) su modularni multifunkcionalni enzimi, sačinjeni od velikog broja različitih katalitičkih domena združenih na jednom ili više polipeptidnih lanaca. Na ovim enzimskim sustavima nastaje veliki broj kemijski raznolikih prirodnih produkata, osobito značajnih farmakoloških svojstava poput antibiotika, toksina, imunsupresora i antitumorskih spojeva, procesom fino usklađenih kemijskih reakcija.

Minimalni sastav modula, odgovornog za aktivaciju i ugradnju jedne aminokiseline u rastući polipeptidni lanac, čine adenilacijska (A), tiolacijska (T) te kondenzacijska (C) domena. Sinteza na NRPS započinje aktivacijom aminokiselinskog supstrata na A-domeni, koja uz utrošak ATP-a, katalizira nastanak aminoacil-adenilata. Aktivirana se aminokiselina, uz otpuštanje pirofosfata (PPi), prenosi na fosfopanteteinski kofaktor susjedne T-domene. Aminoacilni ili peptidilni intermedijeri se posredstvom T-domene, dostavljaju aktivnom mjestu C-domene koja katalizira nastanak peptidne veze. Osim spomenutih, u sastavu modula mogu se naći i domene koje dodatno kemijski modificiraju peptidni produkt, poput epimerazne (E), oksidoreduktazne (Ox) ili metiltransferazne (Mt domene), što doprinosi strukturnoj varijabilnosti konačnog peptidnog produkta.

Aril- i acil-CoA-sintetaze, A-domene NRPS te luciferaza iz krijesnice pripadaju ANL-superobitelji enzima. Kristalne strukture predstavnika ove obitelji, ukazuju na sličnu topologiju s istaknutom manjom C-terminalnom i većom N-terminalnom poddomenom, koje međusobno zatvaraju pukotinu aktivnog centra. Katalitički ciklus na A-domeni čine dvije nezavisne polureakcije pri čemu u prvoj nastaje aminoacil-adenilat, a u drugoj tioester između aminokiseline i tiolne skupine fosfopanteteinskog kofaktora T-domene. Konformacijske promijene koje prate ovaj proces poznate pod nazivom alternacija poddomena, očituju se u rotaciji manje poddomene za 140^{o} u odnosu na veću, što štiti nastali aminoacil-adenilat od nespecifične hidrolize i prestrukturira aktivni centar za drugu polureakciju.

Iako je do danas objavljeno devedeset i osam struktura četrdeset različitih enzima pripadnika ANL-superobitelji, dinamika proteinske konformacije, posebice u otopini i dalje je neistražena. Usklađenost konformacijskih promijena s katalitičkim ciklusom na adenilacijskoj domeni, nužna je za uspješnu sintezu neribosomski sintetiziranih peptida. Stoga je za konstrukciju hibridnih neribosomskih peptid-sintetaza od velike važnosti detaljno poznavanje konformacijskih promjena koje prate proces katalize.

Monomodularna tirocidin-sintetaza 1 (TycA), dio je biosintetskog sustava za sintezu dekapeptidnog antibiotika tirocidina. U ovom radu korištene su A i T-domena TycA (TycA-A i TycA-T) kao zasebno eksprimirani i pročišćeni model proteini. Cilj ovog rada bilo je ispitati konformacijske promjene TycA-A u otopini, tijekom prve i druge polureakcije, koristeći svojstvo intrinzične fluorescencije

proteina. Fluorescencija proteina najvećim dijelom potječe od triptofana (Trp) koji je relativno slabo brojčano zastupljen te se može selektivno pobuditi na valnoj duljini od 295 nm. Zbog izrazito hidrofobne prirode njegovog indolnog bočnog lanca, najčešće dolazi u dijelovima proteina koji su djelomično ili potpuno nedostupni okolnom otapalu. Budući da ga odlikuju specifična spektralna svojstva, idealan je kao fluorescencijska strukturna proba u proteinima. Valja napomenuti da se za razliku od metode ogiba X-zraka o kristale proteina, metodom fluorescencijske spektroskopije promijene proteinske strukture promatraju u otopini.

S obzirom da aminokiselinski slijed proteina TycA-A sadrži pet potencijalno fluorescirajućih Trp, bilo je potrebno ispitati njihove pojedinačne doprinose emisijskom spektru proteina te utvrditi koji može poslužiti kao intrinzična fluorescencijska proba konformacijskih promjena. U radu je također ispitan utjecaj vezanja nepripadajućih supstrata na konformaciju proteina. Smatra se da će rezultati ove studije pridonijeti boljem razumijevanju usklađenosti konformacijskih promjena i katalitičkog ciklusa na A-domenama NRPS.

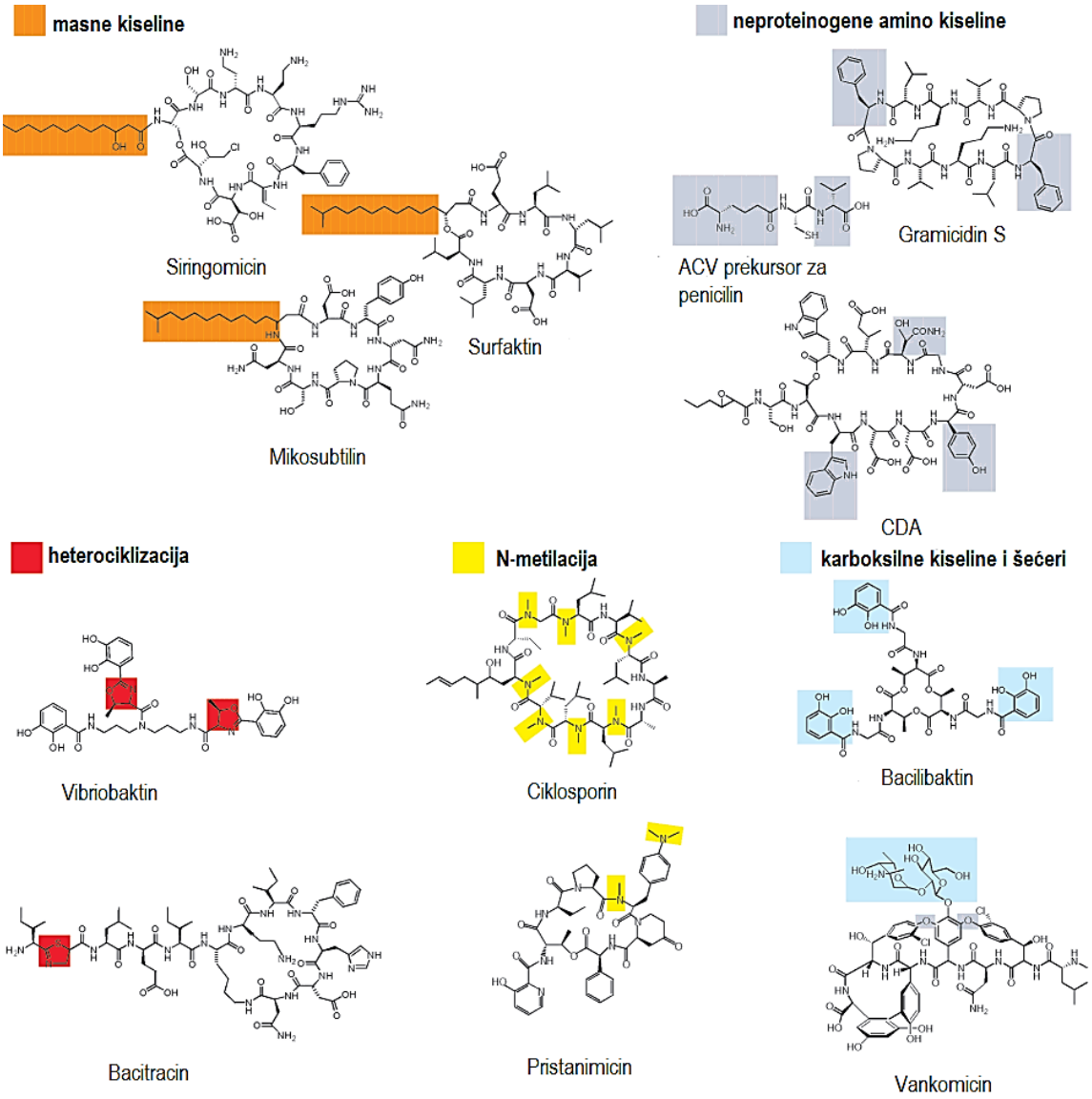
2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Strukturna raznolikost neribosomski sintetiziranih peptida (NRP)

Neribosomski sintetizirani peptidi (NRP) su biološki aktivni spojevi izrazite kemijske raznolikosti i farmakološke primjene. Od otkrića penicilina kasnih 20-ih godina prošlog stoljeća pa do danas, ovi spojevi imaju značajan utjecaj na ljudsko zdravlje te se primjenjuju kao antibiotici, imunosupresori i antitumorski spojevi. Vodeći proizvođači NRP su *gram* pozitivne bakterije rodova *Actinomycetes* i *Bacilli*, filamentozne gljive i morski mikroorganizmi [1]. S kemijskog stajališta riječ je o razgranatim cikličkim i heterocikličkim strukturama prosječne duljine od tri do nekoliko desetaka aminokiselinskih ostataka [2, 3]. Sinteza NRP odvija se na velikim modularnim enzimskim sustavima, neribosomskim peptid-sintetazama (NRPS) koje sintetiziraju peptidni produkt neovisno o molekuli RNA. Za razliku od klasične ribosomske sinteze ograničene skupinom od 20 prirodnih aminokiselina, do danas je poznato oko 500 različitih građevnih jedinica neribosomske sinteze [4]. Osim velikog broja različitih monomera, izrazitoj strukturnoj varijabilnosti ovih spojeva doprinose i brojne kemijske modifikacije peptidne okosnice od kojih su neke prikazane na slici 1 [5].

Osnovna karakteristika svih NRP je rigidnost strukture koja određuje konformaciju sintetiziranog peptida i uvjetuje vrlo specifično prepoznavanje ciljanih molekula. Procesi heterociklizacije, makrociklizacije ili glikozilacije, osim što stabiliziraju peptidnu okosnicu čine je otpornom na proteolizu, te direktno određuju biološku aktivnost ovih spojeva [2, 6].

Primjer izravne medicinske primjene NRP je lipopeptidni antibiotik daptomicin, koji se koristi kod bakterijskih infekcija koje pokazuju rezistenciju na penicilin, meticilin i vankomicin. Daptomicin se umeće u lipidni dvosloj narušavajući integritet bakterijske membrane što naposljetku dovodi do stanične smrti [7-9]. U novije vrijeme bakterijska rezistencija na postojeće antibiotike predstavlja sve učestaliji medicinski problem [10, 11]. Uporaba antibiotika u kombinaciji sa spojevima koji pospješuju antibiotsko djelovanje, primjenjuje se kao jedan od načina obrane od rezistencije. Tako primjerice aspergilomarasmin A iz gljivice *Aspergillus versicolor*, djeluje kao vrlo specifični inhibitor metalo-β-laktamaze 1 koja hidrolizira antibiotiski β-laktamski prsten [12]. Drugu skupinu novih antibiotika s potpuno drugačijim mehanizmom djelovanja čine acildepsipeptidi (ADEP) izolirani iz *Streptococcus hawaiiensis*. Istraživanja na ovoj skupini antibiotika pokazala su da se acildepsipeptidi ciljano vežu za podjedinicu iz bakterijskog proteosomalnog kompleksa, ClpP. Vezanje ADEP-a inducira konformacijsku promjenu koja uzrokuje nekontroliranu proteosomalnu razgradnju bakterijskih proteina i konačno smrt stanice [13, 14]. Gotovo nepresušna prirodna varijabilnost neribosomskih peptid-sintetaza te nemogućnost jednostavne *in vitro* sinteze, zasigurno će ih i dalje činiti glavnim izvorom klinički važnih prirodnih proizvoda [15].

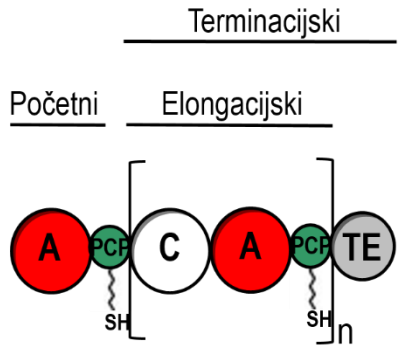


Slika 1. Neribosomski sintetizirani peptidi. Primjeri neribosomski sintetiziranih peptida s označenim strukturnim karakteristikama [5].

2.2. Modularna građa neribosomskih peptid-sintetaza (NRPS)

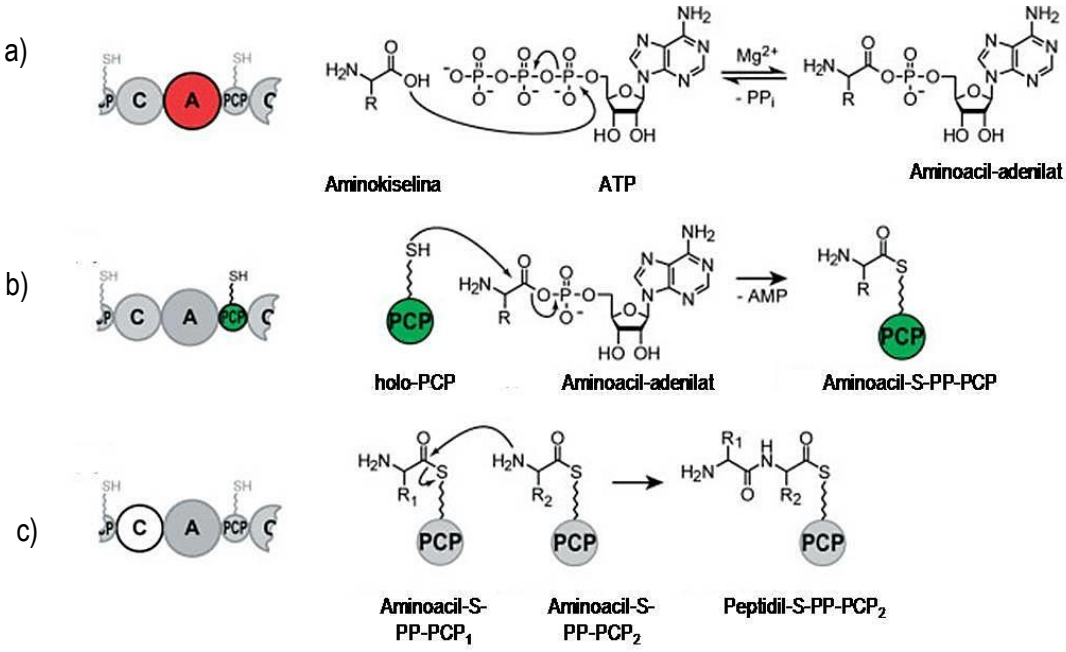
Osnovna građevna komponenta neribosomskih peptid-sintetaza je modul. Razlikujemo tri vrste modula, početni, elongacijski i terninacijski modul (slika 2.). Početni modul započinje sintezu peptidnog produkta aktivacijom odabrane aminokiseline na adenilacijskoj (A) domeni. Elongacijski modul čine domene koje su odgovorne za ugradnju po jedne aminokiseline u rastući polipeptidni lanac, a čine ga A-domena, protein-nosač peptidilne skupine (PCP) ili tiolacijska (T) domena, te kondenzacijska (C)

domena. Terminacijski modul, osim spomenutog minimalnog sastava, sadrži još i tioesteraznu (TE) domenu koja hidrolitički ili ciklizacijom otpušta sintetizirani peptid s proteinskog kompleksa [1].



Slika 2. Shematski prikaz modularne građe NRPS. Prikazani su tipični početni modul, elongacijski modul koji se sastoji iz C-, A- i PCP-domene, te terminacijski modul koji obuhvaća TE-domenu.

Domene su nezavisne katalitičke jedinice koje mogu biti samostalne ili činiti dio polipeptidnog lanca modula. Sinteza neribosomski sintetiziranih peptida započinje aktivacijom aminokiseline na A-domeni u obliku aminoacil-adenilata uz utrošak ATP-a i otpuštanje PP_i (slika 3). Aktivirana aminokiselina se prenosi na T-domenu u obliku tioestera vezanog za fosfopanteteinski kofaktor. Sa T-domene se aminokiselina prenosi na C-domenu koja naposljetku katalizira nastanak peptidne veze. Konačan peptidni produkt otpušta se s NRPS kompleksa hidrolizom ili makrociklizacijski djelovanjem TE-domene [16, 17].



Slika 3. Reakcijski mehanizam minimalnog modula: a) aktivacija aminokiseline uz potrošnju molekule ATP-a pri čemu nastaje aminoacil-adenilat, b) fosfopanteteinski kofaktor PCP-domene s tiolnom skupinom veže aktiviranu

aminokiselinu uz oslobađanje AMP-a, c) C-domena katalizira nastajanje peptidne veze između dvaju susjednih aminoacil-S-PP-PCP-ova [17].

Osim osnovnog seta domena, NRPS mogu sadržavati i domene koje vrše dodatnu kemijsku modifikaciju konačnog peptidnog produkta, poput ciklizacijske (Cy), oskidoreduktazne (Ox), epimerazne (E) i metiltransferazne (Mt) domene [1, 18, 19]. Nova istraživanja pokazuju kako se uz genske klastere za NRPS, mogu naći i geni koji kodiraju za specifične peptidaze ili glikozil-transferaze. Pretpostavlja se da peptidaze sudjeluju u aktivaciji inaktivne preteče peptidnog produkta koja se potom vjerojatno putem ABC transportera usmjerava u periplazmatski prostor, a kroz vanjsku membranu putem TolC-sličnog proteina. Ovim načinom moglo bi se objasniti kako se stanice koje sintetiziraju određeni peptidni produkt, štite od njegovog nepovoljnog učinka [20].

Sinteza na nerobosomskim peptid-sintetazama odvija se u pravilu kolinearno, što znači da broj i redoslijed ugrađenih monomernih jedinica u konačnom peptidnom produktu odgovara broju i redoslijedu modula u pripadajućem biosintetskom sustavu. Opisani linearni tip sinteze daje mogućnost da se relativno jednostavno na osnovu strukture promatranog NRPS-a predvidi struktura i konformacija biosintetskog produkta. Međutim, danas su poznati brojni primjeri koji pobijaju pravilo kolinearnosti bilo da je riječ o jednostavnom preskakanju pojedinih domena i/ili modula ili njihovom ponovljenom korištenju [1, 8, 20, 21].

Nedavna istraživanja ukazala su na još jedan zanimljiv izuzetak od kolinearng tipa sinteze peptidnih produkata. Tako se antibiotik pacidamicin sintetizira djelovanjem devet NRPS proteina (PacD, PacH, PacI, PacJ, PacL, PacN, PacO, PacP te PacW) i aminoacil-transferaze PacB. Supstrati proteina PacB su pripadajuća acil-tRNA i slobodna amino skupina peptidilnog intermedijera vezanog za PacH. S obzirom da se kao supstrat koristi acil-tRNA nastala sintezom na aa-tRNA-sintetazi, ova skupina enzima, čini izravnu sponu između primarnog i sekundarnog metabolizma [22]. Drugi primjer ovakve sinteze čini skupina enzima ciklodipeptid-sintaza (CDPS) koja također tijekom biosineze koristi aminokiselinu prethodno aktiviranu pomoću aa-tRNA-sintetaza. Ciklodipeptid-sintaze kao i PacB tako predstavljaju tRNA-ovisan tip NRP sinteze [23, 24].

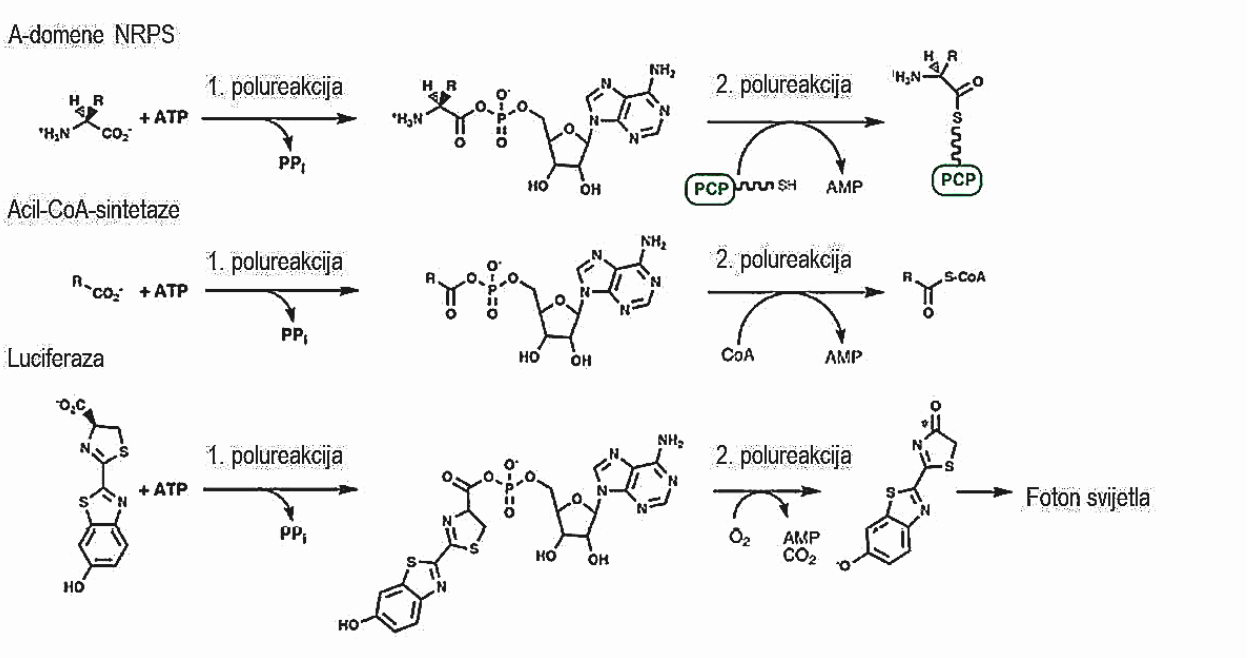
2.3. Strukturno-funkcionalna obilježja NRPS domena

2.3.1. A-domena

A-domena (~ 550 aminokiselina) NRPS započinje proces biosinteze katalizom dviju kemijski različitih polureakcija. U prvoj polureakciji, u prisustvu Mg^{2+}, A-domena iz vezanog ATP-a i odabrane aminokiseline sintetizira aminoacil-adenilat, koji se u drugoj polureakciji u obliku tioestera veže za

sulfhidrilnu skupinu kofaktora susjedne T-domene. Kako reakcija na NRPS započinje aktivacijom odabrane aminokiseline na A-domeni, aminokiselinski sastav peptidnog produkta određen je njenom specifičnošću.

A-domena zajedno s acil- i aril-CoA-sintetazama te luciferazom iz krijesnice pripada adenilat-formirajućoj ANL-superobitelji enzima (acil- ili aril-CoA-sintetaze, adenilacijske domene NRPS, te luciferaza iz krijesnice). Zajedničko svojstvo svih pripadnika ANL-superobitelji je kataliza dviju nezavisnih polureakcija. U prvom koraku katalitičkog ciklusa, nastaje adenilat, koji se u drugom koraku reakcije prenosi na molekulu akceptora. Kod acil-CoA-sintetaza te A-domena NRPS akceptor aktiviranog adenilata je tiolna skupina na panteteinu, koja tijekom nukleofilnog napada na karboksilatni C-atom otpušta AMP. Kod luciferaze aktivirani luciferil-adenilat oksidativno se dekarboksilira pri čemu nastaje reakcijski intermedijer koji se spontano raspada uz oslobađanje fotona svjetlosti (slika 4) [25].



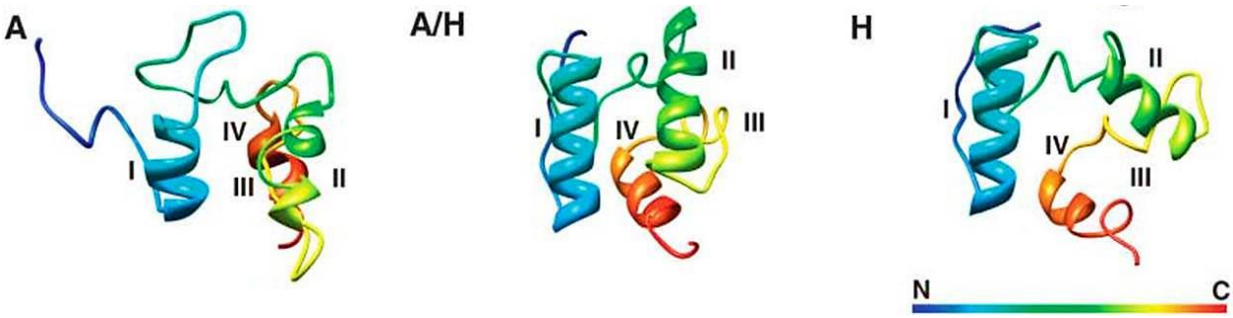
Slika 4. Shematski prikaz prve i druge polureakcije koju kataliziraju pripadnici ANL-superobitelji enzima. U prvom koraku nastaje adenilat, koji se u drugom koraku prenosi na različite akceptorske-skupine. Kod A-domena NRPS i acil-CoA-sintetaza, aktivirani karboksilat veže se za sulfhidrilnu skupinu panteteina, dok se kod luciferaze odvija oksidativna dekarboksilacija luciferil-adenilata uz oslobađanje fotona svjetlosti [25].

2.3.2. T-domena ili protein-nosač peptidilne skupine (PCP)

T-domena (~ 80-100 aminokiselina) je najmanja esencijalna domena NRPS. Iako nije katalitički aktivna, ima središnju ulogu u sintezi NRP, jer prenosi reakcijske intermedijere s jednog na drugi katalitički centar. S obzirom da tijekom katalitičkog ciklusa stupa u interakciju s brojnim proteinskim

domenama, riječ je o proteinu čija struktura nije optimizirana ni za jednu od pojedinih interakcija [26]. Strukturno i funkcionalno sličan T-domenama NRPS je protein-nosač acilne skupine (ACP) iz sintetaza masnih kiselina i poliketid-sintetaza.

Prva struktura T-domene riješena je metodom nuklearne magnetske rezonance (NMR) za T-domenu iz biosintetskog sustava za sintezu tirocidina, a nakon toga objavljene su i strukture određene kako NMR-om tako i kristalografski [27, 28]. Ove studije pokazale su da je riječ o vrlo fleksibilnoj proteinskoj domeni koja se sastoji iz četiri α-heliksa, a čija se duljina i relativni prostorni položaj mijenjaju s obzirom na posttranslacijsku modifikaciju proteina (slika 5) [29]. T-domena se posttranslacijski modificira fosfopanteteinom, derivatom molekule CoA, na apsolutno očuvanom Ser ostatku koji je dio konzerviranog motiva G(G/L/A)(D/H/N)**S** [30]. Posttraslacijsku modifikaciju vrše specifične fosfopantetein-transferaze iz pripadajućeg biosintetskog sustava [31]. Rezultati NMR studije ukazali su na tri konformacijska stanja T-domene: A, A/H te H. Konformacijsko stanje A čini apo T-domena, H holo T-domena, a A/H konformacija predstavlja prijelazni oblik između spomenuta dva konformacijska stanja. Noviji rezultati studija ogiba X-zraka na samostalnim holo T-domenama i didomenama, ukazuju na isključivo A/H konformaciju ove proteinske domene [30, 32–35].



Slika 5. Konformacijska stanja T-domene ovisno o posttranslacijskom stanju. A označava apo T-domenu, A/H konformacija između apo i holo T-domene, dok H označava holo konformaciju T-domene [29].

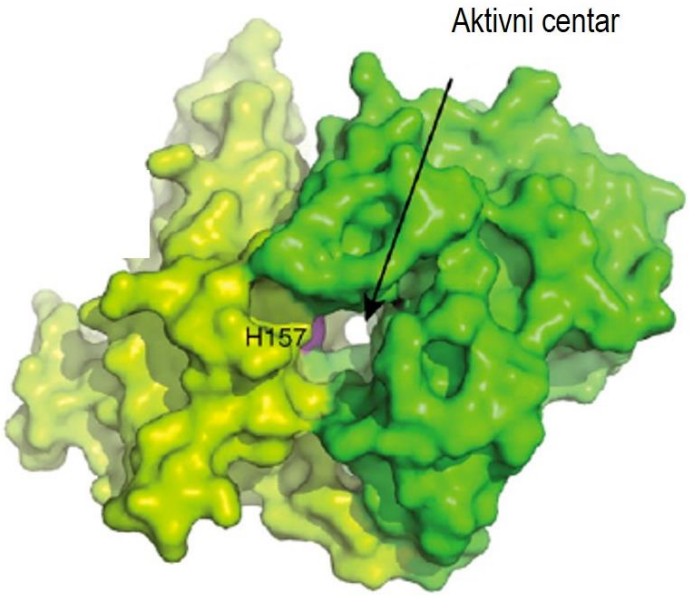
T-domena tijekom reakcijskog ciklusa na NRPS, prenosi supstrate s jednog na drugi katalitički centar ostvarujući tako brojne proteinske interakcije. S obzirom da duljina fosfopanteteinskog kofaktora (18 Å), nije dostatna kako bi se dosegli svi reakcijski centri tijekom katalize, za pretpostaviti je da su koordinirane konformacijske promijene na razini čitavog biosintetskog sustava, nužne za uspješnu sintezu konačnog peptidnog produkta [36].

2.3.3. C-domena

C-domena (~450 aminokiselina) katalizira nastanak peptidne veze između dvaju aminokiselinskih ili peptidilnih monomera vezanih na dvije susjedne T-domene. Strukturno nalikuje acetil-transferazama s kojima zajedno s epimeraznom te heterociklizacijskom domenom NRPS, dijeli i

visoko očuvani motiv HHXXXDG. Biokemijske studije provedene na acetil-transferazama i C-domenama NRPS, pokazale su da drugi His iz ovog motiva ima katalitičku ulogu [5, 37].

Prva riješena kristalna struktura C-domene bila je struktura iz biosintetskog sustava za sintezu vibriobaktina, VibH. Strukturu čine dvije pseudodimerne poddomene koje međusobno zatvaraju tunel unutar kojega je se nalazi aktivni centar s katalitičkim His (slika 6). Biokemijskim i strukturnim studijama uočeno je postojanje donorskog (uzvodnog) i akceptorskog (nizvodnog) veznog mjesta, pri čemu akceptorsko mjesto pokazuje izrazitu selektivnost prema duljini bočnog lanca, te L- i D-konfiguraciji supstrata [37, 38].



Slika 6. C-domena iz biosintetskog sustava za sintezu CDA. Središnji dio strukture čini utor među poddomenama s istaknutim katalitičkim His [39].

Osim strukture VibH, do danas su objavljene i strukture kondenzacijskih domena u sastavu didomene ili čitavog modula NRPS, te novija struktura C-domene iz sustava za sintezu antibiotika CDA (engl. *calcium dependent antibiotic*). Strukture su potvrdile sveukupnu topologiju i orijentaciju među poddomenama [35, 39, 40].

2.3.4. TE-domena

TE-domena (~ 270 aminokiselina) je posljednja u nizu esencijalnih domena NRPS. Za razliku od spomenute tri domene koje se uzastopno ponavljaju unutar biosintetskog sustava, TE-domena se obično nalazi samo u posljednjem modulu te katalizira otpuštanje sintetiziranog peptidnog produkta najčešće hidrolizom ili makrociklizacijski. Ove domene pripadaju velikoj skupini α,β-hidrolaza s

katalitičkom trijadom u aktivnom centru, gdje apsolutno očuvan Ser djeluje kao nukleofil koji oslobađa produkt vezan tioesterskom vezom.

Kristalne strukture TE-domene, osim što su ukazale na sveukupne topološke značajke s α,β-hidrolazama, po prvi puta su dale uvida u aktivno mjesto koje strukturom i aminokiselinskim sastavom jako podsjeća na C-domenu [35, 41, 42]. Procijep aktivnog mjesta oblažu prvenstveno hidrofobni ili aromatski aminokiselinski ostaci prilagođeni supstratu u konformaciji koja omogućava ciklizaciju glava-rep. Struktura također pokazuje i dodatnu fleksibilnu regiju koja nadsvođuje aktivni centar. Smatra se da ova regija regulira dostupnost aktivnog mjesta supstratima, te štiti reaktivni intermedijer od nespecifične hidrolize [16].

2.4. ANL-superobitelj enzima

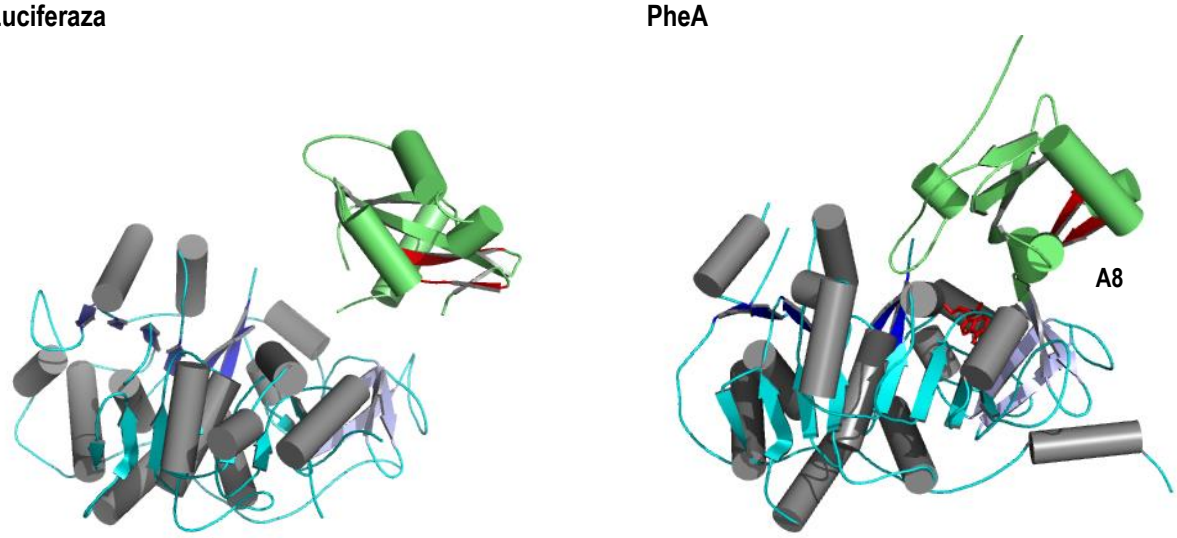
Da je riječ o konformacijski vrlo dinamičnoj skupini enzima ustanovili su prije 50 godina McElroy, Bar-Tana i Rose, koji su prvi predložili da različita konformacijska stanja vrlo vjerojatno odgovaraju dvama, kemijski različitim, polureakcijama [25]. Analiza sekvenci kodirajućih gena pripadnika ANL-obitelji, ukazala je na devet očuvanih motiva (A1-A8 te A10) svojstvenih ovoj skupini enzima [43]. Brojne biokemijske studije provedene na aminokiselinskim ostacima unutar konzerviranih regija, ukazale su na ulogu u vezanju supstrata i ATP-a [44–49]. Međutim, prve egzaktne informacije o veznom mjestu dobivene su strukturnim studijama tek 1994/95 [50].

Prva struktura predstavnika ANL-superobitelji, riješena je 1994. godine metodom ogiba X-zraka na kristalima luciferaze. Samo godinu nakon toga, ista grupa objavljuje kristalnu strukturu Phe-aktivirajuće A-domene iz biosintetskog sustava za sintezu gramicidina (PheA) [51]. Oba proteina imaju sličnu sveukupnu topologiju s istaknutom većom A_N- (~400 aminokiselina) i manjom A_C-poddomenom (~100 aminokiselina) koje međusobno ostvaruju tek nekoliko izravnih veza. Prisutnost supstrata u strukturi PheA u odnosu na kristalnu strukturu luciferaze bez supstrata, utječe na položaj A_C-poddomene koja je u odnosu na A_N-poddomenu zarotirana za 90° (slika 7).

Aktivni centar smješten je između dviju poddomena u obliku plitkog žlijeba na površini A_N-poddomene. Poddomene su međusobno povezane ostacima iz konzervirane A8 regije za koju se kasnije pokazalo da sadrži očuvani Asp ili Lys kao 'zglobni' ostatak oko kojega se vrši rotacija poddomena.

Velika A_N-poddomena je *αβαβα* tipa. Dvije velike β-ploče čine središnji dio strukture, oko kojih su raspoređene α-zavojnice. A_C-poddomena se sastoji iz dvije α-zavojnice te dvije manje β-ploče. Polipeptidni lanac na C-terminalnom kraju čini petlju koja u strukturi prijanja uz ostatke A_N-poddomene.

Valja naglasiti kako su ostaci s N- i C- kraja ovog polipeptidnog lanca slabije uređene strukture koje strše izvan ostatka proteina [50, 51].



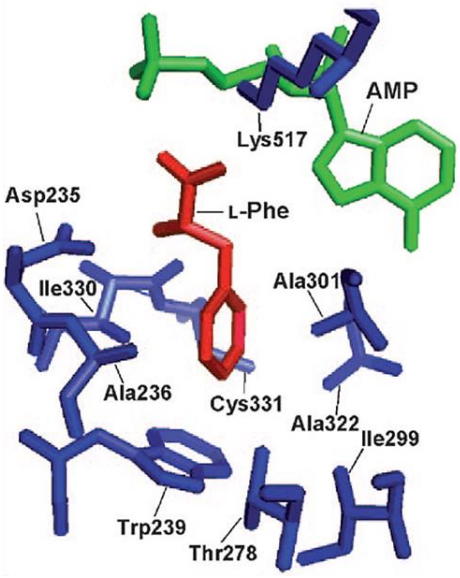
Slika 7. Prve kristalne strukture pripadnika ANL-superobitelji enzima. PheA iz biosintetskog sustava za sintezu gramicidina i luciferaza iz krijesnice *Photinus pyralis*. Strukture su prikazane koristeći softverski alat PyMOL v0.99 pomoću koordinata pohranjenih u PDB 1amu i 1lci. Označena je konzervirana regija A8 sa 'zglobnim' Asp oko kojega se vrši rotacija poddomena.

2.4.1. Aktivno mjesto PheA

Struktura adenilacijske domene iz sustava za sintezu gramicidina bila je revolucionarno otkriće koje je potaklo niz novih saznanja o ovoj skupini enzima. Uslijedile su detaljne bioinformatičke studije koje su omogućile predviđanje supstratne specifičnosti ostalih A-domena samo na temelju njihove primarne strukture. Takozvani '*kod specifičnosti*' čini devet aminokiselinskih ostataka u veznom džepu za aminokiselinski supstrat, od kojih su neke na apsolutno očuvanim pozicijama, a druge su promjenjive i ovisne o kemijskoj prirodi aminokiseline odabrane za aktivaciju (slika 8). Analizom primarne strukture utvrđeno je da se ovih devet aminokiselinskih ostataka nalazi unutar niza od ~ 100 aminokiselina.

Mapiranjem prostornog položaja očuvanih motiva (A1-A10) u PheA, utvrđeno je kako se većina nalazi u A_N-poddomeni u blizini aktivnog centra. Time je potvrđen niz prethodnih biokemijskih studija tijekom kojih su određene funkcije nekih aminokiselina iz očuvanih motiva [52, 53].

Apsolutno očuvani Asp iz A4 regije te Lys iz A10 regije elektrostatskim interakcijama stabiliziraju amino i karboksilnu skupinu na α-C atomu supstrata, usmjeravajući bočni ogranak specifične aminokiseline u kemijski komplementarno vezno mjesto (slika 8).



Slika 8. Vezno mjesto za L-Phe iz PheA (PDB: 1amu) s istaknutim vezanim L-Phe i AMP-om, koji nastaje kao produkt hidrolize aminoacil-adenilata [54].

U PheA, ovi položaji odgovaraju Asp235 odnosno Lys517, dok bočne strane veznog mjesta s jedne strane čine Ala236, Ile330 te Cys332, a s druge Ala322, Ala301 te Thr278. Dno aktivnog džepa zatvoreno je indolnim prstenom izrazito hidrofobnog Trp239. Adeninski i ribozilni dio molekule AMP-a tvori niz izravnih interakcija s aminokiselinskim ostacima A_N-poddomene. α-fosfat se s jedne strane stabilizira vezanjem Mg^{2+} iona, a s druge vezanjem očuvanog Lys517 iz A10 motiva [51].

Prva kristalna struktura eukariotske A-domene siderofornog biosintetskog sustava iz gljivice *Neotyphodium lolii*, ukazuje na neobično veliki aktivni centar prilagođen za vezanje neprirodne aminokiseline N^{δ}-*cis*-anhidromevalonil-N^{δ}-hidroksi-L-ornitina (*cis*-AMHO). Vezno mjesto za supstrat čini 17 aminokiselinskih ostataka, pa se predviđanje supstratne specifičnosti temeljeno na modelu PheA, ne može primijeniti kod A-domena koje aktiviraju velike supstrate. Također, usporedba ove strukture s PheA ukazuje na znatno veću izloženost aktivnog mjesta te predstavlja jedinu poznatu strukturu A-domene NRPS u otvorenoj konformaciji proteina [55].

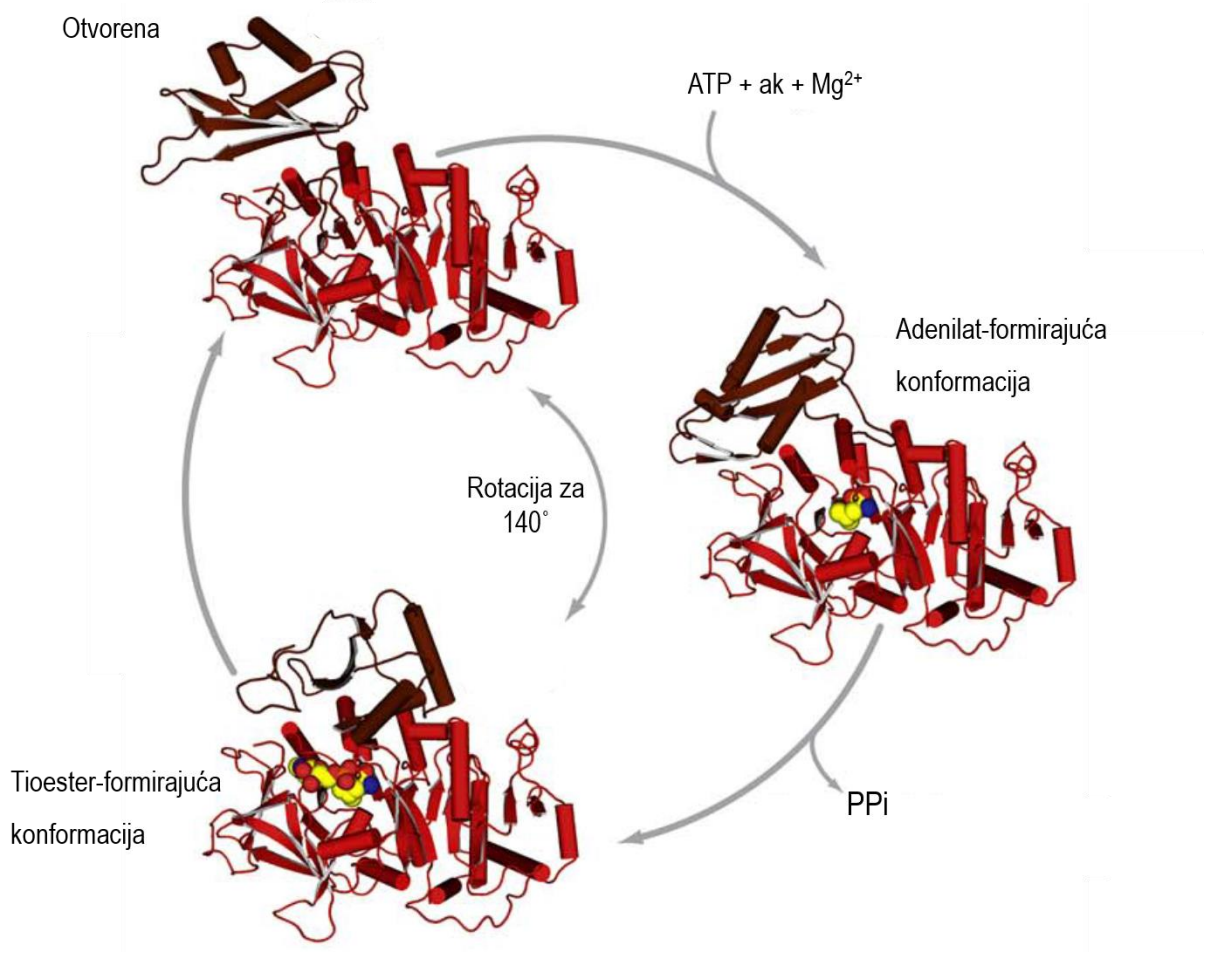
2.4.3. Reakcijski mehanizam

Do danas je poznato nekoliko struktura predstavnika ANL-superobitelji enzima pomoću kojih je u načelu bilo moguće razjasniti katalitički ciklus [56–61].

U otvorenoj konformaciji enzima, dvije poddomene ostvaruju tek nekoliko izravnih proteinskih interakcija, pa je aktivno mjesto izloženo okolnom otapalu. Vezanje supstrata inducira konformacijsku promjenu koja se očituje u zatvaranju aktivnog mjesta i zaštiti reakcijskih međuprodukata od hidrolize.

Spomenutu, adenilat formirajuću konformaciju, karakterizira aktivacija aminokiseline koja se u drugom koraku reakcije, kovalentno veže za fosfopanteteinski kofaktor T-domene, uz otpuštanje AMP-a.

Reakcijski ciklus na A-domeni NRPS, odvija se uz izrazite strukturne preinake, koje se očituju u rotaciji manje poddomene u odnosu na veću za 140°. Rotacija A_C-poddomene omogućava prestrukturiranje aktivnog centra prilikom čega se formira fosfopanteteinski tunel za pristup kofaktoru T-domene (slika 9).

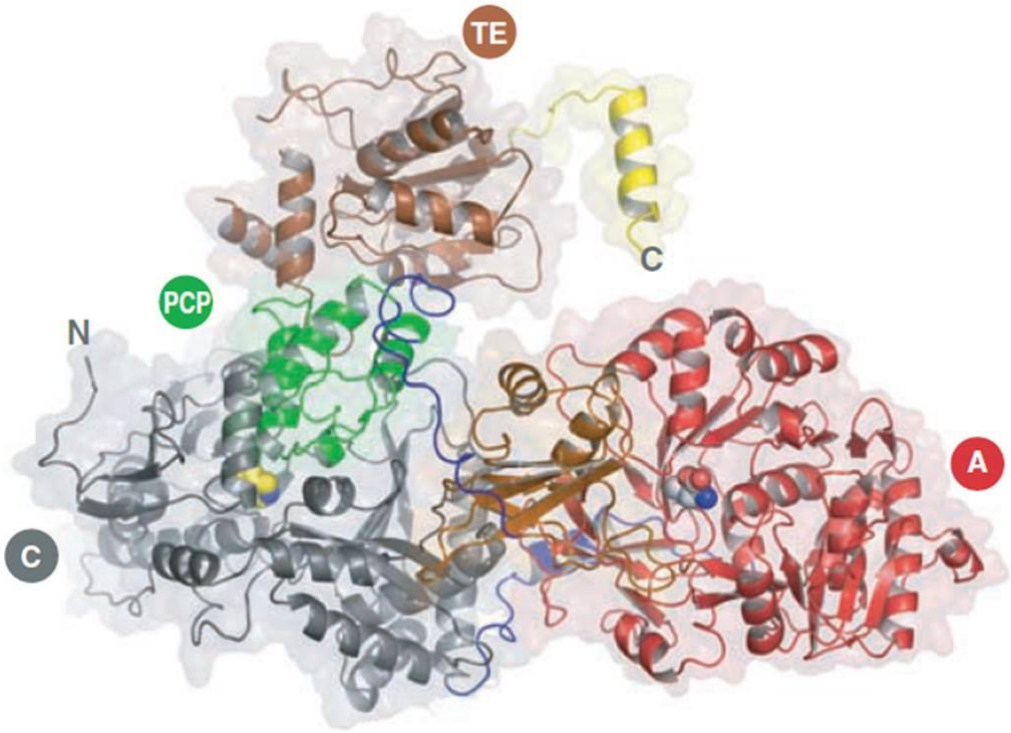


Slika 9. Reakcijski ciklus adenilacijske domene s istaknute tri različite konformacije. Tijekom prve adenilat-formirajuće konformacije nastaje aminoacil-adenilat. Otpuštanje PP_i inducira konformaciju u kojoj nastaje fosfopanteteinski tunel tioester-formirajuće konformacije [62].

2.5. Strukture modula i didomena neribosomskih peptid-sintetaza

U strukturnim studijama peptid-sintetaza, najveći izazov predstavljaju strukturne karakterizacije čitavih modula i didomena. Kristalizaciju ovih enzimskih sustava, otežavaju fleksibilne proteinske regije među pojedinačnim domenama, pa je do danas poznata samo jedna struktura čitavog modula, terminacijski modul surfaktin-sintetaze (SrfA-C) [35].

Surfaktin-sintetaza čini biosintetski sustav za sintezu lipoheptapeptidnog antibiotika surfaktina, a sastoji se iz tri polipeptidna lanca SrfA-A, SrfA-B, te SrfA-C. Terminacijski modul SrfA-C, čine četiri osnovne NRPS domene, C-A-PCP-TE, koje se mogu podijeliti u tri nezavisne proteinske regije. Prvu regiju čini elonglacijski modul (C-A-PCP), drugu TE-domena, a treću regiju heksahistidinski biljeg, korišten pri pročišćavanju proteina (slika 10). Središnji dio SrfA-C strukture čine C-domena te A_N-poddomena, ostvarujući međusobno brojne protein-protein interakcije. Vezane za ovu 'katalitičku platformu' nalaze se dvije izrazito fleksibilne proteinske regije, A_C-poddomena te T-domena, pri čemu položaj T-domene odgovara interakciji s akceptroskim mjestom na C-domeni. Aktivni centri A- i C-domene, međusobno su udaljeni za više od 60 Å, što znači da su koordinirane konformacijske promijene nužne za uspješnu sintezu konačnog peptidnog produkta.



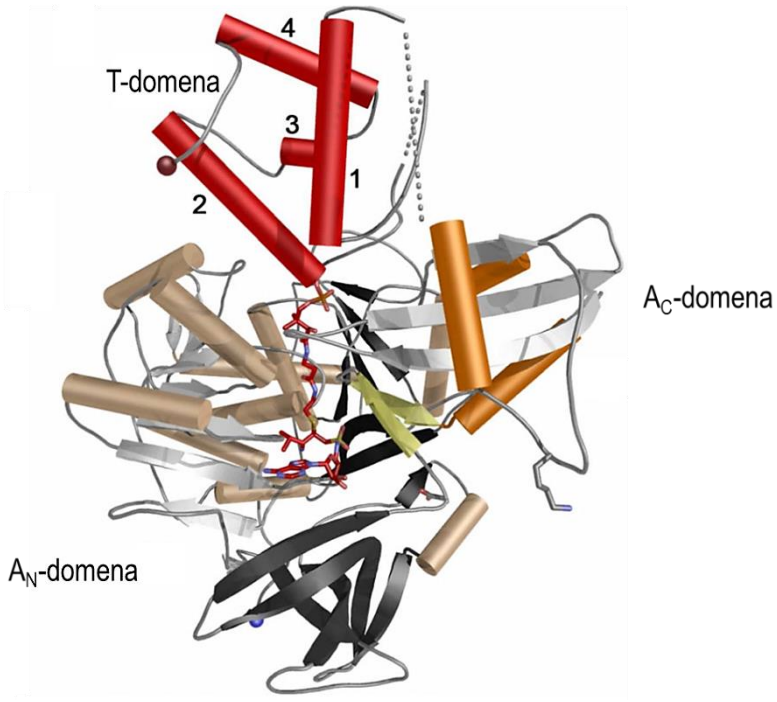
Slika 10. Terminacijski modul SrfA-C (PDB: 2vsq). Prikazana je relativna međusobna orijentacija četiri esencijalne NRPS domene. A-domena prikazana je s vezanim Leu supstratom, dok je C-domena prikazana s očuvanim His u aktivnom centru. Peptidni slijed koji tvori afinitetni biljeg obojan je žuto [35].

Struktura terminacijskog modula surfaktin-sintetaze posebno je značajna za konstrukciju hibridnih NRPS sustava, a koji se koriste u cilju sinteze novih ili modifikacije postojećih peptidnih produkata. S obzirom da središnji dio ove strukture čini dobro umrežena A-C dodirna površina, pretpostavka je da bi potencijalno mjesto fuzije u takvim sustavima trebalo biti u A-T linker regiji [35].

Prva kristalna struktura didomene A-T objavljena je 2012. godine iz biosintetskog sustava za sintezu enterobaktina [26]. Enterobaktin je kateholatni siderofor kojega izlučuje bakterija *E. coli* kako bi

iz okoliša namakla željezo. Sintetizira se djelovanjem sedam proteina: EntA, EntB, EntC, EntD, EntE, EntF, te EntH. EntE je adenilacijska domena koja aktivira 2,3-dihidroksibenzojevu kiselinu (2,3-DHB) koja se potom tioesterski veže za T-domenu, EntB. Kristalna struktura didomene A-T, predstavlja konstrukt dvaju proteina, EntE i EntB, koji su združeni na jednom polipeptidnom lancu. U opisanoj strukturi, A-domena zauzima tioester-formirajuću konformaciju, a očuvani Ser ostatak T-domene posttrasnalcijski je modificiran fosfopanteteinom koji pristupa aktivnom centru A-domene. Iako fosfatni dio panteteina ne ostvaruje izravnu interakciju s A-domenom, spekulira se da je elektrostatski stabiliziran pozitivnim Arg iz motiva A8. Tako ova struktura predstavlja katalitički funkcionalnu interakciju između dvije domene.

Paralelno s ovom strukturom, objavljena je i biokemijska studija tijekom koje je ispitana uloga očuvanog motiva A9 u okviru interakcije među A- i T-domenom. Studija potvrđuje da ostaci iz A9 motiva ili njegove neposredne blizine, izravno sudjeluju u prepoznavanju dvaju proteina [63]. Dodatna potvrda A-T interakcijske površine, uslijedila je iste godine, a riječ je o kristalnoj strukturi didomene PA1221 iz *Pseudomonas aeruginosa* (slika 11) [64].



Slika 11. A-T didomena PA1221 (PDB: 4dg8). Crveno je prikazana T-domena koja je na očuvanom Ser posttranslacijski modificirana fosfopanteteinom. Četiri α-zavojnice označena su brojevima. Aminokiselinski ostaci A_N-domene prikazani su crnom, sivom i bež bojom, a A_C-domene narančastom [64].

Kristalne strukture didomena A-T, omogućile su detaljnu analizu linker regije među ovim proteinima. Analiza ukazuje na očuvani LPxP motiv koji sudjeluje u stabilizaciji katalitičkog Lys iz

očuvanog A10 motiva. Smatra se da izravna interakcija LPxP motiva s ostacima iz A_C-poddomene privlači T-domenu u neposrednu blizinu aktivnog centra A-domene [65].

Posljednja u okviru kristalnih struktura NRPS, a koje opisuju katalitički funkcionalne interakcije među domenama, je kristalna struktura T-TE didomene iz sustava za sintezu enterobaktina. T-TE didomena predstavlja prvu riješenu holo-NRPS strukturu. Dodirnu površinu među domenama čine, ne samo, brojne protein-protein interakcije već i interakcija s fosfopanteteinom T-domene. S obzirom na udaljenost aktivnog mjesta TE-domene i mjesta posttranslacijske modifikacije na T-domeni, uočena konformacija opisuje strukturu koja odgovara prijenosu reakcijskih međuprodukata s T- na TE-domenu [34].

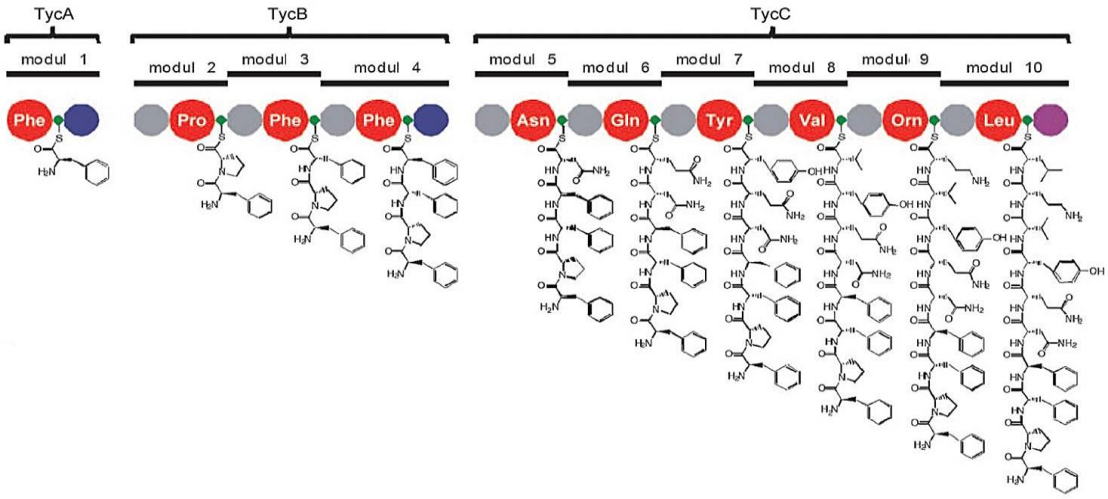
2.7. Biosintetski sustav za sintezu tirocidina

Tirocidin je ciklički dekapeptidni antibiotik kojeg proizvodi bakterija *Bacillus brevis*. Njegova sinteza povezana je s procesom sporulacije u stacionarnoj fazi rasta bakterije [66].

Riječ je o amfipatskoj molekuli koja poprima sekundarnu strukturu β-nabranog lista. S jedne strane te strukture nalazi se pozitivno nabijeni ornitin (Orn), a drugu čini niz hidrofobnih aminokiselina. Smatra se da njegovo biološko djelovanje obuhvaća ugradnju u lipidni dvosloj što destabilizira plazma membranu i dovodi do stvaranja pora. Time se narušava osmotska i ionska regulacija što na koncu dovodi do smrti stanice. Budući da nespecifično djeluje i na eukariotske stanice, njegova medicinska uporaba ograničena je na lokalnu primjenu. Nedavno su proizvedene varijante tirocidina poboljšanih terapeutskih svojstava u smislu veće selektivnosti prema bakterijskim membranama [67, 68].

Genski klaster iz biosintetskog sustava za sintezu tirocidina, bio je prvi sekvencionirani NRPS [69]. Ovaj sustav čine tri nezavisna multifunkcionalna proteina TycA, TycB i TycC. Sinteza tirocidina je kolinearnog tipa, što znači da broj i redoslijed aminokiselinskih ostataka u peptidnom produktu odgovara broju i redoslijedu odgovarajućih modula u biosintetskom sustavu.

A-domena TycA odabire L-Phe koji se naknadno epimerizira u D-Phe djelovanjem pripadajuće E-domene. Sinteza se nastavlja na proteinu TycB koji kondenzira dvije susjedne aminokiseline te na nastali dipeptid ugrađuje još dva Phe. Sintezu dovršava multifunkcionalni protein TycC dodatkom šest aminokiselina na tetrapeptid sa TycB (slika 12) [54]. Linearni produkt otpušta se s biosintetskog kompleksa posredstvom TE-domene koja katalizira ciklizaciju dekapeptida u smjeru glava-rep. Nastali tirocidin zapravo je mješavina četiri izomera koji na položajima 3, 4 i 7 imaju varijabilne aminokiselinske ostatke.



Slika 12. Biosintetski sustav za sintezu tirocidina. Prikazana su tri multifunkcionalna proteina TycA, TycB i TycC na kojima se odvija usklađeni niz biosintetskih reakcija. Sinteza je kolinearnog tipa pri čemu broj aminokiselinskih monomera u produktu odgovara broju modula u biosintetskom sustavu [54].

2.7.1. Specifičnost TycA pri odabiru aminokiseline

Vjernost neribosomske sinteze velikim djelom određena je specifičnošću A-domene. A-domene, osim prirodnih supstrata mogu, u pravilu s nešto nižom efikasnošću, aktivirati i nepripadajuće aminokiseline.

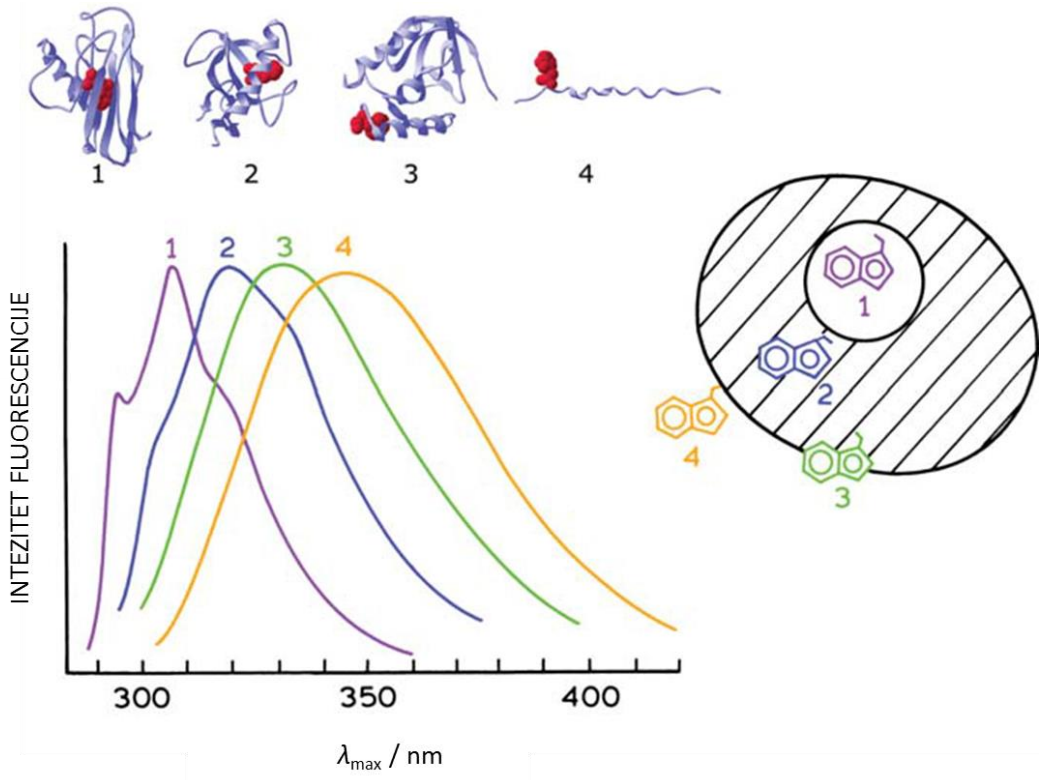
Specifičnost TycA prema aminokiselinskom supstratu, ispitana je s ukupno 30 različitih supstrata [54]. Pri tome je uočeno da na selektivnost A-domene utječe hidrofobnost bočnog ogranka supstrata, kao i strukturna komplementarnost supstrata i veznog mjesta na enzimu. Također, A-domena TycA podjednako dobro aktivira D- i L-Phe, što upućuje na zaključak da se u aktivni džep mogu smjestiti oba stereoizomera. Zamjene na amino i karboksilnom kraju supstrata se ne toleriraju, vjerojatno zbog narušenih elektrostatskih interakcija s Arg iz A4 te Lys iz A10 motiva. Aktivirana nepripadajuća aminokiselina, hidrolizira se na razini aminoacil-adenilata zbog nemogućnosti stabilizacije enzim-supstrat kompleksa [70].

Nedavno je ispitana mogućnost da se usmjerenom evolucijom promijeni specifičnost A-domene TycA [71]. Usmjerena evolucija u ovom kontekstu obuhvaća promjenu pojedinačnih aminokiselina iz veznog mjesta, za koje se pokazalo da se nalaze na varijabilnim položajima u *kodu specifičnosti*. Ovim načinom specifičnost prema neprirodnom supstratu uvećana je i do 170 puta.

2.8. Intrinzična fluorescencija proteina

Intrinzična (nativna) fluorescencija u biokemiji, obično podrazumijeva fluorescenciju proteina koja potječe od tri aromatske aminokiseline, Phe, Tyr i Trp. Među navedenim, najznačajniji doprinos ukupnoj fluorescenciji daje Trp koji apsorbira pri višim valnim duljinama i ima najveći ekstinkcijski koeficijent, pa je prijenos apsorbirane energije s Tyr i Phe na Trp dosta čest. U vodenoj otopini, slobodni Phe, pokazuje maksimalni intenzitet emisije pri valnoj duljini od 282 nm, Tyr pri 303 nm, a Trp pri 350 nm.

Nekoliko razloga čini Trp jako pogodnom fluorescentnom probom u biološkim sustavima. Jedan od njih je mogućnost njegove selektivne pobude pri valnoj duljini od 295 nm. Time se izbjegava nespecifična pobuda drugih aromatskih aminokiselina, pa je emisijski spektar promatranog proteina isključivo odraz prisutnih Trp. Raspon valnih duljina emisijskog maksimuma (λ_{max}) Trp u proteinima, kreće se od 308 nm do 355 nm, pri čemu raspon ovih vrijednosti odgovara stupnju izloženosti bočnog ogranka [72]. Trp u potpuno apolarnom okolišu pokazuje niže vrijednosti za λ_{max} (engl. *blue shift*). Kako izloženi Trp postaje dostupan okolnom otapalu, tako s promjenom stupnja izloženosti, indolni prsten Trp stvara vodikove veze s okolnom vodom, što rezultira pomakom valne duljine maksimuma intenziteta fluorescencije prema crvenom dijelu spektra (engl. *red shift*) [73].



Slika 13. Utjecaj mikrookoliša Trp na emisijski spektar proteina. Prikazani su emisijski spektri apoazurina (1), ribonukleaze T1 (2), nukleaze stafilokoka (3) te glukagona (4) [73].

Slaba brojčana zastupljenost, kao i izrazita osjetljivost na polarnost neposrednog okoliša, omogućavaju da se putem fluorescencije Trp mapiraju dijelovi proteina čija se struktura u promatranim uvjetima mijenja [73, 74].

Dodatno svojstvo Trp je mogućnost gašenja njegove fluorescencije specifičnim molekulama gasiteljima (engl. *quencher*). Gašenje fluorescencije je proces opadanja intenziteta fluorescencije, kao posljedica sudaranja molekula gasitelja s molekulom fluorofora. Obično se kao gasitelji koriste molekule poput akrilamida ili KI s ograničenim dosegom prodiranja u proteinski matriks, pa stoga i s ograničenom mogućnošću gašenja fluorescencije. Akrilamid je velika molekula koja relativno slabo prodire u hidrofobne dijelove proteina. Za razliku od akrilamida, KI je ionski gasitelj, pa zbog negativnog naboja I^- iona i njegove hidratacije, gasi isključivo Trp koji se nalaze na površini proteina. Tako je kod proteina koji pokazuju maksimalni intenzitet fluorescencije pri nižim valnim duljinama, gašenje fluorescencije ograničeno mogućnošću difuzije molekule gasitelja u hidrofobni matriks proteina. Suprotno tome, kod proteina koji pokazuju maksimum intenziteta fluorescencije pri višim valnim duljinama, fluorescencija se gasi gotovo jednako dobro kao i kod slobodnog Trp u otopini [73].

Za razliku od gašenja izravnim kontaktom molekule gasitelja s molekulom fluorofora, fluorescentni rezonantni transfer energije (FRET) među hodrofobnim aminokiselinama proteina (Phe, Tyr i Trp), podrazumijeva prijenos energije s molekule donora na molekulu akceptora. Ovaj prijenos energije moguć je samo ako su emisijski i apsorpcijski spektri molekula međusobno komplementarni. Udaljenost pri kojoj je učinkovitost FRET-a 50 %, naziva se Förster-ova udaljenost, a između dva Trp iznosi 16 Å [73].

Na emisijski spektar određenog proteina, može utjecati nekoliko faktora. Tako primjerice, fluorescenciju Trp mogu gasiti bočni ogranci Asn, Asp, Gln, Glu, Lys, Tyr, Cys i His [75]. U ovom slučaju, gašenje se odvija ako postoji izravni kontakt indolnog bočnog lanca s nekom od aminokiselina, ili ako je njihova međusobna udaljenost unutar Van der Waals-ovog radijusa [73].

Nativna fluorescencija te gašenje nativne fluorescencije predstavljaju učinkovite metode za promatranje konformacijskih promjena u proteinu. Vrlo često promjena konformacije proteina nastaje kao posljedica vezanja supstrata pri čemu dolazi do promjene izloženosti pojedinih Trp [76]. Kod proteina koji sadrže veći broj Trp, prvo je potrebno definirati njihov pojedinačni doprinos emisijskom spektru, što obično obuhvača zamjenu Trp sličnim Phe.

2.8.1. Ekstrinzična fluorescencija proteina

Za razliku od intrinzične fluorescencije, koja potječe od aromatskih aminokiselina u proteinu, ekstrinzična se fluorescencija odnosi na korištenje fluorescentnih molekula koje se specifično vežu na ciljani protein. Ekstrinzičnim fluorescentnim probama u proteinskoj kemiji ispituju se konformacijske promjene, površinska hidrofobnost, te procesi strukturiranja, denaturacije i agregacije proteina [77].

Ekstrinzične se fluorescentne probe, na protein od interesa mogu vezati bilo kovalentno ili nekovalentno. Kovalentno se vežu adicijom na ε-amino skupinu Lys, α-amino skupinu N-terminalnog kraja proteina ili na tiolnu skupinu Cys. Osim kovalentnog vezanja, neke se fluorescentne probe na ciljani protein vežu elektrostatski ili putem nekovalentnih interakcija. Tako se primjerice 1-anilinonaftalen-8-sulfonska kiselina (ANS) te boja SYPRO orange, vežu za hidrofobne površine na proteinu te se u tom smislu često koriste za procjenu površinske hidrofobnosti proteina. Značajka ovih proba je da su u vodenom mediju slabo fluorescentne, međutim, vezanjem za protein, intenzitet njihove fluorescencije raste uz pomak emisijskog maksimuma prema nižim vrijednostima valnih duljina [77].

2.8.2. Fluorescencija kod proteina pripadnika ANL-superobitelji

Metoda fluorescencije kod proteina pripadnika ANL-superobitelji, najčešće se koristila kod izučavanja strukturno-funkcionalnih svojstava luciferaze. Luciferaza iz *Pothinus piralis* u prisustvu Mg^{2+} i ATP-a, katalizira oksidaciju luciferina (LH_2) u oksiluciferin, koji se potom spontano raspada emitirajući foton svjetlosti. Primarna struktura luciferaze sadrži jedan Trp i devetnaest Tyr ostataka, pa izgled emisijskog spektra ovog proteina ovisi o valnoj duljini ekscitacije. Tako se pri valnoj duljini ekscitacije od 295 nm selektivno pobuđuje samo Trp, a pri 275 nm, Trp i Tyr. Gašenjem intrinzične fluorescencije pripadajućim supstratima luciferaze, LH_2 i ATP-om, uočeno je da LH_2 ima veći doseg gašenja fluorescencije koja potječe od Trp. Također, ovim načinom određene su i pripadajuće K_D vrijednosti, koje su pokazale da vezanje jednog supstrata za enzim, smanjuje afinitet prema drugom supstratu [78, 79].

Druge studije na luciferazi, a koje su koristile metodu fluorescencije, ticale su se strukturne stabilnosti ovog proteina. Ciljanom zamjenom aminokiselinskih ostataka u fleksibilnoj regiji proteina, protein se stabilizira te postaje otporniji na djelovanje proteaza. U tom smislu, doseg gašenja fluorescencije akrilamidom, može dati informaciju o stabilizaciji strukture proteina. Izloženost hidrofobnih površina na proteinu, kao mjera strukturne stabilnosti promatranog proteina, ispitana je korištenjem ekstrinzične fluorescencijske probe, ANS [80, 81].

Primjena intrinzične fluorescencije kod izučavanja konformacijskih promjena na A-domenama NRPS, zabilježena je jedino kod biosintetskog sustava za sintezu enterobaktina (vidi poglavlje 2.5.) [82, 83]. Ovi radovi, opisuju pojavu FRET-a koji se javlja kao posljedica rezonantnog prijenosa energije između intrinzičnih fluorofora na proteinu i supstrata.

Nakon ekscitacije pri 280 nm, A-domena EntE, pokazuje maksimum emisije na 330 nm koja najvećim dijelom potječe od Tyr. Dodatkom supstrata (2,3-dihidroksibenzoata (2,3-DHB)), emisijski spektar proteina EntE, pored signala kod 330 nm, sadrži i dodatan signal kod 440 nm. Ovaj signal posljedica je emisije 2,3-DHB, čiji se ekscitacijski spektar preklapa s emisijskim spektrom Tyr. Preklapanje spektara dovodi do rezonantnog prijenosa energije (FRET) s proteina na supstrat. Iako protein EntE može aktivirati i nepripadajuće supstrate, njihovim dodatkom u reakcijsku smjesu, emisijski spektar EntE pokazuje samo signal pri 330 nm. Ovo upućuje na zaključak da se nepripadajući supstrati ne vežu u aktivno mjesto na isti način kao i 2,3-DHB, što za posljedicu ne rezultira FRET signalom [82].

Također, ove studije doprinijele su boljem razumijevanju strukture veznog mjesta za 2,3-DHB. Pri tome su poslužili homologni modeli, izrađeni na temelju poznate strukture adenilacijske domene DhbE. U blizini veznog mjesta, EntE ima pet Tyr od kojih jedan, Y236, izravno stupa u interakciju s aromatskim dijelom 2,3-DHB. Dodatak pripadajuće T-domene u reakcijsku smjesu s proteinom EntE i 2,3-DHB, ometa FRET na način da se snizuje signal kod 440 nm. Ova pojava objašnjena je promjenom konformacije u aktivnom mjestu EntE, koja nastaje kao posljedica premještanja 2,3-DHB u blizinu ATP-a. U skladu s tim, signal kod 440 nm opada zbog nemogućnosti efikasnog prijenosa energije s Y236 na 2,3-DHB [83].

Dodatni primjer uspješne primjene ekstrinzične fluorescencije, a u okviru fluorescencije zabilježene kod pripadnika ANL-superobitelji, je primjena fluorescentno obilježenog kofaktora T-domene [84]. U radu je biokemijski okarakterizirana interakcija A- i T-domene, pri čemu se tiolna skupina kofaktora, specifično obilježava bojom Texas-Red. Ukoliko je interakcija među proteinima funkcionalna, tiolna skupina kofaktora sporije se obilježava fluorescentnom probom od pozitivne kontrole, pri čemu se kao pozitivna kontrola koristi samostalna holo-T-domena.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Osnovne kemikalije

Agaroza (*Sigma*), akrilamid (*Serva*), amonijev persulfat (APS) (*Sigma*), 1-anilinonaftalen-8-sulfonska kiselina (ANS) (*Sigma*), 1,4-ditioeritritol (DTE) (*Sigma*), 1,4-ditiotreitol (DTT) (*Sigma*), etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) (*Kemika*), etanol (*Riedel de Haan*), fosforna kiselina (*Kemika*), fenilmetansulfonil-fluorid (PMSF) (*Sigma*), glicerol (*Gram-mol doo*), glicin (*Carl Roth*), 4-(2-hidroksietil)piperazin-1-etansulfonska kiselina (HEPES) (*Sigma*), imidazol (*Sigma*), kalijev dihidrogenfosfat (*Kemika*), kalcijev klorid (*Merck*), klorovodična kiselina (*Kemika*), 2-(N-morfolino)etensulfonska kiselina (MES) (*Sigma*), magnezijev klorid heksahidrat (*Merck*), magnezijev sulfat heptahidrat (*Merck*), *β*-merkaptoetanol (*Sigma*), metanol (*CarloErba*), N,N'-metilenbisakrilamid (*Merck*), natrijev acetat (*Sigma*), natrijev dihidrogenkarbonat (*Kemika*), natrijev hidrogenfosfat dihidrat (*T.T.T.*), natrijev dihidrogenfosfat monohidrat (*T.T.T.*), natrijev dodecilsulfat (SDS) (*Carl Roth*), natrijev hidroksid (*Kemika*), natrijev klorid (*T.T.T.*), niklov sulfat heksahidrat (*Sigma*), octena kiselina (*Kemika*), piperazin-N,N'-bis(2-hidroksipropansulfonska kiselina) (PIPES) (*Carl Roth*), N,N,N',N',-tetrametiletilendiamin (TEMED) (*Sigma*), tricin (*Carl Roth*), trikloroctena kiselina (TCA) (*Merck*), Tris(hidroksimetil)-aminometan (Tris) (*Sigma*), urea (*Carl Roth*).

3.1.2. Aminokiseline i nukleotidi

Adenozin-trifosfat (ATP) (*Fluka*), L-cistein (L-Cys) (*Prolabo*), D-fenilalanin (D-Phe) (*Sigma*), L-fenilalanin (L-Phe) (*Sigma*), D,L-*treo*-*β*-fenilserin (L-fenil-Ser) (*Sigma*), L-metionin (L-Met) (*Sigma*), dNTP (smjesa dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (*Thermo Scientific*).

3.1.3. Boje

Bromfenol plavilo (*Sigma*), Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB R-250) (*Merck*), Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB G-250) (*Biorad*), etidij-bromid (*Sigma*), SYPRO orange (*Life Technologies*).

3.1.4. Proteini, enzimi i oligonukleotidi

Albumin goveđeg seruma (BSA) (*Carl Roth*), tripsin (*Sigma*), *Pfu* DNA-polimeraza (*Stratagene*), *Taq* DNA-polimeraza (*Fermentas*), *T4* DNA-ligaza s puferom (*NEB*), restrikcijska endonukleaza *Nco*I (*NEB*), restrikcijska endonukleaza *BamH*I (*NEB*).

DNA standardi i proteinski standardi

DNA Ladder 1 kb (*NEB*), Protein Ladder, 10-250 kDa (*NEB*), ColorPlus Prestained Protein Ladder, 10-230 kDa (*NEB*), Protein Marker VI, 10-245 kDa (*AppliChem*).

Oligonukleotidi

Oligonukleotidi korišteni u ovom radu kao početnice, sintetizirani su na zahtjev, uslugom servisa *Mycrosinth,* Balgach, Švicarska. Oligonukleotidi korišteni za mutagenezu sintetizirani su korištenjem usluge servisa *Sigma-Aldrich*.

3.1.5. Sastojci mikrobioloških hranjivih podloga

Agar (*BD*), ampicilin (*Carl Roth*), izopropil-*β*-D-tiogalaktopiranozid (IPTG) (*Carl Roth*, *AppliChem*), kanamicin-sulfat (*Carl Roth*), ekstrakt kvasca (*Carl Roth*), tripton (*Fluka, Carl Roth*).

3.1.6. Kromatografske kolone

HisTrap HP 5 (*GE Healthcare*), MonoS HR 5/5 (*GE Healthcare*), UniQ6 (*Biorad*), HisTrap FF Crude 1 (*GE Healthcare*).

3.1.7. Ostali materijali

Celulozno crijevo za dijalizu promjera 6 mm (*Sigma*), benzoilirano celulozno crijevo za dijalizu promjera 6 mm (*Sigma*), centrifugalni sistemi za koncentriranje i filtriranje uzoraka s granicom prolaza Mr 3 000 i 30 000 Da (*Sartorius*, *Millipore*), nitrocelulozne membrane za filtriranje veličine pora 0,22 μm (*Whatman*), sterilni filtri s veličinom pora 0,22 te 0,45 μm (*TPP*).

3.1.8. Komercijalni kompleti ("kitovi")

Komplet za izolaciju plazmidne DNA – *QIAprep Spin Miniprep Kit* (*Qiagen*), komplet za pročišćavanje proteina s histidinskim privjeskom *Ni-NTA Spin Kit* (*Qiagen*), komplet za određivanje pirofosfata *EnzCheck Pyrophosphate Assay Kit* (*Intvitrogen*), komplet za ligaciju *Quick Ligation Kit* (*NEB*), komplet za pročišćavanje PCR produkta *QIAquick PCR Purification Kit* (*Qiagen*).

3.1.9. Sojevi bakterije *E. coli*

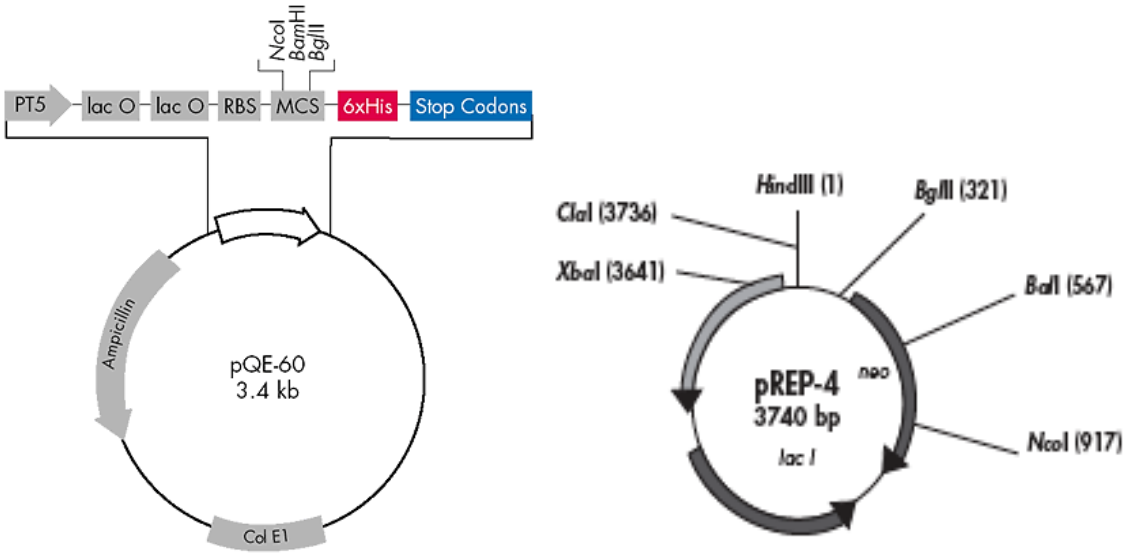
XL1Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac*[F'*proAB lacIqZΔM15* Tn*10* (Tetr)]), korišten je za pohranu svih plazmidnih DNA u ovom radu, te za ekspresiju A-domene.

BL21(DE3) (F-*ompThsdSb(rB-mB+)galdcm*(DE3)), s delecijom gena *lon* i *ompT* koji kodiraju stanične proteaze, poslužio je za ekspresiju T-domene.

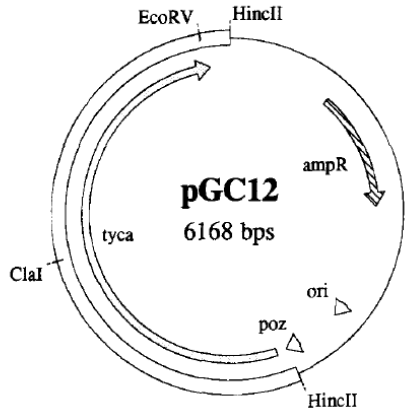
DH5α (*supE*44 Δ*lac*U169 (φ80 *lacZ*ΔM15) *hsdR*17 *recA*1 *endA*1 *gyrA*96 *thi*- 1 *relA*1) korišten je tijekom procesa mutageneze kao i rutinskog umnažanja plazmidne DNA.

3.1.10. Plazmidi

Plazmid **pQE60** (*Qiagen*) poslužio je za kloniranje kodirajućih regija A- i T-domene koje nose heksahistidinski biljeg na C-terminalnom kraju. Nivo transkripcije reguliran je inducibilnim T5 promotorom iz koli-faga kojeg neometano prepoznaje bakterijska RNA-polimeraza. Nizvodno od promotora, nalaze se dvije sekvence *lac* operatora koje vezanjem represor proteina Lac osiguravaju učinkovitu kontrolu transkripcije [86]. Ukoliko bakterijski soj koji se koristi za ekspresiju, na genomu ne nosi gen za represor protein Lac, stanice su osim plazmidom pQE60 transformirane i plazmidom **pREP4/Sfp**. Osim što osigurava dovoljnu količinu represor proteina, ovaj plazmid kodira za fosfopantetein-transferazu Sfp koja je u ovom radu korištena za posttranslacijsku modifikaciju T-domene fosfopanteteinom. Transkripcija se inducira dodatkom IPTG-a koji vezanjem za represor protein Lac potiče njegovu disocijaciju s operatora i omogućava neometano vezanje RNA-polimeraze za promotor. Plazmid pREP4/Sfp ljubazno je ustupio prof. M. A. Marahiel.



Plazmid **pGC12** derivat je mnogokopijskog plazmida pUC19 te nosi otpornost na ampicilin. Ovaj plazmid ima ugrađen gen koji kodira prvi modul iz biosintetskog sustava za sintezu tirocidina – *tycA* (pGC12/TycA). Fragment je veličine 3,6 kb i pod kontrolom je promotora *lac*, a ugrađen je u mjesta koja prepoznaju restrikcijske endonukleaze *Pst*I i *Bam*HI. Plazmid pGC12/TycA korišten je za umnažanje kodirajućih regija A- i T-domene.



3.1.11. Mikrobiološke hranjive podloge

Luria-Bertani (LB) medij - osnovni laboratorijski mikrobiološki medij sastava: 10 g dm^{-3} triptona, 5 g dm^{-3} ekstrakta kvasca, 5 g dm^{-3} NaCl. U krutu hranjivu podlogu, osim navedenog, dodaje se i 15 g dm^{-3} agara.

LB^{+}medij - medij korišten za uzgoj bakterija nakon transformacije s reakcijskim smjesama mutageneze ili ligacije, sastava: 10 g dm^{-3} triptona, 5 g dm^{-3} ekstrakta kvasca, 5 g dm^{-3} NaCl, 4 g dm^{-3} glukoze, 12,5 mmol dm^{-3} $MgCl_2$, 12,5 mmol dm^{-3} $MgSO_4$.

2 x YT^{+} medij – bogata varijanta LB-medija korištena tijekom ekspresije proteina sastava: 16 g dm^{-3} triptona, 10 g dm^{-3} ekstrakta kvasca, 10 g dm^{-3} NaCl, 20 mmol dm^{-3} $MgCl_2$.

Sve navedene mikrobiološke hranjive podloge autoklavirane su na temperaturi od 121 °C, 20 min. Nakon autoklaviranja u medij su po potrebi dodani prethodno sterilno filtrirani: ampicilin (natrijeva sol, 100 mg dm^{-3}) i/ili kanamicin sulfat (25 mg dm^{-3}), glukoza, $MgCl_2$ te $MgSO_4$.

3.2. Standardne metode

3.2.1. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina određena je spektrofotometrijski na valnoj duljini od 280 nm te metodom po Bradfordu.

Metoda po Bradfordu

Metoda se zasniva na pomaku apsorpcijskog maksimuma boje Coomassie Brilliant Blue G-250 koja u kiselom mediju uslijed vezanja za protein, prelazi iz crvene u plavu [85]. Porast apsorbancije na 595 nm proporcionalan je količini vezane boje, odnosno koncentraciji proteina u uzorku. Za izradu

baždarnog pravca pripreme se otopine proteinskog standarda (BSA) u rasponu koncentracija od 0-1 mg cm^{-3}. Otopina BSA pripremi se u istom puferu kao i protein od interesa, a otopina koncentracije od 1 mg cm^{-3} provjeri se spektrofotometrijski te iznosi A_{280}=0,66.

Koncentracija proteina određena je u mikrotitarskim pločicama u posebno prilagođenom čitaču EL808 (*Bio-Tek Instruments*). Istom volumenu uzorka, standarda i slijepe probe (5 µL) doda se 250 µL pripravka boje sastava: Commassie Brilliant Blue G-250 (0,1 g dm^{-3}), etanol (Φ=5%) i fosforna kiselina (Φ=10%). Boja se razvija od 5 min do 1 h, a potom se očita apsorbancija na 595 nm.

Određivanje koncentracije proteina na 280 nm pomoću uređaja NanoDrop 1000

Određivanje koncentracije proteina na 280 nm provedeno je pomoću uređaja NanoDrop 1000 (*Thermo Scientific*). Metoda se temelji na Beer-Lambert zakonu koji opisuje apsorbanciju kao umnožak između molarnog apsorpcijskog koeficijenta, koncentracije ispitivanog uzorka i duljine puta svijetlosti. Molarni apsorpcijski koeficijent kao i molarna masa proteina korištenih u ovom radu, određeni su pomoću proteinskog softverskog alata (http://web.expasy.org/protparam/). Konačno, softverski alat uređaja NanoDrop, na temelju unesenih podataka i izmjerene apsorbancije na 280 nm, izračuna masenu koncentraciju ispitivanog proteina.

3.2.2. Elektroforetske metode

Elektroforeza proteina u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima (SDS-PAGE)

Elektroforeza proteina izvedena je u diskontinuiranom sustavu kojega čine dva gela različitih masenih udjela otopine akrilamida (vodena otopina akrilamida i bisakrilamida u omjeru 30:0,8). Između dva vertikalno položena stakalca prvo se izlije gel za razdvajanje sastava: otopina akrilamida (masenog udjela od 12-15%), otopina Tris pufera (0,375 mol dm^{-3}, pH 8,8), APS (0,5 g dm^{-3}) te TEMED (Φ=0,05%). Budući da kisik iz zraka inhibira polimerizaciju, gel se nadsvodi vodom koja se nakon polimerizacije otopine akrilamida ukloni, a površina gela dodatno osuši filter papirom. Nad gel za razdvajanje, izlije se potom gel za sabijanje sastava: otopina akrilamida (masenog udjela 5%), otopina Tris pufera (125 mol dm^{-3}, pH 6,8), APS (0,5 g dm^{-3}) te TEMED (Φ=0,05 %). U ovaj gel stavi se češalj za formiranje jažica.

Uzorci za elektroforezu pripremljeni su zakuhavanjem u puferu sastava: Tris (125 mol dm^{-3}, pH 6,8), SDS (40 g dm^{-3}), glicerol (Φ=20%), β-merkaptoetanol (Φ=10%), bromfenol plavilo (0,2 g dm^{-3}) na temperaturi od 95 °C, u trajanju od 5 min. Elektroforeza proteina u ovom radu provedena je u sustavu za elektroforezu Mini-Protean Tetra Cell (*Bio-Rad*), u puferu sastava: Tris (0,025 mol dm^{-3}, pH 8,3), glicin (0,192 mol dm^{-3}), SDS (1 g dm^{-3}), pri naponu od 100 V.

Proteinske vrpce vizualizirane su nakon provedene elektroforeze bojanjem u otopini sastava: Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,25 g dm^{-3}), metanol (Φ=40%), octena kiselina (Φ=7%), uz miješanje na orbitalnoj treskalici 4 h do preko noći. Postepeno odbojavanje gelova odvija se u otopini sastava: metanol (Φ=40%), octena kiselina (Φ=7%), a čuvanje u otopini sastava: metanol (Φ=5%) i octena kiselina (Φ=7%).

Elektroforeza DNA u agaroznom gelu

Horizontalna elektroforeza DNA u agaroznom gelu korištena je pri analizi pripravaka DNA nastalih tijekom kloniranja, restrikcijske analize specifičnim endonukleazama, te za analizu reakcija mutageneze. Gel je pripremljen zakuhavanjem agaroze masenog udjela 0,7% u TAE puferu sastava: Tris (40 mmol dm^{-3}) i EDTA (1 mmol dm^{-3}), uz podešavanje pH octenom kiselinom do pH 8,0. Prije izlijevanja, otopini agaroze doda se etidij-bromid u koncentraciji od 0,5 mg dm^{-3}. Jažice za nanošenje uzorka formirane su umetanjem teflonskog češljića.

Uzorci DNA se prije nanošenja na gel pomiješaju s puferom za nanošenje uzorka sastava: glicerol (Φ=50%), EDTA (100 mmol dm^{-3}), SDS (0,1 g dm^{-3}), bromfenol plavilo (1 g dm^{-3}). Vrpce DNA vizualizirane su osvjetljavanjem gela na UV-transiluminatoru (*Bio-Rad*). U ovom radu, elektroforeza DNA provedena je u sustavu za horizontalnu elektroforezu Sub-Cell (*Bio-Rad*).

3.2.3. Mikrobiološke metode

Priprema kompetentnih stanica

Kompetentne bakterijske stanice priređene su standardnim postupkom obrade bakterijske stanične stjenke kalcijevim kloridom. Nakon prekonoćnog rasta, bakterijska kultura se razrijedi LB medijem u omjeru 1:100 i nastavi inkubirati uz trešnju pri 37 ^{0}C do logaritamske faze rasta. Volumen od 400 ml inokulirane kulture stanica se potom istaloži centrifugiranjem na temperaturi od 4 ^{0}C, a bakterijski talog resuspendira u 40 cm^{-3} hladne otopine sastava $CaCl_2$ (60 mmol dm^{-3}), glicerol (Φ=15%), PIPES (10 mmol dm^{-3}, pH 7,0). Ispiranje se ponovi još jednom, nakon čega se stanični talog nježno resuspendira u 8 cm^{-3} otopine istog sastava. Ovako pripremljene stanice, podijeljene su u odgovarajuće volumene i pohranjene na -80 ^{0}C.

Uzgoj bakterijskih kultura

Bakterijske kulture uzgajane su na krutom LB mediju u Petrijevim pločama. Sterilnom ezom razmaže se bakterijska kultura, pohranjena u glicerolu na -80 ^{0}C, nakon čega slijedi inkubacija preko noći na temperaturi od 37 ^{0}C.

Uzgoj bakterijskih kultura u tekućem mediju (LB ili 2xYT^{+}) započinje nacjepljivanjem jedne bakterijske kolonije s krute podloge ili inokulacijom tekuće prekonoćne kulture u omjeru 1:100 ili 1:50. Kulture su uzgajane uz trešnju od 190-220 okretaja po minuti pri temperaturi od 37 ^{0}C.

Transformacija bakterijskih stanica metodom temperaturnog šoka

Transformacija je proces uvođenja plazmidne DNA u stanicu bakterije. Najčešće, plazmid koji se unosi nosi otpornost na antibiotik, što omogućava probir transformanti na selektivnoj hranjivoj podlozi. Proces započinje inkubacijom kompetentnih stanica (50 µL), s plazmidnom DNA (1-3 µL) ili reakcijskom smjesom nakon mutageneze (10 µL), na ledu u trajanju od 30 min, nakon čega slijedi temperaturni šok pri 42 ^{0}C u trajanju od 2 min. Stanicama se potom doda 0,5 ml^{-3} LB^{+}ili LB medija uz trešnju u trajanju od 1 sat pri 37 ^{0}C. Prikladni volumen ovako pripremljene kulture nacijepi se na krutu hranidbenu podlogu s odgovarajućim antibiotikom uz prekonoćni uzgoj na 37 ^{0}C.

3.3. Metode rekombinantne DNA

Standardni laboratorijski postupci manipulacije molekulom DNA, poput obrade endonukleazama i restrikcijske analize, provedeni su kako je opisano u laboratorijskom priručniku J. Sambrook i D. Russell: Molecular Cloning: Laboratory Manual, 3. izdanje, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001) ili koristeći preporuke proizvođača enzima. Za pročišćavanje umnoženih molekula DNA nakon lančane reakcije polimerazom (PCR), izolaciju plazmidne DNA iz bakterije *E. coli*, te za postupak ligacije pomoću *T4* DNA-ligaze, korištena su uputstva proizvođača komercijalnih kompleta.

3.3.1. Lančana reakcija polimeraze (PCR)

Lančana reakcija polimeraze (engl. *Polymerase chain reaction*, skraćeno PCR) je rutinska laboratorijska metoda koja se koristi za umnažanje molekule DNA ili njenih fragmenata u velikim količinama. U ovom radu korištena je prilikom umnažanja kodirajućih regija za A- i T-domenu, te za probir bakterijskih kolonija s odgovarajućim insertima. Sve PCR reakcije provedene su u uređaju Arktik Thermal Cycler (*Thermo Scietific*).

3.3.2. Umnažanje i kloniranje kodirajućih regija za A- i T-domenu

Kao kalup za umnažanje regija DNA koje kodiraju za A- i T-domenu proteina TycA, poslužio je plazmid pGC12/TycA. TycA protein čini prvi modul biosintetskog sustava za sintezu tirocidina iz bakterije *Bacillus brevis*, a sastoji se iz tri katalitički nezavisne domene (A-, T- i E-) na jednom polipeptidnom lancu (slika 14). Granice gena za A- i T-domenu, određene su kako je ranije opisano [87]. s napomenom da je fragment koji kodira za T-domenu umnožen u dvije varijante, kraćoj i duljoj.

Umnažanjem fragmenta za A-domenu nastaje produkt veličine 1542 pb, a umnažanjem fragmenata za T-domenu (T_1 i T_2-domena) nastaju produkti veličina 292 pb, odnosno 262 pb. Kraćoj varijanti T-domene (T_2-domena) nedostaje sekvenca linkera sačinjena od ~ 10 aminokiselina.



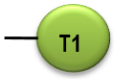
Slika 14. Shematski prikaz modula TycA te umnoženih proteinskih regija A- i T-domena.

Za umnažanje svih fragmenata gena *tycA*, PCR reakcijska smjesa sadrži: odgovarajući par početnica koncentracije 500 nmol dm^{-3}, pGC12/TycA (20 ng), pufer za PCR, $MgCl_2$ (2,5 µmol dm^{-3}), dNTP miks (250 nmol dm^{-3}) te DNA polimerazu *Taq* (1,5 U $µl^{-1}$) u konačnom volumenu od 50 µL. Reakcije su provedene koristeći slijedeće postavke na uređaju za PCR:

Tablica 1. Uvjeti reakcije PCR korišteni za umnažanje kodirajućih regija A- i T-domene.

Korak	Temperatura/ °C	Vrijeme/ min	
Početna denaturacija kalupa	94	10	
Denaturacija kalupa	94	0:30	**40 ciklusa**
Sparivanje početnica	62	0:30	
Produljivanje lanca	72	0:30	
Završno produljivanje lanca	72	10	

Tablica 2. Početnice korištene za reakciju PCR. Podebljano su označena restrikcijska mjesta za *Nco*I (CCATGG) te *Bam*HI (GGATCC), dok su modificirani nukleotidi podcrtani.

Shematski prikaz	Protein	Početnica	Nukleotidni slijed početnice
	TycA-A (A-domena)	TycA-A (NcoI)	5' –GGACC CATGG TAGCA AATCA GGC- 3'
		TycA-A (BamHI)	5' –GGTAG GATCC CTGGC TTTGG TTTG- 3'
	TycA-T_1 (T_1-domena)	TycA-T_1 (NcoI)	5' –GAGCC CATGG TTACG GCAAA CC- 3'
		TycA-T (BamHI)	5' –CGATG GATCC CTGAT CGCTT TTTCT C- 3'
	TycA-T_2 (T_2-domena)	TycA-T_2 (NcoI)	5' –GCTGC CATGG ATCCT CCGAG AACC- 3'
		TycA-T (BamHI)	5' –CGATG GATCC CTGAT CGCTT TTTCT C- 3'

Po završetku reakcije PCR, umnoženi fragmenti DNA pročišćeni su pomoću *Qiaquick PCR Purification* komercijalnog kompleta (*Qiagen*) po uputi proizvođača. Kako bi se dobili ljepljivi krajevi pogodni za reakciju ligacije, plazmid pQE60 i umnoženi fragmenti gena, obrađeni su restrikcijskim endonukleazama u reakcijskoj smjesi sastava: plazmid pQE60 ili umnoženi fragmenti gena (1 µg), *Bam*HI (10 U), *Nco*I (10 U), NEB pufer 3 do volumena od 50 µL uz inkubaciju u trajanju od 1 sat pri temperaturi od 37 ^{0}C. Produkti digestije ponovno su pročišćeni pomoću *Qiaquick PCR Purification* kita uz provjeru koncentracije uređajem NanoDrop.

Reakcija ligacije inserta s plazmidom pomoću *T4* DNA-ligaze provedena je koristeći *Quick Ligation Kit* (*NEB*) po uputstvima proizvođača. Reakcijska smjesa sadrži insert u molarnom omjeru prema plazmidu od 6:1, linearizirani plazmid pQE60 (50-60 ng), *Quick T4* DNA-ligazu (1 µL), 2 x *Quick Ligation* pufer (10 µL) te mQH_2O do konačnog volumena od 20 µL, uz inkubaciju na sobnoj temperaturi u trajanju od 5 min. Transformacija bakterijskih stanica reakcijom ligacije provedena je na ranije opisan način.

3.3.3. Probir bakterijskih kolonija s insertom

Za probir bakterijskih kolonija s odgovarajućim insertom korištene su metode restrikcijske analize plazmidne DNA te metoda lančane reakcije polimerazom na odabranoj bakterijskoj koloniji. Konačna potvrda o uspješnom kloniranju slijedi nakon analize sekvencioniranjem koja je provedena uslugom servisa *Macrogen*, Seoul, Korea odnosno Amsterdam, Europa. Plazmid koji sadrži gen za TycA-A označen je kao pQE60/TycA-A, odnosno pQE60/TycA-T_1, pQE60/TycA-T_2 za TycA-T proteine.

Lančana reakcija polimeraze na bakterijskim kolonijama

Lančana reakcija polimeraze na bakterijskim kolonijama (engl. *colony PCR*) provedena je u svrhu probira klonova s odgovarajućim insertom. Kao kalup koristi se nasumično odabrana bakterijska kolonija koja se sterilnim nastavkom prenese u reakcijsku smjesu za PCR. Ukoliko kolonija sadrži odgovarajući insert, isti će se ovom metodom umnožiti u dovoljnoj količini kako bi se detektirao na agaroznom gelu. Za lančanu reakciju polimeraze na bakterijskim kolonijama korištene su iste količine sastojaka reakcijske smjese kao i kod reakcija umnažanja kodirajućih regija A- i T-domene. Uvjeti reakcije modificirani su kako je opisano:

Tablica 3. Uvjeti reakcije PCR na bakterijskim kolonijama.

Korak	Temperatura/ °C	Vrijeme/ min	
Početna denaturacija kalupa	95	5	
Denaturacija kalupa	95	1:00	**40 ciklusa**
Sparivanje početnica	62	1:30	
Produljivanje lanca	72	1:00	
Završno produljivanje lanca	72	5	

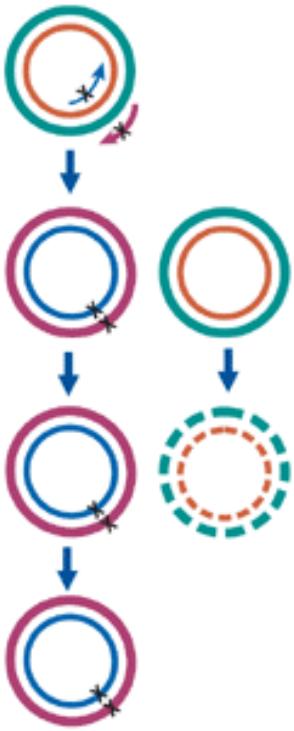
Restrikcijska analiza bakterijske DNA s insertom

Nekoliko bakterijskih kolonija za koje se smatra da bi mogle imati odgovarajući insert uzgoji se preko noći u tekućem LB mediju. Plazmidna DNA izolirana je standardnim postupkom alkalne lize koristeći *QIAprep Spin Miniprep Kit* (*Qiagen*) po uputama proizvođača. Veličina pročišćene plazmidne DNA provjerena je elektroforezom na agaroznom gelu, nakon čega je provedena restrikcijska analiza. Ovim načinom odgrađuju se fragmenti veličine ~1500 pb za TycA-A, ~290 pb za TycA-T_1 odnosno ~260 za TycA-T_2.

3.3.4. Metoda usmjerene mutageneze

Usmjerena mutageneza laboratorijska je metoda koja se učestalo koristi za izučavanje strukturno-funkcionalnih svojstava odabranih aminokiselina u proteinu. U ovom radu u proteine TycA-A te TycA-T_1 uveden je niz supstitucijskih mutacija Trp u Phe koristeći komercijalni *Quik Change Site-Directed Mutagenesis Kit* (*Stratagene*) (tablica 2). Reakcija mutageneze provodi se pomoću mutagenih oligonukleotidnih početnica i DNA-polimeraze *PfuTurbo* koja replicira oba lanca plazmidne DNA (slika

15). Dvolančani kalup plazmidne DNA, razgradi se dodatkom restrikcijske endonukleaze *Dpn*I koja specifično prepoznaje metilirani i hemimetilirani DNA slijed. *Dpn*I stoga cijepa samo plazmidnu DNA koja je poslužila kao kalup, budući da se ova DNA izolira iz bakterijskog soja s dam metilacijom. Višestruke mutante W323F/W406F i W323F/W406F/W301F konstruirane su uzastopnim ponavljanjem reakcije mutageneze na kalupu DNA s jednom supstitucijskom mutacijom. Reakcija mutageneze provedena je u uređaju za PCR pomoću seta mutagenih početnica koje unose željenu promjenu na točno određeno mjesto u genu (slika 15).



1. Uslijed produljene denaturacije plazmidne DNA, mutagene početnice sparuju se s kalupom.
2. Lanci se produljuju pomoću *Pfu Ultra* DNA-polimeraze. Mjesta uvedene mutacije označene su s X.
3. Metilirani kalup razgrađuje se s *Dpn*I enzimom.
4. Transformacija bakterijskih stanica.

Slika 15. Shematski prikaz reakcije mutageneze.

Tablica 4. Nukleotidni slijed mutagenih početnica koje su korištene za unošenje supstitucijskih mutacija u proteine TycA-A i TycA-T_1. Crvenim su označeni promijenjeni nukleotidi.

Protein TycA-A/ mutacija	Nukleotidni slijed početnice
W227F	5' –CGTTCGACGCATCCGTTTTTGAAATGTTCATGGCTTTGC- 3' 5' –GCAAAGCCATGAACATTTCAAAAACGGATGCGTCGAACG- 3'
W301F	5' –CCGCACCCTTGGTAAACAAATTCAAAGACAAACTCAGGTAC- 3' 5' –GTACCTGAGTTTGTCTTTGAATTTGTTTACCAAGGGTGCGG- 3'
W323F	5' –CGCGACGATCTTTGAAGCCCCGTCCAATCAGC- 3' 5' –GCTGATTGGACGGGGCTTCAAAGATCGTCGCG- 3'
W376F	5' –CAAGAGGCTATTTCAATCGGCCCGACTTGACCGC- 3' 5' –GCGGTCAAGTCGGGCCGATTGAAATAGCCTCTTG- 3'
W406F	5' –CACAGGTGACTTGGCCAAATTTCTGACGGATGGAACG- 3' 5' –CGTTCCATCCGTCAGAAATTTGGCCAAGTCACCTGTG- 3'

Tablica 4. (nastavak s prethodne stranice)

Protein TycA-T/ mutacija	Nukleotidni slijed početnice
W9F	5' –CGATTCTCGTCTCCATCTTTCAAAACGTTTTGGGAATTG- 3' 5' –CAATTCCCAAAACGTTTTGAAAGATGGAGACGAGAATCG- 3'

Reakcije mutageneze u oba slučaja složene su po preporuci proizvođača *Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit* (*Stratagen*), uz postavke uređaja kako je navedeno:

Korak	Temperatura/ °C	Vrijeme/ min	
Početna denaturacija kalupa	95	0:30	
Denaturacija kalupa	95	0:30	
Sparivanje početnica	55	1:00	**16 ciklusa**
Produljivanje lanca	68	10:00	

3.4. Metode rada s proteinima

3.4.1. Uzgoj bakterija i priprava proteinskih ekstrakata prekomjerno eksprimiranih TycA-A i TycA-T_1 proteina

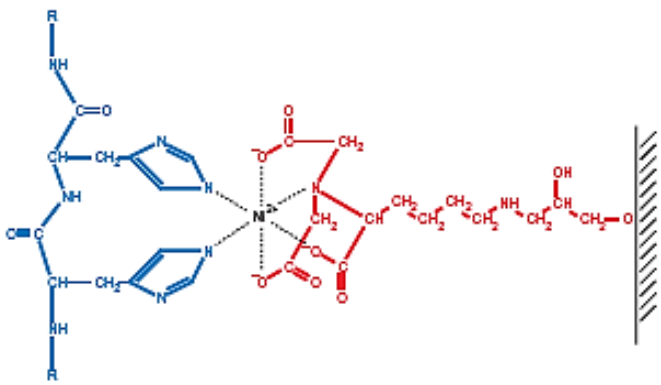
Kao soj stanica bakterije *E.coli* za prekomjernu ekspresiju TycA-A poslužio je *XL1Blue*, a za TycA-T_1 *BL21(DE3)*. Nakon više ciklusa optimizacije uvjeta ekspresije, proteini TycA-A i TycA-T_1 izolirani su iz manjih volumena kulture korištenjem *Ni-NTA Spin Kit* (*Qiagen*). Sami uvjeti uzgoja kao i pročišćavanje afinitetnom kromatografijom isti su za oba proteina, uz napomenu da se uzgoj stanica korištenih za prekomjernu ekspresiju TycA-T_1 odvija na selektivnoj podlozi s ampicilinom (100 μg cm^{-3}) i/ili kanamicinom (25 μg cm^{-3}), ovisno o posttranslacijskoj modifikaciji. U slučaju sinteze posttranslacijski modificiranog proteina vrši se ko-ekspresija s fosfopantetein transferazom iz sustava za sintezu surfaktina Sfp čiji se gen nalazi na plazmidu pREP4 s otpornošću na kanamicin (vidi poglavlje 3.1.10.).

Jedna bakterijska kolonija prenese se sterilnim nastavkom s krute podloge u 30 ml 2 x YT^+ medija u kojega su prethodno dodani odgovarajući antibiotici. Nakon prekonoćnog uzgoja uz trešnju od 220 okretaja po minuti pri temperaturi od 37 °C, početna kultura se razrijedi u 1500 ml medija istog sastava i uzgaja pod istim uvjetima rasta dok optička gustoća ne dostigne vrijednost od OD_{600} = 0,8. Nakon indukcije s IPTG (1 mmol dm^{-3}), kultura se uzgaja još 17 sati pri temperaturi od 30 °C. Konačna

biomasa prikupi se centrifugiranjem pri temperaturi od 4 °C, 4500 g, 15 min. Stanice se resuspendiraju u 25 ml pufera sastava HEPES (50 mmol dm^{-3}), NaCl (300 mmol dm^{-3}), imidazol (20 mmol dm^{-3}), PMSF (1 mmol dm^{-3}), pH 7,8, i soniciraju kroz 4 ciklusa po 15 s, pri 15% snage sonde MS72 uređaja Sonopuls (*Bandelin*). Sonicirana suspenzija se centrifugira na 20000 g, 30 min, a dobiveni supernatant s ukupnim staničnim proteinima se filtrira putem PES filtera s porama veličine 0,45 µm. Ovako pripremljeni proteinski ekstrakt, nanosi se dalje na uređaj za brzu tekućinsku kromatografiju (engl. Fast Protein Liquid Chromatography, FPLC).

3.4.2. Pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom na FPLC uređaju

Daljnje pročišćavanje proteinskog ekstrakta uključuje primjenu Ni-NTA tehnologije (*Amersham*). Agarozni nosač sadrži imobilizirane ione nikla vezane preko četiri koordinacijske veze na NTA matriks. Preostale dvije koordinacijske veze, ioni nikla ostvaruju vezujući se na imidazolne prstene heksahistidinskog privjeska na proteinu od interesa (slika 16). Ispiranje vezanog proteina postiže se propuštanjem pufera koji istiskuje vezani protein s agaroznog nosača u koncentracijskom gradijentu imidazola. Ovom metodom osiguravaju se velike količine relativno čistog rekombinantnog proteina, koji se, ukoliko je potrebno, dodatno pročisti na ionsko izmjenjivačkoj komatografiji. Dobiveni proteinski ekstrakt nanese se na HisTrap HP kolonu volumena 5 mL (*Amersham*), koristeći pufer sastava HEPES (50 mmol dm^{-3}), NaCl (300 mmol dm^{-3}), imidazol (20 mmol dm^{-3}), pH 7,8. Nakon nanošenja, kolona se ispere s 25 ml istog pufera kako bi se uklonili svi nespecifično vezani proteini. Eluiranje proteina od interesa postiže se u gradijentu pufera sastava HEPES (50 mmol dm^{-3}), NaCl (300 mmol dm^{-3}), imidazol (500 mmol dm^{-3}), pH 7,8. Prikupljene frakcije dodatno se analiziraju SDS-poliakrilamidnom elektroforezom kako bi se objedinile one frakcije koje sadrže najčišći protein. Protein se potom prenese, dijaliziranjem ili centrifugalnim filtrima, u pufer za pohranu sastava HEPES (50 mmol dm^{-3}), NaCl (100 mmol dm^{-3}), $MgCl_2$ (10 mmol dm^{-3}), EDTA (1 mmol dm^{-3}), DTE (2 mmol dm^{-3}), pH 7,8. Otopina koja sadrži pročišćeni protein podijeljena je u prikladne volumene i pohranjena na -20 °C.



Slika 16. Shematski prikaz Ni-NTA agaroznog nosača s vezanim proteinom

3.4.3. Pročišćavanje proteina ionsko izmjenjivačkom kromatografijom

Pročišćavanje na anionskom nosaču

Neke varijante proteina TycA-A, dodatno su pročišćene ionsko izmjenjivačkom kromatografijom koristeći anionsku UnoQ6 kolonu (*Bio-Rad*) čija stacionarna faza sadrži pozitivne $-N^+(CH_3)_3$ skupine. Za nanošenje uzorka na kolonu korišten je pufer sastava Tris 50 mmol dm^{-3}, pH 7,8. Pufer ovog sastava omogućava efikasno vezanje TycA-A proteina za nosač s kojega se isti eluira porastom ionske jakosti u gradijentu pufera sastava Tris (50 mmol dm^{-3}), NaCl (1 mol dm^{-3}), pH 7,8. Prikupljene frakcije koje analizom na SDS-poliakrilamidnom gelu pokazuju pročišćeni protein se objedine, a potom se protein prenese u pufer za pohranu. Koncentracija proteina određena je spektrofotometrijski metodom po Bradfordu ili pomoću uređaja NanoDrop.

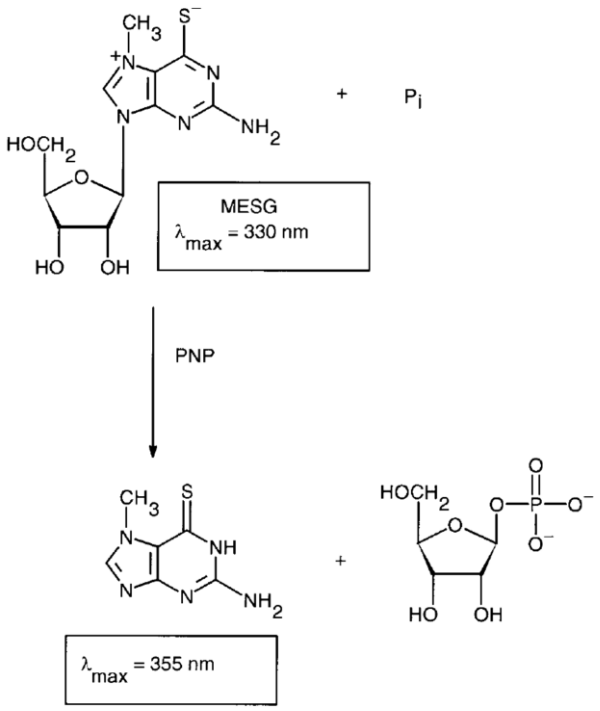
Pročišćavanje na kationskom nosaču

Protein TycA-T dodatno je pročišćen na kationskom izmjenjivaču MonoS HR 5/5 (*GE Healthcare*) koji kao stacionarnu fazu nosi negativno nabijene $–CH_2–SO_3^-$skupine. Za nanošenje uzorka poslužio je pufer sastava MES (20 mmol dm^{-3}), pH 5,5, a za eluiranje pufer istog sastava u gradijentu koncentracije NaCl do 1 mol dm^{-3}. Čistoća pojedinih frakcija analizirana je SDS poliakrilamidnom elektroforezom. Pročišćene frakcije proteina dijalizirane su prema puferu za dijalizu pomoću benzoiliranog crijevca za dijalizu s granicom prolaza Mr 3000 Da. Koncentracija proteina određena je ranije spomenutim načinom.

3.5. Metode biokemijske karakterizacije proteina

3.5.1. Potrošnja ATP i standardna krivulja

U reakciji aktivacije aminokiseline na A-domeni prati se utrošak ATP-a koristeći metodu po Webbu [88]. Potrošnjom ATP-a oslobađa se anorganski pirofosfat (PP_i), koji se djelovanjem enzima anorganske-pirofosfataze (IPP) hidrolizira u dvije molekule anorganskog fosfata (P_i). U prisustvu anorganskog fosfata, purin nukleozid-fosforilaza (PNP) fosforolitički cijepa 2-amino-6-merkapto-7-metilpurin ribonukleozid (MESG) do riboza-1-fosfata i 2-amino-6-merkapto-7-metilpurina (slika 17). Pri toj enzimatskoj pretvorbi MESG-a u reakcijske produkte dolazi do pomaka apsorpcijskog maksimuma sa 330 nm na 355 nm, ali se mjerenje provodi na 360 nm jer je na toj valnoj duljini najveća razlika u apsorbanciji supstrata i produkta.



Slika 17. Prikaz pretvorbe 2-amino-6-merkapto-7-metilpurin ribonukleozida (MESG) u riboza-1-fosfat i 2-amino-6-merkapto-7-metilpurin, u prisustvu P_i, djelovanjem PNP.

Kako bi se promjena apsorbancije pri 360 nm dovela u vezu s količinom PP_i oslobođenog u enzimskoj reakciji, potrebno je izraditi standardnu krivulju koristeći natrijev pirofosfat ($Na_4P_2O_7$) kao pirofosfatni standard. Budući da sam MESG pokazuje značajnu apsorbanciju pri 360 nm koja ovisi o pH i termičkoj stabilnosti MESG-a, standardnu krivulju je potrebno izraditi pod istim reakcijskim pod kojima se provodi i enzimska reakcija. Standardna krivulja pripremljena je određivanjem promjene apsorbancije za niz otopina koje su sadržavale Tris (25 mmol dm^{-3}), magnezijev acetat (1 mmol dm^{-3}), MESG (0,2 mmol dm^{-3}), PNP (0,2 U cm^{-3}), IPP (0,2 U cm^{-3}) te raspon koncentracija $Na_4P_2O_7$ (0-20 µmol dm^{-3}). Na temelju standardne krivulje određena je vrijednost ekstinkcijskog koeficijenta u iznosu od 21 000 mol^{-1} dm^3 cm^{-1}.

Oslobađanje PP_i u reakciji s TycA-A proteinom provedeno je u mikrotitarskoj izvedbi, koristeći *EnzCheck Pyrophosphate Assay Kit* (*Invitrogen*), u čitaču mikrotitarskih pločica EL808 (*Bio-Tek Instruments, Winooski, VT*). Potrošnja ATP-a mjerena je u reakcijskoj smjesi sastava Tris (25 mmol dm^{-3}, pH 7,5), magnezijev acetat (1 mmol dm^{-3}), MESG (0,2 mmol dm^{-3}), PNP (0,2 U cm^{-3}), IPP (0,2 U cm^{-3}), ATP (1 mmol dm^{-3}), TycA-A (0,6 µmol dm^{-3}) u rasponu koncentracija L-Phe od 0-1 mmol dm^{-3}. Sve reakcijske smjese predinkubirane su 10 min pri temperaturi od 37 °C kako bi izreagirale nečistoće prisutne u obliku pirofosfata i fosfata. Reakcija se započinje dodatkom enzima TycA-A. Nastanak 2-amino-6-merkapto-7-metilpurina mjeri se u trajanju od 10 min s očitanjima svakih 12 s pri valnoj duljini

od 360 nm. Kinetički parametri određeni su koristeći GraFit6 softverski alat, utočnavanjem podataka za početnu brzinu enzimske reakcije u ovisnosti o koncentraciji supstrata (0-2 mmol dm^{-3}) pomoću Michaelis-Menten-ove jednadžbe.

3.5.2. Cirkularni dikroizam (CD spektri)

Kako bi se biokemijska svojstva određenih varijanti proteina TycA-A doista mogla pripisati uvedenoj promjeni, potrebno je pokazati da istim promjenama nije došlo do narušavanja sekundarnih elemenata proteinske strukture. U tu svrhu, snimljeni su CD-spektri divljeg tipa TycA-A i mutanti. Snimanje CD-spektara provedeno je na spektropolarimetru *J-715* (*JASCO*, Tokyo, Japan), koristeći kvarcnu kivetu optičkog puta 0,1 mm. Svi proteini razrijeđeni su do koncentracije od 0,5 mg cm^{-3} koristeći pufer sastava Tris 50 mmol dm^{-3}, pH 7,8. Uvjeti snimanja CD spektara za proteine u dalekom UV području (eng. *far UV*) (190-250 nm), pri sobnoj temperaturi (20-25 °C) bili su: rezolucija 0,2 nm, širina puta zrake 1,0 nm, vrijeme mjerenja u jednoj točki 1 s (eng. *response*), brzina snimanja 50 nm min^{-1}. Konačni spektri prosjek su minimalno 3 snimanja.

3.5.3. Ograničena proteoliza

Tripsin specifično cijepa peptidnu vezu na C-terminalnoj strani arginina i lizina, međutim, mnogi proteini u nativnom stanju pokazuju otpornost na proteolizu koja se uglavnom događa na izloženim, fleksibilnim ili mjestimično nestrukturiranim regijama proteina [70, 89]. Djelomična triptička digestija proteina TycA-A ispitana je u puferu sastava Tris (50 mmol dm^{-3}, pH 7,5), $MgCl_2$ (1 mmol dm^{-3}), L-Phe (1 mmol dm^{-3}) te ATP (1 mmol dm^{-3}). Nakon inkubacije u trajanju od 10 min pri 37 ℃, proteoliza je započeta dodatkom tripsina u masenom omjeru protein:proteaza=100:1. Alikvoti reakcijske smjese uzorkovani su u određenim vremenskim intervalima, nakon čega je reakcija prekinuta dodatkom pufera za nanošenje uzorka. Triptički fragmenti analizirani su na SDS-poliakrilamidnom gelu.

Otopina tripsina (10 mg cm^{-3}) pripremljena je otapanjem tripsina u otopini 20 mmol dm^{-3} kalcijevog klorida s 1 mmol dm^{-3} HCl. Tako pripremljena otopina se neposredno prije korištenja ratrijedi s 1 mmol dm^{-3} HCl do konačne koncentracije u radnoj otopini od 0,1 mg cm^{-3}.

3.5.4. Fluorescencijska svojstava TycA-A i TycA-T_1 proteina

Intrinzična fluorescencija

Emisijski spektar proteina predstavlja odnos između intenziteta fluorescencije i valne duljine, a koristi se kod izučavanja strukturno-dinamičkih svojstava proteina. U ovom radu sva mjerenja fluorescencije provedena su koristeći LS 55 spektrofluorimetar (*Perkin Elmer*), sa sljedećim postavkama: valna duljina pobudnog zračenja pri 295 nm, širina emitirajućeg otvora 5,5 nm, širina

pobudnog otvora 2,5 nm, te brzina snimanja spektra 300 nm min^{-1}. Emisijski spektri snimani su u području valnih duljina od 290-700 nm. Sva mjerenja provedena su pri temperaturi od 25 °C u puferu sastava Tris (50 mmol dm^{-3}), $MgCl_2$ (20 mmol dm^{-3}), pH 7,8, koji je prethodno filtriran kroz filter veličine pora 0,22 μm. Snimanja emisijskih spektara u prisustvu supstrata, provedena su u puferu prethodno navedenog sastava uz dodatak aminokiseline i ATP-a do koncentracije od 1 mmol dm^{-3}. Ovako pripremljena reakcijska smjesa inkubirana je pri temperaturi od 25 °C, 10 min, a potom je provedeno snimanje spektra. Svi spektri predstavljaju prosjek od minimalno tri uzastopna mjerenja.

Gašenje intrinzične fluorescencije akrilamidom i kalijevim jodidom

Gašenje fluorescencije podrazumijeva proces opadanja početnog intenziteta fluorescencije uslijed kolizije molekula fluorofora s molekulom gasitelja (engl. *quencher*). Odnos omjera početnog intenziteta fluorescencije i eksperimentalno određenog intenziteta uslijed dodanog alikvota gasitelja opisuje Stern-Volmer jednadžba:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_D[Q]$$

Gdje je F_0 početni intenzitet fluorescencije, F izmjereni intenzitet fluorescencije, K_d Stern-Volmerova konstanta, te $[Q]$ molarna koncentracija gasitelja.

Eksperimenti gašenja intrinzične fluorescencije akrilamidom provedeni su dodavanjem alikvota otopine akrilamida (3,64 mol dm^{-3}) u koncentracijskom rasponu od 0-400 mmol dm^{-3}. Pri najvišoj korištenoj koncentraciji akrilamid pokazuje značajnu apsorbanciju pri valnoj duljini pobude što se zove efekt unutarnjeg filtera (engl. *inner filter effect*). Zbog toga se zapaženi intenzitet fluorescencije, osim za faktor razrjeđenja, mora korigirati za vrijednost faktora kojega opisuje izraz:

$$F_{corr} = F_{obs}\,\text{antilog}\left(\frac{OD_{ex} + OD_{em}}{2}\right)$$

gdje je F_{corr} korigirani intenzitet fluorescencije, F_{obs} zapaženi intenzitet fluorescencije, OD_{ex} apsorbancija pri valnoj duljini pobude, OD_{em} apsorbancija pri valnoj duljini emisije.

Za razliku od akrilamida, KI je ionski gasitelj s ograničenom mogućnošću gašenja ukupne fluorescencije. Eksperimenti gašenja fluorescencije s KI, provedeni su titrirajući otopinu proteina alikvotima KI (5 mol dm^{-3}) u rasponu koncentracija od 0-400 mmol dm^{-3}. Kako povećanjem koncentracije KI raste i ionska jakost otopine, u reakcijsku smjesu dodavani su alikvoti KCl kako bi ukupna ionska jakost u svakoj točki mjerenja bila jednaka, a eksperimentalni podaci utočnavani su koristeći modificiranu Stern-Volmerovu jednadžbu koju opisuje izraz:

$$Y(Q,a) = \frac{F}{F_0} = f_0 + \sum_{i=1}^{n} \frac{f_i}{(1 + K_i[Q]) \exp V_i[Q]}$$

$$\sum_{i=0}^{n} f_i = 1; \quad 0 \leqslant f_i \leqslant 1; \quad K_i \geqslant 0 \quad \text{and} \quad V_i \geqslant 0.$$

gdje je K_i dinamička konstanta gašenja za fluorescentnu komponentu *i*, V_i statička konstanta gašenja za fluorescentnu komponentu *i*, f_i frakcijski doprinos komponente *i* ukupnoj fluorescenciji, f_0 frakcijski doprinos komponente nedostupne gašenju te *a* set nepoznatih parametara [90].

Ekstrinzična fluorescencija

U ovom radu, kao fluorescentna proba, poslužila je 1-anilinonaftalen-8-sulfonska kiselina (ANS) čija vodena otopina slabo fluorescira pri valnoj duljini od 545 nm. Uslijed vezanja za hidrofobne regije na proteinu, intenzitet fluorescencije ANS-a raste, te se pomiče na 470 nm. Mjerenja ekstrinzične fluorescencije s mutantama i divljim tipom proteina TycA-A provedena su u otopini sastava Tris pufer (50 mmol dm^{-3}), $MgCl_2$ (20 mmol dm^{-3}), ANS (30 μmol dm^{-3}), pH 7,8, pri čemu je korišten molarni omjer protein:ANS od 1:25.

Metoda diferencijalne fluorimetrije

Metoda diferencijalne fluorimetrije (engl. *differential scanning fluorometry*) zasniva se na specifičnom vezanju fluorescentne boje za hidrofobne površine na proteinu uslijed termalne denaturacije. Porast intenziteta fluorescencije tijekom procesa termalne denaturacije daje informaciju o termičkoj stabilnosti promatranog proteina. Mjerenja termičke stabilnosti proteina TycA-A provedena su u mikrotitarskim pločicama (*MicroAmp Optical 96-well reaction plate*), koristeći RT-PCR uređaj marke *Applied Biosystem 7500 Fast System*. Reakcijska smjesa sastoji se od pufera sastava Tris (25 mmol dm^{-3}, pH 7,5), magnezijev acetat (1 mmol dm^{-3}), boje SYPRO orange te TycA-A (0,27 μg cm^{-3}) u ukupnom volumenu od 30 μL. Ispitivanje utjecaja supstrata na termičku stabilnost proteina provedeno je u reakcijskoj smjesi navedenog sastava uz dodatak ATP (1 mmol dm^{-3}) i/ili aminokiseline (1 mmol dm^{-3}).

3.6. Bioinformatičke metode

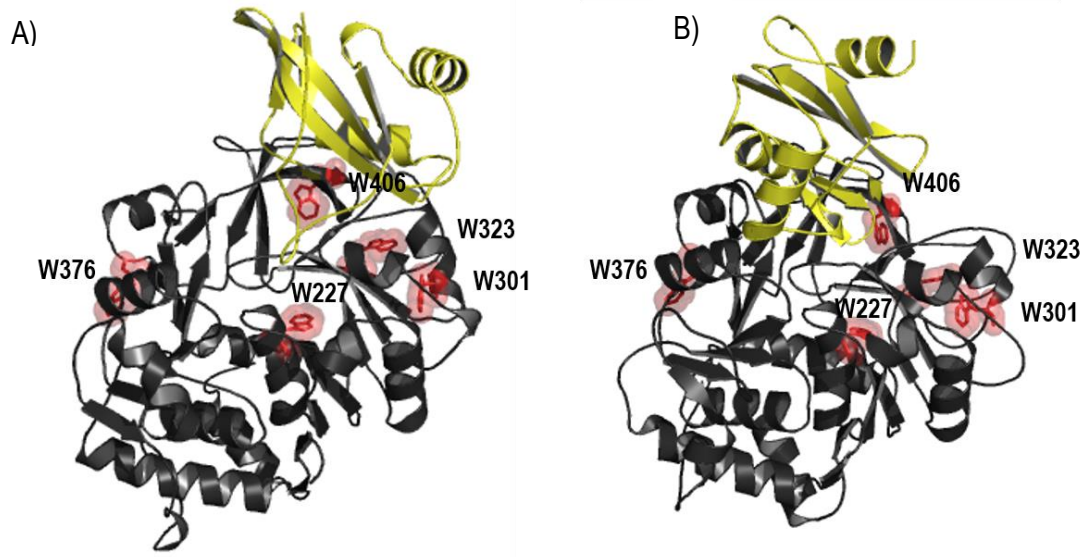
Za izračun proteinskih parametara te za usporedbu i poravnavanje proteinskih sekvenci korišteni su softverski alati preuzeti s http://www.uniprot.org. Grafički prikaz modela proteina izrađen je koristeći program PyMOL, a izračun prostorne izloženosti pojedinih triptofana u modelu TycA-A proteina proveden je koristeći softverski alat http://vadar.wishartlab.com/.

Početnice korištene tijekom mutageneze kreirane su koristeći http://www.bioinformatics.org/primerx/. Homologni modeli izrađeni su koristeći softverski alat http://swissmodel.expasy.org/. Poravnavanje sekvenci izrađeno je pomoću programa http://www.uniprot.org/help/sequence-alignments, a prikaz poravnanih sekvenci pomoću softverskog alata JalView http://www.jalview.org/.

4. REZULTATI

4.1. Analiza mikrookoliša Trp u modelima proteina TycA-A

U primarnoj strukturi, TycA-A sadrži pet potencijalno fluorescirajućih Trp. Kako bi odredili njihov prostorni raspored i aminokiselinski sastav neposrednog mikrookoliša, poslužili su ranije opisani modeli TycA-A u adenilat- i tioester-formirajućoj konformaciji (slika 18). Modeli proteina TycA-A, izrađeni su koristeći koordinate za proteine PheA (PDB: 1amu) te DltA (PDB: 3e7w), pohranjene u proteinskoj bazi podataka [63]. Procjena frakcijske dostupnosti (engl. *accessible surface area* (ASA)) te analiza vodikovih veza s bočnim ograncima Trp, izrađena je pomoću softverskog alata Vadar 1.5 [91].



Slika 18. Modeli proteina TycA-A u A) adenilat- i B) tioester-formirajućoj konformaciji izrađeni koristeći koordinate u proteinskoj bazi podataka za proteine PheA (PDB: 1amu) i DltA (PDB: 3e7w). Istaknute su A_N- (sivo) i A_C- (žuto) poddomene. Crveno su označeni bočni ogranci Trp. Modeli su prikazani koristeći program PyMOL v 0.99.

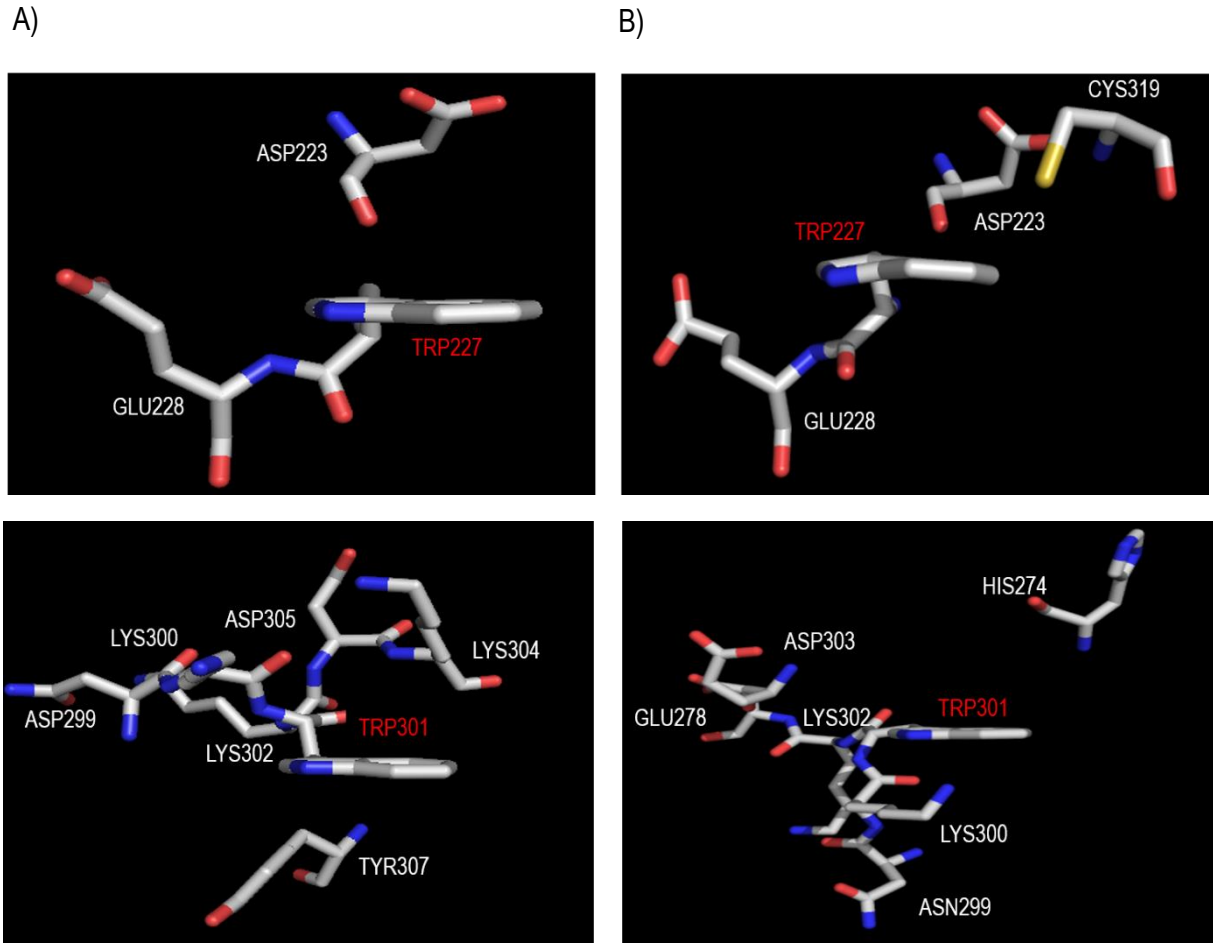
Rezultati analize prostornog rasporeda, ukazuju da su svi triptofani TycA-A smješteni u većoj A_N-poddomeni, izvan konzerviranih regija. W227 zatvara dno veznog mjesta za L-Phe te je u adenilat- i tioester-formirajućoj konformaciji, zajedno s W301, najmanje izložen okolnom otapalu (tablica 5).

Tablica 5. Frakcijska dostupnost triptofana u A) adenilat- te B) tiester-formirajućoj konformaciji proteina TycA-A.

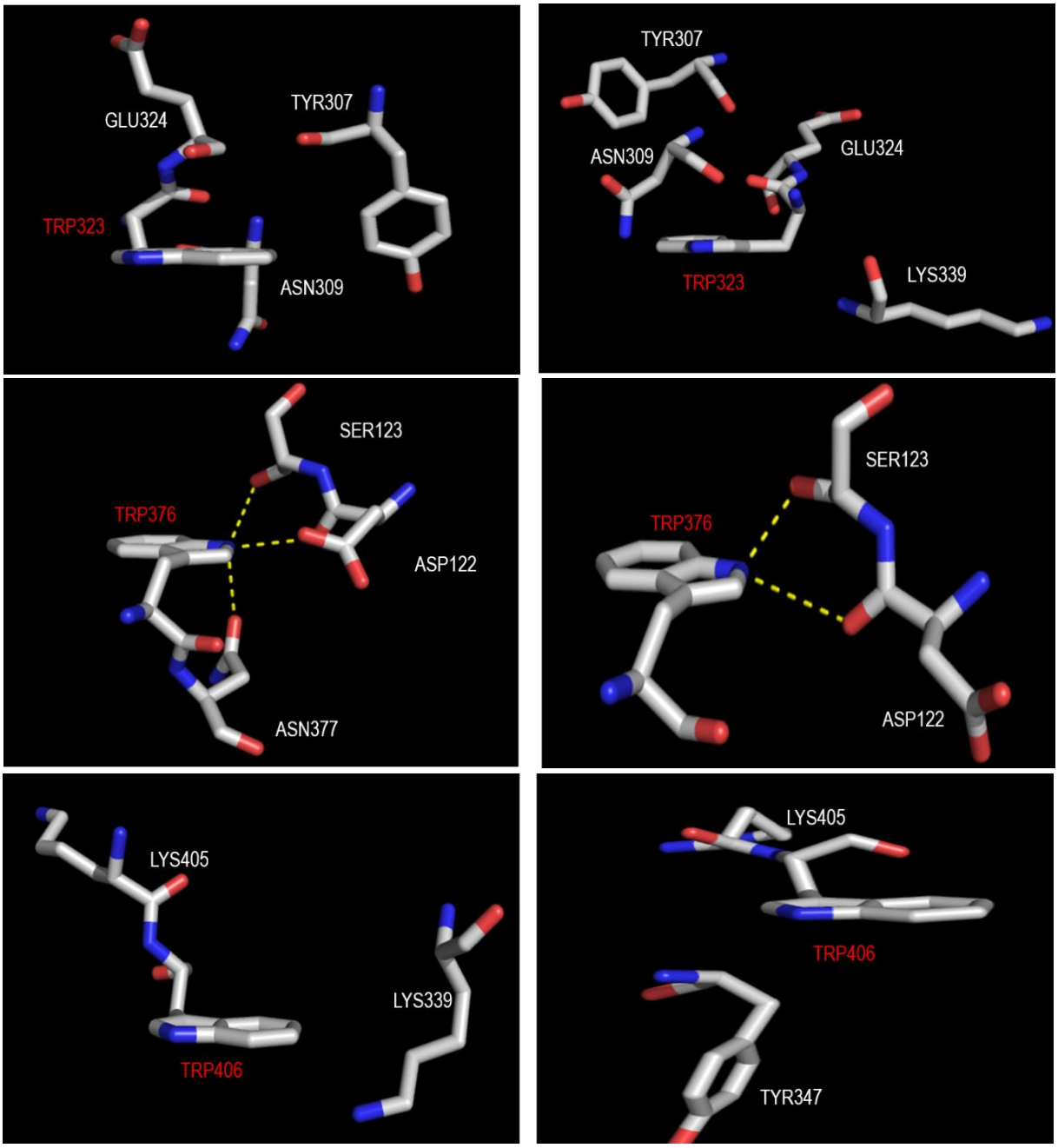
	Konformacija TycA-A	
	A	B
Aminokiselinski ostatak	Frakcijska dostupnost (%)	Frakcijska dostupnost (%)
W227	2	1
W301	0	8
W323	11	31
W376	17	28
W406	19	36

Veća frakcijska dostupnost aminokiselinskih ostataka W323, W376 te W406 u odnosu na W227 i W301, uočena je za obje konformacije TycA-A.

Aminokiselinski sastav neposrednog mikrookoliša Trp, analiziran je unutar radijusa od 5 Å, te ukazuje da se u blizini svakog Trp nalaze barem dvije aminokiseline čiji su bočni ogranci jaki gasitelji fluorescencije (engl. *quencher*) (slika 19). Tako se primjerice, u neposrednoj blizini W227 nalaze bočni ogranci C319, D223 i E228, a koji mogu gasiti nativnu fluorescenciju ovog ostatka. Najveći broj bočnih ogranaka aminokiselina gasitelja, nalazi se u mikrookolišu W301, dok se u blizini W323 nalaze Y307, E324 i N309, a u blizini W406 se nalaze K339 i K405.



Slika 19. Susjedne aminokiseline unutar udaljenosti od 5 Å od pojedinih Trp u modelima proteina TycA-A. Prikazani su mikrookoliši u A) adenilat- te B) tioester-formirajućim konformacijama. Za W376 označene su interakcije bočnog ogranka sa susjednim N377, S123, D122. Analiza je provedena koristeći program PyMOL v 0.99.

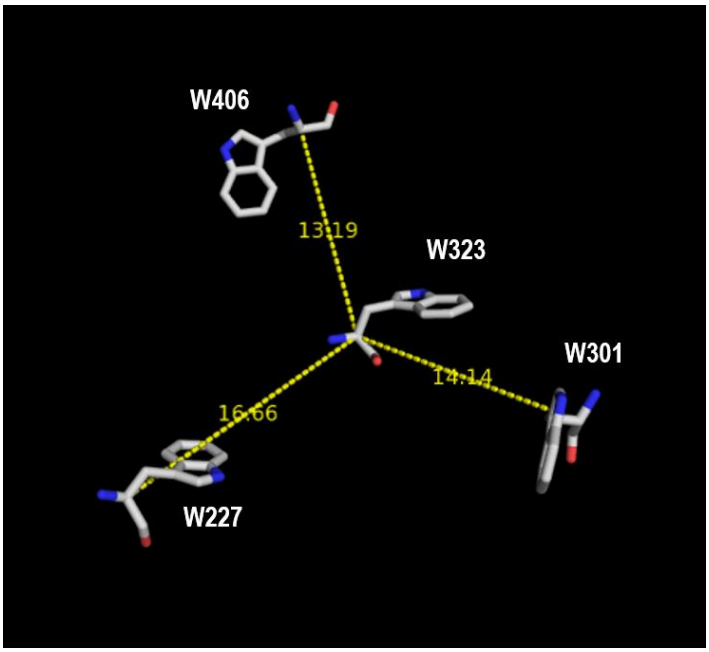


Slika 19. (nastavak s prethodne stranice)

Analiza interakcije indolnih bočnih lanaca s aminokiselinskim ograncima iz neposredne blizine ukazuje da jedino bočni ogranak W376 stvara vodikove veze s D122 , N377 i S123. S obzirom da je bočni ogranak aspartata u obje konformacije u izravnoj vezi s W376, ovaj ostatak će vjerojatno imati najmanji doprinos emisijskom spektru TycA-A.

Kako bi se ispitala mogućnost rezonantnog prijenosa energije među Trp ostacima proteina TycA-A, analizirana je udaljenost njihovih C_α atoma (slika 20). Time je uočeno da su udaljenosti između W406 i W323, W323 i W301 te W227 i W323, približno 16 Å što je gornja granica Förster-ove udaljenosti na kojoj je učinkovitost FRET-a, s jednog na drugi Trp, 50%. Stoga je moguće da se nativna

fluorescencija proteina TycA-A, osim s aminokiselinama iz neposrednog mikrookoliša, gasi i međusobnim djelovanjem susjednih Trp. S obzirom da su analize provedene na modelima TycA-A, kod interpretacije rezultata treba imati na umu da su u proteinu moguća odstupanja od predviđenog.



Slika 20. Udaljenost među C_α atomima pojedinih Trp u modelu proteina TycA-A. Označene brojčane vrijednosti izražene su u Å te su prikazane samo one udaljenosti koje iznose približno 16 Å. Prikaz je konstruiran koristeći program PyMOL v 0.99.

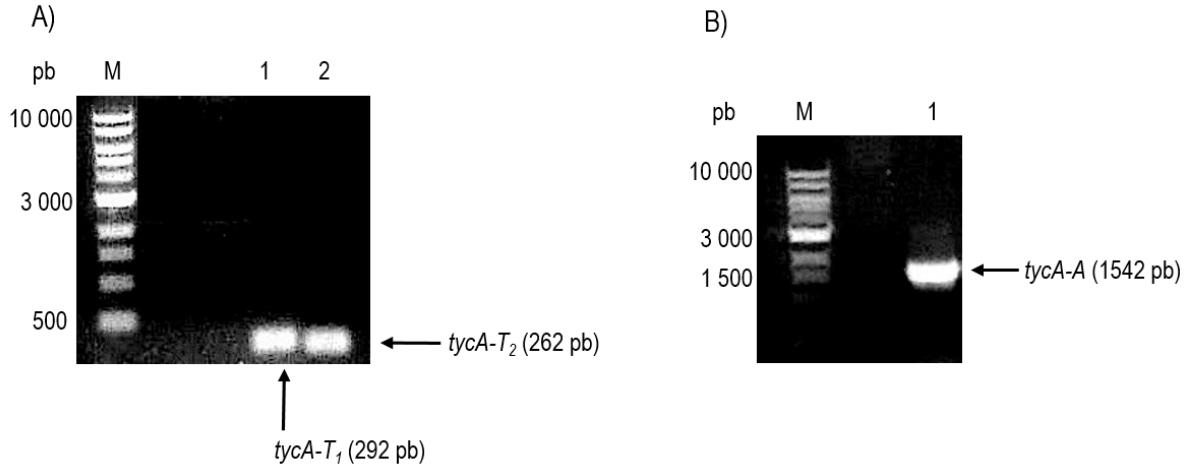
4.2. Heterologna ekspresija proteina TycA-A,TycA-T_1 i TycA-T_2

Za potrebe ovog rada, A i T-domena proteina TycA, eksprimirani su u vidu zasebnih proteina. U tu svrhu korišten je gen za *tycA* iz plazmida pGC12 koji kodira za prvi modul biosintetskog sustava za sintezu tirocidina.

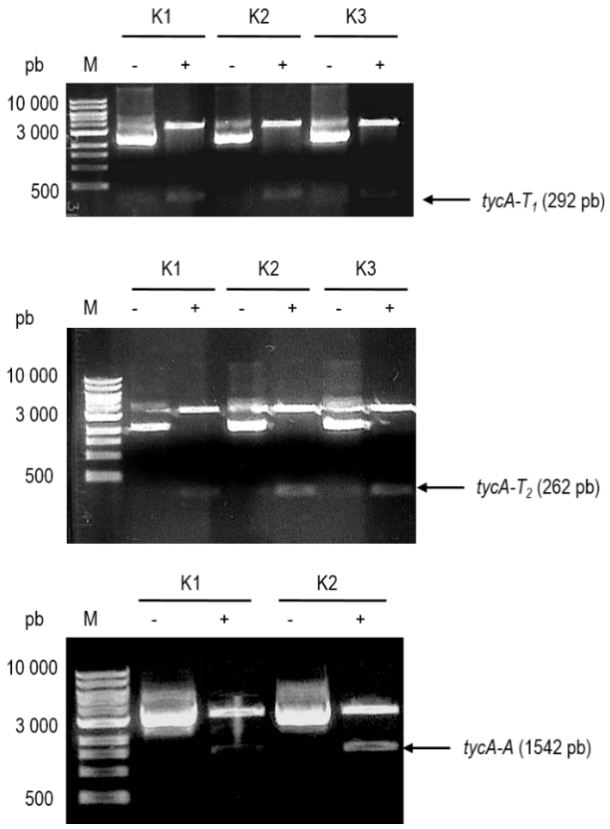
4.2.1. Kloniranje DNA za proteine TycA-A, TycA-T_1 i TycA-T_2 u ekspresijski vektor pQE60

Kodirajuće regije za TycA-A, TycA-T_1 te TycA-T_2 umnožene su PCR-reakcijom iz plazmida pGC12/TycA. Ovaj plazmid sadrži gen *tycA* koji kodira za prvi modul tirocidin-sintetaze, a koji se sastoji iz A-, T- i E-domene. Kodirajuća regija za T-domenu umnožena je u kraćoj (*tycA-T*$_2$) odnosno duljoj (*tycA-T*$_1$) varijanti pri čemu kraćoj varijanti nedostaje sekvenca koja kodira za regiju linkera na N-terminalnom kraju (10 aminokiselina). Uspješnost umnažanja fragmenata reakcijom PCR, potvrđena je elektroforezom na agaroznom gelu (slika 21), nakon čega su dobiveni PCR-produkti ukonirani u *Nco*I i *Bam*HI restrikcijska mjesta ekspresijskog vektora.

Kako bi se potvrdilo prisustvo ukloniranog fragmenta u ekpresijskom vektoru, na nasumično odabranim bakterijskim kolonijama provedena je PCR-reakcija. Ukoliko je analizom na agaroznom gelu potvrđeno umnažanje fragmenta gena određene veličine, uslijedila je dodatna provjera restrikcijskom digestijom (slika 22) i sekvencioniranjem.



Slika 21. Umnožene kodirajuće regije za TycA-A i TycA-T proteine. A) M - marker molekularne mase; 1 - umnoženi fragment za *tycA-T*$_1$; 2 - umnoženi fragment za *tycA-T*$_2$. B) M - marker molekularne mase; 1 - umnoženi fragment za *tycA-A*.



Slika 22. Restrikcijska analiza odabranih transformanata XL1Blue. M - marker molekularne mase; K1 – 3 - plazmidna DNA iz odabranih kolonija; (+) - plazmidna DNA pocijepana restrikcijskim enzimima *Nco*I i *Bam*HI s istaknutim ugrađenim fragmentima, (-) - nepocijepana plazmidna DNA.

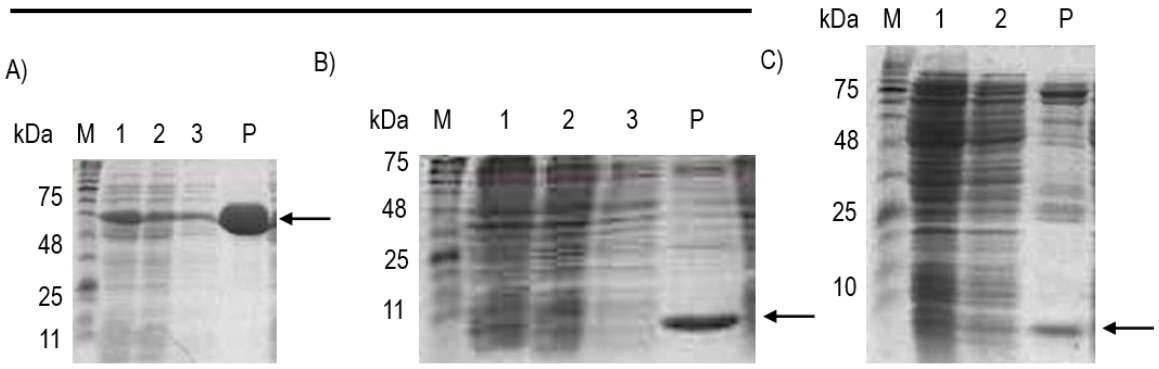
4.2.2. Optimizacija uvjeta prekomjerne ekspresije proteina TycA-A, TycA-T_1 i TycA-T_2

Za prekomjernu ekspresiju proteina TycA-A i proteina TycA-T korištene su bakterijske stanice *E. coli* soja XL1Blue, odnosno BL21(DE3). Ekspresija proteina TycA-T_1 i TycA-T_2 odvija se uz koekpresiju s plazmidom pREP4/Sfp. Osim što kodira represor protein Lac, ovaj plazmid nosi gen za fosfopantetein-transferazu, Sfp, koja posttranslacijski modificira T-domenu (vidi poglavlje 3.1.10.).

Optimizacija ekspresije proteina TycA-A te TycA-T, ispitana je varirajući uvjete uzgoja i indukcije pri čemu je korišten manji volumen bakterijske kulture (50 ml). Pod uvjetima uzgoja varirana je temperatura indukcije (16 – 30 °C) te vrsta hranjivog medija (LB ili 2 x YT), a pod uvjetima indukcije, koncentracija korištenog IPTG-a (0,5 – 1 mmol dm^{-3}). Nakon uzgoja i indukcije pod navedenim uvjetima (tablica 6), proteini su pročišćeni na Ni-NTA Spin kolonicama, a uspješnost prekomjerne ekspresije analizirana je SDS-poliakrilamidnom gel elektroforezom (slika 23). Pri tome je uočeno da je prinos TycA-A i TycA-T_1 zadovoljavajući, dok je prinos proteina TycA-T_2 u odnosu na TycA-T_1 niži, pa se ovaj konstrukt T-domene nije dalje koristio za eksperimentalni rad.

Tablica 6. Uvjeti uzgoja i indukcije za proteine TycA-A i Tyc-T.

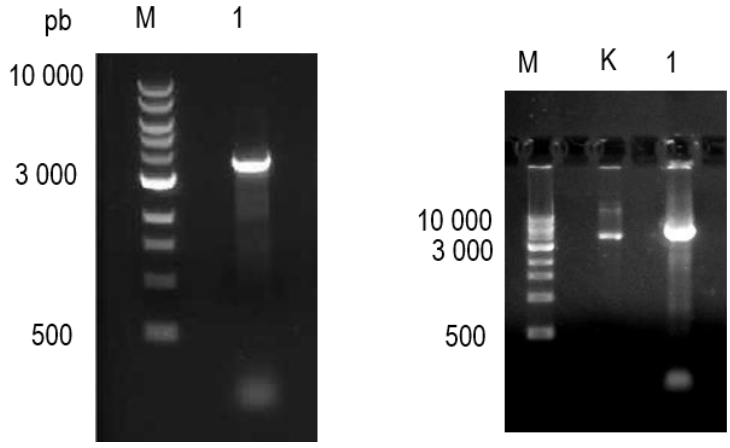
	TycA-A	TycA-T
Hranjivi medij	2 x YT	2 x YT
Temperatura uzgoja prije indukcije/ °C	37	37
Temperatura uzgoja za vrijeme indukcije/ °C	30	30
Gustoća bakterijske kulture pri indukciji	0,8	0,8
[IPTG]/ mmol dm^{-3}	1	1
Duljina ekspresije/ h	≥ 16	≥ 16



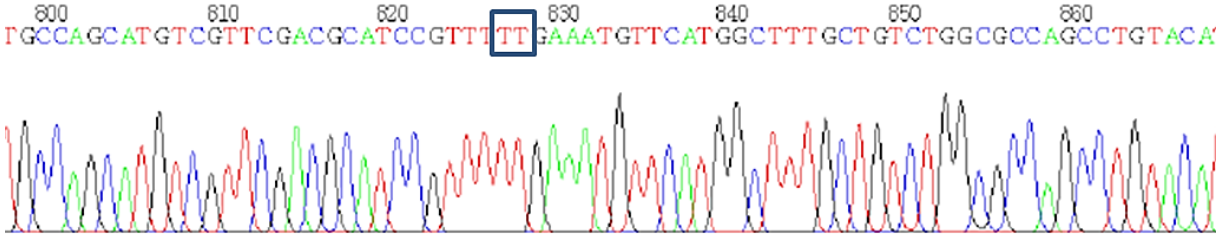
Slika 23. Pročišćavanje na Ni-NTA spin kolonicama za proteine A) TycA-A, B) TycA-T_1 i C) TycA-T_2. M - marker molekularne mase, 1 - bakterijski stanični lizat; 2 - 3 - nespecifično vezani proteini sakupljeni tijekom ispiranja Ni-NTA kolonice; P - pročišćeni proteini TycA-A te TycA-T_1.

4.2.3. Usmjerena mutageneza na TycA-A i TycA-T_1 proteinima

Kako bi se ispitao utjecaj Trp na emisijski spektar proteina TycA-A i TycA-T_1, isti su pojedinačno zamijenjeni fenilalaninom. Reakcija mutageneze provedena je pomoću kita za usmjerenu mutagenezu, *QuikChange Mutagenesis Kit* (*Qiagen*). Nakon restrikcijske digestije *Dpn*I enzimom, reakcija mutageneze provjerena je elektroforezom na agaroznom gelu (slika 24), a potom je izvršena transformacija u XL1Blue stanice. Iz nasumično odabranih transformanata, izolirana je plazmidna DNA, a uspješnost mutageneze provjerena je sekvencioniranjem (slika 25).



Slika 24. Reprezentativni primjeri reakcije usmjerene mutageneze za proteine TycA-A i TycA-T_1, analizirani na 0,7% agaroznom gelu. M - marker molekularne mase, 1 - plazmid pQE60 s odgovarajućim insertom i mutacijom nakon digestije s *Dpn*I, K - kalup pQE60/TycA-A. Mutagene početnice naziru se na dnu gela.

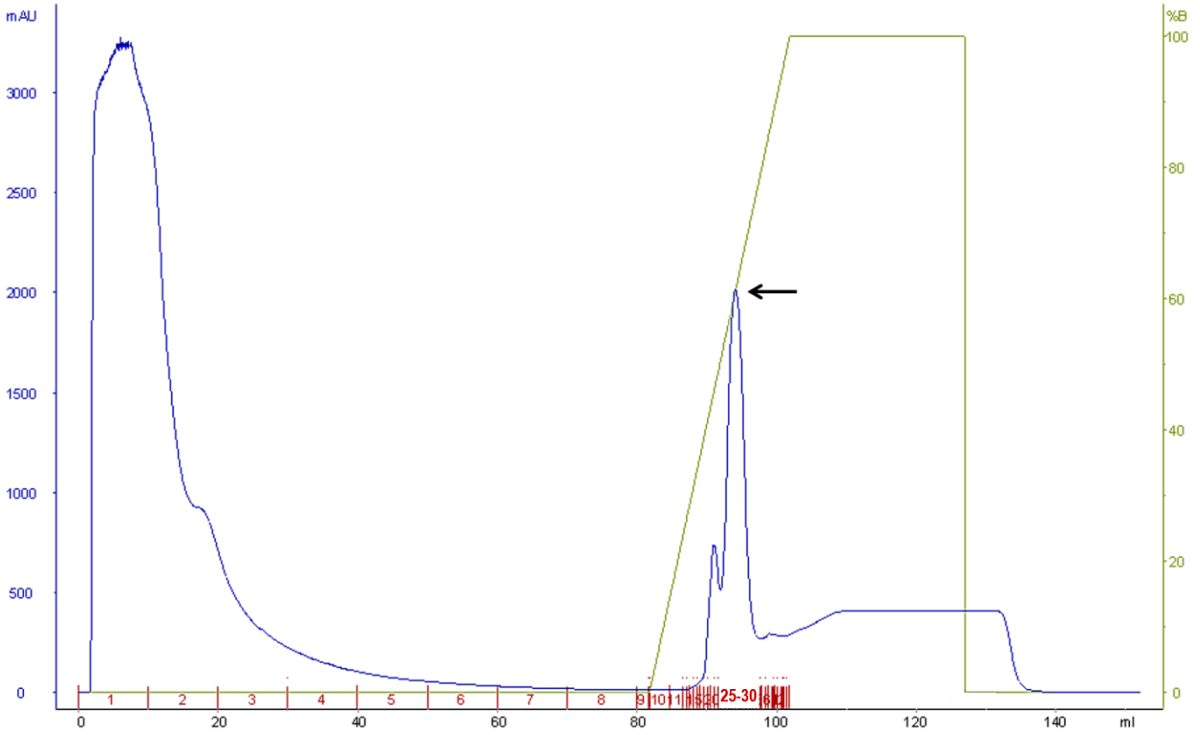


Slika 25. Primjer kromatograma dobivenog sekvencioniranjem plazmidne DNA odabrane kolonije s uvedenom mutacijom za Trp. Zaokruženi su zamijenjeni nukleotidi.

4.2.4. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje proteina TycA-A divljeg tipa i mutanti

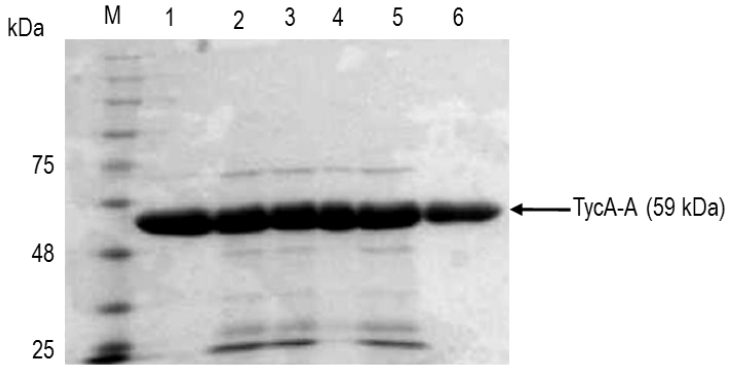
Prekomjerno eksprimirani divlji tip i mutante TycA-A proteina s heksahistidinskim biljegom na C-kraju pročišćeni su metodom afinitetne kromatografije na uređaju za FPLC. Frakcije pročišćenog proteina eluirane su s kolone u gradijentu imidazola (0 - 500 mmol dm^{-3}) nakon čega su analizirane SDS-poliakrilamidnom gel elektroforezom. Frakcije s čistim proteinom su objedinjene i prevedene u

pufer za pohranu. Reprezentativni kromatogram tipičnog tijeka pročišćavanja proteina TycA-A prikazan je na slici 26.



Slika 26. Primjer tipičnog kromatograma uslijed pročišćavanja proteina TycA-A metodom afinitetne kromatografije na uređaju za FPLC. Na lijevoj y-osi označena je apsorbancija uzorka pri 280 nm, a na desnoj udio pufera B korištenog pri kromatografiji. Na x-osi označen je volumen eluensa s prikupljenim brojevima frakcija (crveno). Pik s eluiranim proteinom TycA-A označen je strelicom.

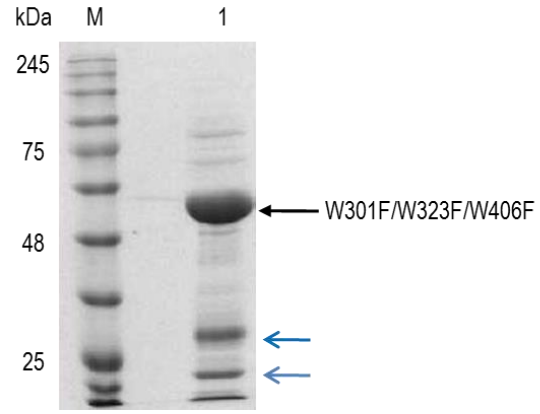
Pročišćeni proteini analizirani su SDS-poliakrilamidnom elektroforezom te je ustanovljeno da su sve varijante proteina TycA-A zadovoljavajuće čistoće, s ukupnim prinosom od ≥ 3 mg iz jedne litre bakterijske kulture (slika 27).



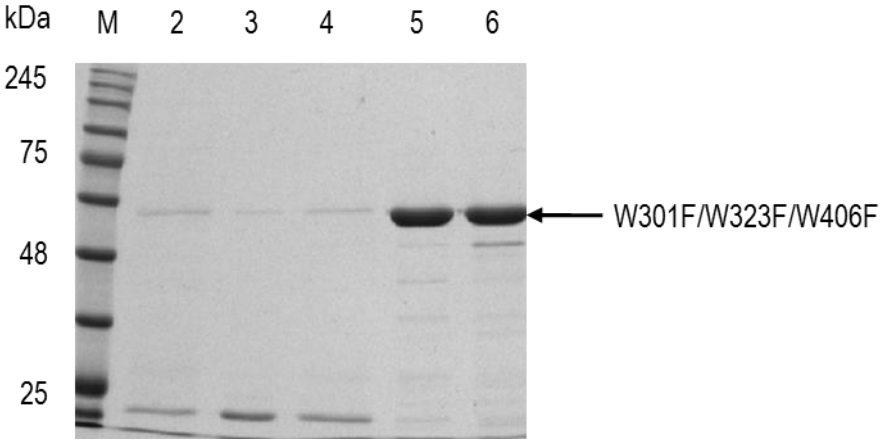
Slika 27. Pročišćeni protein TycA-A. M - marker molekularne mase, 1 - WT, 2 - W227F, 3 - W301F, 4 - W323F, 5 - W376F, 6 - W406F.

Višestruka mutanta W301F/W323F/W406F, pročišćena afinitetnom kromatografijom na HisTrap HP koloni, nije bila zadovoljavajuće čistoće (slika 28). Prisutne proteinske nečistoće mogle bi interferirati

s eksperimentalnim mjerenjima, stoga je proveden dodatan korak pročišćavanja na anionskom izmjenjivaču koristeći UnoQ6 kolonu. Frakcije proteina eluirane su s anionskog izmjenjivača u gradijentu NaCl (0 - 1 mol dm^{-3}). Ovim korakom, nečistoće su gotovo u potpunosti uklonjene (slika 29), a prinos čistog proteina, nakon druge kromatografije, iznosio je > 1,5 mg iz jedne litre bakterijske kulture.



Slika 28. Mutanta W301F/W323F/W406F pročišćena afinitetnom kromatografijom na HisTrap HP koloni. M - marker molekularne mase; 1 - pročišćena mutanta W301F/W323F/W406F s označenim nečistoćama.



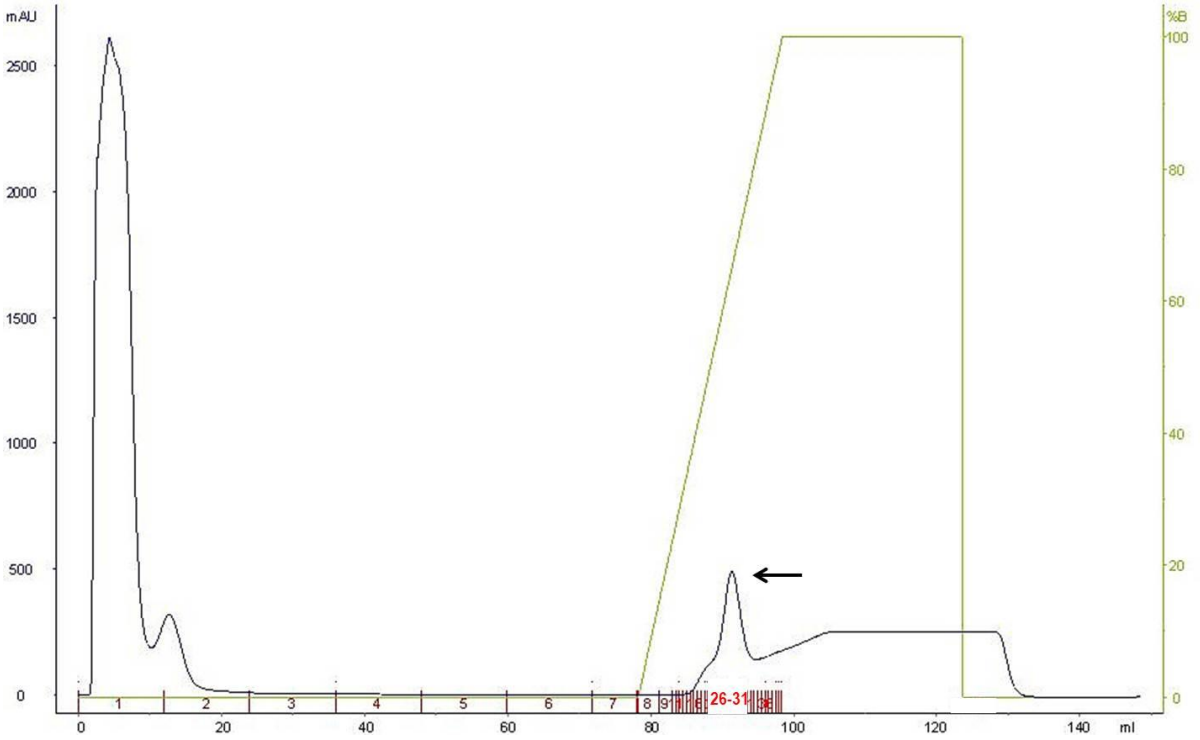
Slika 29. Mutanta W301F/W323F/W406F pročišćena kromatografijom na anionskom izmjenjivaču koristeću UnoQ6 kolonu. M - marker molekularne mase; 2 - 4 frakcije ispranih nečistoća; 5 i 6 - pročišćena mutanta W301F/W323F/W406F.

Mutanta W323F/W406F pročišćena je jednako kao i W301F/W323F/W406F s doprinosom čistog proteina od približno 1 mg dm^{-3} bakterijske kulture.

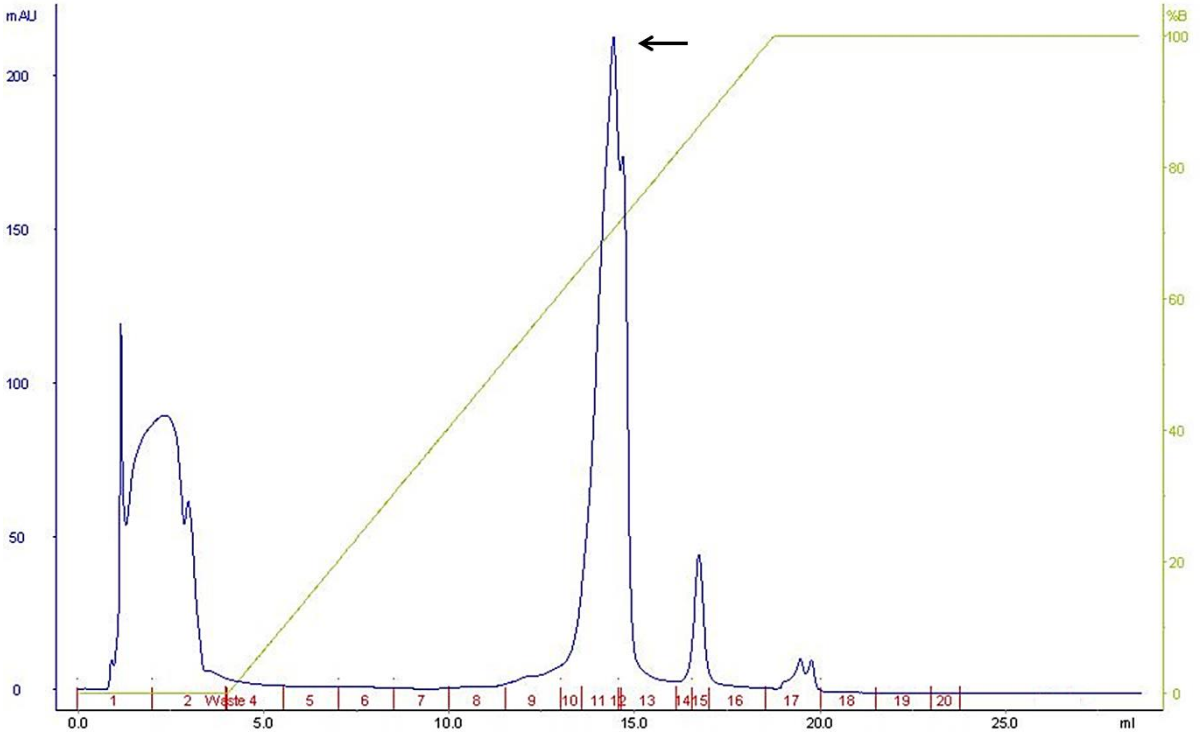
4.2.5. Pročišćavanje TycA-T_1 divljeg tipa i mutante

Protein TycA-T_1 pročišćen je u dva koraka. Tipični kromatogrami tijeka pročišćavanja proteina TycA-T_1 prikazani su na slici 30.

A)

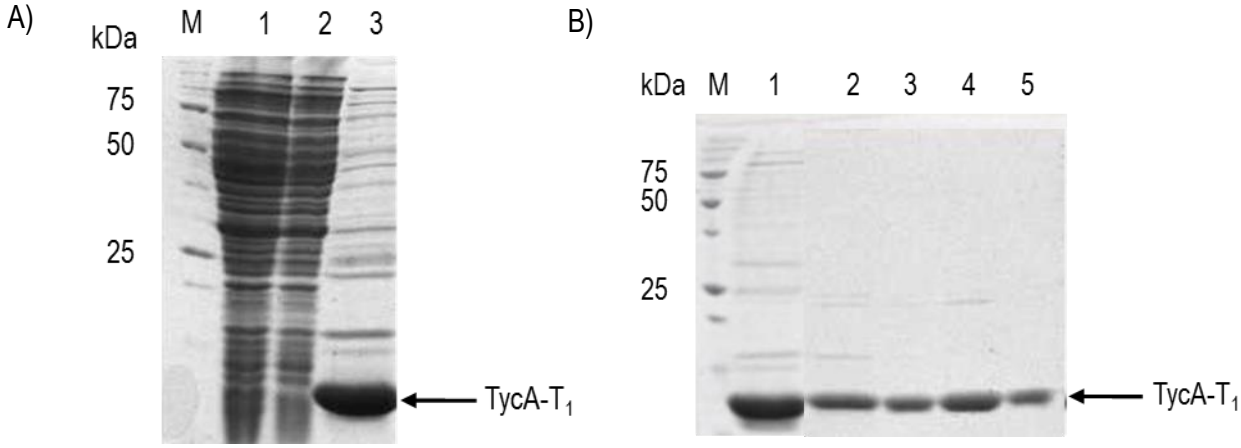


B)



Slika 30. Primjer tipičnog tijeka pročišćavanja za protein TycA-T_1. Prikazani su kromatogrami A) pročišćavanja na HisTrap HP i B) MonoS koloni. Na lijevoj y-osi označena je apsorbancija uzorka pri 280 nm, a na desnoj udio pufera B korištenog pri kromatografiji. Na x-osi označen je volumen eluensa s prikupljenim brojevima frakcija (crveno). Pik s eluiranim proteinom TycA-T_1 označen je strelicom.

S obzirom da su nakon afinitetne kromatografije s pročišćenim proteinom TycA-T_1 uočene nečistoće (slike 31 A i B), dodatno je provedena kromatografija na kationskom izmjenjivaču koristeći kolonu MonoS. Prinos čistog proteina, nakon druge kromatografije iznosio je ≥ 1,3 mg iz jedne litre bakterijske kulture. Uspješnost posttranslacijske modifikacije ispitana je na uređaju za visokotlačnu tekućinsku kromatografiju (HPLC) kako je opisano u doktorskoj disertaciji V. Bučević-Popović [92]. Tako se apo i holo oblik proteina TycA-T_1 razdvajaju pomoću kolone LiChrosphere RC18 (Supelco) u gradijentu acetonitrila s volumnim udjelom TFA 0,1 %. Zbog prisustva fosfopanteteinskog kofaktora na holo T-domeni, retencijska se vremena apo (12 min) i holo (11 min) oblika razlikuju.



Slika 31. Pročišćavanje proteina TycA-T_1. A) Afinitetna kromatografija na koloni HisTrap HP. M - marker molekularne mase, 1 - ukupni stanični proteini, 2 - nespecifično vezani stanični proteini isprani s HisTrap HP kolone, 3 - pročišćen protein TycA-T_1. B) Kromatografija na kationskom izmjenjivaču provedena na koloni MonoS. M - marker molekularne mase. 1 - uzorak prije kromatografije na kationskom izmjenjivaču, 2 - 5 pročišćeni protein TycA-T_1.

Protein TycA-T_1 ima jedan Trp na položaju 9 u primarnoj strukturi. Kako bi se mogao promatrati utjecaj proteina TycA-T_1 na konformaciju proteina TycA-A, bilo je potrebno konstruirati W9F mutantu TycA-T_1. U protivnom, došlo bi do interferencije emisijskih signala dvaju proteina, pa se rezultati ne bi mogli jednoznačno interpretirati. Međutim, mutanta W9F proteina TycA-T_1 nije uspješno eksprimirana, čak ni nakon više pokušaja optimizacije ekpresijskih uvjeta te se nije mogla iskoristiti za planirane pokuse u ovom radu.

4.3. Biokemijska karakterizacija pročišćenih proteina

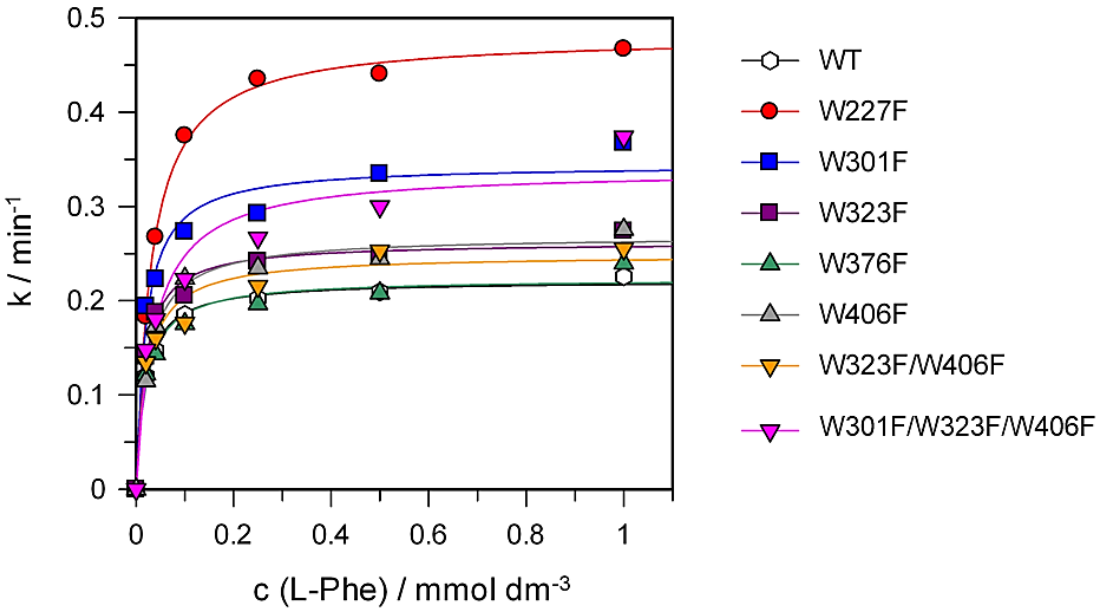
4.3.1. Mjerenje potrošnje ATP-a za protein TycA-A divljeg tipa i mutanti

U prvom koraku enzimske reakcije, protein TycA-A iz odabranog aminokiselinskog supstrata i ATP-a, sintetizira aminoacil-adenilat uz oslobađanje PP_i.

Aktivnost pročišćenih proteina TycA-A određena je spektrofotometrijski mjerenjem brzine oslobađanja PP_i (slika 32). Budući da su svi Trp, osim W227, smješteni izvan aktivnog džepa i van očuvanih regija, nije za očekivati da će njihova zamjena imati značajniji utjecaj na enzimsku aktivnost. Temeljem podataka prikazanih u tablici 7, može se zaključiti su sve mutante proteina u mogućnosti aktivirati prirodni aminokiselinski supstrat.

Približno dvostruka vrijednost za K_M, kod mutanti W227F te W301F/W323F/W406F, upućuju na nešto slabije vezanje pripadajućeg supstrata u aktivno mjesto. Suprotno tome, veće vrijednosti za k_{cat}, kod mutanti W227F te W301F, mogu se objasniti bržim otpuštanjem aminoacil-adenilata iz aktivnog mjesta koji se time oslobađa za novi katalitički ciklus. Do povećanja k_{cat} vrijednosti dolazi zbog veće potrošnje ATP-a koja prati brži gubitak aminokiseline (engl. *leakage*) iz aktivnog centra.

Iako W227 zatvara dno veznog mjesta za L-Phe, zamjena ovog ostatka sličnim hidrofobnim Phe, ne bi trebala narušiti strukturu veznog džepa. Naime, filogenetska analiza adenilacijskih domena koje aktiviraju Phe, Trp ili Tyr, pokazala je kako se u ovom položaju može nalaziti bilo Trp ili Phe [53].



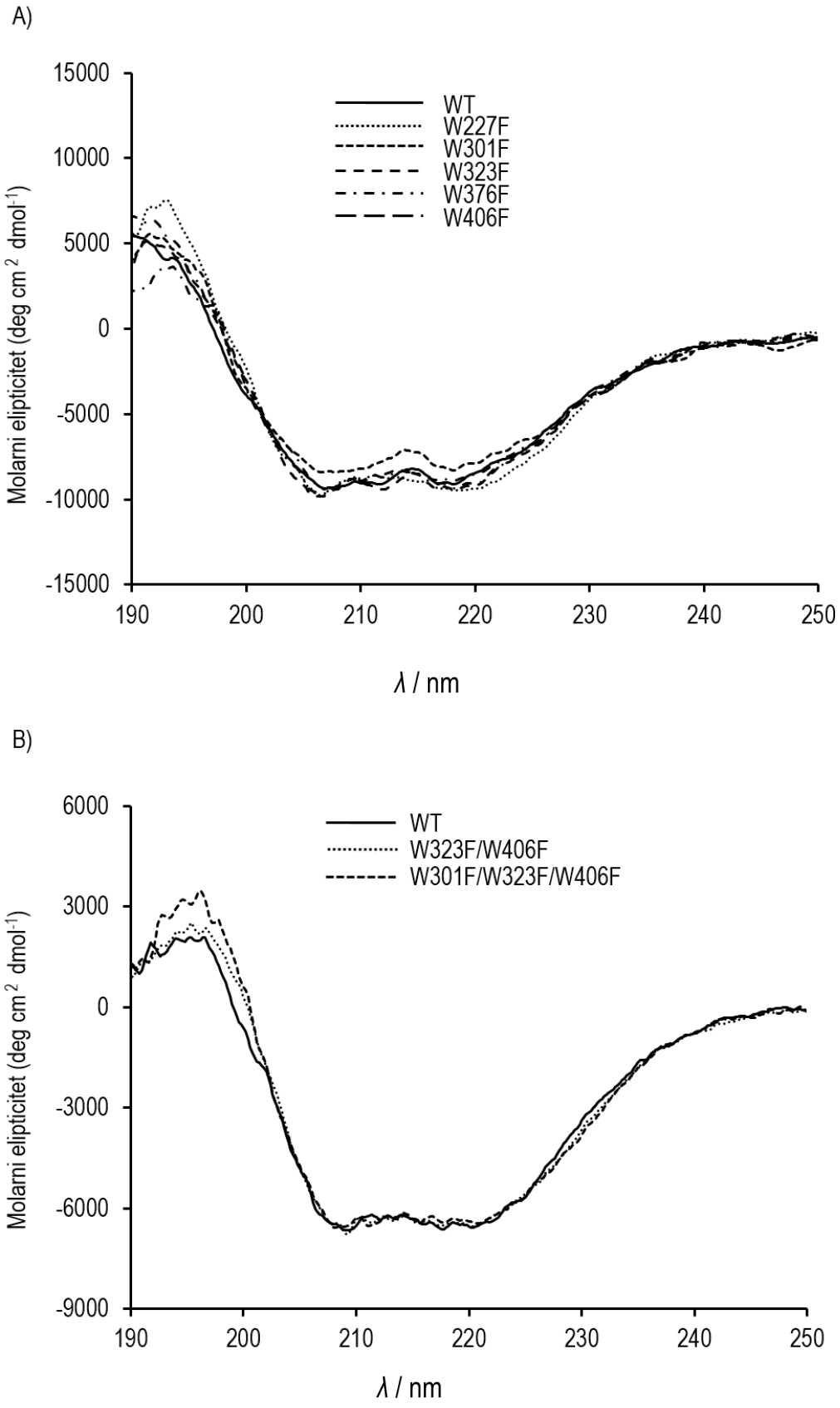
Slika 32. Ovisnost početne brzine enzimski katalizirane reakcije o koncentraciji L-Phe određena za proteine divljeg tipa te mutanti TycA-A. Potrošnja ATP-a mjerena je spektrofotometrijski u puferu sastava Tris (50 mmol dm^{-3}, pH 7.5), $MgCl_2$ (1 mmol dm^{-3}) te ATP (1 mmol dm^{-3}) uz dodatak L-Phe (0 – 1 mmol dm^{-3}). Početne brzine izražene su kroz *k* vrijednost, odnosno kao broj molekula supstrata prevedenih u produkt po molekuli enzima u jedinici vremena (k / min^{-1} = v_0 / c (enzima)).

Tablica 7. Vrijednosti katalitičkih konstanti za protein TycA-A divljeg tipa i mutanti.

Enzim	k_{cat} (min^{-1})	K_M (μmol dm^{-3})	k_{cat} / K_M (mol dm^{-3} $min)^{-1}$
WT	0,25 ± 0,06	18,3 ± 2,6	13661,2 ± 3897,4
W227F	0,48 ± 0,05	34,7 ± 2,0	13832,9 ± 2182,2
W301F	0,44 ± 0,16	18,2 ± 4,4	24175,8 ± 8108,1
W323F	0,29 ± 0,02	18,4 ± 3,6	15760,9 ± 2775,6
W376F	0,25 ± 0,04	17,5 ± 6,8	14285,7 ± 9172,9
W406F	0,27 ± 0,08	21,6 ± 2,1	12500,0 ± 2858,0
W323F/W406F	0,24 ± 0,08	26,0 ± 3,4	9230,8 ± 852,5
W301F/W323F/W406F	0,34 ± 0,05	34,2 ± 2,3	9941,5 ± 1040,8

4.3.2. CD-spektri

Jedno od važnijih fluorescencijskih obilježja Trp je njegova osjetljivost na promjene u neposrednom mikrookolišu. Prilikom zamjene Trp sličnim Phe od velike je važnosti isključiti promjenu sekundarne strukture, koja bi mogla remetiti interpretaciju rezultata. U tu svrhu pročišćeni divlji tip i mutante proteina TycA-A analizirani su cirkularnim dikroizmom. Kao što je prikazano na slici 33., kod mutanti TycA-A nije došlo do većih odstupanja u zakrivljenosti peptidne veze, što znači da su elementi sekundarne strukture ostali očuvani unatoč uvedenim mutacijama.

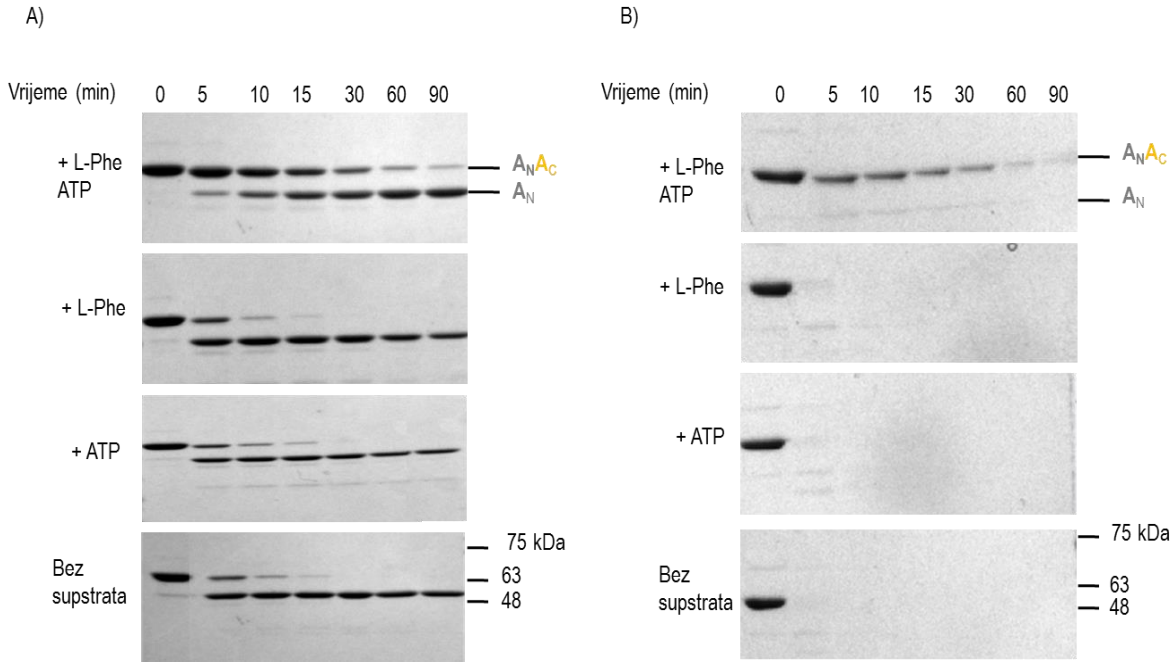


Slika 33. Usporedba CD spektra proteina TycA-A divljeg tipa sa spektrima jednostrukih mutanti (A) i višestrukih mutanti triptofana (B). Svi spektri prosjek su tri uzastopna mjerenja.

4.5.1. Triptička digestija proteina TycA-A divljeg tipa i mutanti

Kako bi se ispitao utjecaj uvedenih mutacija na konformaciju proteina TycA-A, provedeni su eksperimenti u kojima je ispitana podložnost proteolitičkoj digestiji tripsinom u uvjetima bez supstrata, te u prisustvu ATP-a i/ili L-Phe. Raniji eksperimenti triptičke digestije proteina TycA, pokazali su da se glavna mjesta cijepanja nalaze u dijelovima linkera između A-, T- i E-domene, te u linkeru između veće (A_N-) i manje (A_C-) poddomene A-domene [85, 93]. U varijanti samostalno eksprimirane A-domene, TycA-A (A_NA_C), tripsin cijepa na karboskilnom kraju Arg425 iz A8 regije, odgrađujući tako stabilan fragment A_N-poddomene [63].

Otpornost TycA-A na djelovanje tripsina osobito je izražena u prisustvu ATP-a i L-Phe, te je osnovna vrpca TycA-A (A_NA_C) vidljiva na gelu i nakon 90 min inkubacije s tripsinom (slika 34A). Proteoliza TycA-A, provedena bez prisutnih supstrata kao i s pojedinačnim supstratima (L-Phe odnosno ATP), ne ukazuje na veću razliku u obrascu digestije te se može zaključiti da jedino prisustvo oba supstrata ima značajnijeg utjecaja na stabilizaciju strukture.



Slika 34. Djelomična digestija tripsinom divljeg tipa TycA-A (A) i mutante W301F/W323F/W406F (B). Reakcije su provedene bez supstrata ili u prisustvu 1 mmol dm^{-3} L-Phe i/ili ATP, pri omjeru protein:proteaza = 100:1. A_c - C-terminalna poddomena A-domene, A_N - N-terminalna poddomena A-domene.

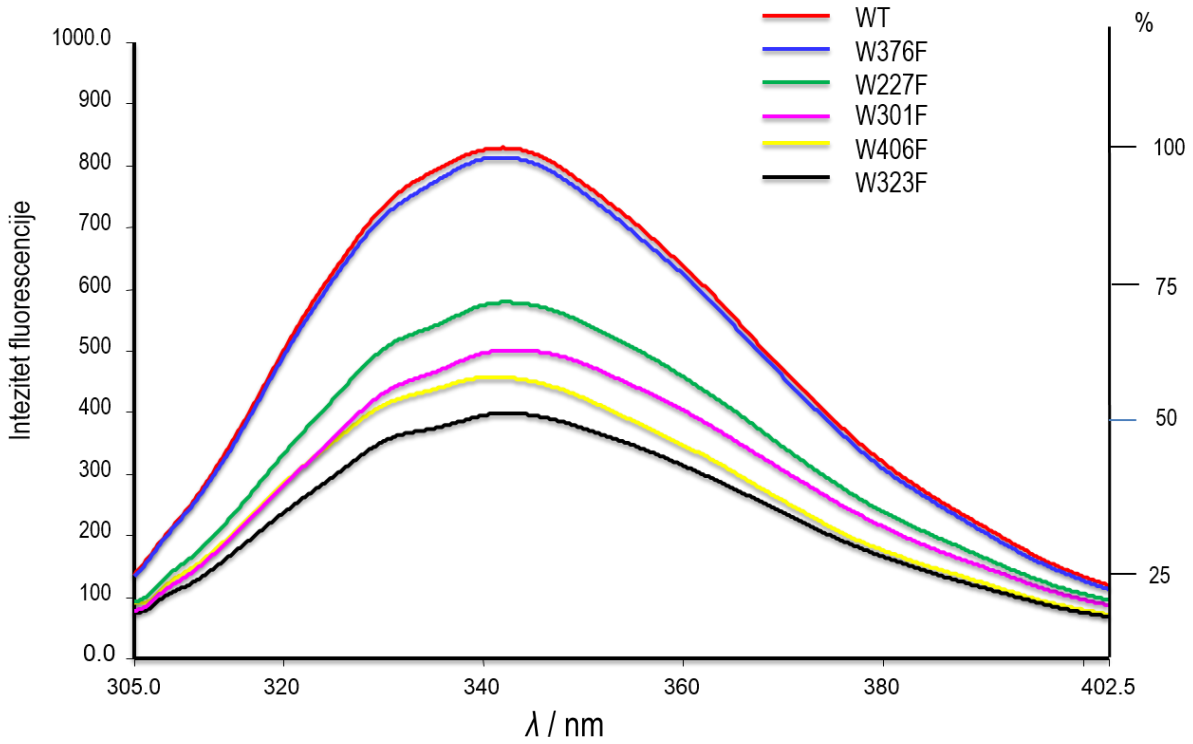
U ovom radu sve mutante proteina TycA-A osim W301F/W323F/W406F, pokazuju isti obrazac razgradnje tripsinom kao i protein divljeg tipa. Međutim, mutanta W301F/W323F/W406F pokazuje izrazitu nestabilnost A_N-terminalne poddomene, koja se na SDS-poliakrilamidnom gelu nazire kao zasebni fragment tek u digestiji koja je provedena s oba supstrata. Nestabilnost A_N-terminalne

poddomene vjerojatno je uzrokovana višestrukim zamjenama Trp koje narušavaju njen integritet te je čine podložnijoj proteolitičkoj degradaciji već u prvim minutama djelovanja tripsina (slika 34B).

4.4. Emisijski spektri

4.4.1. Emisijski spektar proteina TycA-A divljeg tipa i mutanti

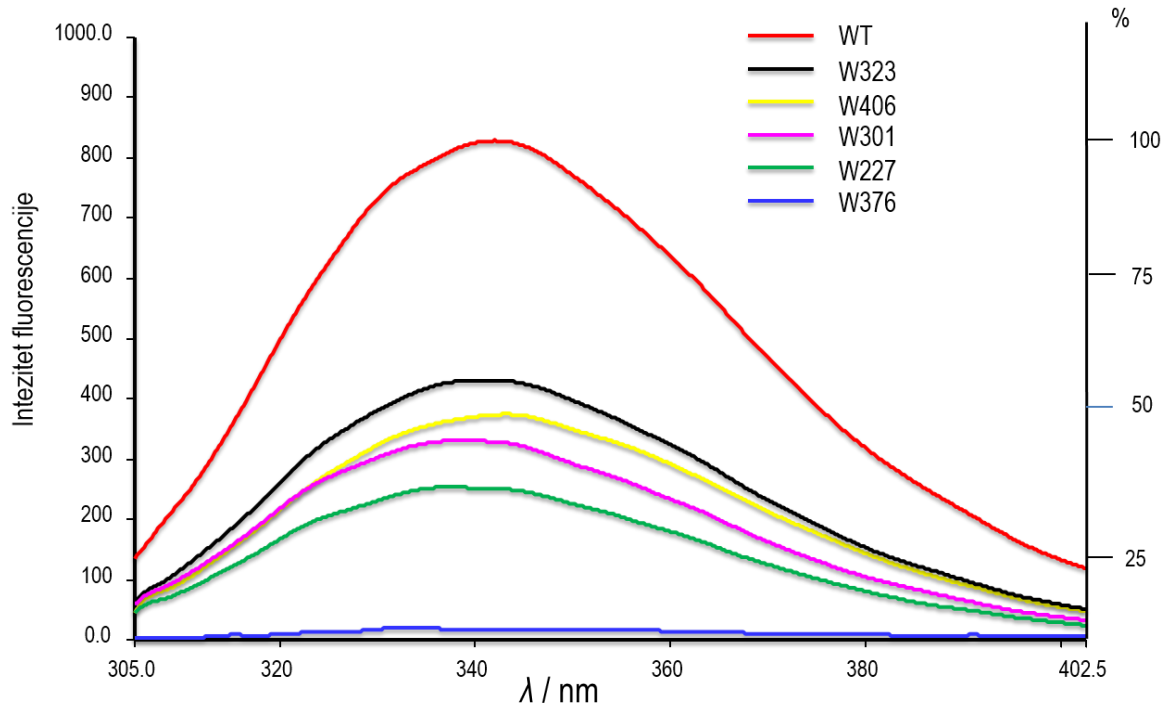
Emisijski spektar divljeg tipa TycA-A pokazuje maksimum intenziteta fluorescencije pri valnoj duljini od 341 nm što može uputiti na zaključak da veći dio opažene fluorescencije potječe od Trp u polarnom okolišu. Budući da TycA-A ima pet Trp, njihovi pojedinačni doprinosi emisijskom spektru proteina divljeg tipa, ispitani su pomoću jednostrukih mutanti (slika 35). Tako je doprinos pojedinog Trp ukupnoj emisiji proteina TycA-A moguće procijeniti umanjivanjem spektra divljeg tipa za emisijski spektar pojedine mutante (engl. *ressolved emission spectra*). Spektri dobiveni tim načinom omogućavaju procjenu doprinosa pojedinih Trp u proteinima s više Trp ostataka (slika 36).



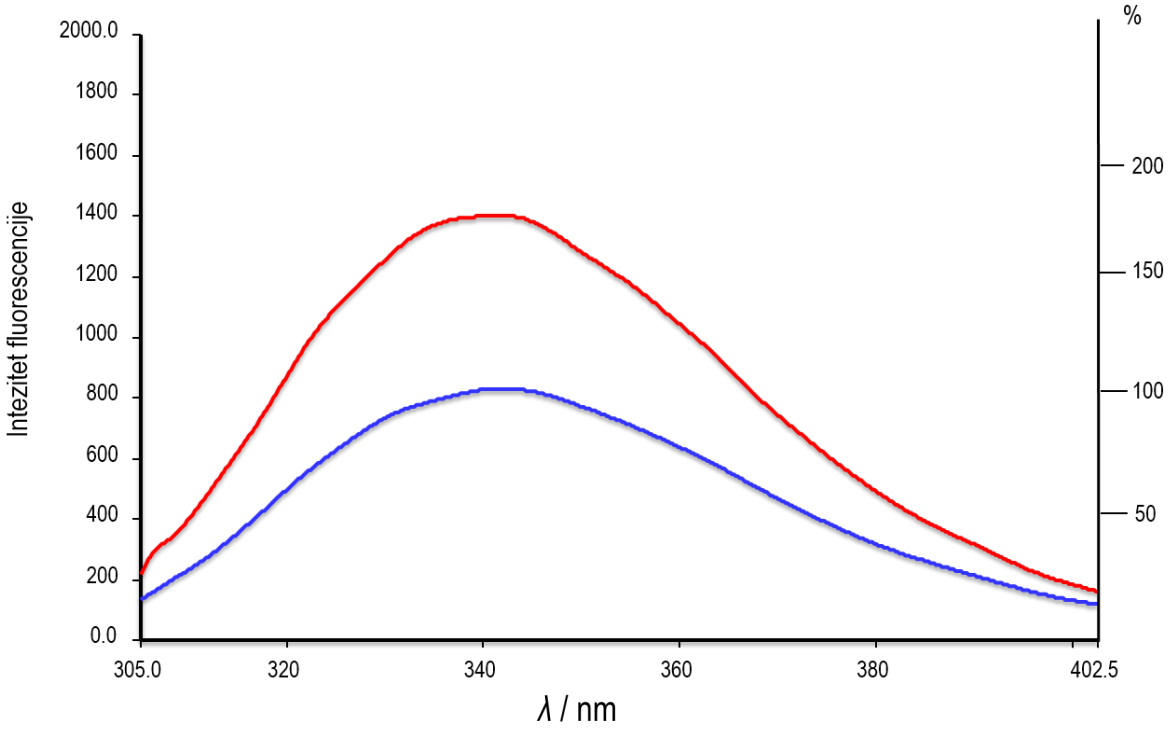
Slika 35. Emisijski spektri proteina TycA-A divljeg tipa i mutanti. Prikazani spektri prosjek su četiri nezavisna eksperimenta.

Svi triptofani proteina TycA-A, osim W376, doprinose njegovoj ukupnoj fluorescenciji pri čemu je doprinos W227 30%, W301 40%, a W323 i W406 doprinose svaki po 50%. W376 ne doprinosi ukupnoj fluorescenciji TycA-A, što je u skladu s rezultatima Vadar analize (slika 19), budući da je indolni bočni ogranak ovog ostatka u interakciji s Asp122 koji gasi fluorescenciju triptofana. Kako se zbrajanjem

pojedinačnih spektara dobije spektar koji premašuje iznos intenziteta fluorescencije divljeg tipa (slika 37), može se zaključiti da je fluorescencija u nativnom proteinu djelomično ugašena.



Slika 36. Emisijski spektri proteina TycA-A divljeg tipa i pojedinačnih Trp. Prikazani spektri nastali su oduzimanjem emisijskog spektra pojedine Trp mutante od spektra divljeg tipa pomoću softverskog alata FL WinLab.

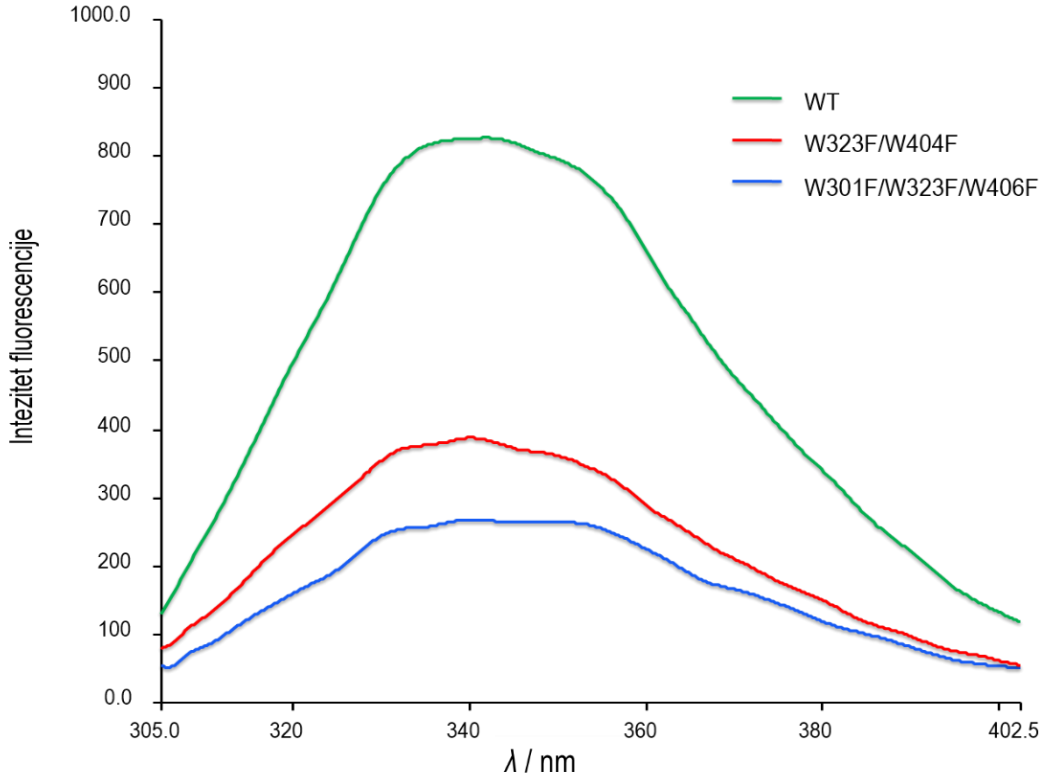


Slika 37. Emisijski spektri divljeg tipa (plavo) i zbroj pojedinačnih doprinosa svih Trp proteina TycA-A (crveno).

4.4.2. FRET u proteinu TycA-A

S obzirom da su snimljeni emisijski spektri proteina TycA-A pokazali kako W227 ima nizak doprinos ukupnoj fluorescenciji (30 %), pretpostavljeno je da se fluorescencija ovog ostatka gasi međudjelovanjem ostalih triptofana. Kako je za W406 i W323 zabilježeni najveći doprinosi ukupnoj fluorescenciji, konstruirane su dvostruka W323F/W406F, odnosno trostruka W301F/W323F/W406F mutanta. Kako je ranije utvrđeno da W376 ne doprinosi fluorescenciji, u dvostrukoj mutanti (W323F/W406F), preostaju fluorescirajući W301 i W227, odnosno kod trostruke mutante (W301F/W323F/W406F), samo W227. Ovim načinom onemogućava se rezonantni prijenos energije s W227 te s W227 i W301 na W323 odnosno W406. Tako se očekuje da će, ukoliko se W227 gasi djelovanjem susjednih triptofana, intenzitet dvostruke i trostruke mutante biti viši od pojedinačnih doprinosa W227 te W227 i W301.

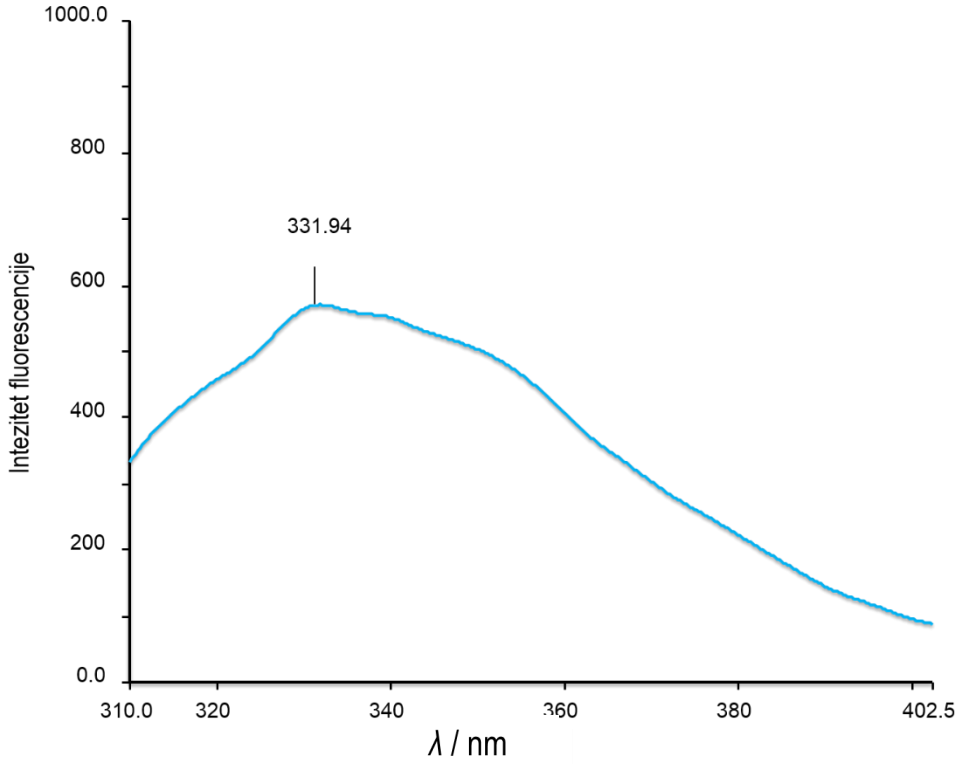
Suprotno očekivanjima emisijski spektri mutanti W301F/W323F/W406F te W323F/W406F ukazuju na doprinose ukupnoj fluorescenciji TycA-A od 30%, odnosno 50% (slika 38).



Slika 38. Emisijski spektri proteina W323F/W406F te W301F/W323F/W406F. Spektri su prosjek tri nezavisna mjerenja. Označene su vrijednosti za λ_{max}.

4.4.3. Emisijski spektar proteina TycA-T_1

Snimanjem emisijskog spektra proteina TycA-T_1, uočeno je da uslijed selektivne pobude Trp na 295 nm, valna duljina maksimuma intenziteta fluorescencije iznosi 332 nm. Opažena vrijednost za λ_{max} potječe od W9, budući da je to jedini Trp u primarnoj strukturi ovog proteina (slika 39). S obzirom na ranije spomenuti raspon vrijednosti valnih duljina koje čine maksimume intenziteta fluorescencije, čini se da se W9 kod TycA-T_1 nalazi u hidrofobnijem okruženju.



Slika 39. Prikaz emisijskog spektra proteina TycA-T_1 s označenom vrijednosti za λ_{max}.

4.5. Utjecaj vezanja supstrata na promjenu konformacije TycA-A

4.5.2. Termalna denaturacija proteina TycA-A divljeg tipa i mutanti

U ovom radu, otpornost proteina TycA-A na termalnu denaturaciju ispitana je metodom diferencijalne fluorimetrije u uvjetima bez supstrata te u prisustvu aminokiseline i/ili ATP-a.

Svi proteini TycA-A, pokazuju isti profil termalne denaturacije kao i enzim divljeg tipa, osim mutante W301F/W323F/W406F, koja pokazuje nešto niže vrijednosti za temperaturu mekšanja (T_m) (tablica 8). Prisustvo oba supstrata (L-Phe i ATP-a) kod svih proteina TycA-A, povisuje vrijednost T_m za ~ 2 ˚C, dok prisustvo pojedinačnih supstrata nema značajnijeg efekta na stabilizaciju strukture.

Kako bi ispitali da li nepripadajući supstrati s ATP-om imaju stabilizirajući efekt na strukturu proteina, odabrani su divlji tip i mutanta W301F/W323F/W406F kao primjeri stabilnog i manje stabilnog proteina TycA-A. Eksperimenti termalne denaturacije provedeni s nepripadajućim supstratima i ATP-om, ne pokazuju značajniji efekt nepripadajućih supstrata na vrijednosti *T*m (tablica 9).

Tablica 8. Temperatura mekšanja (T_m) mutanti TycA-A. Reakcije su provedene bez supstrata, u prisustvu 1 mmol dm^{-3} L-PHE i/ili 1 mmol dm^{-3} ATP-a. Rezultati su prosjek tri nezavisna eksperimenta s navedenim vrijednostima standardne devijacije.

	T_m / °C							
	WT	W227F	W301F	W323F	W376F	W406F	W301F/W323F/W406F
-	49,62 ± 0,50	48,92 ± 0,18	47,40 ± 0,35	46,37 ± 0,30	48,42 ± 0,36	49,05 ± 0,36	46,10 ± 1,03
ATP	49,40 ± 0,56	48,69 ± 0,71	47,15 ± 0,50	46,65 ± 0,64	47,85 ± 0,39	48,75 ± 0,23	45,99 ± 0,94
L-Phe	49,88 ± 0,95	48,74 ±0,52	47,64 ± 0,30	46,78 ± 0,49	48,34 ± 0,63	49,27 ± 0,32	46,15 ± 0,64
ATP/L-Phe	51,58 ± 0,97*	50,04 ±0,38*	50,55 ± 0,64*	48,5 ± 0,31*	51,10 ± 0,53*	51,93 ± 0,26*	47,94 ± 0,77*

* T_m vrijednosti koje se značajno razlikuju ($p^* < 0,05$) od T_m vrijednosti opažene za isti protein u uvjetima bez supstrata

Temeljem provedenih eksperimenata može se zaključiti da jedino nastanak L-Phe-AMP-a ima efekt na stabilizaciju strukture. Vezanje pipadajućih supstrata u aktivno mjesto inducira promjenu konformacije pri čemu protein postaje otporniji na denaturirajuće djelovanje temperature.

Tablica 9. Temperatura mekšanja (T_m) proteina TycA-A divljeg tipa i W301F/W323F/W406F mutante bez supstrata te u prisustvu 1 mmol dm^{-3} aminokiseline i/ili 1 mmol dm^{-3} ATP-a. Rezultati predstavljaju prosjek tri nezavisna eksperimenta s navedenim vrijednostima standardne devijacije.

		T_m (° C)	
ATP	Aminokiselina	WT	W301F/W323F/W406F
-	-	49,62 ± 0,50	46,10 ± 1,03
+	-	49,37 ± 0,56	45,99 ± 0,94
+	L-Phe	51,58 ±0,97*	47,94 ± 0,77*
+	D-Phe	49,84 ± 0,84	46,42 ± 0,33
+	L-PheSer	49,40 ± 0,47	46,64 ± 0,45
+	L-Met	49,71 ± 0,96	46,70 ± 0,47

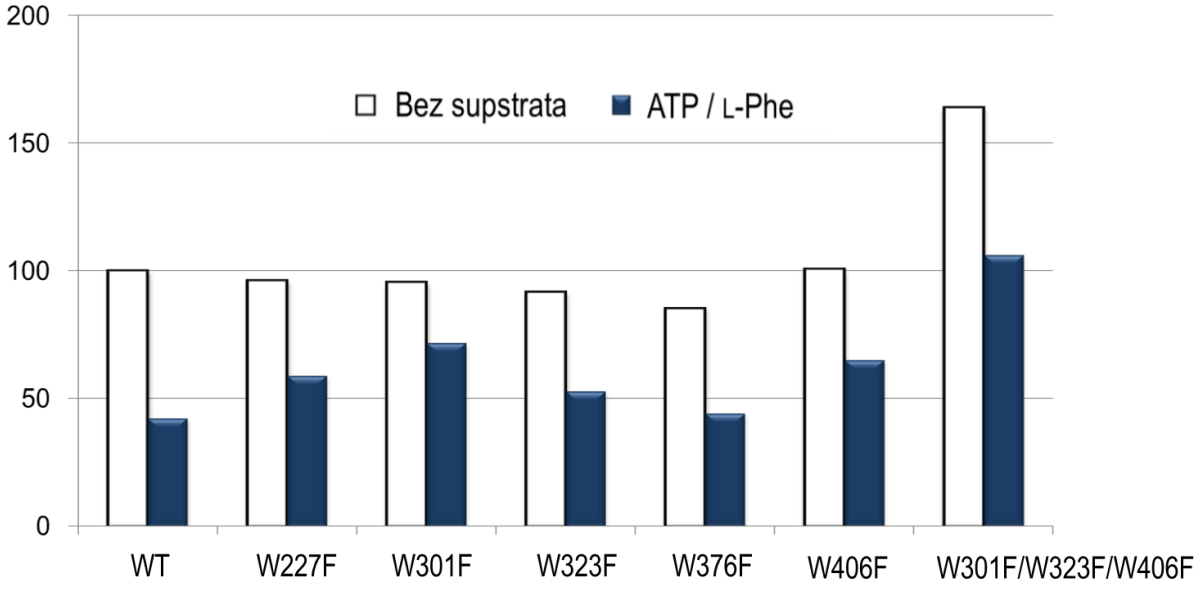
* T_m vrijednosti koje se značajno razlikuju ($p^* < 0,05$) od T_m vrijednosti opažene za isti protein u uvjetima bez supstrata

4.5.3. Ekstrinzična fluorescencija s 1-anilinonaftalen-8-sulfonskom kiselinom (ANS)

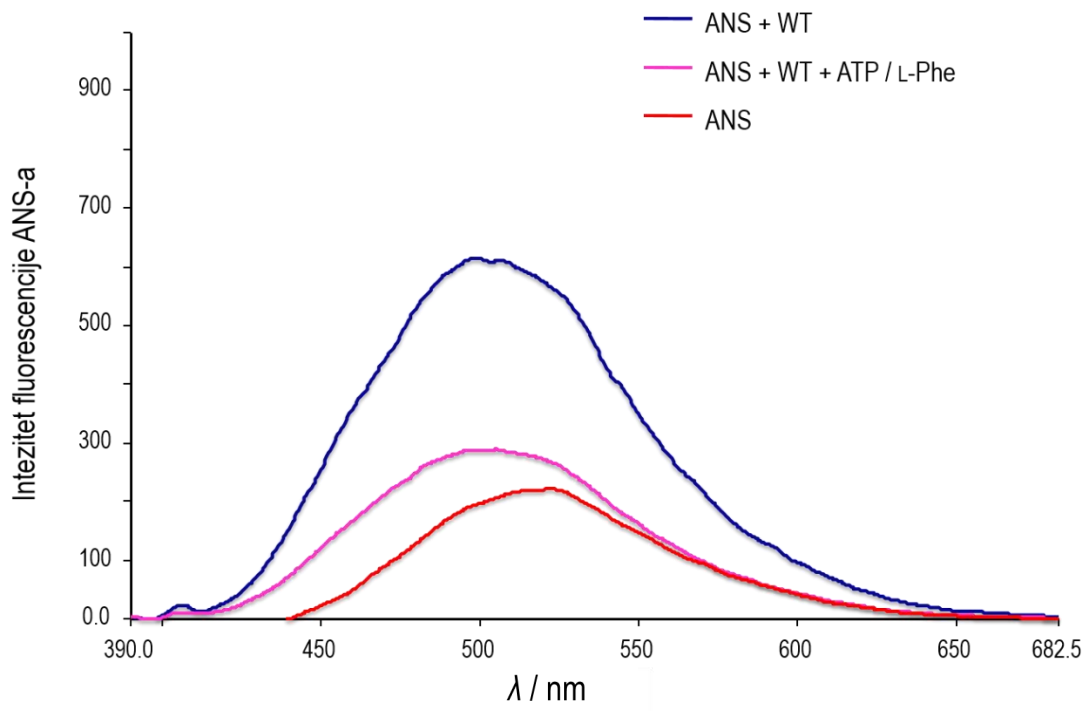
U ovom radu, ekstrinzična fluorescencija proteina TycA-A ispitana je pomoću fluorescentne probe ANS u uvjetima bez supstrata kao i u prisustvu L-Phe i ATP-a. ANS u vodenoj otopini slabo fluorescira, međutim uslijed vezanja za hidrofobne površine na proteinu, intenzitet fluorescencije ANS-a raste te se maksimum emisije primiče nižim vrijednostima λ_{max}. Tako se primjerice ovim načinom može dobiti informacija o konformacijskim promjenama proteina koje nastaju kao posljedica vezanja supstrata.

Usporedba fluorescencije ANS-a u prisustvu proteina divljeg tipa i mutanti u reakcijskoj smjesi bez supstrata, pokazuje neznatna međusobna odstupanja pa je za zaključiti da se izloženost hidrofobnih površina ne mijenja unosom pojedinačne mutacije (slika 40). Suprotno tome, u prisustvu mutante W301F/W323F/W406F zabilježen je najviši intenzitet fluorescencije ANS-a što znači da ova mutanta proteina TycA-A ima najviše izloženih hidrofobnih površina.

U prisustvu supstrata, intenzitet fluorescencije ANS-a smanjuje se za divlji tip enzima (slika 41) kao i za sve ispitane mutante. Ovo upućuje na zaključak da vezanje supstrata inducira konformacijsku promjenu proteina kojom se izlaže manje hidrofobnih površina okolnom otapalu.



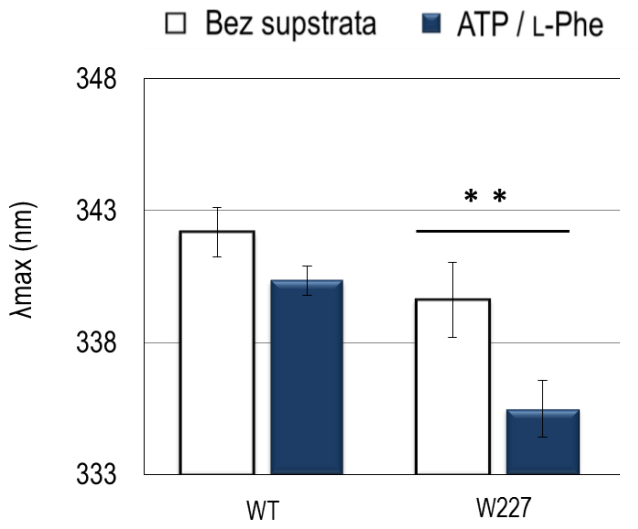
Slika 40. Prikaz relativne fluorescencije ANS-a u prisustvu proteina TycA-A divljeg tipa i mutanti. Mjerenja su provedena u uvjetima bez supstrata te sa 1 mmol dm^{-3} L-Phe i 1 mmol dm^{-3} ATP pri čemu je korišten molarni omjer protein:ANS = 1:25.



Slika 41. Emisijski spektri ANS-a u prisustvu proteina divljeg tipa. ANS u reakcijskom puferu (crveno), ANS u prisustvu proteina divljeg tipa (plavo) te ANS i protein divljeg tipa u reakcijskoj smjesi sa supstratima (ružičasto).

4.5.4. Analiza valne duljine maksimuma intenziteta fluorescencije kod proteina TycA-A u prisustvu supstrata

Valna duljina maksimuma intenziteta fluorescencije može dati informaciju o stupnju izloženosti pojedinog Trp. Kako bi se u ovom radu ispitao utjecaj vezanja supstrata na vrijednosti λ_{max}, emisijski spektri proteina TycA-A divljeg tipa i mutanti, snimljeni su bez supstrata te s L-Phe i ATP-om. Vrijednosti λ_{max} u ovako snimljenim spektrima ne razlikuju se značajno. Međutim, kada se spektri pojedinačnih mutanti oduzmu od spektra proteina divljeg tipa, vrijednosti za λ_{max} se snizuju za sve pojedinačne Trp. To znači da se vezanjem supstrata mijenja konformacija proteina tijekom koje mikrookoliš pojedinačnih Trp postaje hidrofobniji. Najveći utjecaj vezanja supstrata na vrijednosti λ_{max} opažene su za W227, gdje je zabilježen pomak prema nižim valnim duljinama od 4 - 6 nm (slika 42). Ovo upućuje na zaključak da se vezanjem supstrata neposredni mikrookoliš W227 mijenja te da je ta vrijednost statistički značajna.



Slika 42. Vrijednosti λ_{max} za emisijske spektre proteina divljeg tipa te W227 snimani u prisustvu 1 mmol dm^{-3} L-Phe i ATP-a. Istaknuta je standardna devijacija, pri čemu je pomak kod W227 ** $p < 0,01$.

4.6. Gašenje fluorescencije proteina TycA-A divljeg tipa i mutanti

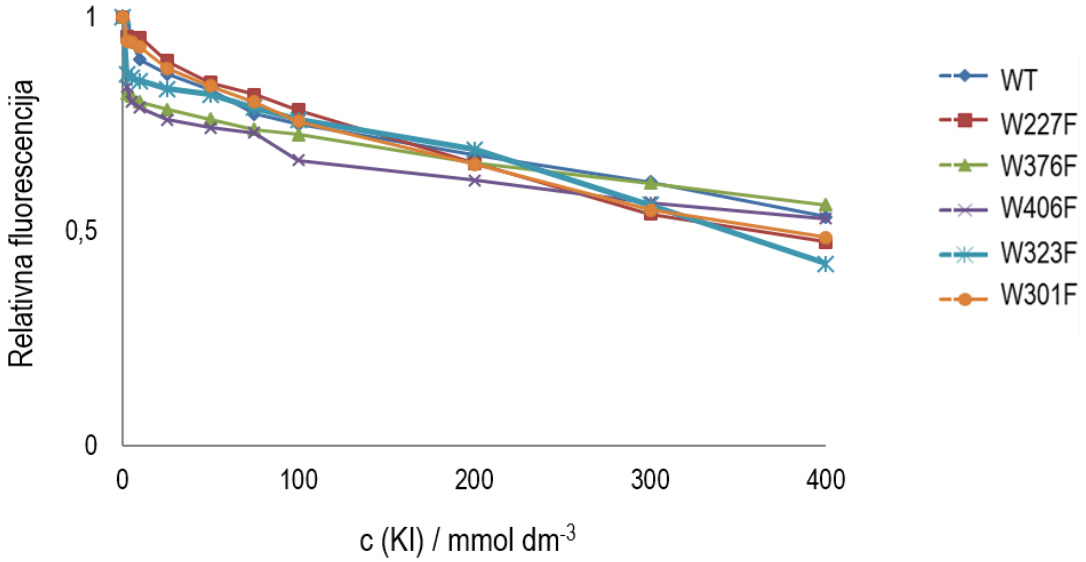
4.6.1. Analiza dosega gašenja fluorescencije korištenjem akrilamida i kalijevim jodidom

Kako bi se ispitala učinkovitost pojedinih molekula gasitelja, gašenje intrinzične fluorescencije proteina TycA-A, ispitano je u pokusima s akrilamidom i kalijevim jodidom (KI).

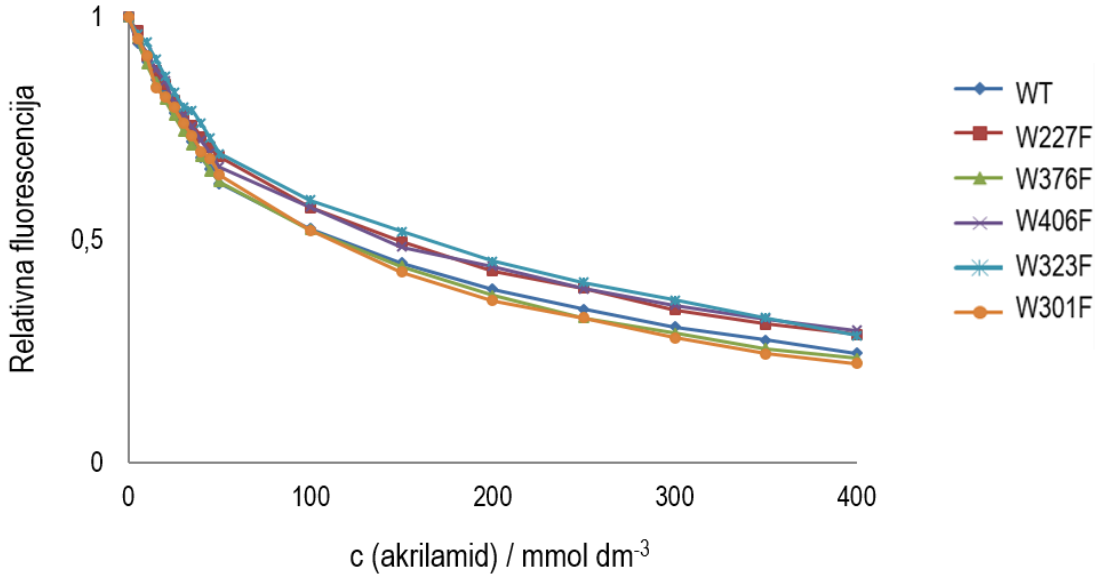
Gašenje nativne fluorescencije akrilamidom u usporedbi s KI, ukazuje na sveukupno veći efekt gašenja (slika 43). Tako se primjerice kod najviše koncentracije KI ukupna fluorescencija kod svih

proteina TycA-A smanji za polovicu početne vrijednosti, dok je za istu koncentraciju kod akrilamida zabilježen pad od približno 75%.

A)



B)



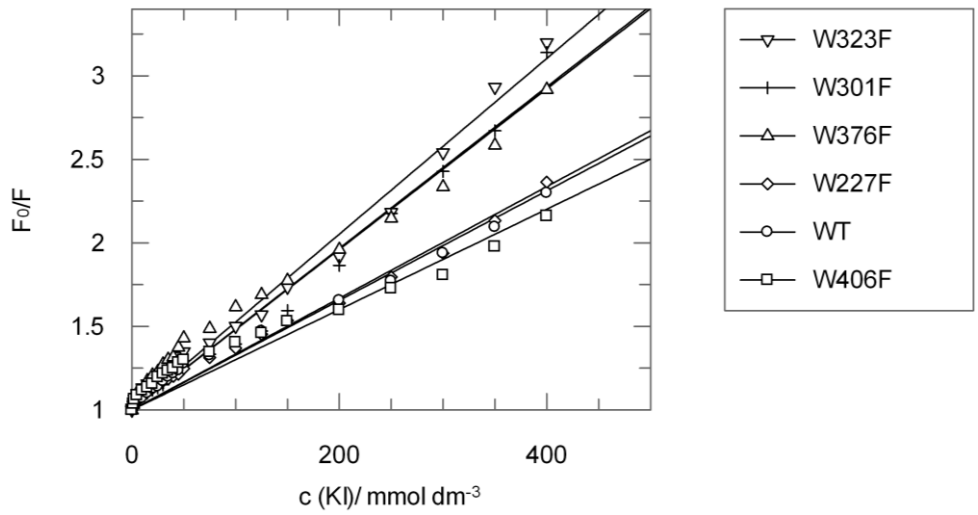
Slika 43. Usporedba učinkovitosti gašenja nativne fluorescencije proteina TycA-A A) KI i B) akrilamidom. Korišten je raspon koncentracije molekule gasitelja 0 - 400 mmol dm^{-3}. Sva mjerenja s KI provedena su uz dodatak KCl.

4.6.2. Gašenje fluorescencije kalijevim jodidom

Kalijev jodid je ionski gasitelj koji s obzirom na negativni naboj i na hidratacijski plašt ima ograničeni doseg gašenja fluorescencije. Zbog teškog prodiranja u hidrofobni matriks proteina, kalijev jodid primarno gasi fluorescenciju triptofana koji se nalaze na površini pa se ovim načinom može dobiti informacija o njihovoj dostupnosti okolnom otapalu.

U radu su eksperimenti gašenja intrinzične fluorescencije kalijev jodid provedeni uz dodatak prikladnog alikvota KCl kako bi se ionska jakost u reakcijskoj smjesi držala konstantnom. Svi proteini TycA-A pokazuju odstupanje od linearnog Stern-Volmerovog grafičkog prikaza (slika 44 A), te su eksperimentalni podaci obrađeni korištenjem modificirane Stern-Volmerove jednadžbe (vidi poglavlje 3.5.3) (slika 44 B).

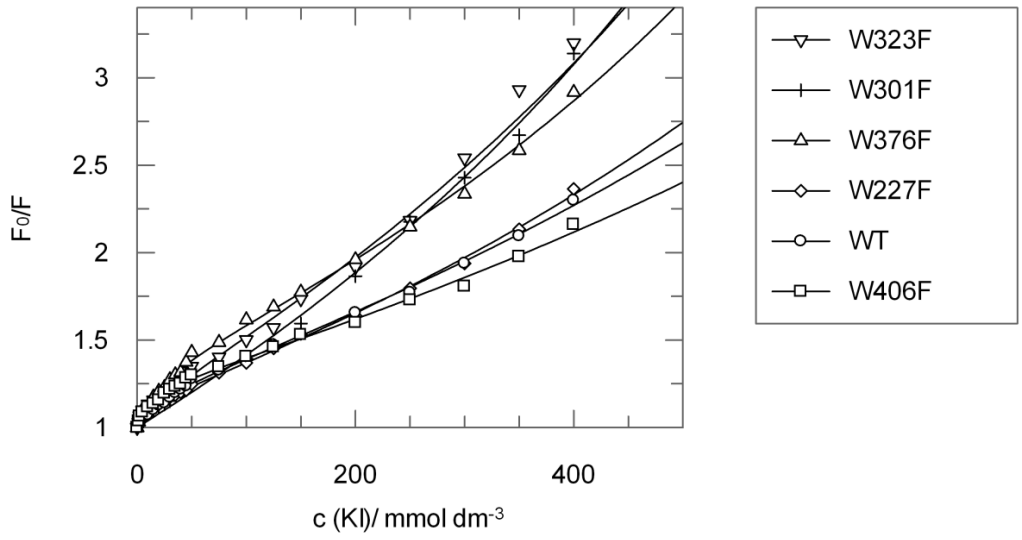
A)



Protein TycA-A	K_{sv} / µmol dm^{-3}
WT	3,3
W227F	3,3
W301F	4,8
W323F	5,3
W376F	4,8
W406F	3,0

Slika 44. Gašenje intrinzične fluorescencije proteina TycA-A divljeg tipa i mutanti s KI. Prikazani su Stern-Volmerovi grafički prikazi gdje su podaci utočnjavani linearno (A), te nelinearno (B).

B)



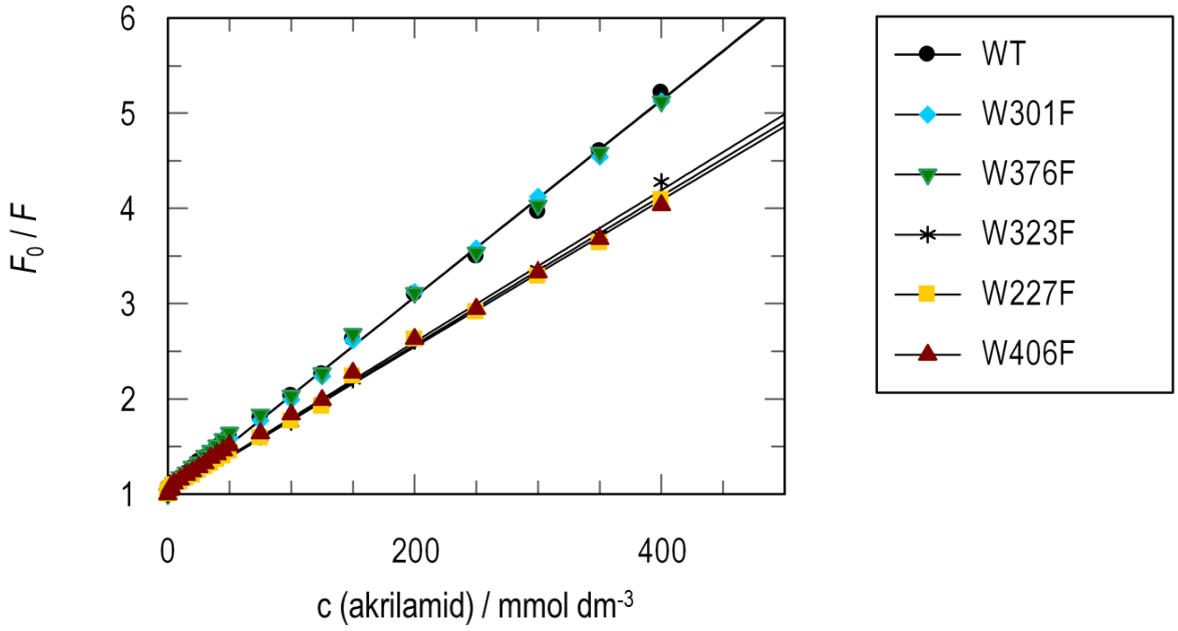
Protein TycA-A	K_1 / μmol dm^{-3}	K_2 / μmol dm^{-3}	f_1	f_2
WT	1,4	53,0	1,1	0,18
W227F	1,5	129,2	1,19	0,12
W301F	3,6	1,6	0,96	0,28
W323F	2,4	43,9	1,06	0,17
W376F	1,4	62,0	1,07	0,27
W406F	1,1	108,3	1,1	0,19

Slika 44. (nastavak s prethodne stranice)

S obzirom na niži doseg gašenja i kompleksnost obrade eksperimentalnih podataka dobivenih korištenjem KI, daljnji eksperimenti gašenja fluorescencije proteina u ovom radu provedeni su koristeći akrilamid.

4.6.3. Gašenje fluorescencije proteina akrilamidom bez prisutnih supstrata

Gašenje fluorescencije je proces opadanja intenziteta fluorescencije koji nastaje kao posljedica sudaranja molekula gasitelja (eng. *quencher*) s molekulom fluorofora. Ovom metodom može se ispitati izloženost pojedinih Trp pod različitim eksperimentalnim uvjetima. Eksperimenti gašenja fluorescencije provedeni su na proteinima divljeg tipa TycA-A i mutanti bez supstrata kao i s prisutnim L-Phe i ATP-om. Rezultati gašenja fluorescencije u odsustvu supstrata, pokazuju da se proteini TycA-A svrstavaju u dvije skupine koje se međusobno razlikuju po dostupnosti gasitelju što upućuje na dvije vrste Trp ostataka (slika 45).



Protein TycA-A	K_{sv} / µmol dm^{-3}
WT	10,3 ± 0,09
W227F	7,7 ± 0,07
W301F	10,3 ± 0,08
W323F	8,0 ± 0,08
W376F	10,4 ± 0,01
W406F	7,8 ± 0,01

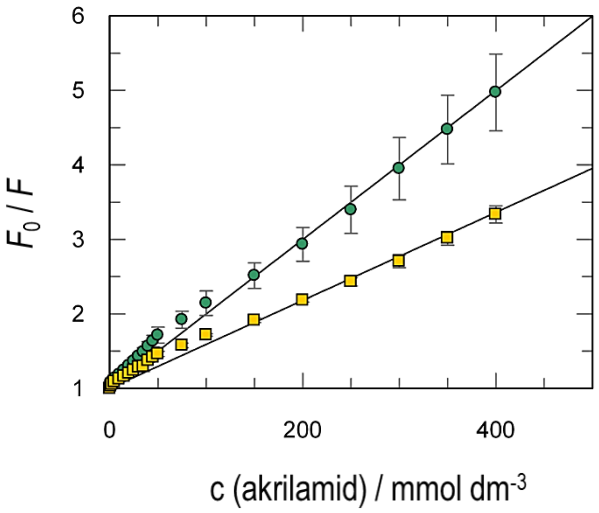
Slika 45. Stern-Volmerov grafički prikaz gašenja fluorescencije kod divljeg tipa TycA-A i mutanti. Opažena fluorescencija korigirana je za faktor unutarnjeg filtera akrilamida. Korišten je raspon koncentracija akrilamida od 0-400 mmol dm^{-3}. Pripadajuće Stern-Volmerove konstante (K_{sv}) za proteine TycA-A prikazane su u tablici.

Skupini koja pokazuje veći doseg gašenja fluorescencije akrilamidom pripadaju divlji tip proteina te W301F i W376F. Proteini W227F, W323F te W406F čine drugu skupinu kod koje je zabilježen manji obim gašenja ukupne fluorescencije. Ovi rezultati upućuju na zaključak kako su kod proteina TycA-A indolni bočni ogranci triptofana W227, W323 te W406 podjednako izloženi okolnom otapalu, te da se stupanj izloženosti W301 i W376 od njih razlikuje.

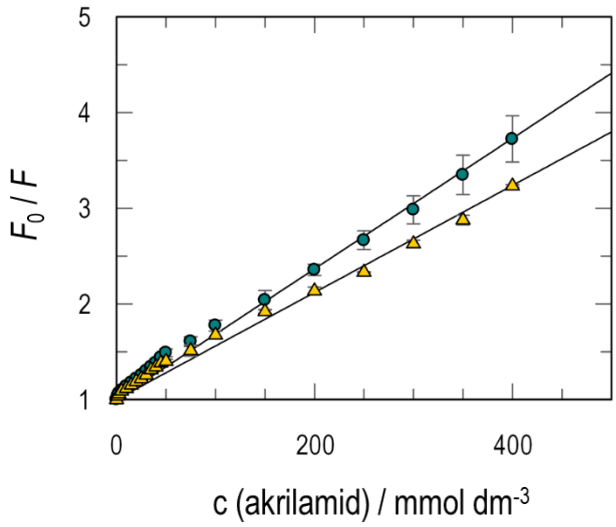
4.6.4. Utjecaj supstrata na gašenje fluorescencije akrilamidom

Tijekom izrade ovog rada, posebna pažnja usmjerena je na izučavanje konformacijskih promjena proteina TycA-A koje nastaju kao rezultat vezanja supstrata. Svi ispitani proteini pokazuju da

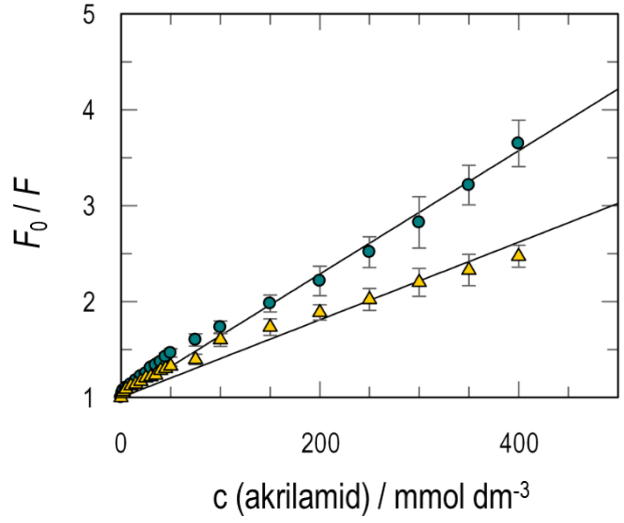
vezanje supstrata inducira konformacijsku promjenu tijekom koje su Trp manje izloženi i dostupni gašenju akrilamidom (slika 46).



Protein TycA-A	K_{sv} / µmol dm^{-3}
WT	10,3 ± 0,09
WT + L-Phe /ATP	5,9 ± 0, 01



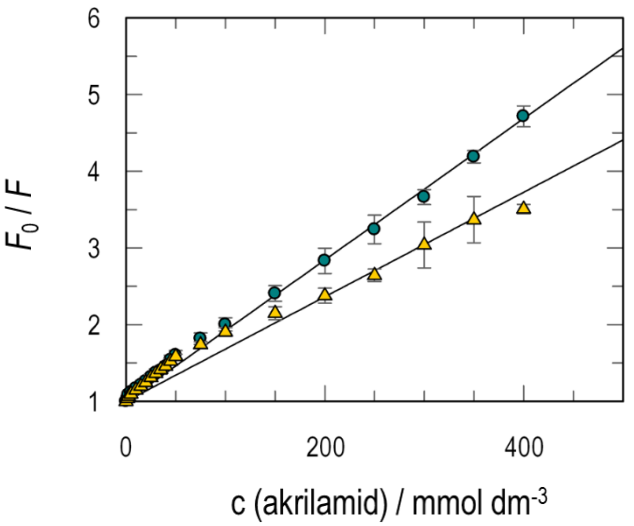
Protein TycA-A	K_{sv} / µmol dm^{-3}
W301F	6,8 ± 0, 01
W301F + L-Phe / ATP	5,6 ± 0,05



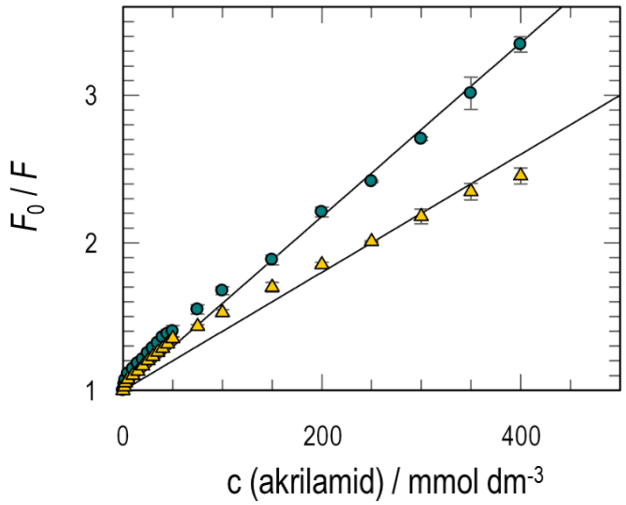
Protein TycA-A	K_{sv} / µmol dm^{-3}
W323F	6,4 ± 0, 02
W323F + L-Phe / ATP	4,1 ± 0,06

Slika 46. Stern-Volmerov grafički prikaz gašenja fluorescencije kod proteina TycA-A bez supstrata te s 1 mmol dm^{-3} L-Phe i 1 mmol dm^{-3} ATP-om. Opažena fluorescencija korigirana je za faktor unutarnjeg filtera izmjerenog

za akrilamid i ATP. Korišten je raspon koncentracija akrilamida od 0-400 mmol dm^{-3}**.** Mjerenja su prosjek tri nezavisna eksperimenta s istaknutom standardnom devijacijom.



Protein TycA-A	K_{sv} / µmol dm^{-3}
W376F	9,2 ± 0, 07
W376F + L-Phe / ATP	6,8 ± 0,05

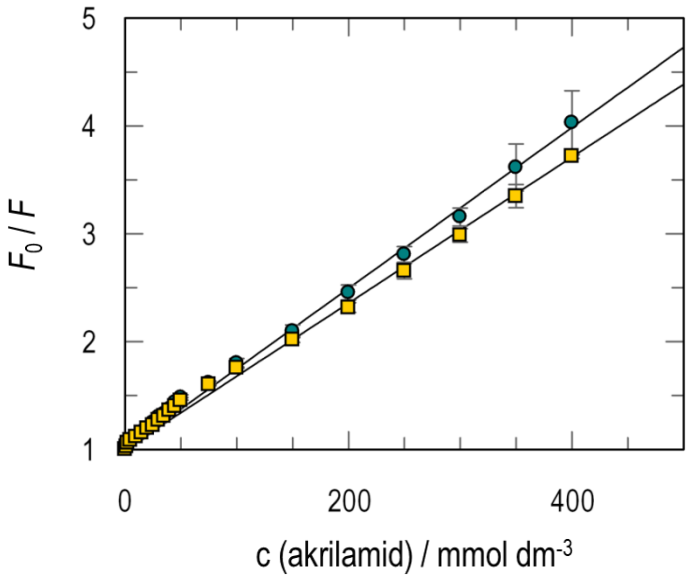


Protein TycA-A	K_{sv} / µmol dm^{-3}
W406F	5,9 ± 0, 04
W406F + L-Phe / ATP	4,0 ± 0,07

Slika 46. (nastavak s prethodne stranice)

Također, utočnavanjem eksperimentalnih podataka na Stern-Volmerovu jednadžbu, uočeno je odstupanje od linearnog grafičkog prikaza što upućuje na heterogenu emisiju triptofana u proteinu TycA-A.

Stern-Volmerov grafički prikaz koji opisuje tijek opadanja intenziteta fluorescencije u ovisnosti o koncentraciji gasitelja, kod mutante W227F, pokazuje najmanju razliku u dosegu gašenja s obzirom na prisustvo supstrata (slika 47). Unos mutacije na to mjesto u primarnoj strukturi, eliminira osjetljivost na vezanje supstrata što upućuje na zaključak kako je promjena konformacije lokalizirana u blizini ovog aminokiselinskog ostatka.

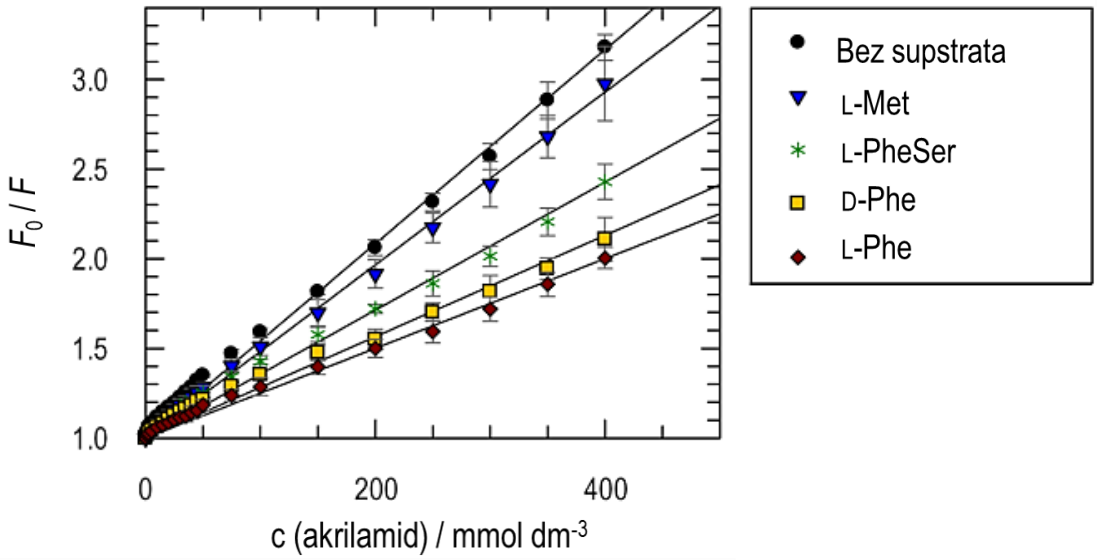


Protein TycA-A	K_{sv} / µmol dm^{-3}
W227F	7,7 ± 0,07
W227F+ L-Phe / ATP	6,8 ± 0,09

Slika 47. Stern-Volmerov grafički prikaz gašenja fluorescencije mutante W227F bez supstrata te s 1 mmol dm^{-3} L-Phe i 1 mmol dm^{-3} ATP-om. Opažena fluorescencija korigirana je za faktor unutarnjeg filtera izmjerenog za akrilamid i ATP. Korišten je raspon koncentracija akrilamida od 0 - 400 mmol dm^{-3}.

Od ranije je poznato da A-domena prvog modula tirocidin-sintetaze može, s manjom efikasnošću aktivirati i nepripadajuće aminokiseline, koje se hidroliziraju na razini adenilata zbog nedovoljne zaštite aktivnog centra od okolnog otapala [54, 70]. Kako bi se u ovom radu ispitao utjecaj neprirodnih supstrata na konformaciju TycA-A, provedeni su eksperimenti gašenja intrinzične fluorescencije akrilamidom na mutanti W301F/W323F/W406F koja sadrži samo jedan fluorescentni Trp227 (slika 48). Nepripadajući supstrati odabrani su na temelju ranije objavljenih podataka o enzimskoj aktivnosti TycA u prisustvu ovih supstrata [70].

Eksperimenti gašenja fluorescencije akrilamidom u prisustvu supstrata A-domene pokazuju da je konformacija proteina različita s obzirom na ponuđeni supstrat. Tako se iz Stern-Volmerovog prikaza za mutantu W301F/W323F/W406F može uočiti da vezanje L-Phe rezultira najnižom K_{sv} vrijednosti, što znači da je fluorofor najmanje dostupan gašenju. Suprotno tome, enzim pokazuje najvišu K_{sv} vrijednost u prisustvu L-Met, što upućuje na veću dostupnost fluorofora gašenju. S obzirom da je L-Met odabran kao primjer lošeg supstrata TycA-A, očito je da vezanjem ove aminokiseline enzim nije u mogućnosti zauzeti konformaciju koja bi učinkovito zaštitila aktivni centar od okolnog otapala.



Mutanta W301F/W323F/W406F	K_{sv} / μmol dm^{-3}
Bez supstrata	5,4 ± 0,08
L-Met	4,8 ± 0,05
L-PheSer	3,6 ± 0,07
D-Phe	2,8 ± 0,08
L-Phe	2,5 ± 0,05

Slika 48. Stern-Volmerov grafički prikaz gašenja fluorescencije kod divljeg tipa TycA-A i W301F/W323F/W406F mutante bez te u prisustvu 1 mmol dm^{-3} aminokiseline i 1 mmol dm^{-3} ATP. Opažena fluorescencija korigirana je za faktor unutarnjeg filtera izmjerenog za akrilamid i ATP. Podaci su prikupljeni u rasponu koncentracija akrilamida od 0 - 400 mmol dm^{-3}.

5. RASPRAVA

Sinteza velikog broja medicinski važnih peptidnih spojeva poput antibiotika, imunosupresanata i antitumorskih spojeva, katalizirana je djelovanjem neribosomskih peptid-sintetaza (NRPS). NRPS su veliki multifunkcionalni proteini sačinjeni od različitih domena združenih u module. Tipičan modul sadrži barem tri osnovne domene koje su odgovorne za odabir i aktivaciju, prijenos te ugradnju jednog aminokiselinskog supstrata u konačni peptidni produkt.

Proces biosinteze na NRPS započinje na A-domeni koja u prisustvu Mg^{2+} iz aminokiseline i ATP-a sintetizira aminoacil-adenilat. A-domene NRPS zajedno s acil- i aril-CoA-sintetazama te luciferazom iz krijesnice pripadaju skupini ANL-superobitelj enzima. Osim što je kemijska reakcija koju kataliziraju ovi enzimi slična, strukturne studije pokazale su da pripadnici ANL-obitelji dijele i zajedničke topološke karakteristike. Tako njihovu strukturu karakteriziraju dvije poddomene, veća A_N- te manja A_C-poddomena, koje međusobno zatvaraju procjep aktivnog mjesta. Kod acil- i aril-CoA-sintetaza te A-domena NRPS, uočeno je da se manja A_C-poddomena tijekom katalitičkog ciklusa rotira za 140° što dovodi do prestrukturiranja aktivnog mjesta za reakciju formiranja tioestera. Luciferaza nema ovaj korak u sklopu katalitičkog ciklusa, već se nastali aktivirani intermedijer spontano dekarboksilira emitirajući foton svjetlosti.

Budući da otpornost bakterija na antibiotike predstavlja sve učestaliji medicinski problem, javlja se potreba za ne samo novim dijagnostičkim metodama, već i za novim antibioticima [10, 94, 95]. S obzirom na modularnu građu NRPS te na specifičnost pojedinih adenilacijskih domena prema aminokiselinskom supstratu, postoji mogućnost sinteze novih NRP metodom genetičkog inženjerstva. Međutim, manipulacija peptid-sintetazama pokazala se zahtjevnijom no što se prvotno smatralo te je obično rezultirala niskim prinosom konačnog peptidnog produkta [96–98]. Razlog tome su narušene protein-protein interakcije među pojedinačnim domenama i/ili modulima. Za uspješnu sintezu konačnog peptidnog produkta na NRPS kao i za prijenos reakcijskih intermedijera s jednog na drugi katalitički centar, od velike su važnosti koordinirane konformacijske promjene usklađene s koracima katalize. Stoga je izučavanje strukturno-funkcionalnih obilježja ovih enzimskih sustava od velike važnosti za uspješnu biosintezu novih peptidnih produkata tehnologijom rekombinantne DNA.

Dosadašnje saznanje o konformacijskim promjenama A-domena NRPS temeljeno je na kristalnim strukturama koje daju informaciju o jednom trenutku u nizu strukturnih promjena tijekom biosintetskog procesa. U ovom radu, istraživanja su provedena radi boljeg razumijevanja dinamike proteinske konformacije u otopini, te konformacijskih promjena u prisustvu nepripadajućih supstrata, a koji bi mogli poslužiti kao alternativni supstrati tijekom biosinteze novih biološki aktivnih spojeva.

Nativna fluorescencija proteina potječe od tri aromatske aminokiseline: Phe, Tyr i Trp.

Triptofan se može selektivno pobuditi na valnoj duljini od 295 nm, pri čemu je emisijski spektar promatranog proteina odraz emisije prisutnih triptofana. Budući da je emisija triptofana izrazito osjetljiva na promjene u mikrookolišu, ovom metodom mogu se izučavati konformacijske promjene proteina u otopini. Kako bi se u ovom radu pobliže ispitale konformacijske promjene na A-domeni, upotrebljena je metoda fluorescencijske spektroskopije koristeći A-domenu iz prvog modula biosintetskog sustava za sintezu tirocidina, a koja aktivira L-Phe (TycA-A). TycA-A ima ukupno pet triptofana u primarnoj strukturi te kako bi ustanovili koji od njih može poslužiti kao intrinzična fluorescencijska proba, konstruirane su mutante u kojima je izvršena zamjena triptofana fenilalaninom.

5.1. Intrinzična fluorescencija proteina TycA-A

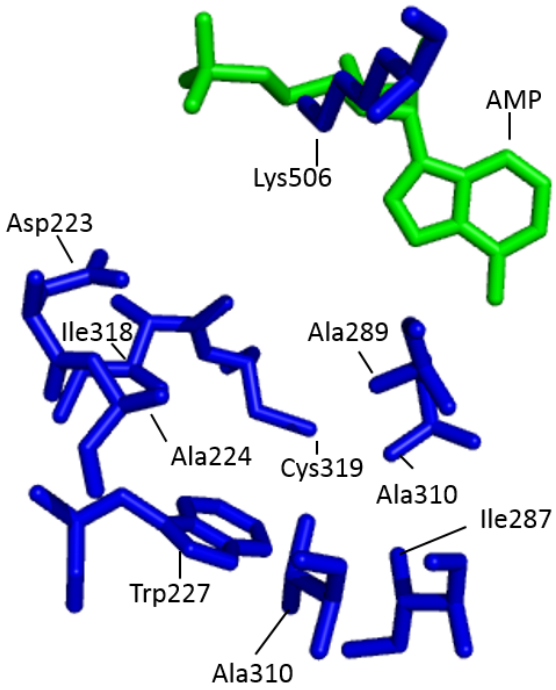
Emisijski maksimum triptofana u proteinima nalazi se unutar raspona vrijednosti valnih duljina od 308 - 355 nm pri čemu viša valna duljina emisije ukazuje na veću izloženost promatranog Trp otapalu. U primarnoj strukturi TycA-A ima pet triptofana: W227, W301, W323, W376 i W406. Maksimalni intenzitet fluorescencije zabilježen je pri valnoj duljini od 341 nm, što upućuje na zaključak da većina opažene fluorescencije potječe od triptofana u polarnom okolišu [63].

Svi triptofani proteina TycA-A smješteni su u većoj, A_N-terminalnoj poddomeni, izvan očuvanih regija. Analiza mikrookoliša pojedinih triptofana u TycA-A, provedena je na temelju homolognih modela u adenilat- i tioester-formirajućoj konformaciji, izrađenima na temelju struktura (PheA (PDB: 1amu) i DltA (PDB: 3e7w)) pohranjenih u proteinskoj bazi podataka [63]. Analiza neposrednog mikrookoliša svih indolnih bočnih ogranaka ukazuje kako se sastav okolnih aminokiselina mijenja s prijelazom iz adenilat- u tioester-formirajuću konformaciju. Također je opaženo da svi triptofani u svojoj neposrednoj blizini u obje konformacije sadrže barem dvije aminokiseline čiji bočni ogranci mogu gasiti fluorescenciju [75]. Međutim, samo je bočni ogranak jednog od njih, W376, u izravnoj interakciji s D122. Budući da bočni ogranak aspartata može gasiti fluorescenciju, W376 će vrlo vjerojatno imati najmanji doprinos u ukupnoj fluorescenciji TycA-A.

Dostupnost indolnih bočnih lanaca procijenjena je koristeći iste homologne modele za protein TycA-A. Opažena manja dostupnost W227 i W301 u odnosu na W323, W376 i W406 u obje promatrane konformacije, ukazuje na hidrofobnije okruženje ovih triptofana. Također se izloženost pojedinih ostataka mijenja s obzirom na promjenu konformacije proteina, pa su tako bočni ogranci W323, W376, W406 te W301 u tioester-formirajućoj konformaciji dostupniji okolnom otapalu od W227. Budući da se promjenom konformacije proteina TycA-A mijenja i aminokiselinsko okruženje pojedinih Trp, za očekivati je da će se mijenjati i njihova fluorescencijska svojstva.

Dostupnost pojedinih Trp okolnom otapalu kao i doprinos ukupnoj emisiji proteina TycA-A ispitana je pomoću jednostrukih mutanti. Zakrivljenost peptidne veze cirkularnim dikroizmom kao i otpornost na proteolizu, analizirane su kako bi se ispitao utjecaj unesenih mutacija na strukturu proteina TycA-A. Rezultati ukazuju da se zamjenama triptofana fenilalaninom nije značajno poremetila struktura mutanti.

Enzimska aktivnost proteina, određena je spektrofotometrijski praćenjem brzine oslobađanja pirofosfata koji nastaje hidrolizom ATP-a pri aktivaciji aminokiseline u obliku aminoacil-adenilata. Korak koji određuje brzinu reakcije je oslobađanje aa-AMP-a s enzima, pa se ova brzina u literaturi još naziva i brzina curenja aa-AMP-a (engl. *leakage*) te se može koristiti kao mjera stabilnosti nastalog adenilata [99]. Sve mutante TycA-A zadržale su enzimsku aktivnost pri čemu su uočene nešto više vrijednost za K_M kod mutante W227F (K_M = 34,7 μmol dm^{-3}) u odnosu na divlji tip (K_M =18,3 μmol dm^{-3}). To se može objasniti položajem ovog triptofana u strukturi TycA-A, a koji zatvara dno veznog mjesta za L-Phe (slika 49). Iako se radi o mutaciji ostatka u veznom mjestu, filogenetska analiza A-domena koje aktiviraju L-Phe, L-Tyr ili L-Trp pokazala je kako se na ovom položaju osim triptofana može nalaziti i Phe [53].



Slika 49. Vezno mjesto za L-Phe u strukturi TycA-A. Označeni su aminokiselinski ostaci koji čine vezno mjesto. Zeleno je označen AMP koji nastaje kao produkt hidrolize ATP-a.

Također, razlike u k_{cat} vrijednostima uočene za mutantu W227F (k_{cat} = 0,48 min^{-1}) kao i W301F (k_{cat} = 0,44 min^{-1}) u odnosu na divlji tip (k_{cat} = 0,25 min^{-1}), upućuju na slabiju stabilizaciju nastalog

adenilata što se može objasniti njegovim bržim curenjem (engl. *leakage*) iz aktivnog mjesta. Time se aktivno mjesto na enzimu brže oslobađa za novi katalitički ciklus, što rezultira većom potrošnjom ATP-a.

Gašenje fluorescencije mutanti proteina TycA-A u otopini bez prisutnih supstrata, ukazuje na dvije skupine triptofana različite izloženosti okolnom otapalu. Tako mutante W323F, W406F i W227F pokazuju manji doseg gašenja fluorescencije akrilamidom od proteina divljeg tipa, te mutanti W376F i W301F. Budući da W376F i W301F pokazuju isti obim gašenja fluorescencije kao i enzim divljeg tipa, znači da je njihov doprinos fluorescenciji zanemariv ili da ovi ostaci nisu dostupni gašenju. To je u skladu s rezultatima analize Vadar, kojom je predviđeno da W376 vjerojatno ne doprinosi ukupnoj fluorescenciji zbog interakcije s D122, a da W301 nije izložen okolnom otapalu. Veća izloženost ostataka W323 te W406 također je u skladu s onom predviđenom u analizi modela, a što upućuje na zaključak da se dostupnost ovih ostataka ne mijenja s obzirom na konformaciju proteina.

Za razliku od ostalih triptofana, izloženost W227 veća je nego što je predviđeno na temelju modela. Razlog tome je što se protein u odsustvu supstrata vjerojatno nalazi u konformaciji koja ne odgovara ni jednom od modela, već u tzv. otvorenoj konformaciji. Dobiveni rezultati su u skladu s objavljenom kristalnom strukturom eukariotske adenilacijske domene, SidNA3, koja do danas predstavlja jedini primjer A-domene u otvorenoj konformaciji. Obilježje SidNA3 strukture je velika udaljenost među poddomenama zbog čega je aktivno mjesto izrazito dostupno okolnom otapalu [100].

Kako bi se odredio fluorescencijski doprinos pojedinog triptofana, od emisijskog spektra proteina divljeg tipa oduzeti su doprinosi preostalih triptofana kod pojedinačnih mutanti. Emisijski spektri dobiveni ovim načinom, ukazuju da svi triptofani, osim W376, pridonose fluorescenciji proteina TycA-A, pri čemu W221 i W301 pridonose ~ 30%, odnosno 40%, a W323 i W406 pojedinačno doprinose ~ 50%. Emisijski spektar mutante W376F, jednak je spektru proteina divljeg tipa, što potvrđuje ranije opažanje da W376 ne pridonosi ukupnoj fluorescenciju TycA-A. Zbrajanjem pojedinačnih doprinosa dobiva se vrijednost intenziteta fluorescencije koja premašuje emisiju proteina divljeg tipa. To upućuje na zaključak da je emisija divljeg tipa proteina ugašena zbog prijenosa energije među triptofanskim ostacima (FRET).

Kako bi ispitali pojavu FRET-a u proteinu TycA-A, dodatno su konstruirane dvostruka W323F/W406F, odnosno trostruka W301F/W323F/W406F mutanta. Višestruke mutante su manjeg stupnja čistoće od ostalih mutanti proteina TycA-A. Zbog –NH skupine, indolni bočni ogranak nije jednako hidrofoban kao bočni ogranak fenilalanina, pa se triptofan ne može adekvatno zamijeniti niti jednom drugom aminokiselinom [101]. Moguće je da se višestrukim mutacijama triptofana u fenilalanin narušavaju polarne interakcije s okolnim otapalom što u konačnici destabilizira protein. Eksperimenti

triptičke digestije mutante W301F/W323F/W406F ukazuju da se fragment A_N-terminalne poddomene gotovo u potpunosti raspada već u prvim minutama djelovanja tripsina. Razlog tome su višestruke zamjene triptofana u A_N-terminalnoj poddomeni, čime inače stabilan proteinski fragment, postaje podložniji proteolizi. No, na temelju CD-spektra može se zaključiti da su u i u višestrukim mutantama očuvani elementi sekundarne strukture. Emisijski spektri dvostruke i trostruke mutante, W323F/W406F odnosno W301F/W323F/W406F, nisu dali informaciju koja bi u potpunosti razriješila pitanje FRET-a u proteinu TycA-A. Tako intenzitet fluorescencije trostruke mutante, a koja ima samo jedan fluorescirajući triptofan, W227, odgovara doprinosu ovog ostatka koji se dobije oduzimanjem emisijskog spektra njegove mutante od spektra proteina divljeg tipa. To ukazuje da W227 vrlo vjerojatno ne sudjeluje u prijenosu energije među triptofanskim ostacima. Suprotno tome, u emisijskom spektru dvostruke mutante, čijoj fluorescenciji doprinose samo preostali W227 i W301, intenzitet ukupne fluorescencije smanjuje se za polovinu vrijednosti dobivene kod proteina divljeg tipa. Ovi rezultati nisu u skladu sa zbrojem pojedinačnih doprinosa W227 i W301, a koji iznosi 70%. Moguće je da je doprinos W301 u dvostrukoj mutanti manji, jer dio energije namiruje od susjednog triptofana, tj. W323 koji se od W301 nalazi na udaljenosti od 14 Å (slika 20).

5.2. Utjecaj vezanja supstrata na konformaciju proteina TycA-A

Emisijski spektri snimljeni u prisustvu supstrata upućuju na promjenu valne duljine maksimuma intenziteta fluorescencije. Pri tome je opaženo da se valna duljina maksimuma intenziteta fluorescencije, kod svih mutanti proteina primiče prema nižim valnim duljinama (engl. *blue shift*) za ~ 2 nm. Međutim, najznačajniji pomak u iznosu od 4-6 nm, zabilježen je kod W227. Pomak emisijskog maksimuma može se objasniti promjenom mikrookoliša W227, koji se vezanjem supstrata zaklanja od okolnog otapala i time postaje manje dostupan molekulama gasitelja. Dobiveni rezultati dodatno potvrđuju opažanje da se vezanjem supstrata mikrookoliš W227 najviše mijenja, stoga bi ovaj ostatak mogao poslužiti kao intrinzična fluorescencijska proba konformacijskih promjena TycA-A.

Konformacija proteina TycA-A ispitana je u prisustvu prirodnog aminokiselinskog supstrata i uz pomoć ekstrinzične fluorescencijske probe, ANS. ANS slabo fluorescira u vodenom mediju, međutim, uslijed vezanja za protein intenzitet njegove fluorescencije raste uz pomak emisijskog maksimuma prema nižim valnim duljinama. Opaženi rezultati ukazuju da prisustvo prirodnog supstrata rezultira promjenom konformacije pri čemu enzim izlaže manje hidrofobnih površina okolnom otapalu te se intenzitet fluorescencije ANS-a smanjuje. Niži intenzitet fluorescencije ANS-a upućuje na stabilizirajući efekt vezanja supstrata što je u skladu s višim vrijednostima temperature mekšanja. Ranije uočena

nestabilnost mutante W301F/W323F/W406F u skladu je s opaženim višim intenzitetom fluorescencije ANS-a u njenom prisustvu.

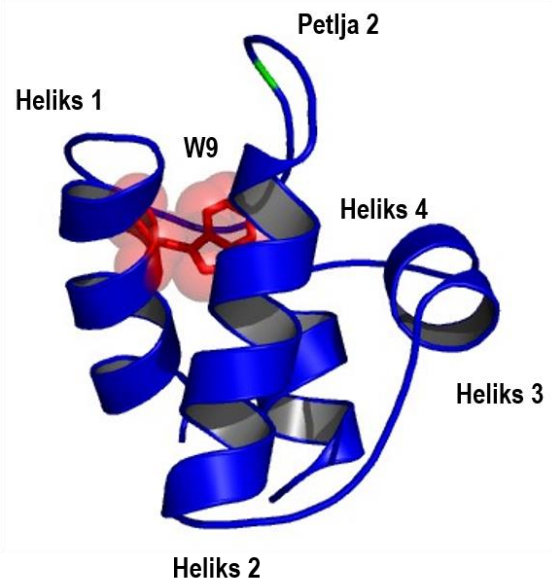
Kako bi se ispitao utjecaj supstrata na fluorescencijska svojstva pojedinih triptofana u proteinu TycA-A, gašenje fluorescencije provedeno je na mutantama u prisutnosti supstrata. Pri tome je opaženo da prisustvo supstrata kod svih mutanti umanjuje doseg gašenja fluorescencije, što upućuje na promjenu konformacije proteina. Međutim, najmanju razliku u dosegu gašenja bez i sa supstratima pokazuje mutanta W227F. Budući da u ovoj mutanti nedostaje ostatak W227, može se zaključiti kako je konformacijska promjena nastala vezanjem supstrata lokalizirana oko ovog triptofana.

5.3. Intrinzična fluorescencija proteina TycA-T_1

Pri selektivnoj valnoj duljini pobude na 295 nm, TycA-T_1 protein pokazuje maksimum intenziteta fluorescencije na 331 nm. Opažena valna duljina emisije upućuje na zaključak da fluorescencija potječe od Trp koji se nalazi u hidrofobnom okruženju. Emisija proteina TycA-T_1 potječe od W9, budući da je to jedini triptofan u ovom proteinu. Kako bi se metodom fluorescencije mogle izučavati konformacijske promjene TycA-A u prisustvu T-domene tijekom druge polureakcije, W9 je zamijenjen fenilalaninom. Time se onemogućava interferencija emisijskih signala između dvaju proteina (slika 50 A).

W9F mutanta TycA-T_1 nije uspješno eksprimirana čak ni nakon nekoliko pokušaja optimizacije ekspresije te se nije mogla iskoristiti za planirane pokuse. Poravnavanjem sekvenci T-domena, uočeno je kako se na ovom položaju uglavnom nalazi hidrofobna aminokiselina, koja ulazi u sastav heliksa 1 (slika 50 B). Sve T-domene iz biosintetskih sustava bakterije roda *Bacillus* (GrsA, SrfA, BacA, TycC) ukazuju na očuvanost W9, pa zamjena ovog triptofana vjerojatno nije prihvatljiva, jer destabilizira strukturu proteina [28, 29, 102–104].

A)



B)

```
                                                  *                                                   *
SP|O30409|TYCC_BREPA/1-68          1 ----VESK-LAEIWERVLGVSGIGILDNFFQIGGHSLKAMAVAAQV 41
SP|A5F3F4|VIBB_VIBC3/1-72          1 TGLSLRTMQHDVAAALNLSVDEVDVQENLLFLGLDSIRAIQLLEKW 46
SP|P11454|ENTF_ECOLI/1-68          1 ----SETI-IAAAFSSLLGCDVQDADADFFALGGHSLLAMKLAAQL 41
SP|P0ADI4|ENTB_ECOLI/1-72          1 ----SKAALREVILPLLDESDEPFDDDNLIDYGLDSVRMMALAARW 42
SP|P0C061|GRSA_ANEMI/1-67          1 ----IEET-LVTIWQDVLGIEKIGIKDNFYALGGDSIKAIQVAARL 41
SP|Q08787|SRFAC_BACSU/1-68         1 ----MEET-IAQIWSEVLGRKQIGIHDDFFALGGHSLKAMTAASRI 41
SP|P09095|TYCA_BREPA/1-67          1 ----TESI-LVSIWQNVLGIEKIGIRDNFYSLGGDSIQAIQVVARL 41

SP|O30409|TYCC_BREPA/1-68         42 HREYQVELPLKVLFAQPTIKALAQYVA---- 68
SP|A5F3F4|VIBB_VIBC3/1-72         47 K-AQGADISFAQLMEHVTLQQWWQTIQ---- 72
SP|P11454|ENTF_ECOLI/1-68         42 SRQVARQVTPGQVMVASTVAKLATIID---- 68
SP|P0ADI4|ENTB_ECOLI/1-72         43 R-KVHGDIDFVMLAKNPTIDAWWKLLSREVK 72
SP|P0C061|GRSA_ANEMI/1-67         42 H-SYQLKLETKDLLKYPTIDQLVHYIK---- 67
SP|Q08787|SRFAC_BACSU/1-68        42 KKELGIDLPVKLLFEAPTIAGISAYLK---- 68
SP|P09095|TYCA_BREPA/1-67         42 H-SYQLKLETKDLLNYPTIEQVALFVK---- 67
```

Slika 50. A) Homologni model proteina TycA-T_1 izrađen na temelju koordinata homologa PDB: 1dny. Triptofan W9 označen je istaknut je u crvenom, mjesto posttranslacijske modifikacije na očuvanom Ser zelenom i heliksi 1 – 4. B) Poravnavanje sekvenci T-domena različitih biosintetskih sustava. Crvenom zvjezdicom označen je apsolutno konzervirani Ser, mjesto posttranslacijske modifikacije fosfopanteteinom. Crnom zvjezdicom označena je pozicija s promatranim Trp ostatkom. Poravnavanje sekvenci izrađeno je koristeći aplikaciju u proteinskoj bazi podataka a prikaz poravnanih sekvenci pomoću alata Jalview.

5.4. Konformacijske promijene TycA-A u prisustvu nepripadajućih supstrata

Prethodna istraživanja pokazala su kako A-domena tirocidin-sintetaze, u pravilu s nešto slabijom efikasnošću, može aktivirati i nepripadajuće aminokiseline [105]. Supstratna specifičnost TycA, ispitana je i sustavnom studijom u kojoj je ispitano 30 različitih aminokiselinskih supstrata.[106] Pri tome se došlo do zaključka da je prisustvo amino i karboksilne grupe nužno s obzirom da su ove skupine

stabilizirane interakcijama s visokoočuvanim D223 odnosno K506. Također, ključno svojstvo je i hidrofobnost bočnog lanca supstrata koji ostvaruje van der Waalsove interakcije s aminokiselinskim bočnim ograncima u veznom mjestu enzima.

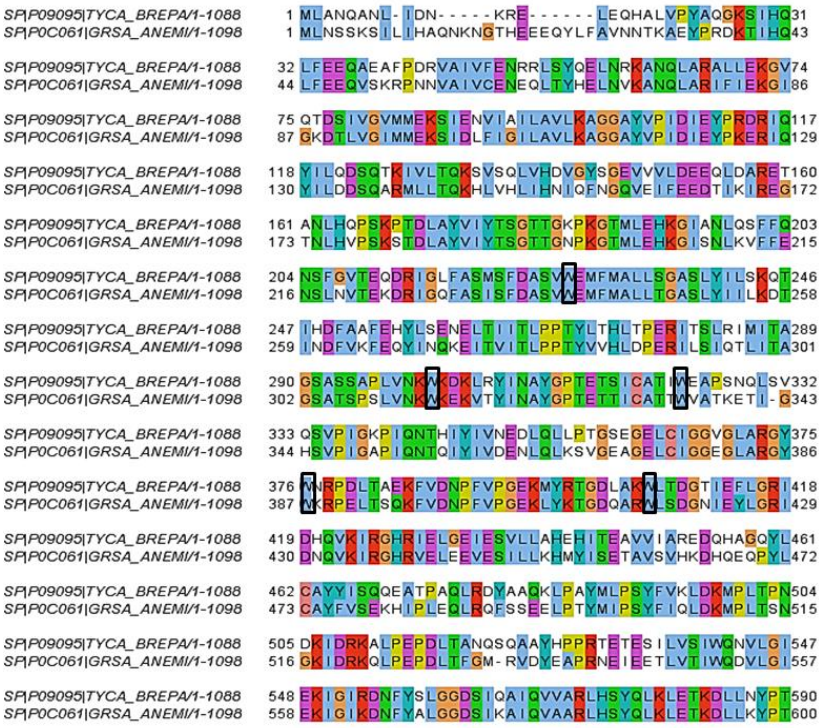
Nepripadajuće aminokiseline su odabrane na temelju literaturnih podataka za katalitičke konstante TycA u prisustvu istih.[71] Naime izmjenom ATP-[^{32}P]PP$_i$, pokazalo se kako TycA, osim L-Phe, učinkovito stvara adenilat i s D-Phe te L-PheSer, a manje učinkovito s L-Met i L-His. Utjecaj nepripadajućih aminokiselina na konformaciju TycA-A u ovom radu, ispitan je eksperimentima termalne denaturacije, ekstrinzične fluorescencije, te gašenjem fluorescencije akrilamidom.

Otpornost proteina na termalnu denaturaciju ispitana je usporedbom pripadajućeg u odnosu na nepripadajući supstrat. Kod svih proteina opaženo je kako prisustvo prirodnog supstrata povisuje temperaturu mekšanja (T_m) za ~2 °C. Ovo upućuje na zaključak da se u prisutnosti supstrata konformacija proteina mijenja čime enzim postaje otporniji na termalnu denaturaciju. U odnosu na protein divljeg tipa, mutanta W301F/W323F/W406F pokazuje niže vrijednosti za T_m u odsutnosti supstrata, što je u skladu s rezultatima proteolize koji ukazuju na manju stabilnost ove mutante. Nepripadajući supstrati nemaju utjecaja na vrijednost T_m kod proteina divljeg tipa. Moguće je da ova metoda nije dovoljno osjetljiva da bi se detektirale konformacijske promjene nastale vezanjem nepripadajućih supstrata.

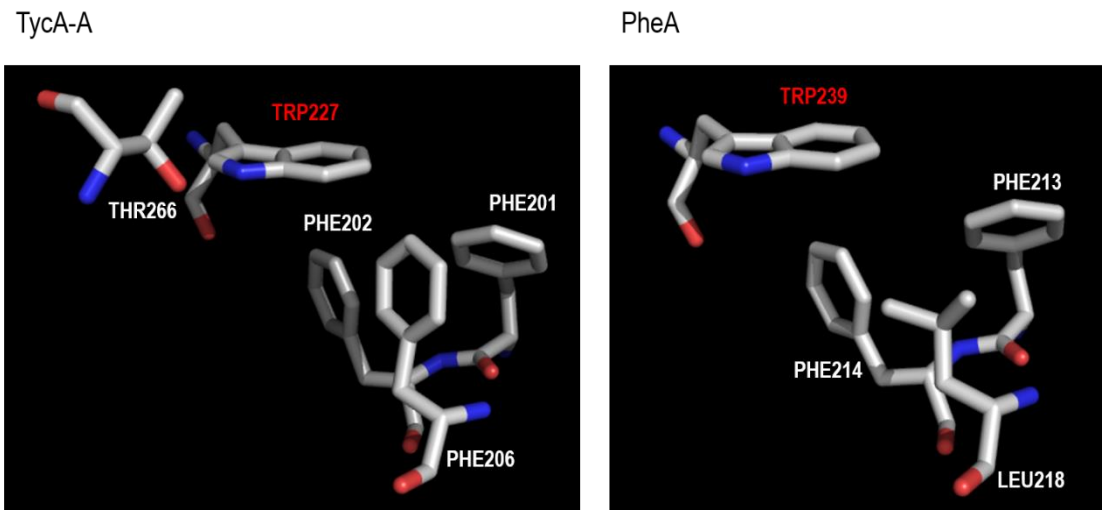
Gašenje fluorescencije mutante W301F/W323F/W406F, koja sadrži samo W227, provedeno je u prisustvu L-Phe, D-Phe, L-PheSer i L-Met. Budući da bočni ogranak histidina može gasiti fluorescenciju triptofana, L-His nije se mogao uvrstiti u eksperiment [72]. Podjednak doseg gašenja fluorescencije u prisustvu L- i D-Phe te mala razlika među pripadajućim K_{SV} vrijednostima, upućuju na sličnu konformaciju proteina u prisustvu ove dvije aminokiseline. Rezultati su u skladu s činjenicom da se u vezno mjesto na enzimu, podjednako dobro mogu smjestiti oba stereoizomera. Jednako je opaženo i u kristalnim strukturama A-domene homologne gramicidin-sintetaze 1 u prisustvu L- i D-Phe. U ovim strukturama, konformacija proteina minimalno se razlikuje kao i orijentacija benzenskog prstena L- i D-Phe [51]. Međutim, viši doseg gašenja opažen je u prisustvu L-PheSer i L-Met, što upućuje na suboptimalnu konformaciju u prisustvu ovih supstrata. Najveći doseg gašenja, zabilježen je u prisustvu L-Met. Dobiveni rezultati u skladu su s opaženim vrijednostima za relativnu adenilacijsku aktivnost TycA u prisustvu nepripadajućih supstrata. Relativne aktivnosti, s obzirom na vrijednosti izmjerene s prirodnim supstratom L-Phe, su za D-Phe 80%, L-PheSer 41% te L-Met 10% [70]. Najlošiji supstrat među ispitanim aminokiselinama, L-Met, nije pronađena u niti jednom neribosomski sintetiziranom peptidu.

5.5. Usporedba fenilalanin-aktivirajuće adenilacijske domene gramicidin-sintetaze 1 s TycA-A

Poravnavanjem sekvence A-domene gramicidin-sintetaze 1 (PheA) s TycA-A, ustanovljeno je da ovi proteini imaju 63% identičnih aminokiselinskih ostataka uključujući i pet Trp (slika 51). S obzirom na prisustvo istih triptofanskih ostataka kao i na općenito visoku homologiju u aminokiselinskom slijedu, za očekivati je da navedeni proteini pokazuju i slična fluorescencijska svojstva. Međutim, valna duljina maksimuma intenziteta fluorescencije proteina TycA-A (341 nm), razlikuje se od one objavljene za PheA gdje je maksimum intenziteta emisije opažen pri 327 nm. Za razliku od TycA-A, valna duljina maksimuma intenziteta fluorescencije PheA upućuje na emisiju koja većim dijelom potječe od triptofana u hidrofobnom okruženju. Objavljene studije u kojima se opaženo svojstvo PheA koristi za izračun K_d vrijednosti za supstrat (L-Phe), temeljene su na pretpostavci da većina opažene fluorescencije ovog proteina potječe od Trp239 [107, 108]. Ovaj položaj kod TycA-A odgovara Trp227 koji zatvara dno veznog mjesta za L-Phe. Za razliku od PheA, fluorescencija TycA-A ne gasi se dodatkom pripadajućeg aminokiselinskog supstrata, te većina opažene fluorescencije TycA-A potječe od izloženih triptofana W323 i W406 [63]. Sastav neposrednog mikrookoliša pojedinih triptofana u PheA, ukazuje na suptilnu razliku u mikrookolišu W227 (TycA-A) u odnosu na W239 (PheA). Naime, u neposrednom mikrookolišu W227 pored ranije spomenutih aminokiselinskih ostataka (slika 19) nalazi se i T266 te tri fenilalaninska ostatka (F201, F202 i F206) (slika 52). Za razliku od W227 u TycA-A, kod PheA se u mikrookolišu W239 ne nalazi treonin, a na mjestu F206 nalazi se L218. Moguće je da fenilalanini na ovim položajima umanjuju fluorescenciju W227 ili da je bočni ogranak T266 u polarnoj interakciji s W227 zbog čega je doprinos ovog triptofana ukupnoj fluorescenciji TycA-A nizak (30%).



Slika 51. Poravnavanje sekvenci adenilacijskih domena gramicidin-sintetaze 1 s tirocidin-sintetazom 1. Istaknuti su triptofanski ostaci.



Slika 52. Razlike neposrednog mikrookoliša Trp227 i Trp239 s istaknutim bočnim ograncima fenilalanina i treonina u modelu TycA-A.

Velike strukturne promjene adenilacijske domene tijekom katalitičkog ciklusa, očituju se u rotaciji dviju poddomena za čak 140 °. Rotacijom poddomena, A-domena osigurava prestrukturiranje aktivnog mjesta za dvije katalitički nezavisne reakcije. Konstrukcija hibridnih biosintetskih sustava otežana je zbog izostanka konformacijskih promjena koje podržavaju uspješno provođenje pojedinačnih koraka u katalitičkom ciklusu. Koordinirane konformacijske promjene usklađene s koracima katalize, nužne su za uspješnu sintezu konačnog peptidnog produkta.

Ograničenost metode ogiba X-zraka o kristale proteina je u tome što daje statičnu sliku jednog trenutka u nizu konformacijskih promjena tijekom katalitičkog ciklusa. Metoda fluorescencijske spektroksopije koja koristi intrinzičnu fluorescenciju proteina, mogla bi dati informaciju o konformacijskim promjenama A-domene tijekom katalitičkog cikusa. Rezultati dobiveni u ovom radu upućuju na moguću primjenu triptofana iz aktivnog mjesta kao intrinzične fluorescencijske probe prilikom izučavanja konformacijskih promjena kod adenilacijskih domena koje specifično aktiviraju L-Phe, L-Tyr ili L-Trp. Kod adenilacijskih domena koje prirodno ne sadrže triptofan u aktivnom mjestu, konformacijske promjene mogle bi se proučavati fluorescencijskom spektroskopijom nakon uvođenja prikladne fluorescencijske probe u blizini aktivnog mjesta. Bolje poznavanje konformacijskih promjena nužno je za uspješan proces sinteze novih peptidnih spojeva.

6. ZAKLJUČCI

- Adenilacijska domena TycA-A ima pet triptofana u primarnoj strukturi s valnom duljinom emisije na 341 nm. Analizom homolognih modela TycA-A u adenilat- i tioester-formirajućoj konformaciji, uočeno je da se dostupnost i mikrookoliš pojedinih triptofana mijenja s promjenom konformacije.
- Kako bi se konformacijske promjene mogle pripisati određenom triptofanu u TycA-A, konstruirane su pojedinačne mutante sa zamjenom triptofana u fenilalanin: W227F, W301F, W323F, W376F i W406F. Emisijski spektri pojedinačnih mutanti ukazuju na nejednake doprinose pojedinih triptofana ukupnoj emisiji TycA-A, pri čemu W227 doprinosi 30%, W301 40%, a W323 i W406 svaki po 50%. W376 najmanje doprinosi fluorescenciji, vjerojatno zbog polarne interakcije indolnog bočnog ogranka sa susjednim D122.
- Zbrajanjem pojedinačnih doprinosa pojedinih triptofana, dobije se emisija koja intezitetom premašuje divlji tip, što upućuje na zaključak da se fluorescencija TycA-A gasi djelovanjem FRET-a.
- Nejednaki dosezi gašenja fluorescencije akrilamidom ukazuju na različitu dostupnost pojedinih triptofana, pri čemu se u proteinu TycA-A mogu razlikovati dvije skupine triptofanskih ostataka. Gašenje fluorescencije provedeno na mutantama u prisustvu supstrata, ukazuje na manji obim gašenja što se može dovesti u vezu s promjenom konformacije proteina.
- Najmanju razliku u dosegu gašenja pokazuje mutanta W227F. To upućuje na zaključak da je konformacijska promjena inducirana vezanjem supstrata lokalizirana oko ovog triptofana. Također valna duljina emisije ovog ostatka u prisustvu supstrata ukazuje na pomak od 4 – 6 nm (engl. *blue shift*). Stoga bi ovaj ostatak mogao poslužiti kao intrinzična fluorescencijska proba konformacijskih promijena u TycA-A.
- TycA-A može s manjom efikasnošću aktivirati i nepripadajuće aminokiseline. Konformacijske promjene u prisustvu nepripadajućih aminokiselinskih supstrata ispitane su koristeći W227 kao intrinzičnu fluorescentnu probu.
- Najmanji doseg gašenja fluorescencije TycA-A odvija se u prisustvu L- i D-Phe, pri čemu pripadajuće K_{sv} vrijednosti ukazuju na sličnu konformaciju proteina u prisutnosti ovih aminokiselinskih supstrata. Najviši dosezi gašenja zabilježeni su s L-PheSer te L-Met, što upućuje na zaključak da enzim u prisustvu ovih susptrata zauzima suboptimalnu konformaciju.
- Adenilacijska domena TycA-A pokazuje 63%-tnu homologiju u primarnoj sekvenci s PheA. Unatoč velikom stupnju homologije spomenuti proteini imaju različita fluorescencijska svojstva. Oba proteina imaju pet triptofana čiji se položaji u primarnoj strukturi poravnavaju. Usporedbom neposrednog mikrookoliša ostatka W227 u TycA-A s W239 u PheA uočeno je kako se

aminokiselinski sastav razlikuje u samo dvije aminokiseline T266 i F206, što može biti razlog različitih fluorescencijskih svojstava dvaju inače veoma sličnih proteina.

7. LITERATURA

1. R. Finking, M. A. Marahiel: Biosynthesis of nonribosomal peptides. *Annu. Rev. Microbiol.* **58** (2004) 453–88

2. E. M. Nolan, C. T. Walsh: How nature morphs peptide scaffolds into antibiotics. *Chembiochem*, **10** (2009) 34–53

3. J. Grünewald, M. A. Marahiel: Chemoenzymatic and template-directed synthesis of bioactive macrocyclic peptides. *Microbiol. Biol. Mol. Rev.* **70** (2006) 121–146

4. S. Caboche, V. Leclere, M. Pupin, G. Kucherov, P. Jacques: Diversity of Monomers in Nonribosomal Peptides: towards the Prediction of Origin and Biological Activity. *Journal of Bacteriology*, **192** (2010) 5143–5150

5. S. A. Sieber, M. A. Marahiel: Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: approaches to new antibiotics. *Chem. Rev.* **105** (2005) 715–738

6. M. A. Fishbach, C. T. Walsh: Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: Logic, machinery and mechanisms. *Chem. Rev.* **106** (2006) 3468-3496

7. R. D. Arbeit, D. Maki, F. P. Tally, E. Campanaro, B. I. Eisenstein: The safety and efficacy of daptomycin for the treatment of complicated skin and skin-structure infections. *Clin. Infect. Dis.* **38** (2004) 1673–1681

8. G. H. Hur, C. R. Vickery, M. D. Burkart: Explorations of catalytic domains in non-ribosomal peptide synthetase enzymology. *Nat. Prod. Rep.* **29** (2012), 1074–1098

9. M. A. Marahiel, T. Stachelhaus, H. D. Mootz: Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chem. Rev.* **97** (1997) 2651-2673

10. M. A. Fischbach, C. T. Walsh: Antibiotics for emerging pathogens. *Science*, **325** (2009) 1089–1093

11. J. W. H. Li, J. C. Vederas: Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science*, **325** (2009) 161–163

12. A. M. King, S. A. Reid-Yu, W. Wang, D. T. King, G. De Pascale, N. C. Strynadka, T. R. Walsh, B. K. Coombes, G. D. Wright: Aspergillomarasmine A overcomes metallo-β-lactamase antibiotic resistance. *Nature*, **510** (2014) 503–506

13. B. P. Conlon, E. S. Nakayasu, L. E. Fleck, M. D. LaFleur, V. M. Isabella, K. Coleman, S. N. Leonard, R. D. Smith, J. N. Adkins, K. Lewis: Activated ClpP kills persisters and eradicates a chronic biofilm infection. *Nature*, **503** (2013) 365–370

14. H. Brötz-Oesterhelt, D. Beyer, H.-P. Kroll, R. Endermann, C. Ladel, W. Schroeder, B. Hinzen, S. Raddatz, H. Paulsen, K. Henninger, J. E. Bandow, H.-G. Sahl, H. Labischinski: Dysregulation of bacterial proteolytic machinery by a new class of antibiotics. *Nat. Med.* **11** (2005) 1082–1087

15. D. J. Newman, G. M. Cragg: Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* **70** (2007) 461–477

16. M. A Marahiel, L. O. Essen: Nonribosomal peptide synthetases mechanistic and structural aspects of essential domains. *Methods in enzymology*, **458** (2009) 337–351

17. M. A. Marahiel: Working outside the protein-synthesis rules: Insights into non-ribosomal peptide synthesis. *J. Pept. Sci.* **15** (2009) 799–807

18. H. D. Mootz, M. A. Marahiel: Biosynthetic systems for nonribosomal peptide antibiotic assembly. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1** (1997) 543–551

19. C. T. Walsh, H. Chen, T. A. Keating, B. K. Hubbard, H. C. Losely, L. Luo, C. G. Marshall, D. A. Miller, H. M. Patel: Tailoring enzymes that modify nonribosomal peptides during and after chain elongation on NRPS assembly lines. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5** (2001) 525–534

20. D. Reimer, H. B. Bode: A natural prodrug activation mechanism in the biosynthesis of nonribosomal peptides. *Nat. Prod. Rep.* **31** (2014) 154–159

21. H. D. Mootz, D. Schwarzer, M. A Marahiel: Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases. *Chembiochem*, **3** (2002) 490–504

22. W. Zhang, I. Ntai, N. L. Kelleher, C. T. Walsh: tRNA-dependent peptide bond formation by the transferase PacB in biosynthesis of the pacidamycin group of pentapeptidyl nucleoside antibiotics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108** (2011) 12249–12253

23. T. W. Giessen, A. M. von Tesmar, M. A Marahiel: Insights into the generation of structural diversity in a tRNA-dependent pathway for highly modified bioactive cyclic dipeptides. *Chem. Biol.* **20** (2013) 828–838

24. T. W. Giessen, M. A Marahiel: Ribosome-independent biosynthesis of biologically active peptides: Application of synthetic biology to generate structural diversity. *FEBS Lett.* **586** (2012) 2065–2075

25. A. M. Gulick: Conformational dynamic in the acyl-CoA synthetases, adenylation domains of non-ribosomal peptide synthetases, and firefly luciferase. *ACS Chem. Biol.* **4** (2009) 811–827

26. J. A Sundlov, C. Shi, D. J. Wilson, C. C. Aldrich, A. M. Gulick: Structural and functional investigation of the intermolecular interaction between NRPS adenylation and carrier protein domains. *Chem. Biol.* **19** (2012) 188–198

27. J. Crosby, M. P. Crump: The structural role of the carrier protein-active controller or passive carrier. *Nat. Prod. Rep.* **29** (2012) 1111–1137

28. T. Weber, R. Baumgartner, C. Renner, M. A Marahiel, T. A Holak: Solution structure of PCP, a prototype for the peptidyl carrier domains of modular peptide synthetases. *Structure*, **8** (2000) 407–18

29. A. Koglin, M. R. Mofid, F. Löhr, B. Schäfer, V. V Rogov, M. M. Blum, T. Mittag, M. A. Marahiel, F. Bernhard, V. Dötsch: Conformational switches modulate protein interactions in peptide antibiotic synthetases. *Science*, **312** (2006) 273–6

30. C. L. Allen, A. M. Gulick: Structural and bioinformatic characterization of an Acinetobacter baumannii type II carrier protein. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **70** (2014) 1718–25

31. R. Lambaloti, A. M. Gehring, R. S. Fluge, P. Zuber, M. Lacelle, M. A. Marahie, R. Reid, C. Khosia, C. T. Walsh: A new enzyme transferases superfamily - the phosphopantetheinyl transferases. *Chem. Biol.* **3** (1996) 923–936

32. J. R. Lohman, M. Ma, M. E. Cuff, L. Bigelow, J. Bearden, G. Babnigg, A. Joachimiak, G. N. Phillips, B. Shen: The crystal structure of BlmI as a model for nonribosomal peptide synthetase peptidyl carrier proteins. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **82** (2014) 1210–1218

33. D. P. Frueh, H. Arthanari, A. Koglin, D. A. Vosburg, A. E. Bennett, C. T. Walsh, G. Wagner: Dynamic thiolation-thioesterase structure of a non-ribosomal peptide synthetase. *Nature*, **454** (2008) 903–906

34. Y. Liu, T. Zheng, S. D. Bruner: Structural basis for phosphopantetheinyl carrier domain interactions in the terminal module of nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* **18** (2011) 1482–1488

35. A. Tanovic, S. A Samel, L. O. Essen, and M. A. Marahiel: Crystal structure of the termination module of a nonribosomal peptide synthetase. *Science*, **321** (2008) 659–663

36. H. L. Condurso, S. D. Bruner: Structure and noncanonical chemistry of nonribosomal peptide biosynthetic machinery. *Natural Product Reports*, **29** (2012) 1099–1110

37. T. A. Keating, C. G. Marshall, C. T. Walsh, A. E. Keating: The structure of VibH represents nonribosomal peptide synthetase condensation, cyclization and epimerization domains. *Nat. Struct. Biol.* **9** (2002) 522–526

38. D. E. Ehmann, J. W. Trauger, T. Stachelhaus, C. T. Walsh: Aminoacyl-SNACs as small-molecule substrates for the condensation domains of nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* **7** (2000) 765–772

39. K. Bloudoff, D. Rodionov, T. M. Schmeing: Crystal structures of the first condensation domain of CDA synthetase suggest conformational changes during the synthetic cycle of nonribosomal peptide synthetases. *J. Mol. Biol.* **425** (2013) 3137–3150

40. S. A. Samel, G. Schoenafinger, T. A. Knappe, M. A. Marahiel, and L.O. Essen: Structural and functional insights into a peptide bond-forming bidomain from a nonribosomal peptide synthetase. *Structure*, **15** (2007) 781–792

41. S. D. Bruner, T. Weber, R. M. Kohli, D. Schwarzer, M. A. Marahiel, C. T. Walsh, M. T. Stubbs, Structural basis for the cyclization of the lipopeptide antibiotic surfactin by the thioesterase domain SrfTE. *Structure*, **10** (2002) 301–310

42. S. A. Samel, B. Wagner, M. A. Marahiel, L. O. Essen: The thioesterase domain of the fengycin biosynthesis cluster: a structural base for the macrocyclization of a non-ribosomal lipopeptide. *J. Mol. Biol.* **359** (2006) 876–889

43. M. A. Marahiel: Protein templates for the biosynthesis of peptide antibiotics. *Chem. Biol.* **4** (1997) 561–567

44. W. Kallow, M. Pavela-Vrancic, R. Dieckmann, H. von Döhren: Nonribosomal peptide synthetases-evidence for a second ATP-binding site. *Biochim. Biophys. Acta*. **1601** (2002) 93–99

45. M. Pavela-Vrancic, R. Dieckmann, H. von Döhren: ATPase activity of non-ribosomal peptide synthetases. *Biochim. Biophys. Acta*. **1696** (2004) 83–91

46. M. Pavela-Vrancic, H. Van Liempt, E. Pfeifer, W. Freist, H. Von Döhren: Nucleotide binding by multienzyme peptide synthetases. *Eur. J. Biochem.* **220** (1994) 535–42

47. R. Dieckmann, M. Pavela-Vrancic, H. von Döhren: Synthesis of (di)adenosine polyphosphates by non-ribosomal peptide synthetases (NRPS). *Biochim. Biophys. Acta*. **1546** (2001) 234–41

48. R. Dieckmann, M. Pavela-Vrancic, E. Pfeifer, H. von Döhren, H. Kleinkauf: The adenylation domain of tyrocidine synthetase 1-structural and functional role of the interdomain linker region and the (S/T)GT(T/S)GXPKG core sequence. *Eur. J. Biochem.* **247** (1997) 1074–1082

49. M. Gocht, M. A. Marahiel: Analysis of core sequences in the D-Phe activating domain of the multifunctional peptide synthetase TycA by site-directed mutagenesis. *J. Bacteriol.* **176** (1994) 2654–2662

50. E. Conti, N. P. Franks, P. Brick: Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Structure*, **4** (1996) 287–298

51. E. Conti, T. Stachelhaus, M. A. Marahiel, P. Brick: Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *EMBO J.* **16** (1997) 4174–4183

52. T. Stachelhaus, H. D. Mootz, M. A. Marahiel: The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* **6** (1999) 493–505

53. G. L. Challis, J. Ravel, C. A. Townsend: Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *Chem. Biol.* **7** (2000) 211–224

54. B. R. M. Villiers, F. Hollfelder: Mapping the limits of substrate specificity of the adenylation domain of TycA. *Chembiochem*, **10** (2009) 671–682

55. T. V. Lee, L. J. Johnson, R. D. Johnson, A. Koulman, G. A. Lane, J. S. Lott, V. L. Arcus,: Structure of a eukaryotic nonribosomal peptide synthetase adenylation domain that activates a large hydroxamate amino acid in siderophore biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **285** (2010) 2415–2427

56. L. Du, Y. He, Y. Luo: Crystal structure and enantiomer selection by D-alanyl carrier protein ligase DltA from Bacillus cereus. *Biochemistry*, **47** (2008) 11473–11480

57. J. A. Sundlov, D. M. Fontaine, T. L. Southworth, B. R. Branchini, A. M. Gulick: Crystal structure of fire fly luciferase in a second catalytic conformation supports a domain alternation mechanism. *Biochemistry*, **51** (2012) 6493-6495

58. K. T. Osman, L. Du, Y. He, Y. Luo: Crystal structure of Bacillus cereus D-alanyl carrier protein ligase (DltA) in complex with ATP. *J. Mol. Biol.* **388** (2009) 345–355

59. A. M. Gulick, V. J. Starai, A. R. Horswill, K. M. Homick, J. C. Escalante-Semerena: The 1.75 A crystal structure of acetyl-CoA synthetase bound to adenosine-5'-propylphosphate and coenzyme A. *Biochemistry*, **42** (2003) 2866–2873

60. H. Yonus, P. Neumann, S. Zimmermann, J. J. May, M. A. Marahiel, M. T. Stubbs: Crystal Structure of DltA: Implications for the reaction mechanism of non-ribosomal peptide synthetase adenylation domains. *J. Biol. Chem.* **283** (2008) 2484–32491

61. R. Wu, A. S. Reger, X. Lu, A. M. Gulick, D. Dunaway-Mariano: The mechanism of domain alternation in the acyl-adenylate forming ligase superfamily member 4-chlorobenzoate: coenzyme A ligase. *Biochemistry*, **48** (2009) 4115–4125

62. M. Strieker, A. Tanović, M. A. Marahiel: Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **20** (2010) 234–240

63. V. Bučević-Popović, M. Sprung, B. Soldo, and M. Pavela-Vrančič: The A9 core sequence from NRPS adenylation domain is relevant for thioester formation. *Chembiochem*, **13** (2012) 1913–1920

64. C. A. Mitchell, C. Shi, C. C. Aldrich, A. M. Gulick: Structure of PA1221, a nonribosomal peptide synthetase containing adenylation and peptidyl carrier protein domains. *Biochemistry*, **51** (2012) 3252–3263

65. B. R. Miller, J. A. Sundlov, E. J. Drake, T. A. Makin, A. M. Gulick: Analysis of the linker region joining the adenylation and carrier protein domains of the modular nonribosomal peptide synthetases. *Proteins*, **82** (2014) 2691–2702

66. M. A. Marahiel, M. M. Nakano, P. Zuber: Regulation of peptide antibiotic production in Bacillus. *Mol. Microbiol.* **7** (1993) 631–636

67. R. M. Kohli, C. T. Walsh, M. D. Burkar: Biomimetic synthesis and optimization of cyclic peptide antibiotics. *Nature*, **418 (**2002) 658–661

68. H. Lin, D. A. Thayer, C. H. Wong, C. T. Walsh: Macrolactamization of glycosylated peptide thioesters by the thioesterase domain of tyrocidine synthetase. *Chem. Biol.* **11** (2004) 1635–1642

69. H. D. Mootz, M. A. Marahiel: The tyrocidine biosynthesis operon of Bacillus brevis : Complete nucleotide sequence and biochemical characterization of functional internal adenylation domains. *J. Bacteriol.* **179** (1997) 6843-6850

70. V. Bucević-Popović, M. Pavela-Vrancic, R. Dieckmann, H. Von Döhren: Relationship between activating and editing functions of the adenylation domain of apo-tyrocidin synthetase 1 (apo-TY1). *Biochimie*, **88** (2006) 265–270

71. B. Villiers, F. Hollfelder: Directed evolution of a gatekeeper domain in nonribosomal peptide synthesis. *Chem. Biol.* **18** (2011) 1290–1299

72. J. T. Vivian, P. R. Callis: Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. *Biophys. J.* **80** (2001) 2093–2109

73. J. R. Lakowitz: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, New York, 2006.

74. C. P. Pan, P. L. Muiño, M. D. Barkley, P. R. Callis: Correlation of tryptophan fluorescence spectral shifts and lifetimes arising directly from heterogeneous environment. *J. Phys. Chem.* **115** (2011) 3245–3253

75. Y. Chen, M. D. Barkley: Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins. *Biochemistry*, **37** (1998) 9976–9982

76. R. Pan, I. Image, X. J. Zhang, I. I. Image, Z. J. Zhang, Y. Zhou, W. X. Tian, R. Q. He: Substrate-induced changes in protease active site conformation impact on subsequent reactions with substrates. *J. Biol. Chem.* **285** (2010) 22950–22956

77. A. Hawe, M. Sutter, W. Jiskoot: Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization. *Pharm. Res.* **25** (2008) 1487–1499

78. T. N. Vlasova, N. N. Ugarova: Quenching of the fluorescence of Tyr and Trp residues of firefly luciferase from Luciola mingrelica by the substrates. *Biochem. Biokhimiia*, **72** (2007) 962–967

79. N. N. Ugarova: Interaction of firefly luciferase with substrates and their analogs: a study using fluorescence spectroscopy methods. *Photochem. Photobiol. Sci.* **7** (2008) 218–227

80. Z. Amini-Bayat, S. Hosseinkhani, R. Jafari, K. Khajeh: Relationship between stability and flexibility in the most flexible region of Photinus pyralis luciferase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1824** (2012) 350–358

81. A. Riahi-Madvar, S. Hosseinkhani: Design and characterization of novel trypsin-resistant firefly luciferases by site-directed mutagenesis. *Protein Eng. Des. Sel.* **22** (2009) 655–663

82. S. Khalil, P. D. Pawelek: Ligand-induced conformational rearrangements promote interaction between the Escherichia coli enterobactin biosynthetic proteins EntE and EntB. *J. Mol. Biol.*, vol. **393** (2009) 658-671

83. S. Khalil, P. D. Pawelek: Enzymatic adenylation of 2,3-dihydroxybenzoate is enhanced by a protein-protein interaction between Escherichia coli 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase (EntA) and 2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase (EntE). *Biochemistry*, **50** (2011) 533–45

84. J. Zettler, H. D. Mootz: Biochemical evidence for conformational changes in the cross-talk between adenylation and peptidyl-carrier protein domains of nonribosomal peptide synthetases. *FEBS J.* **277** (2010) 1159–1171

85. M. Bradford: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72** (1976) 248-154

86. *The QIA expressionist*, 5th ed. (2003), Qiagen

87. T. Stachelhaus, H. D. Mootz, V. Bergendahl, M. A. Marahiel: Peptide bond formation in nonribosomal peptide biosynthesis. Catalytic role of the condensation domain. *J. Biol. Chem.* **273** (1998) 22773–22781

88. M. R. Webb: A continuous spectrophotometric assay for inorganic phosphate and for measuring phosphate release kinetics in biological systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89** (1992) 4884–4887

89. A. Fontana, P. P. De Laureto, B. Spolaore, E. Frare, P. Picotti, M. Zambonin: Probing protein structure by limited proteolysis. *Acta Biochem. Pol.* **51** (2004) 299-321

90. W. Stryjewski, Z. Wasylewski: The resolution of heterogeneous fluorescence of multitryptophan-containing proteins studied by a fluorescence-quenching method. *Eur. J. Biochem.* **158** (1986) 547–553

91. L. Willard: VADAR: a web server for quantitative evaluation of protein structure quality. *Nucleic Acids Res.* **31** (2003) 3316–3319

92. V. Bučević-Popović: Nerisbosomske peptid-sintetaze: utjecaj očuvanih regija adenilacijske domene na strukturna i funkcionalna obilježja tirocidin-sintetaze 1. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, 2010.

93. R. Dieckmann, M. Pavela-Vrancic, H. von Döhren, H. Kleinkauf: Probing the domain structure and ligand-induced conformational changes by limited proteolysis of tyrocidine synthetase 1. *J. Mol. Biol.* **288** (1999) 129–140

94. A. Maravić, M. Skočibušić, M. Sprung, I. Samanić, J. Puizina, M. Pavela-Vrančić: Occurrence and antibiotic susceptibility profiles of Burkholderia cepacia complex in coastal marine environment. *Int. J. Environ. Health Res.* **22** (2012) 531–542

95. M. J. Blaser: Missing Microbes: How the Overuse of Antibiotics Is Fueling Our Modern Plagues. *Henry Holt and Company LLC, New York*, 2014

96. A. Schneider, T. Stachelhaus, M. A. Marahiel: Targeted alteration of the substrate specificity of peptide synthetases by rational module swapping. *Mol. Gen. Genet.* **257** (1998) 308–318

97. T. Stachelhaus, A. Schneider, M. A. Marahiel: Rational design of peptide antibiotics by targeted replacement of bacterial and fungal domains. *Science*, **269** (1995) 69–72

98. T. Duerfahrt, S. Doekel, T. Sonke, P. J. L. M. Quaedflieg, M. A. Marahiel: Construction of hybrid peptide synthetases for the production of alpha-l-aspartyl-l-phenylalanine, a precursor for the high-intensity sweetener aspartame. *Eur. J. Biochem.* **270** (2003) 4555–4563

99. T. J. McQuade, A. D. Shallop, A. Sheoran, J. E. Delproposto, O. V Tsodikov, S. Garneau-Tsodikova: A nonradioactive high-throughput assay for screening and characterization of adenylation domains for nonribosomal peptide combinatorial biosynthesis. *Anal. Biochem.* **386** (2009) 244–250

100. T. V. Lee, L. J. Johnson, R. D. Johnson, A. Koulman, G. A. Lane, J. S. Lott, V. L. Arcus: Structure of a eukaryotic nonribosomal peptide synthetase adenylation domain that activates a large hydroxamate amino acid in siderophore biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **285** (2010) 2415–5427

101. A. M. Lesk: *Introduction to protein architecture: The structural biology of proteins.* Oxford university press, 2001.

102. J. R. Lai, M. A. Fischbach, D. R. Liu, C. T. Walsh: A protein interaction surface in nonribosomal peptide synthesis mapped by combinatorial mutagenesis and selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103** (2006) 5314–5319

103. J. R. Lai, M. A. Fischbach, D. R. Liu, C. T. Walsh: Localized protein interaction surfaces on the EntB carrier protein revealed by combinatorial mutagenesis and selection. *J. Am. Chem. Soc.* **128** (2006) 11002–11003

104. Z. Zhou, J. R. Lai, C. T. Walsh: Directed evolution of aryl carrier proteins in the enterobactin synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104** (2007) 11621–11626

105. M. Pavela-Vrancic, R. Dieckmann, H. V Döhren, H. Kleinkauf: Editing of non-cognate aminoacyl adenylates by peptide synthetases. *Biochem. J.* **342** (1999) 715–719

106. B. R. M. Villiers, F. Hollfelder: Mapping the limits of substrate specificity of the adenylation domain of TycA. *Chembiochem*, **10** (2009) 671–682

107. B. W. Stevens, R. H. Lilien, I. Georgiev, B. R. Donald, A. C. Anderson: Redesigning the PheA domain of gramicidin synthetase leads to a new understanding of the enzyme's mechanism and selectivity. *Biochemistry*, **45** (2006) 15495–15504

108. L. Luo, M. D. Burkart, T. Stachelhaus, C. T. Walsh: Substrate recognition and selection by the initiation module PheATE of gramicidin S synthetase. *J. Am. Chem. Soc.* **12** (2001) 11208–11218

8. POPIS KRATICA

A	adenilacijska domena
aa	aminokiselina, aminoacil-
aa-AMP	aminoacil-adenilat
Acs	acetil-CoA-sintetaza
ACP	protein-nosač acilne skupine
ADEP	acildepsipeptidi
AMP	adenozin-monofosfat
APS	amonijev persulfat
ATP	adenozin-trifosfat
BSA	albumin iz goveđeg seruma
C	kondenzacijska domena
4CBAL	4-klorobenzoat-CoA-ligaza
CDPS	ciklodipeptid-sintetaza
Cis-AMHO	N^{δ}-*cis*-anhidromevalonil-N^{δ}-hidroksi-L-ornitina
CoA	koenzim A
DltA	D-alanin-(protein-nosač)-ligaza
DTE	1,4-ditioeritritol
DTT	1,4-ditiotreitol
engl.	engleski
E	epimerazna domena
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
f_0	frakcijski doprinos nedostupne komponente gašenju
f_a	frakcija fluorescencije dostupna gašenju
f_i	frakcijski doprinos komponente 'i' fluorescnenciji
FPLC	*fast protein liquid chromatography*
GrsA	gramicidin S-sintetaza 1
HPLC	*high-performance liquid chromatography*
HEPES	4-(2-hidroksietil)piperazin-1-etansulfonska kiselina
His-tag	histidinski privjesak
IPP	pirofosfataza
IPTG	izopropil-*β*-D-tiogalaktopiranozid
k_{cat}	obrtni broj
K_d	konstanta disocijacije
K_M	Michaelisova konstanta
K_{SV}	Stern-Volmerova konstanta

LB	Luria-Bertani
MESG	2-amino-6-merkapto-7-metilpurin-ribonukleozid
Ni-NTA	nikal(II)-nitrilotrioctena kiselina
OD_{600}	optička gustoća bakterijskih kultura mjerena spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 600 nm
NRP	neribosomski sintetizirani peptid
NRPS	neribosomska peptid-sintetaza
PCP	protein-nosač peptidilne skupine
PheA	A-domena gramicidin S-sintetaze 1
P_i	fosfat, PO_4^{3-}
PIPES	piperazin-*N,N'*-bis(2-hidroksipropansulfonska kiselina)
PNP	purin-nukleozid-fosforilaza
PMSF	fenilmetansulfonil-fluorid
PP_i	pirofosfat, $P_2O_7^{4-}$
SDS	natrijev dodecilsulfat
SDS-PAGE	elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog Dodecilsulfata
Sfp	surfaktinska fosfopanteteinil-transferaza
T	tiolacijska domena
TCA	trikloroctena kiselina
TE	tioesterazna domena
TFA	trifluoroctena kiselina
TEMED	*N,N,N',N'*-tetrametiletilendiamin
Tris	tris(hidroksimetil)-aminometan
TycA	tirocidin-sintetaza 1
TycA-A	A-domena tirocidin-sintetaze 1
TycA-T_1	T-domena tirocidin-sintetaze 1 s linkerom na N-terminalnom kraju
TycA-T_2	T-domena tirocidin-sintetaze 1 bez linkera na N-terminalnom kraju
VibH	vibriobaktin-sintetaza

Aminokiseline

Ala	A	alanin
Arg	R	arginin
Asn	N	asparagin
Asp	D	asparaginska kiselina
Cys	C	cistein

L-PheSer		D,L-treo-*β*-fenilserin
Gln	Q	glutamin
Glu	E	glutaminska kiselina
Gly	G	glicin
His	H	histidin
Ile	I	izoleucin
Leu	L	leucin
Lys	K	lizin
Met	M	metionin
Orn		ornitin
Phe	F	fenilalanin
Pro	P	prolin
Ser	S	serin
Thr	T	treonin
Trp	W	triprofan
Tyr	Y	tirozin
Val	V	valin

9. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 22. kolovoza, 1980. godine u Splitu. Osnovnu i srednju školu (Klasičnu gimnaziju) završila sam u Splitu. Studij biologije i kemije (profesorski smjer) na Fakultetu prirodoslovno-matematičkih znanosti i odgojnih područja u Splitu, upisala sam 2000. godine. Diplomski rad 'Zamjena Gln83 s Leu alkalne fosfataze iz *Escherichia coli* usmjerenom mutagenezom *phoA* gena' izrađen je pod vodstvom prof. dr. sc. Maje Pavela-Vrančić, 2005. Nakon tromjesečnog stručnog usavršavanja na američkoj klinici *Mayo*, izabrana sam u svojstvo znanstvenog novaka na Odjelu za kemiju, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta pod mentorstvom dr. sc. Maje Pavela-Vrančić. Kao asistent sudjelujem u izvođenju nastave iz više predmeta u području biokemije i biotehnologije. Suvoditelj sam jednog diplomskog rada.

Znanstvene publikacije:

1. Šprung, M., Bučević-Popović, V., Soldo, B., Pavela-Vrančić, M. & Orhanović, S. Influence of subunit interface mutations on kinetic and dynamic properties of alkaline phosphatase from E.coli. *Croatica chemica acta*. **86** (2013).
2. Bučević Popović, V., Šprung, M., Soldo, B. & Pavela-Vrančić, M. The A9 core sequence from NRPS adenylation domain is relevant for thioester formation. *ChemBioChem*. **13** (2012).
3. Maravić, A., Skočibušić, M., Šprung, M., Šamanić, I., Puizina, J. & Pavela-Vrančić, M. Occurrence and antibiotic susceptibility profiles of Burkholderia cepacia complex in coastal marine environment. *International journal of environmental health research*. **22** (2012).

Priopćenja na znanstvenim skupovima :

1. Orhanović, S., Šprung, M., Bučević-Popović, V. &Pavela-Vrančić, M. Utjecaj mutacija na dodirnoj površini podjedinica na kinetičke i dinamičke karakteristike alkalne fosfataze kod E. coli. *Znanstveni simpozij 50 godina molekularne biologije u Hrvatskoj,* 2008.
2. Bučević-Popović, V., Šprung, M., Soldo, B., Orhanović, S. & Pavela-Vrančić, M. Exploring the role of a conserved motif in the adenylation domain of a non-ribosomal peptide synthetase from Bacillus brevis. *The Secret Life of Biomolecules, 10th Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology, Book of abstracts,* 2008.
3. Bučević-Popović, V., Orhanović, S., Šprung, M., Soldo, B. & Pavela-Vrančić, M. Adenylation domain of nonribosomal peptide sythetase - the role of conserved motifs and protein-protein interactions. *Protein interaction modules - FEBS Practical Course*. 2009.
4. Šprung, M., Bučević-Popović, V., Orhanović, S., Soldo, B. & Pavela-Vrančić, M. Protein-protein interactions between the adenylation and peptidyl carrier domain in tyrocidine

sythetase 1. *Supramolecular structure and function – 1 th International Summer school on biophysics, Book of abstracts,* 2009.

5. Bučević-Popović, V., Šprung, M., Soldo, B., Orhanović, S. & Pavela-Vrančić, M. Exploring the role of a conserved motif in the adenylation domain of a non-ribosomal peptide synthetase from Bacillus brevis. *The Secret Life of Biomolecules, 10th Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology, Book of abstracts,* 2009.
6. Bučević-Popović, V., Šprung, M., Soldo, B., Orhanović, S. & Pavela-Vrančić, M. Exploring the role of a conserved motif in the adenylation domain of a non-ribosomal peptide synthetase from Bacillus brevis. Abstract of the 35th FEBS Congres, The FEBS Journal Volume 277, 2010.
7. Šprung, M., Orhanović, S., Bučević-Popović, V., Soldo, B. & Pavela-Vrančić, M. Kinetic and dynamic properties of interface mutants of alkaline phosphatase from *E.coli*. *Abstract of the 35th FEBS Congres, The FEBS Journal Volume 277,* 2010.
8. Šprung, M., Bučević-Popović, V., Soldo B., Orhanović S., & Pavela-Vrančić, M. Substrate induced conformational changes in adenylation-domain of Tyrocidine-synthetase one probed by intrinsic Trp fluorescence. *The Interplay of Biomolecules, Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology, Book of abstracts*, 2014.