Mehanizmi popravka pogreške leucil-tRNA-sintetaze sprječavaju nekanonsku mistranslaciju proteoma bakterije Escherichia coli

Cvetešić, Nevena

Doctoral thesis / Disertacija

2015

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:217:762578

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

Nevena Cvetešić

MEHANIZMI POPRAVKA POGREŠKE LEUCIL-tRNA-**SINTETAZE SPRJEČAVAJU** NEKANONSKU MISTRANSLACIJU PROTEOMA BAKTERIJE *ESCHERICHIA COLI*

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2015.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Nevena Cvetešić

PROOFREADING ACTIVITIES OF LEUCYL-tRNA SYNTHETASE PREVENT NONCANONICAL MISTRANSLATION OF *ESCHERICHIA COLI* PROTEOME

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2015.



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Nevena Cvetešić

MEHANIZMI POPRAVKA POGREŠKE LEUCIL-tRNA-**SINTETAZE SPRJEČAVAJU** NEKANONSKU MISTRANSLACIJU PROTEOMA BAKTERIJE *ESCHERICHIA COLI*

DOKTORSKI RAD

Mentor:
dr. sc. Ita Gruić Sovulj, izv. prof.

Zagreb, 2015.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Nevena Cvetešić

PROOFREADING ACTIVITIES OF LEUCYL-tRNA SYNTHETASE PREVENT NONCANONICAL MISTRANSLATION OF *ESCHERICHIA COLI* PROTEOME

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
dr. sc. Ita Gruić Sovulj, Associate Professor

Zagreb, 2015.

Zahvale

Ova doktorska disertacija nije rezultat samo mog rada, već je puno ljudi značajno pridonijelo njenoj izradi kroz godine…

Najiskrenije hvala:

Mojoj mentorici Iti...neizmjerno sam zahvalna na prilici za izradu ove doktorske disertacije. No, još više sam zahvalna na strpljivosti i trudu koji je uložila ne samo u razvoj ove disertacije, već u razvoj i izgradnju mene kao mlade znanstvenice i osobe.

Morani...koja je uvijek slušala moja pitanja oko eksperimenata i pomagala u rješavanju svih nedoumica.

Jasmini…jer mi je uvijek pružala podršku i utjehu i veselila se mojim uspjesima.

Marku…koji je uvijek samnom rješavao sve znanstvene, ali često i neznanstvene probleme.

Mirni…na beskrajnoj podršci i prijateljstvu.

Profesorici Ivani Weygand-Đurašević…što je vjerovala u moj potencijal.

Svim sadašnjim i bivšim članovima Zavoda za biokemiju na brojnim savjetima i ugodnoj radnoj atmosferi…
A to su:
Maja, Mario, Ana, Jelena, Vlatka, Igor, Sonja, Vesna, Nina, Mirela, Boris, Željka, Anđelka.

Dragim suradnicima na značajnom znanstvenom doprinosu ovoj disertaciji, a to su:
Mario Cindrić i društvo iz Planinske, Boris Maček i Maja Šemanjski

Mojim diplomandicama Ireni i Nikolini…

Mojim prijateljima…

Tati...koji podržava i razumije moje izbivanje iz svakodnevnog života...

Sadržaj

SAŽETAK ..... **XI**
ABSTRACT ..... **XII**
1 Uvod **1**
2 Literaturni pregled **5**
2.1 Biosinteza proteina 5
2.2 tRNA 9
2.2.1 Strukturne značajke molekula tRNA 9
2.2.2 Elementi identiteta 12
2.3 Aminoacil-tRNA-sintetaze 12
2.3.1 Podjela aminoacil-tRNA-sintetaza 13
2.3.2 Reakcija aminoaciliranja 14
2.3.3 Točnost aminoaciliranja 16
2.3.4 Mehanizmi popravka pogreške aminoacil-tRNA-sintetaza 17
2.4 Izoleucil- i valil-tRNA-sintetaza 19
2.5 Leucil-tRNA-sintetaza 21
2.5.1 Strukturna obilježja LeuRS 21
2.5.2 Točnost reakcije aminoaciliranja 23
2.5.2.1 Popravak pogreške prije prijenosa aminokiseline 24
2.5.2.2 Popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline 25
2.5.3 Funkcionalni ciklus *E. coli* LeuRS 28
2.6 Uloga elongacijskog faktora Tu u sprječavanju pogrešne biosinteze proteina 29
2.7 Norvalin 31
2.8 Pogrešna biosinteza proteina 34
2.8.1 Točnost biosinteze proteina 34
2.8.2 Učinak mistranslacije na stanicu 35
3 Materijali i metode **38**
3.1 Materijali 38
3.1.1 Standardne kemikalije 38
3.1.2 Aminokiseline i nukleotidi 38
3.1.3 Boje 39
3.1.4 Enzimi, proteini i nukleinske kiseline 39
3.1.5 Komercijalni kompleti za pročišćavanje DNA 39
3.1.6 Radioaktivno obilježeni spojevi 39

3.1.7 Hranjive podloge i mediji za uzgoj bakterije *E. coli* 39
3.1.7.1 Tekuća hranjiva podloga Luria-Bertani (LB): 39
3.1.7.2 Minimalni medij M9 39
3.1.7.3 Krute hranjive podloge LB: 40
3.1.8 *E. coli* sojevi i plazmidi 40
3.1.8.1 Sojevi 40
3.1.8.2 Plazmidi 41
3.1.9 Kromatografske kolone, punila i ostali kromatografski materijali 42
3.1.10 Ostali materijal 42
3.2 Metode 42
3.2.1 Metode rada s bakterijama 42
3.2.1.1 Priprema elektrokompetentnih stanica bakterije *Escherichia coli* 42
3.2.1.2 Transformacija bakterijskih stanica elektroporacijom 43
3.2.1.3 Zamjena gena u genomu bakterije *Escherichia coli* homolognom rekombinacijom 43
3.2.1.4 Testovi toksičnosti nepripadnih aminokiselina *in vivo* (određivanje IC50) 44
3.2.1.5 Uzgoj bakterija u mikroaerobnim uvjetima 45
3.2.1.6 Test vijabilnosti stanica - sposobnost stvaranja kolonija na krutim hranjivim podlogama 45
3.2.2 Metode rada s DNA 46
3.2.2.1 Izolacija plazmidne DNA 46
3.2.2.2 Agarozna gel-elektroforeza 46
3.2.2.3 Određivanje koncentracije nukleinskih kiselina 46
3.2.2.4 Lančana reakcija polimeraze 46
3.2.2.5 Ciljana mutageneza 47
3.2.2.6 Ligacija DNA pomoću T4 DNA-ligaze 47
3.2.2.7 Analiza nukleotidnih sljedova dobivenih sekvenciranjem 48
3.2.3 Metode rada s tRNA 48
3.2.3.1 Izolacija i pročišćavanje ukupne tRNA obogaćene s $tRNA^{Leu}$ 48
3.2.3.2 Denaturirajuća poliakrilamidna gel-elektroforeza u prisustvu ureje 49
3.2.3.3 Dijaliza tRNA 50
3.2.3.4 Obilježavanje tRNA radioaktivnim izotopom [^{32}P] 50
3.2.4 Metode rada s proteinima 51
3.2.4.1 Prekomjerna ekspresija rekombinantnih proteina 51
3.2.4.2 Priprema proteinskih ekstrakata 51

3.2.4.3 Afinitetna kromatografija na Ni-NTA agarozi 52
3.2.4.4 Denaturirajuća poliakrilamidna gel-elektroforeza u prisustvu natrijevog dodecil sulfata 52
3.2.4.5 Ugušćivanje proteina ultrafiltracijom 53
3.2.4.6 Dijaliza proteina 53
3.2.4.7 Određivanje koncentracije proteina 53
3.2.4.7.1 Metoda po Bradfordu 53
3.2.4.7.2 Mjerenje koncentracije proteina na spektrofotometru NanoDrop 1000 54
3.2.5 Kinetičke metode 54
3.2.5.1 Aktivacija aminokiselina mjerena metodom izmjene pirofosfata 54
3.2.5.2 Reakcija aminoaciliranja 56
3.2.5.2.1 Aminoaciliranje uz [^{14}C]-aminokiselinu 56
3.2.5.2.2 Aminoaciliranje uz [^{32}P]-tRNA 57
3.2.5.3 Određivanje akceptorske aktivnosti tRNA 58
3.2.5.4 Prijenos aminokiseline na tRNA 58
3.2.5.5 Određivanje kinetičkog K_D za aminokiselinu pri aminoaciliranju u uvjetima jednog obrtaja enzima 60
3.2.5.6 Reakcija deacilacije 61
3.2.5.6.1 Deacilacija u uvjetima ustaljenog stanja 61
3.2.5.6.2 Deacilacija u uvjetima jednog obrtaja enzima 62
3.2.5.7 Test utroška ATP-a 62
3.2.5.8 Neenzimska hidroliza aminoacil-adenilata u otopini 63
3.2.5.9 Paralelno praćenje nastanka AMP-a i aminoacilirane ili misacilirane tRNA 64
3.2.5.10 Kinetički test za određivanje udjela pripadne aminokiseline u uzorku nepripadne aminokiseline 65
3.2.5.11 Aktivacija elongacijskog faktora Tu 65
3.2.5.12 Određivanje aktivnog udjela EF-Tu 66
3.2.5.13 Određivanje konstante disocijacije ternarnog kompleksa EF-Tu:GTP:aa-tRNA pri 4 °C metodom zaštite aa-tRNA od djelovanja ribonukleaze 67
3.2.5.14 Određivanje koeficijenta brzine disocijacije aa-tRNA iz ternarnog kompleksa EF-Tu:GTP:aa-tRNA pri 4°C 67
3.2.5.15 Određivanje konstante disocijacije ternarnog kompleksa EF-Tu:GTP:aa-tRNA pri 37 °C metodom zaštite aa-tRNA od neenzimske hidrolize 68
3.2.6 Pročišćavanje izoleucina od tragova leucina 69

3.2.7 Kvantitativna spektrometrija masa ... 70
3.2.7.1 Uzgoj *E. coli* i obilježavanje proteoma metodom SILAC ... 70
3.2.7.2 Ekstrakcija proteoma iz *E. coli* u denaturirajućim uvjetima ... 71
3.2.7.3 Precipitacija proteina ... 71
3.2.7.4 Provjera razine ugradnje „teških“ (SILAC) aminokiselina ... 72
3.2.7.5 Razgradnja proteina na peptide u otopini ... 72
3.2.7.6 Frakcioniranje proteoma izoelektričnim fokusiranjem u otopini (*OffGel*) ... 73
3.2.7.7 Pročišćavanje razgrađenih peptida na matrici C_{18} ... 74
3.2.7.8 Nano-HPLC-ESI MS/MS analiza proteoma ... 74
3.2.7.9 Procesiranje podataka i analiza ... 75
4 Rezultati ... 76
4.1 Proizvodnja i pročišćavanje divljeg tipa i mutiranih varijanti *E. coli* LeuRS ... 76
4.2 Proizvodnja i pročišćavanje $tRNA^{Leu}$ ... 78
4.3 Kontaminacija izoleucina tragovima leucina i priprema pročišćenog izoleucina ... 79
4.4 Diskriminacija aminokiselina u reakciji aktivacije ... 82
4.5 Diskriminacija aminokiselina u koraku prijenosa na $tRNA^{Leu}$ ... 85
4.6 Diskriminacija izoleucina u ukupnom aminoaciliranju – određivanje kinetičkog K_D za izoleucin u uvjetima jednog obrtaja enzima ... 88
4.7 Popravak pogreške u prisustvu nepripadnih aminokiselina ... 90
4.7.1 Popravak pogreške prije prijenosa aminokiseline ... 90
4.7.2 Popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline ... 95
4.8 Procjena koeficijenta brzine translokacije 3' kraja tRNA iz sintetskog mjesta u domenu CP1 ... 99
4.9 Proizvodnja i pročišćavanje elongacijskog faktora Tu iz *E. coli* ... 101
4.10 Razvoj modificiranog testa zaštite od razgradnje ribonukleazom ... 104
4.11 Afinitet EF-Tu za Nva-$tRNA^{Leu}$ i Leu-$tRNA^{Leu}$ ... 105
4.12 Toksičnost norvalina i izoleucina za soj *E. coli* sa zamijenjenim genom *leuS* koji kodira za LeuRS s ugašenim popravkom pogreške ... 108
4.13 Vijabilnost soja *E. coli* s ugašenim popravkom pogreške LeuRS u mikroaerobnim uvjetima ... 110
4.14 Analiza mistranslacije leucinskih kodona izoleucinom ili norvalinom kvantitativnom spektrometrijom masa na razini proteoma ... 112
5 Rasprava ... 120
5.1 Glavnu prijetnju točnosti dekodiranja leucinskih kodona ne predstavlja izoleucin, već norvalin ... 120
5.2 LeuRS hidrolizira nepripadne aminoacil-adenilate putem tRNA-neovisnog popravka pogreške ... 126

5.3 $tRNA^{Leu}$ ne stimulira hidrolizu nepripadnih aminoacil-adenilata 127
5.4 Popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline LeuRS sprječava mistranslaciju leucinskih kodona 131
5.5 Fiziološka uloga popravka pogreške LeuRS 132
6 Zaključak 136
7 Popis oznaka, kratica i simbola 138
8 Literaturni izvori 140
9 Životopis XIII

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

MEHANIZMI POPRAVKA POGREŠKE LEUCIL-tRNA-SINTETAZE SPRJEČAVAJU NEKANONSKU MISTRANSLACIJU PROTEOMA BAKTERIJE *ESCHERICHIA COLI*

Nevena Cvetešić

Zavod za biokemiju, Kemijski odsjek, Horvatovac 102A, Zagreb

Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) su enzimi koji kataliziraju povezivanje aminokiseline i tRNA. Povezivanje isključivo pripadnog para presudno je za točnu biosintezu proteina. AaRS koje nisu dovoljno specifične za pripadnu aminokiselinu imaju složene mehanizme popravka vlastitih pogrešaka. Popravak se može odvijati prije (hidroliza aminoacil-adenilata) ili nakon prijenosa aminokiseline na tRNA (hidroliza misacilirane tRNA). U ovoj disertaciji detaljno su okarakterizirane sintetska i hidrolitičke reakcije leucil-tRNA-sintetaze (LeuRS) iz bakterije *E. coli*. Pokazano je da LeuRS ne koristi tRNA-ovisan popravak pogreške prije prijenosa i da pogreške uklanja kroz hidrolizu misacilirane tRNA. Izoleucin je u literaturi istaknut kao dobar supstrat LeuRS koji ugrožava točnost dekodiranja leucinskih kodona. Kinetički eksperimenti pokazuju da LeuRS u sintetskoj reakciji učinkovito isključuje izoleucin, zbog čega popravak pogreške nema ulogu u sprječavanju mistranslacije leucinskih kodona izoleucinom. Nedavno je pokazano da se norvalin, neproteinogena aminokiselina, nakuplja u bakterijskoj citoplazmi u uvjetima nedostatka kisika. Rezultati ove disertacije pokazuju da je glavna biološka funkcija hidrolitičkog popravka LeuRS isključivanje norvalina iz genetičkog koda. Kroz ovo istraživanje otkrivena je poveznica popravka pogreške LeuRS i mehanizama prilagodbe bakterija na rast u uvjetima sa smanjenom količinom kisika.

(145 + XVI stranica, 47 slika, 10 tablica, 165 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: elongacijski faktor Tu/ leucil-tRNA-sintetaza/ mikroaerobni uvjeti/ mistranslacija/ norvalin/ popravak pogreške

Mentor: dr. sc. Ita Gruić-Sovulj, izv. prof.

Ocjenitelji: dr. sc. Branimir Bertoša, doc.
dr. sc. Ita Gruić Sovulj, izv. prof.
dr. sc. Gordana Maravić Vlahoviček, izv. prof.

Rad prihvaćen: 4. ožujka 2015.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

PROOFREADING ACTIVITIES OF LEUCYL-tRNA SYNTHETASE PREVENT NONCANONICAL MISTRANSLATION OF THE *ESCHERICHIA COLI* PROTEOME

Nevena Cvetešić

Biochemistry Laboratory, Department of Chemistry, Faculty of Science, Horvatovac 102A, Zagreb

Aminoacyl-tRNA synthetases (aaRS) are enzymes that catalyse pairing of amino acids and tRNAs. As coupling of cognate pairs is crucial for accurate protein biosynthesis, aaRSs have developed complex proofreading mechanisms for correction of errors made in amino acid selection. Proofreading may occur before (hydrolysis of aminoacyl-adenylate), or after transfer of amino acid to tRNA (hydrolysis of misacylated tRNA). Synthetic and hydrolytic reactions of leucyl-tRNA synthetase (LeuRS) are characterised in detail within this thesis. The results demonstrate that LeuRS lacks tRNA-dependent pre-transfer editing and relies on robust post-transfer editing to clear aminoacylation errors. Isoleucine is generally thought to be a significant threat for accurate leucylation. However, kinetic experiments demonstrate that LeuRS efficiently excludes isoleucine in the synthetic reaction and that hydrolytic repair does not have a role in isoleucine elimination. A recent study showed that norvaline, a non-proteinogenic amino acid, accumulates in bacterial cytoplasm during oxygen deprivation. It appears that the major biological role of LeuRS editing is exclusion of norvaline from the genetic code. Research within this thesis reveals that LeuRS editing is interconnected with cellular mechanisms that ensure bacterial adaptability to low-oxygen environment.

(145 + XVI pages, 47 figures, 10 tables, 165 references, original in Croatian)

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

Keywords: elongation factor Tu/ leucyl-tRNA synthetase/ micro-aerobic conditions/ mistranslation/ norvaline/ proofreading

Supervisor: dr. sc. Ita Gruić-Sovulj, Associate Professor

Reviewers: dr. sc. Branimir Bertoša, Assistant Professor
dr. sc. Ita Gruić Sovulj, Associate Professor
dr. sc. Gordana Maravić Vlahoviček, Associate Professor

Thesis accepted: March 4th, 2015

1 Uvod

Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) su enzimi koji u reakciji aminoaciliranja kataliziraju esterifikaciju tRNA pripadnom aminokiselinom[1]. Reakcija aminoaciliranja odvija se u dva stupnja. U prvom stupnju dolazi do aktivacije aminokiseline, pri čemu je preciznim pozicioniranjem ATP-a i aminokiseline u aktivnom mjestu omogućen nukleofilni napad α-karboksilne skupine aminokiseline na α-atom fosfora ATP-a. Produkt je miješani anhidrid aminoacil-adenilat (aa-AMP) uz oslobođeni pirofosfat. Reakcija aktivacije kod gotovo svih aaRS može se odvijati u odsustvu pripadne tRNA, a iznimka su glutaminil-, glutamil, arginil- te lizil-tRNA-sintetaza razreda I[2]. Drugi stupanj reakcije aminoaciliranja je prijenos acilne skupine s aminoacil-adenilata na tRNA pri nukleofilnom napadu kisika iz 2'- ili 3'-OH skupine riboze krajnjeg adenozina 3'-kraja tRNA, na atom ugljika aminoacil-adenilata. Produkti reakcije aminoaciliranja su tRNA esterificirana aminokiselinom na 3'-kraju i AMP kao izlazna skupina. Reakciju termodinamski povoljnom čini hidroliza pirofosfata oslobođenog prilikom aktivacije aminokiseline, a katalizira ju anorganska pirofosfataza.

Specifično i točno aminoaciliranje tRNA je temeljni preduvjet za ispravan prijenos genetičke informacije. Aminoacil-tRNA-sintetaze su razvile brojne strategije koje im omogućavaju prepoznavanje supstrata u staničnom okruženju. Unatoč tome, prepoznavanje pripadne aminokiseline u pojedinim slučajevima ipak predstavlja problem. tRNA je znatno veća molekula s kojom aaRS ostvaruju niz interakcija, dok pojedine aminokiseline često nemaju dovoljno izražene strukturne razlike da bi ih aaRS mogle jednostavno razlikovati. Primjerice, aktivacija valina katalizirana izoleucil-tRNA-sintetazom (IleRS), svega 200 puta je manje učinkovita od aktivacije pripadnog izoleucina[3]. Aminoacil-tRNA-sintetaze sklonije pogreškama, razvile su mehanizme popravka kako bi ukupna razina pogreške u biosintezi proteina ostala na razini koja je stanici prihvatljiva[4-6] (1 na 10^3-10^4). Mehanizmi popravka pogreške omogućavaju hidrolizu pogrešno aktivirane aminokiseline (aminoacil-adenilata) ili pogrešno aminoacilirane, odnosno misacilirane tRNA (reakcija deacilacije). Za IleRS, valil-tRNA-sintetazu (ValRS) i leucil-tRNA-sintetazu (LeuRS) specifično je postojanje dodatne domene CP1 (CP1 prema engl. *connective peptide* I) umetnute u sintetsko aktivno mjesto. Biokemijskim istraživanjima izdvojene domene CP1 utvrđeno je da je aktivno mjesto za popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline, odnosno za hidrolizu misacilirane tRNA,

smješteno unutar domene CP1 i udaljeno 30 Å od aktivnog sintetskog mjesta[7-10]. Popravak pogreške na razini aminoacil-adenilata može se odvijati u odsustvu tRNA (tRNA-neovisni popravak pogreške prije prijenosa), no također može biti i stimuliran prisustvom tRNA (tRNA-ovisni popravak pogreške prije prijenosa)[5]. Novija istraživanja pokazala su da se tRNA-ovisni kao i tRNA-neovisni popravak prije prijenosa odvija unutar sintetskog aktivnog mjesta gdje nastaje aminoacil-adenilat[11-14], a postavljen je i model kinetičke razdiobe aminoacil-adenilata koji objašnjava udio i važnost tRNA-ovisnog popravka pogreške prije prijenosa u ukupnom popravku pogreške[11, 13]. Naime, ukoliko je prijenos aminokiseline s aminoacil-adenilata na tRNA brži od hidrolize aminoacil-adenilata, češće će nastajati misacilirana tRNA koja se deacilira u domeni CP1. Što je brzina hidrolize aminoacil-adenilata sličnija brzini prijenosa aminokiseline, veća je važnost i udio tRNA-ovisnog popravka pogreške prije prijenosa u ukupnom popravku pogreške.

LeuRS je enzim koji katalizira nastajanje leucil-$tRNA^{Leu}$ i omogućava programiranu ugradnju leucina u polipeptidne lance. Poznato je da LeuRS može aktivirati *in vitro* i neke nepripadne aminokiseline, poput izoleucina i norvalina[15-17]. Pojedini autori navode da učestalost aktivacije izoleucina i norvalina premašuje učestalost eksperimentalno izmjerene dozvoljene pogreške u biosintezi proteina, što navodi na nužnost popravka pogreške za učinkovito sprječavanje njihove ugradnje u polipeptidne lance umjesto leucina.

Objavljene razine diskriminacije izoleucina na razini aktivacije variraju u ovisnosti o provedenoj studiji, stoga nije jasno je li izoleucin zaista dobar supstrat LeuRS, te je li nužan popravak pogreške za sprječavanje ugradnje izoleucina umjesto leucina ili se učinkovito uklanja već na temelju prepoznavanja u sintetskoj reakciji.

Iz literature je poznato da je norvalin vrlo dobar supstrat LeuRS, te da njegovo nakupljanje predstavlja ozbiljnu prijetnju točnosti translacije leucinskih kodona. Norvalin je prirodna neproteinogena aminokiselina za koju je nedavno pokazano da se u uvjetima uzgoja sa smanjenom količinom kisika i uz dodatak glukoze nakuplja u citoplazmi bakterija do milimolarne koncentracije[18]. Također je poznato da se ponekad prilikom prekomjerne ekspresije rekombinantnih proteina, uslijed pogreške ugrađuje norvalin umjesto leucina[19]. Iako je norvalin dosta istraživan kao supstrat LeuRS, nije razriješeno koji je glavni mehanizam popravka pogreške kojim ga LeuRS uklanja iz genetičkog koda. Glavni razlog tome je nepouzdanost literaturnih podataka. Autori dosadašnjih studija često pretpostavljaju da je mehanizam popravka pogreške svojstvo enzima koje je neovisno o supstratu, odnosno

nepripadnoj aminokiselini. Sukladno tim razmišljanjima, napravljena su istraživanja s norvalinom u kojima je mjeren popravak pogreške prije prijenosa s deacilacijski defektnim varijantama LeuRS čija je deacilacijska aktivnost provjerena dodatkom izoleucilirane $tRNA^{Leu}$ [20, 21]. Za mjerenje popravka pogreške prije prijenosa, te donošenje zaključaka o važnosti istog u ukupnom popravku pogreške, izuzetno je važno koristiti varijante enzima s posve ugašenim popravkom pogreške nakon prijenosa. U suprotnom će važnost popravka pogreške prije prijenosa aminokiseline biti preuveličana jer će bilo kakva rezidualna aktivnost popravka pogreške nakon prijenosa biti pogrešno pripisana aktivnosti popravka prije prijenosa.

1.1 Svrha i cilj rada

Unatoč dugogodišnjim istraživanjima bakterijske leucil-tRNA-sintetaze, nisu pruženi odgovori na temeljna mehanistička pitanja. Iz literaturnih podataka nije jasno koje prirodne aminokiseline predstavljaju prijetnju točnosti dekodiranja leucinskih kodona, a nepoznat je i doprinos tRNA-ovisnog popravka pogreške prije ili nakon prijenosa aminokiseline sveukupnom očuvanju točnosti leucilacije. Obzirom na navedeno, specifični ciljevi ove disertacije su:

1. razriješiti predstavlja li izoleucin dobar supstrat za sintetsku reakciju LeuRS, te otkriti uzrok značajnih varijacija u publiciranim faktorima diskriminacije izoleucina
2. utvrditi glavni mehanizam popravka pogreške leucil-tRNA-sintetaze iz bakterije *Escherichia coli* u prisustvu norvalina
3. okarakterizirati popravak pogreške LeuRS u prisustvu izoleucina
4. izmjeriti doprinos tRNA-ovisnog popravka pogreške prije prijenosa aminokiseline, ukoliko postoji
5. utvrditi nužnost popravka pogreške LeuRS u održavanju funkcionalnog proteoma bakterije *E. coli* u normalnim uvjetima rasta, ali i u uvjetima stresa (npr. smanjena količina kisika u mediju)
6. odrediti razinu ugradnje nepripadnih aminokiselina u proteom soja bakterije *E. coli* s ugašenim popravkom pogreške

U ostvarivanju ciljeva 1.-4. korištene su kinetičke metode ustaljenog i predustaljenog stanja koje obuhvaćaju mjerenja aktivacije aminokiseline, prijenosa aminokiseline na tRNA,

hidrolitičkog popravka u sintetskom mjestu te hidrolitičkog popravka u domeni CP1. Za ostvarivanje ciljeva 5. i 6. pripremljeni su sojevi *E. coli* s ugašenim popravkom pogreške LeuRS koristeći metodologiju genetičkog inženjerstva za zamjenu gena u kromosomu *E. coli*. Za određivanje razine ugradnje nepripadnih prirodnih aminokiselina umjesto leucina u proteom *E. coli* korištena je kvantitativna spektrometrija masa.

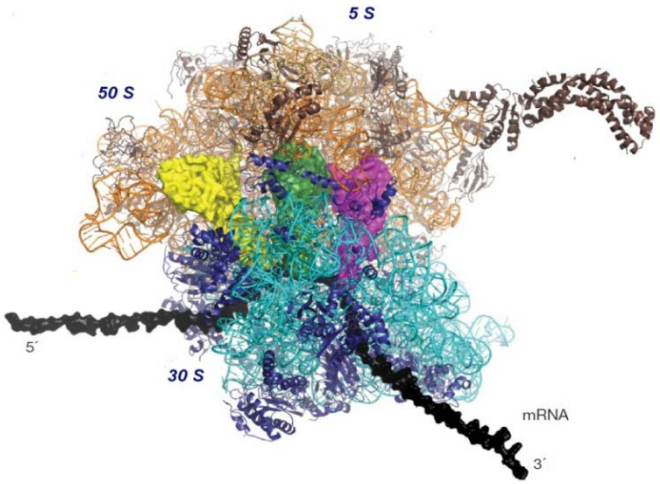
Očekivani znanstveni doprinos ove disertacije obuhvaća razumijevanje mehanizama diskriminacije aminokiselina i mehanizama popravka pogreške leucil-tRNA-sintetaze, te određivanje uloge popravka pogreške u održavanju funkcionalnog proteoma bakterije *Escherichia coli* u različitim uvjetima rasta.

2 Literaturni pregled

2.1 Biosinteza proteina

Za život svakog organizma presudna je brza i regulirana biosinteza proteina kao osnovnih staničnih građevnih jedinica. Biosinteza proteina je očuvani stanični proces kojeg sačinjava nekoliko koraka karakterističnih za sve organizme, od bakterija do viših eukariota. Regulirana biosinteza proteina podrazumijeva trenutnu biosintezu proteina potrebnih kao odgovor na stanični podražaj, ali i njihov transport do odgovarajuće stanične lokacije, te kontroliranu razgradnju nepotrebnih ili nefunkcionalnih proteina.

Prvi preduvjet biosinteze proteina je prepisivanje, odnosno transkripcija gena koji kodiraju za određeni protein u molekulu mRNA (engl. *messenger RNA*). Transkripcija se odvija pomoću enzima RNA-polimeraze, a nastala mRNA se na ribosomu prevodi u protein u procesu translacije. Ribosomi su makromolekulski kompleksi građeni od ribosomske RNA (rRNA) i proteina, a strukturno se sastoje od velike i male podjedinice (Slika 2.1).



Slika 2.1. Struktura prokariotskog (70S[1]) ribosoma. Označene su 50S i 30S podjedinice, 5S rRNA i mRNA[22].

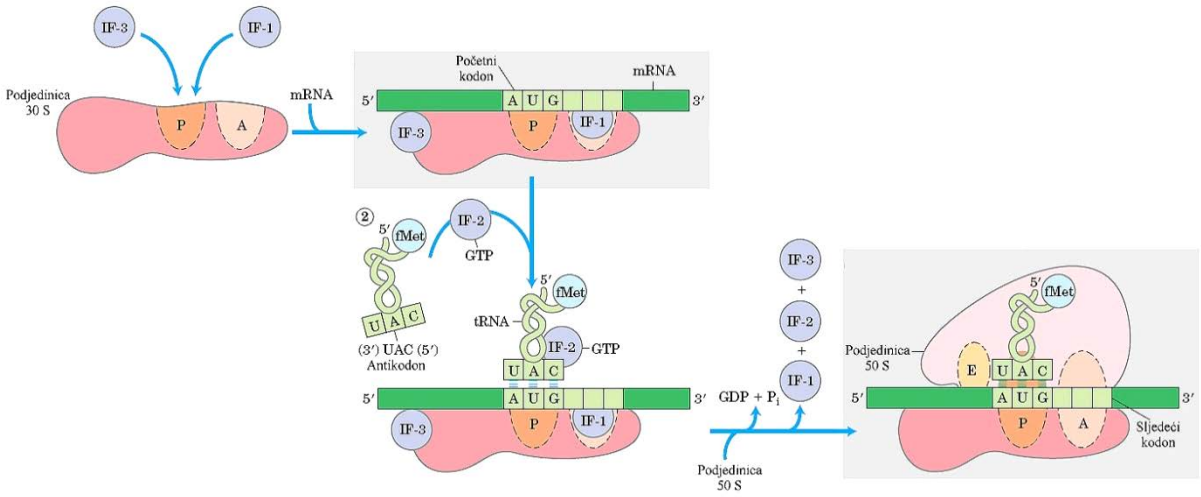
Svi ribosomi vrše istu ulogu, no postoje neke strukturne razlike između prokariotskih i eukariotskih ribosoma[23]. U bakterijskoj stanici je ribosom makromolekulski kompleks veličine 2,5 MDa koji je građen od velike podjedinice ribosoma (50S), sastavljene od oko 30 proteina i 2 rRNA (5S i 23S), te male podjedinice (30S), sastavljene od 20 proteina i 16S

[1] S = Svedberg, mjerna jedinica brzine sedimentacije. 1 S odgovara vremenu od 10^{-13} s.

rRNA. Eukariotski ribosom je nešto veći od bakterijskog, a eukariotska velika (60S) i mala podjednica (40S) tvore kompleks veličine 3,3 MDa[24].

Strukturna i biokemijska istraživanja pokazala su da sintezu peptidne veze katalizira aktivni centar ribosoma, tzv. peptidil-transferaza koja je građena od 23 S rRNA smještene u velikoj podjedinici ribosoma. Prema tome, uz strukturnu ulogu, RNA ima i katalitičku ulogu zbog čega se ribosom svrstava u ribozime[11, 23].

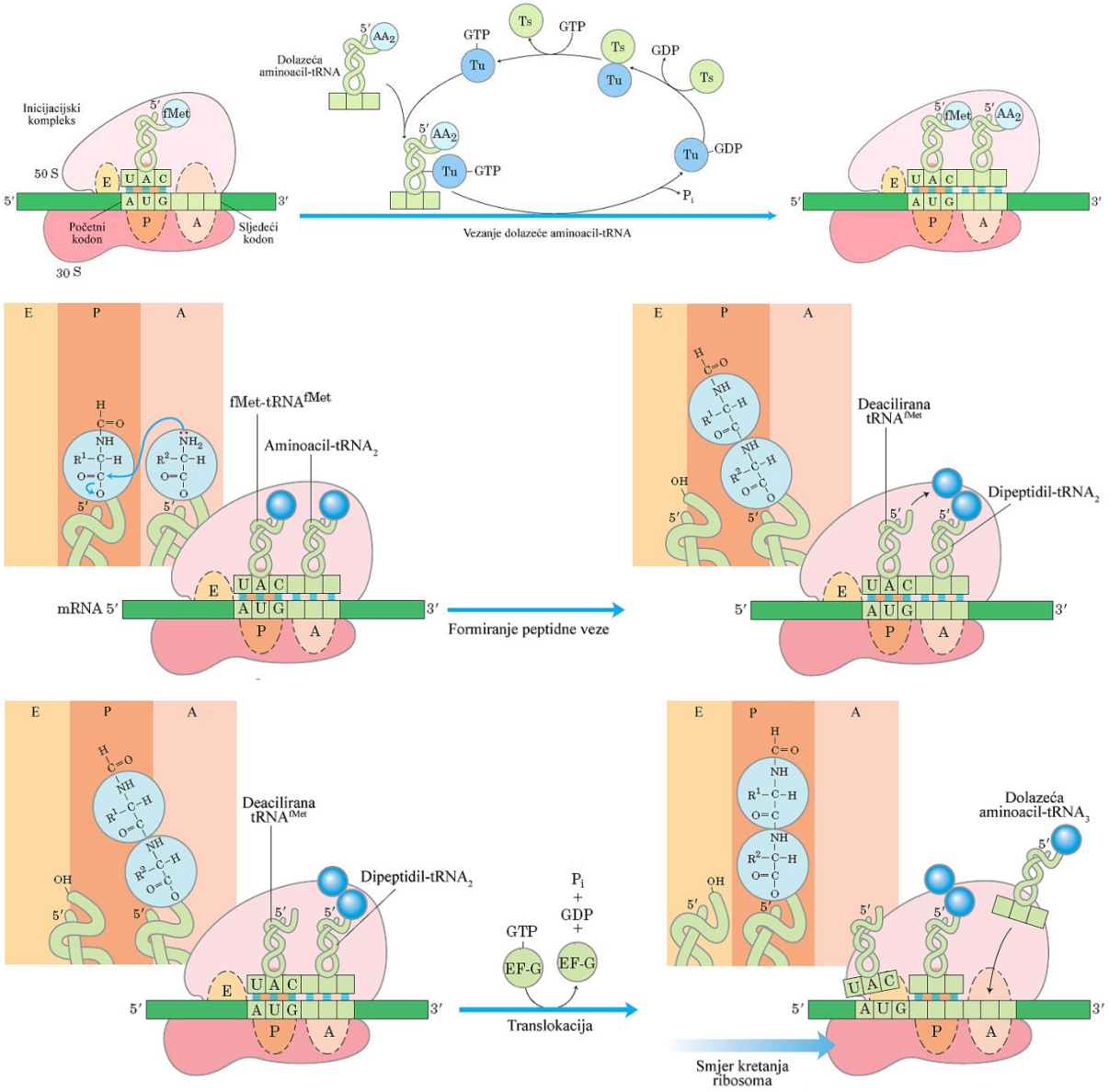
Uz transkripciju, preduvjet biosinteze proteina je i aktivacija aminokiselina. Ulogu aktivacije aminokiselina obavljaju enzimi aminoacil-tRNA-sintetaze (detaljno opisane u poglavlju 2.3) koje vežu aminokiselinu na 3'-kraj pripadne molekule tRNA. Rezultat je aminoacilirana tRNA (aa-tRNA) koja aktiviranu aminokiselinu dovodi na ribosom, a u procesu translacije, na temelju kodon-antikodon prepoznavanja, određuje se redoslijed ugradnje aminokiselina u polipeptidni lanac. Translacija se kao proces može podijeliti u tri koraka, a to su inicijacija, elongacija i terminacija translacije pri čemu se novosintetizirani polipeptidni lanac oslobađa u citoplazmu stanice. U koraku inicijacije translacije sastavlja se tzv. inicijacijski kompleks kojeg sačinjavaju mala i velika podjedinica ribosoma, inicijacijska tRNA, inicijacijski faktori (IF-1, IF-2 i IF-3) i mRNA (Slika 2.2). Za sastavljanje inicijacijskog kompleksa potrebna je energija u obliku GTP-a. Sklapanjem podjedinica oblikuju se tri vezna mjesta na ribosomu: A - mjesto u koje se veže aminoacil-tRNA; P – mjesto u koje se smješta peptidil-tRNA; E (engl. *exit site*) - mjesto iz kojeg tRNA koja je predala aminokiselinu napušta ribosom.



Slika 2.2. Inicijacija translacije proteina. A - mjesto vezanja aminoacil-tRNA, P - mjesto nastajanja peptidil-tRNA, E - mjesto izlaska tRNA, IF-1, IF-2 i IF-3 - inicijacijski faktori, fMet - formilmetionilna skupina. Preuzeto i prilagođeno iz Nelson D. L., Cox M. M. (2008)[25]

Kako ribosom prepoznaje odakle započeti translaciju, odnosno čime je zadan okvir čitanja vezane mRNA? John Shine i Lynne Dalgarno pokazali su da postoji slijed bogat purinima u molekuli mRNA, koji se sparuje s komplementarnim pirimidinskim slijedom u 16S rRNA (30S podjedinica) i time pozicionira prvi kodon (AUG) u mjesto P. Navedeni slijed u mRNA, u čast znanstvenicima koji su ga otkrili, naziva se Shine-Dalgarno slijed[26]. Specifična inicijacijska formilmetionil-tRNA^{fMet} (fMet-tRNA^{fMet}), različita od uobičajene metionil-tRNA^{Met} koja sudjeluje u elongaciji translacije, prepoznaje startni kodon AUG u mjestu P ribosoma, pri čemu se hidrolizira GTP. Inicijacijska tRNA je jedina tRNA koja se veže u mjesto P ribosoma.

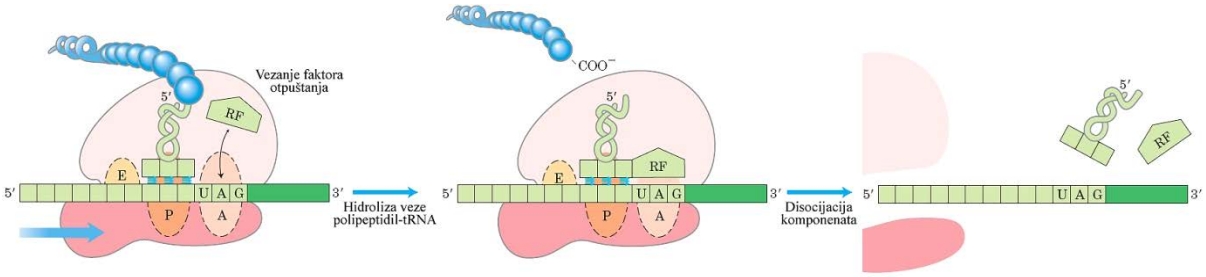
Drugi korak u translaciji je elongacija, pri čemu se peptidni lanac produžuje uzastopnom ugradnjom aminokiselina. Svaku aminokiselinu u mjesto A ribosoma donosi elongacijska tRNA s antikodonom komplementarnim kodonu u mRNA. U elongaciji translacije sudjeluju i proteinski faktori, tzv. elongacijski faktori (EF): Tu, Ts i G. Elongacijski faktor Tu (EF-Tu) (opisan u poglavlju 2.6) veže slobodnu aa-tRNA i omogućava njeno vezanje u mjesto A ribosoma uz utrošak GTP-a. Nastali EF-Tu:GDP je inaktivan oblik EF-Tu, a obnavlja se u aktivan oblik koji može vezati aminoaciliranu tRNA izmjenom GDP-a s GTP-om pomoću elongacijskog faktora Ts. Elongacijski faktor G ima ulogu pomicanja mRNA u odnosu na ribosom nakon ostvarivanja peptidne veze kako bi omogućio pozicioniranje sljedećeg kodona u mjesto A i sparivanje s odgovarajućim antikodonom elongacijske tRNA. Deacilirana tRNA se tada pomiče iz mjesta P u mjesto E, te disocira s ribosoma. tRNA na koju je vezan rastući polipeptidni lanac pomiče se iz mjesta A u mjesto P, a u mjesto A se veže odgovarajuća aa-tRNA (Slika 2.3)[25].



Slika 2.3. Prvi (gore) i drugi (u sredini) korak elongacije, te translokacija (dolje). A - mjesto vezanja aminoacil-tRNA, P - mjesto nastajanja peptidil-tRNA, E - mjesto izlaska tRNA, Tu - elongacijski faktor Tu, Ts - elongacijski faktor Ts, EF-G - elongacijski faktor G, AA_2 - aminoacilna skupina vezana na drugu po redu tRNA, fMet - formilmetionilna skupina. Preuzeto i prilagođeno iz Nelson D. L., Cox M. M. (2008)[25].

Zadnji korak translacije je terminacija, odnosno završetak translacije i otpuštanje novosintetiziranog polipeptidnog lanca (Slika 2.4). Svaki protein se sintetizira od N- prema C-kraju sve dok u mjesto A ribosoma ne dođe neki od stop kodona - UAA, UAG ili UGA. Stop kodone prepoznaju tzv. faktori otpuštanja koji kroz interakciju s peptidil-transferazom mijenjaju njenu konformaciju i omogućavaju vezanje molekule vode te hidrolizu esterske

veze peptidil-tRNA. Polipeptidni lanac se otpušta u citoplazmu stanice, posljednja tRNA prelazi iz mjesta P u mjesto E, te ribosom disocira na sastavne podjedinice. Novosintetizirani polipeptidni lanac postiže svoju funkcionalnost smatanjem u odgovarajuću trodimenzionalnu strukturu, a mnogi proteini se nakon biosinteze još i posttranslacijski modificiraju – npr. fosforiliraju, metiliraju, acetiliraju ili glikoziliraju[27].



Slika 2.4. Završetak translacije proteina. A - mjesto vezanja aminoacil-tRNA, P - mjesto nastajanja peptidil-tRNA, E - mjesto izlaska tRNA, RF - faktor otpuštanja (engl. *release factor*). Preuzeto i prilagođeno iz Nelson D. L., Cox M. M. (2008)[25].

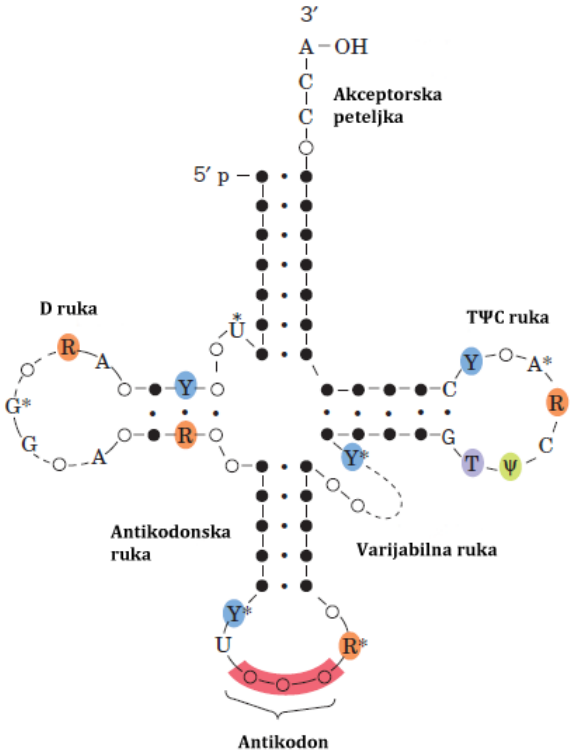
2.2 tRNA

Francis Crick je 1955. godine predložio teoriju o postojanju dvadeset adaptera i dvadeset specijalnih enzima koji bi katalizirali sparivanje odgovarajućih aminokiselina i adaptera. Adaptere je uveo kao molekule koje služe za prijenos informacija zapisanih u molekuli DNA u redoslijed aminokiselina koje grade polipeptidne lance. Crick je prepoznao molekule RNA kao idealne posrednike između svijeta DNA i svijeta proteina zbog mogućnosti komplementarnog sparivanja dušičnih baza, odnosno sparivanja s mRNA. Hipoteza adaptera je potvrđena kada su pedesetih godina Paul Zamecnick i Mahlon Hoagland pokazali da se radioaktivno obilježene aminokiseline vrlo brzo vežu za RNA niske molekulske mase te zatim i ugrađuju u proteine[28]. Nekadašnji adapteri, odnosno RNA niske molekulske mase, danas su poznati kao molekule tRNA (engl. *transfer RNA*).

2.2.1 Strukturne značajke molekula tRNA

Zbog degeneriranosti genetičkog koda, za svaku aminokiselinu postoji skupina izoakceptorskih tRNA u stanici. Molekule tRNA koje pripadaju određenoj skupini izoakceptorskih tRNA, specifične su za istu aminokiselinu, ali se razlikuju antikodonom i prepoznaju različite kodone. Sve molekule tRNA građene su od jednolančane RNA, prosječne

duljine oko 76 nukleotida. Sekundarnu strukturu tRNA prvi je opisao Robert Holley 1965. godine prilikom istraživanja tRNA specifične za alanin ($tRNA^{Ala}$), a izolirane iz pekarskog kvasca, *Saccharomyces cerevisiae*. Holley je pokazao da je sekundarna struktura $tRNA^{Ala}$ oblika lista djeteline, a ubrzo je pokazano i da je taj oblik svojstven svim molekulama tRNA. U sekundarnoj strukturi razlikuju se akceptorska peteljka, D ruka, antikodonska, TΨC te varijabilna ruka (Slika 2.5).



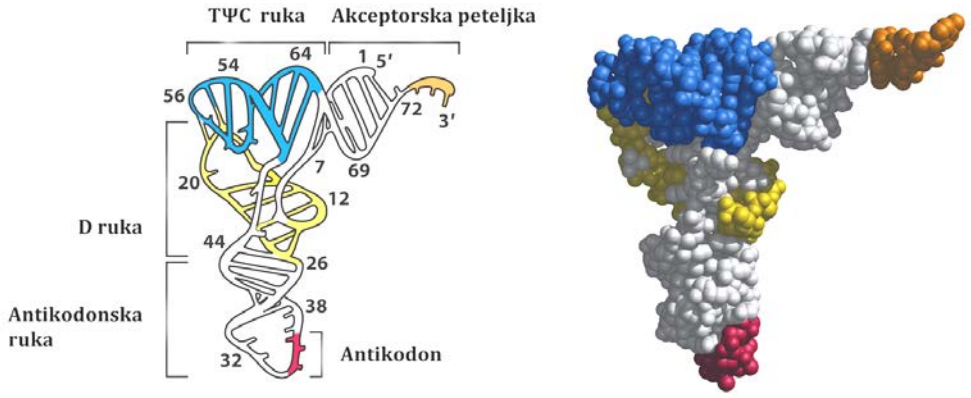
Slika 2.5. Sekundarna struktura tRNA. Puni krugovi povezani točkama predstavljaju Watson-Crickove parove baza, dok prazni krugovi predstavljaju baze koje sudjeluju u ostvarivanju neuobičajenih interakcija. R i Y predstavljaju purinske i pirimidinske baze koje se nalaze na tim položajima unutar primarne strukture svih do sada poznatih molekula tRNA. Zvjezdicom su označene baze koje su najčešće modificirane. Preuzeto i prilagođeno iz Voet D., Voet J. G. (2004)[28].

Akceptorska peteljka sastoji se od 7 parova baza te sadrži 5'- i 3'-kraj tRNA. Na 3'-kraju nalazi se slijed CCA koji je u potpunosti očuvan kod svih tRNA budući da se na krajnji adenozin veže aminokiselina. 5'-kraj molekule tRNA obično završava 5'-fosforiliranim gvanozinom, odnosno gvanilatom. Ruku D čini peteljka D sastavljena od 3 ili 4 para baza te omča u kojoj se pojavljuje modificirana baza dihidrouridin. Antikodonska ruka sastavljena je od peteljke duge 5 parova baza i omče koja sadrži antikodon, triplet baza komplementaran kodonu. Ruku TΨC gradi 5 parova baza duga peteljka sa završetkom u omči koja sadrži slijed TΨC, pri čemu Ψ označava pseudouridin. Varijabilna ruka je mjesto najveće raznolikosti

među poznatim molekulama tRNA. Može sadržavati od 3 do 21 nukleotida te posjedovati peteljku duljine do 7 parova baza. Također, u peteljkama se često pojavljuju neuobičajeni parovi baza poput G•U, U•U, A•A, C•C, C•U ili G•A.

Na temelju duljine varijabilne ruke, molekule tRNA svrstavaju se u dvije skupine. Tip 1 sačinjavaju tRNA s kratkom varijabilnom rukom, duljine 4 ili 5 nukleotida, dok tip 2 čine tRNA s dugom varijabilnom rukom, duljine 13 do 21 nukleotida[29]. Tipični predstavnici tRNA tipa 2 su $tRNA^{Ser}$ i $tRNA^{Leu}$, dok kod nekih tRNA pripadnost pojedinom razredu ovisi o ishodišnom organizmu. Primjerice, $tRNA^{Tyr}$ iz *E. coli* pripada tipu 2, dok se kvaščeva $tRNA^{Tyr}$ svrstava u tip 1.

Uz sekundarnu strukturu, za sve molekule tRNA karakteristična je i očuvana tercijarna struktura. Usporedbom utvrđenih kristalnih struktura tRNA uočena je pravilnost u trodimenzionalnoj strukturi svih molekula tRNA. Tipična konformacija je u obliku slova L, kojem jedan kraj čine akceptorska peteljka i ruka T, dok drugi kraj čine ruka D i antikodonska ruka (Slika 2.6).



Slika 2.6. Tercijarna struktura $tRNA^{Phe}$. Preuzeto i prilagođeno iz: Nelson D. L., Cox M. M. (2008)[25].

U tercijarnoj strukturi se slijed CCA, na kojem je vezana aminokiselina, nalazi na suprotnom kraju molekule u odnosu na antikodon. Takav prostorni raspored idealan je za molekulu koja ima ulogu adaptera između dvije stanične mašinerije jer ih maksimalno prostorno razdvaja. Stabilnost tercijarne strukture osiguravaju sparivanje baza vodikovim vezama i vertikalne hidrofobne interakcije (engl. *base stacking*) koje se ostvaruju između baza.

Dodatnoj raznolikosti molekula tRNA pridonose i posttranskripcijske modifikacije nukleotida. Do danas je poznato čak preko 90 različitih posttranskripcijskih modifikacija[30].

Nije sasvim jasna uloga svake pojedine modifikacije, no poznato je da modifikacije često pogoduju kompaktnosti i stabilnosti nativne trodimenzionalne strukture tRNA, te da mogu imati ulogu u ostvarivanju specifičnih interakcija aminoacil-tRNA-sintetaza (aaRS) i pripadne tRNA[31] (opisano u poglavlju 2.2.2 Elementi identiteta).

2.2.2 Elementi identiteta

Za točnost reakcije aminoaciliranja, presudno je da aaRS veže isključivo pripadnu tRNA u produktivan kompleks. Pod produktivnim kompleksom smatra se kompleks aaRS:tRNA u kojem 3'-kraj tRNA može biti optimalno pozicioniran za sudjelovanje u reakciji prijenosa aminokiseline (aminoaciliranje je opisano u poglavlju 2.3.2). Strukturni elementi koji omogućavaju nastajanje odgovarajućeg para aaRS:tRNA nazivaju se pozitivnim elementima identiteta tRNA[29]. Uz pozitivne postoje i negativni elementi identiteta koji sprječavaju prepoznavanje i aminoaciliranje pogrešnih, nepripadnih tRNA[32]. Nukleotid, ili skupina nukleotida koji djeluju kao pozitivan element identiteta za ostvarivanje interakcije mogu istovremeno predstavljati i negativan element identiteta koji onemogućava produktivnu interakciju s nepripadnom aaRS. Nukleotidi antikodona su vrlo često elementi identiteta. Pokazano je da čak 17 od 20 skupina izoakceptora tRNA iz *E. coli* ima kao element identiteta najmanje jedan nukleotid antikodona[33]. Iznimka su naravno tRNA specifične za aminokiseline koje su kodirane s većim brojem kodona, primjerice leucin ili serin, gdje je raznolikost antikodona unutar izoakceptorske skupine prevelika da bi postojao zajednički pozitivni element identiteta za pripadnu aaRS. Elementi identiteta nisu ograničeni samo na antikodon, već se često nalaze i u akceptorskoj peteljci, varijabilnoj omči ili na poziciji 73 primarne strukture, tzv. diskriminacijska baza[33]. Također, i posttranskripcijske modifikacije tRNA mogu predstavljati elemente identiteta[34].

2.3 Aminoacil-tRNA-sintetaze

Aminoacil-tRNA-sintetaze su enzimi koji kataliziraju esterifikaciju molekule tRNA s pripadnom aminokiselinom u reakciji aminoaciliranja. U literaturi su poznate kao jedine molekule koje znaju genetički kod jer povezuju informaciju zapisanu u molekuli DNA, odnosno prepisanoj mRNA s informacijom o aminokiselini kroz interakciju kodona s komplementarnim antikodonom.

2.3.1 Podjela aminoacil-tRNA-sintetaza

Svaka aaRS je u pravilu specifična za jednu od 20 standardnih aminokiselina i jednu ili više izoakceptorskih tRNA. Zbog strukturnih i mehanističkih razloga dijele se u dva razreda po deset članova[35, 36] (Tablica 2.1). Sve aaRS mogu se svrstati u jedan od dva razreda, a poznata iznimka je lizil-tRNA-sintetaza (LysRS) koja temeljno pripada razredu II, no varijanta prisutna kod većine arheja i nekih bakterija svrstava se u razred I[37, 38]. AaRS koje pripadaju razredu I specifične su za jedanaest aminokiselina: Val, Leu, Ile, Cys, Met, Glu, Gln, Arg, Lys, Tyr i Trp dok su aaRS razreda II specifične za deset aminokiselina: Gly, Thr, Ala, Pro, His, Ser, Asp, Asn, Lys i Phe). Dodatno je svaki razred podijeljen na tri podrazreda – a, b i c (Tablica 2.1) prema kemijskoj sličnosti aminokiselina koje prepoznaju[26].

Tablica 2.1 Podjela aminoacil-tRNA-sintetaza[36]**.**

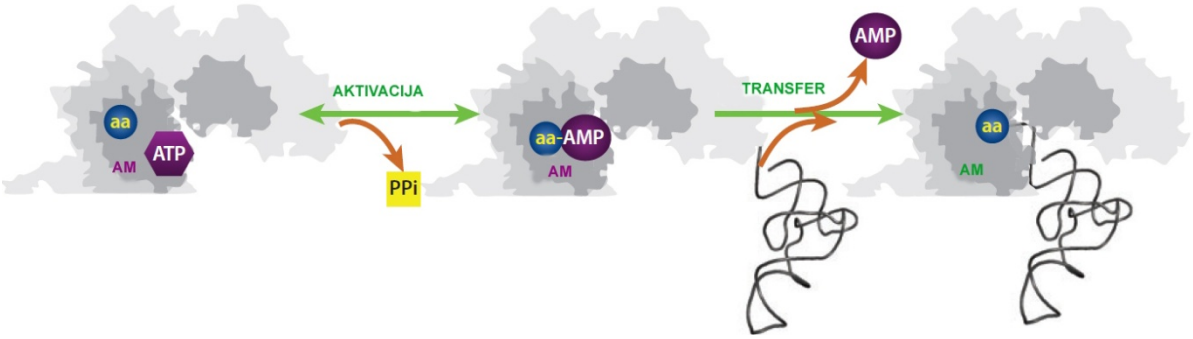
Razred I		**Razred II**	
Podrazred	**aaRS**	**Podrazred**	**aaRS**
a	ValRS	**a**	GlyRS
	LeuRS		ThrRS
	IleRS		AlaRS
	CysRS		ProRS
	MetRS		HisRS
b	GluRS	**b**	SerRS
	GlnRS		AspRS
	ArgRS		AsnRS
	LysRS-I		LysRS-II
c	TyrRS	**c**	PheRS
	TrpRS		

AaRS razreda I uglavnom su monomeri (osim TrpRS i TyrRS), dok su aaRS razreda II uglavnom homo- ili heterodimeri. Aktivno mjesto aaRS razreda I sastavljeno je od dva slična uzastopna β-α-β motiva koji čine šesterolančanu paralelnu β strukturu poznatu kao Rossmannova struktura. Rossmannova struktura karakteristična je za sve proteine koji vežu ATP ili NAD^+ i direktno sudjeluje u vezanju nukleotida. Vezno mjesto za ATP unutar Rossmannove strukture čine dva očuvana aminokiselinska slijeda - motivi KMSKS i HIGH[39].

Strukturnu specifičnost aminoacil-tRNA-sintetaza razreda II čine tri izrazito očuvana slijeda aminokiselina – motiv 1, motiv 2 i motiv 3. Motiv 1 sastoji se od dugačke α zavojnice i gradi dodirnu površinu podjedinica dimera, odnosno tzv. dimerizacijsko sučelje. Motivi 2 i 3 sačinjavaju dijelove aktivnog mjesta. Motiv 2 se sastoji od dva antiparalelna β-lanca povezana dugom petljom, a sudjeluje u vezanju ATP-a, aminokiseline i akceptorskog kraja tRNA[40]. Motiv 3 građen je od β-lanca na kojeg se nastavlja α-zavojnica, a kao i motiv 2 sudjeluje u vezanju ATP-a.

2.3.2 Reakcija aminoaciliranja

Sve aaRS reakciju aminoaciliranja provode u dva koraka. Najprije se aminokiselina aktivira pomoću ATP-a, pri čemu α-karboksilat aminokiseline nukleofilno napada α-atom fosfora ATP-a mehanizmom SN2. Kao produkti nastaju pirofosfat i miješani anhidrid aminoacil-adenilat (aa-AMP) koji ostaje nekovalentno vezan u aktivnom mjestu enzima. Za aktivaciju aminokiseline kod svih aaRS, osim arginil-, glutamil-, glutaminil- i lizil-tRNA-sintetaze razreda I, nije potrebna prisutnost pripadne tRNA u kompleksu s aaRS. U drugom koraku reakcije, kisik iz 2' ili 3'OH skupine adenozina na 3'-kraju tRNA nukleofilno napada α-karbonilni ugljikov atom aminoacil-adenilata, pri čemu nastaje aminoacilirana tRNA i oslobađa se adenilat (AMP)[1] (Slika 2.7). Produkti reakcije aminoaciliranja su tRNA esterificirana na 3'-kraju aminokiselinom i AMP kao izlazna skupina. Anorganska pirofosfataza hidrolizira pirofosfat oslobođen prilikom aktivacije aminokiseline i time reakciju aminaciliranja čini termodinamski povoljnom.

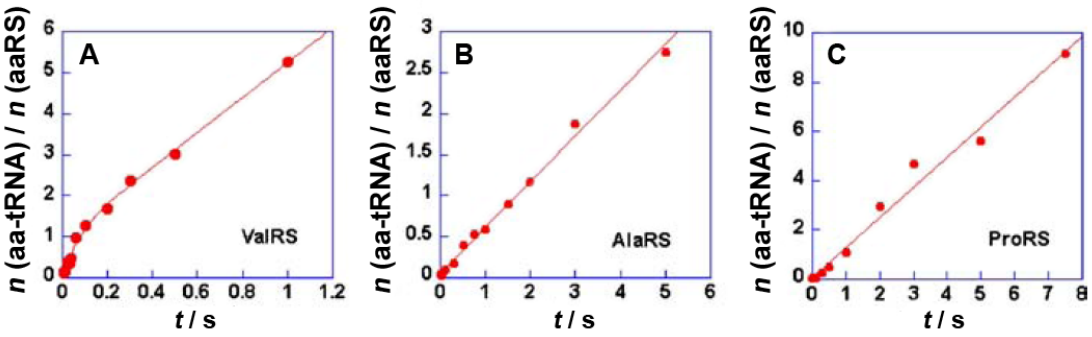


Slika 2.7. Sinteza aminoacil-tRNA. aa - aminokiselina; AM - aktivno mjesto; PP_i - pirofosfat; aa-AMP - aminoacil-adenilat. Preuzeto i prilagođeno iz Ling i sur. 2009[6].

Razlike između sintetaza razreda I i razreda II očituju se u mehanističkim detaljima reakcije aminoaciliranja. Naime, aaRS razreda I pozicioniraju 2'-OH skupinu krajnje riboze u

neposrednu blizinu karbonilnog ugljikovog atoma aminoacil-adenilata, zbog čega aminokiselina završi esterificirana primarno na 2'OH skupini. AaRS razreda II kataliziraju nastajanje 3'-estera aminokiseline i tRNA. Jedini izuzetak od tog pravila je PheRS koja, iako pripada razredu II, kovalentno veže fenilalanin na 2'OH skupinu riboze[41]. Za slobodnu aminoaciliranu tRNA (aa-tRNA u otopini) karakteristična je neenzimska transacilacija aminokiseline između 2'OH i 3'OH skupine[42]. Pravi supstrat u biosintezi proteina je zapravo tRNA esterificirana aminokiselinom na 3'OH kraju. Naime, peptidil-transferazni centar ribosoma u translaciji koristi jedino tRNA esterificiranu na 3'OH skupini riboze. Također i EF-Tu veže isključivo tRNA esterificiranu aminokiselinom na 3'OH skupini, a time pomiče i ravnotežu u smjeru transacilacije na 3'OH skupinu[43].

Za aaRS razreda I specifična je bifazna kinetika nastajanja produkta[44]. U terminologiji enzimske kinetike uvriježeni je termin *burst* kinetika (engl. *burst* – prsnuće, erupcija), pri čemu se *burst* odnosi na kratkotrajno i brzo nastajanje produkta. Vremenski tijek, odnosno krivulja nastanka produkta u vremenu koja je specifična za *burst* kinetiku, sastoji se od eksponencijalnog i linearnog dijela. Eksponencijalni dio krivulje odgovara prvom krugu katalize i mjerenju u predustaljenom stanju, dok linearni dio krivulje predstavlja višestruke obrtaje enzima i odgovara ustaljenom stanju. Koeficijent brzine dobiven iz nagiba linearnog dijela u pravilu se podudara s obrtnim brojem (k_{cat}) dobivenim klasičnom kinetikom Michaelis-Menten u ustaljenom stanju jer predstavlja isti proces. Bifazni oblik krivulje, odnosno prisutnost eksponencijalne i linearne faze objašnjava se postojanjem sporijeg koeficijenta brzine reakcijskog koraka koji slijedi nakon bržeg kemijskog koraka. Sporiji korak u mehanizmu reakcije može biti disocijacija produkta koja ograničava regeneraciju enzima tj. pražnjenje aktivnog mjesta. U mjerenjima se to očituje kao kratkotrajno i vrlo brzo nastajanje produkta u prvom krugu katalize, dok su sljedeći krugovi katalize i nastanka produkta sporiji jer su ograničeni koeficijentom brzine disocijacije produkta iz prethodnog kruga enzimske katalize. *Burst* produkta kod aaRS razreda I upućuje na brz prijenos aminokiseline na tRNA kojeg prati spora disocijacija nastale aminoacilirane tRNA (Slika 2.8).



Slika 2.8 *Burst* kinetiku u reakciji aminoaciliranja pokazuje ValRS. A) *E. coli* ValRS B) *E. coli* AlaRS. C) *Deinococcus radiodurans* ProRS. Preuzeto i prilagođeno iz Zhang i sur. 2006[44].

Koeficijent brzine disocijacije aminoacilirane tRNA, kao najsporiji korak u reakcijskom mehanizmu aaRS razreda I, određuje brzinu aminoaciliranja mjerenu u ustaljenom stanju, odnosno u uvjetima mjerenja višestrukih obrtaja enzima[44]. AaRS razreda II nemaju bifaznu, odnosno *burst* kinetiku, a pretpostavlja se da ukupnu brzinu reakcije aminoaciliranja ograničava brzina aktivacije aminokiseline u prisustvu tRNA[44-46].

AaRS se razlikuju i u načinima vezanja supstrata. AaRS razreda I vežu ATP u izduženoj konformaciji, dok aaRS razreda II vežu ATP u savijenoj konformaciji pri čemu je γ-fosfat ATP-a savijen prema adeninskoj bazi. Razlikuju se i načini vezanja tRNA - aaRS razreda I prilaze pripadnoj tRNA sa strane malog utora, dok aaRS razreda II prilaze pripadnoj tRNA sa strane velikog utora[39].

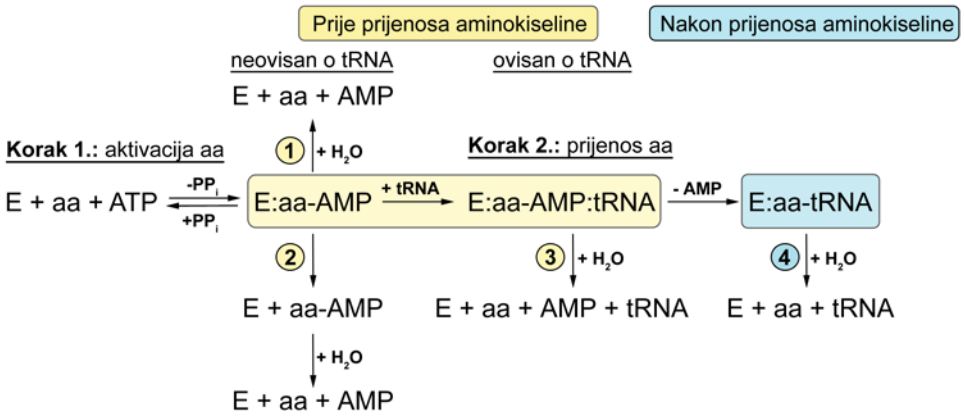
2.3.3 Točnost aminoaciliranja

Specifično i točno povezivanje aminokiseline i pripadne tRNA je temeljni preduvjet za ispravan prijenos genetičke informacije. Ukoliko tRNA esterificirana pogrešnom aminokiselinom završi otpuštena u citoplazmu stanice, uglavnom ne postoje nizvodni robustni mehanizmi popravka pogreške koji bi spriječili njenu ugradnju u polipeptidni lanac umjesto aminokiseline određene kodonom molekule mRNA. Zato je za održavanje funkcionalnog proteoma svakog organizma izuzetno važna točnost prepoznavanja pripadnih aminokiselina i tRNA kao supstrata aaRS. Prepoznavanje pripadnih molekula tRNA je za aaRS relativno jednostavno, budući da su molekule tRNA velike molekule (oko 23-24 kDa), usporedive s veličinom sintetaza (oko 100 kDa) te se za svaki pripadni par aaRS:tRNA ostvaruju brojne specifične interakcije putem pozitivnih elemenata identiteta (opisano u poglavlju 2.2.2). Za aaRS je znatno veći problem prepoznavanje pripadne aminokiseline u citoplazmi stanice.

Aminokiseline su male molekule (oko 0,11 kDa) i često nemaju dovoljno izražene strukturne razlike na temelju kojih ih aaRS mogu jednostavno razlikovati[35]. Primjerice, izoleucin i valin razlikuju se za jednu metilensku skupinu pa je aktivacija valina koju katalizira IleRS svega 200 puta manje učinkovita od aktivacije pripadnog izoleucina[3, 14]. Aminoacil-tRNA-sintetaze koje su poput IleRS sklonije pogreškama, razvile su mehanizme popravka vlastitih pogrešaka (Slika 2.9) kako bi ukupna razina pogreške u biosintezi proteina ostala na razini koja je stanici prihvatljiva (1 na 10^3-10^4)[24]. Hidrolitički popravak pogreške do sada je otkriven kod polovice aminoacil-tRNA-sintetaza: IleRS, ValRS, LeuRS, PheRS, MetRS, ThrRS, AlaRS, ProRS, LysRS razreda II te SerRS[24, 35].

2.3.4 Mehanizmi popravka pogreške aminoacil-tRNA-sintetaza

Mehanizmi popravka pogreške omogućavaju hidrolizu aminoacil-adenilata nastalog aktivacijom pogrešne aminokiseline ili konačnog produkta - misacilirane tRNA (Slika 2.9). Tip popravka pogreške kojem je supstrat aminoacil-adenilat naziva se popravkom pogreške prije prijenosa aminokiseline, a popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline odnosi se na hidrolizu misacilirane tRNA (Slika 2.9).



Slika 2.9. Shematski prikaz mehanizama popravka pogreške. Popravak pogreške prije prijenosa aminokiseline odvija se potpomognutom disocijacijom nepripadnog aminoacil-adenilata (②) ili enzimskom hidrolizom nepripadnog aminoacil-adenilata u aktivnom mjestu (①, ③) koja može biti neovisna o tRNA (①) ili ovisna o tRNA (③). Misacilirana tRNA hidrolizira se putem mehanizma popravka nakon prijenosa aminokiseline (④). Središnji dio sheme odnosi se na pripadnu aminokiselinu, dok se ostatak sheme odnosi na reakcije s nepripadnom aminokiselinom. Preuzeto i prilagođeno iz Cvetesic i sur. 2012[47].

Za IleRS, ValRS i LeuRS razreda Ia specifično je postojanje dodatne domene CP1 (CP1 prema engl. *connective peptide* I) umetnute u Rossmannovu strukturu, tj. sintetsko aktivno

mjesto. Biokemijska istraživanja izdvojene domene CP1 pokazala su da je aktivno mjesto za popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline, odnosno za hidrolizu misacilirane tRNA, smješteno unutar domene CP1 i time udaljeno 30 Å od sintetskog aktivnog mjesta[7-10]. Model popravka pogreške nakon prijenosa aminokiseline predložen je na temelju utvrđene kokristalne strukture kompleksa IleRS:tRNA^{Ile}. Pogrešnu aminokiselinu iz sintetskog mjesta u mjesto popravka unutar domene CP1 dovodi upravo 3'-kraj tRNA koji translocira iz sintetskog mjesta u 30 Å udaljeno hidrolitičko mjesto, a pritom ostatak tijela tRNA ostaje vezan za enzim[10]. Popravak pogreške prije prijenosa aminokiseline je nešto složeniji. Naime, hidroliza aminoacil-adenilata može biti enzimski katalizirana pri čemu se hidroliza odvija unutar aktivnog mjesta enzima (Slika 2.9, put 1 i 3), ili se aminoacil-adenilat otpušta u otopinu gdje se odvija neenzimska hidroliza[5] (Slika 2.9, put 2). Neenzimska hidroliza otpuštenog aminoacil-adenilata može se smatrati popravkom pogreške ukoliko postoji selektivnost u otpuštanju nepripadnog aminoacil-adenilata, odnosno zadržavanju pripadnog aminoacil-adenilata unutar aktivnog mjesta. Selektivnost u disocijaciji aminoacil-adenilata je moguća zbog različitih konstanti disocijacije aminoacil-adenilata uslijed različitog doprinosa aminokiselinskog dijela aminoacil-adenilata ukupnom afinitetu. Naravno, otpuštanje pripadnog aminoacil-adenilata je energetski nepovoljno, budući da prilikom svake sinteze utroši jedan ATP, a ne nastaje konačni produkt aminoacilirana tRNA[48].

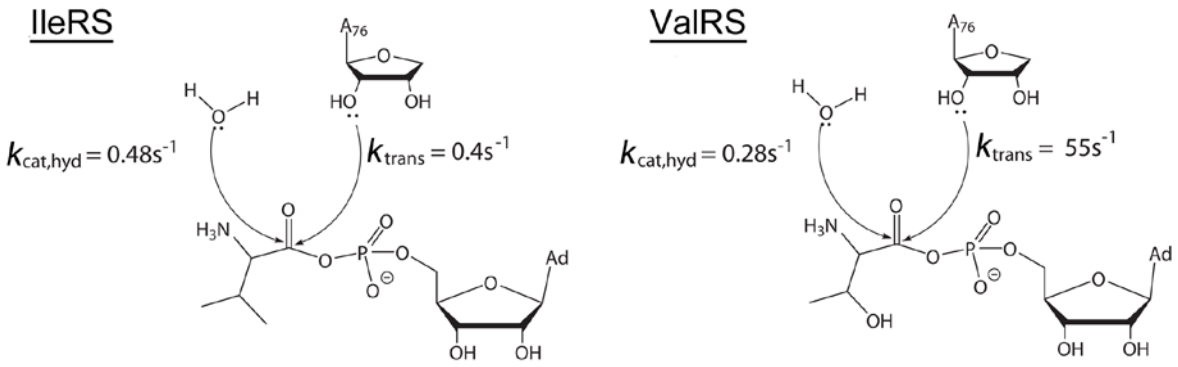
Enzimska hidroliza aminoacil-adenilata može se odvijati u prisustvu ili odsustvu tRNA (Slika 2.9, put 3, odnosno 1). Ukoliko je enzimska hidroliza nepripadnog aminoacil-adenilata učinkovitija u prisustvu tRNA, takav tip popravka pogreške naziva se tRNA-ovisnim popravkom pogreške prije prijenosa aminokiseline. Dugo se u području raspravljalo oko mjesta odvijanja tRNA-ovisnog popravka pogreške prije prijenosa. Do nedavno je bio uvriježen model u kojem se takav tip popravka kao i popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline odvijao unutar domene CP1. Takav model poznatiji je u literaturi kao translokacijski model, budući da se aa-AMP prenosi iz sintetskog aktivnog mjesta u domenu CP1 gdje se hidrolizira. Predloženo je da je signal za translokaciju aminoacil-adenilata jedan krug popravka pogreške nakon prijenosa kada enzim ostaje zarobljen u konformaciji koja omogućava translokaciju nepripadnih aminoacil-adenilata iz sintetskog mjesta u domenu CP1[49]. Međutim, problemi translokacijskog modela su sljedeći: kanal kroz koji bi se odvijala translokacija nepripadnih aa-AMP nije vidljiv u utvrđenim kristalnim strukturama i nije jasno kako aa-AMP na putu od sintetskog mjesta do mjesta popravka u domeni CP1 ostaje vezan za

enzim; pripadni aminoacil-adenilati nakon provjere u domeni CP1 morali bi se vratiti u aktivno mjesto kako bi se dogodio prijenos aminokiseline na tRNA, inače se uzalud troši ATP; nikada nije pokazana sposobnost hidrolize nepripadnih aa-AMP zasebno eksprimirane domene CP1[20, 50, 51]. Nedavno su istraživanja u našem laboratoriju opovrgnula translokacijski model i pokazala da se tRNA-ovisan, kao i tRNA-neovisan popravak pogreške prije prijenosa aminokiseline odvija u sintetskom aktivnom mjestu enzima[11, 52]. Pokazano je da IleRS s mutacijom u domeni CP1 koja inaktivira popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline, ima i dalje aktivan tRNA-ovisan popravak pogreške prije prijenosa aminokiseline. Takvim eksperimentom direktno je opovrgnuta uloga deacilacije kao signala za translokaciju aminoacil-adenilata, a predloženo je i da se tRNA-ovisna hidroliza aminoacil-adenilata zapravo događa u sintetskom aktivnom mjestu[11]. U nastavku istraživanja pobliže je okarakterizirano podmjesto u sintetskom mjestu gdje se odvija hidroliza. Ključnim bočnim ogrankom pokazala se aminokiselina na poziciji 59. Promjena tirozina 59 u treonin u potpunosti gasi tRNA-ovisan popravak pogreške prije prijenosa aminokiseline, odnosno prisustvo tRNA ne stimulira hidrolizu aminoacil-adenilata. Gašenje tRNA-ovisnog popravka pogreške putem promjene bočnog ogranka unutar aktivnog sintetskog mjesta dokazalo je da je sintetsko mjesto ujedno i hidrolitičko mjesto. Ciljanom mutagenezom pokazano je i da se podmjesta sinteze i hidrolize aminoacil-adenilata preklapaju jer je gotovo nemoguće ugasiti hidrolitičku aktivnost bez utjecaja na aktivaciju[52]. Mehanizam hidrolize te uloga tRNA u stimulaciji popravka pogreške prije prijenosa još uvijek nisu poznati.

2.4 Izoleucil- i valil-tRNA-sintetaza

Izoleucil i valil-tRNA-sintetaza svrstavaju se u razred Ia, te kao i za srodnu leucil-tRNA-sintetazu, zajedničko im je postojanje domene CP1 umetnute u Rossmannovu strukturu kao mjesta popravka pogreške nakon prijenosa aminokiseline. Izoleucin je pripadni supstrat IleRS, međutim, zbog male strukturne razlike valina i izoleucina, IleRS aktivira nepripadni valin svega 200 puta manje učinkovito od pripadnog izoleucina[3, 11]. IleRS je prva aaRS kod koje je uočen popravak pogreške[53], to tRNA-ovisni popravak pogreške prije prijenosa valina [54], te popravak pogreške nakon prijenosa valina[55] – hidroliza Val-tRNA^{Ile}. U prethodnom poglavlju (poglavlje 2.3.4) već je opisan tRNA-ovisan popravak pogreške prije prijenosa kod IleRS te model koji ga smješta u sintetsko mjesto. No, kako se određuje važnost pojedinog

mehanizma popravka pogreške, tj. koliku ulogu u točnosti aminoaciliranja ima popravak pogreške prije prijenosa u odnosu na popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline? Detaljnja kinetička karakterizacija IleRS i ValRS otkrila je značajnu razliku u upotrebi mehanizama popravka pogreške[11]. Iako su te dvije aaRS vrlo slične i srodne, pokazalo se da prisutnost tRNA ne stimulira hidrolizu nepripadnog treonil-adenilata, odnosno da *E. coli* ValRS ne koristi tRNA-ovisan popravak pogreške prije prijenosa aminokiseline, dok prisutnost $tRNA^{Ile}$ stimulira hidrolizu valil-adenilata kod *E. coli* IleRS. Jedina značajna razlika u kinetičkom ponašanju tih dviju sintetaza primijećena je u koeficijentu brzine prijenosa aminokiseline na tRNA. Za obje aaRS pokazano je da korak prijenosa aminokiseline ne pridonosi specifičnosti enzima, odnosno da ne postoji razlika u brzini prijenosa nepripadnih aminokiselina – valina u slučaju IleRS ili treonina u slučaju ValRS, u odnosu na pripadne aminokiseline izoleucin ili valin. Međutim, koeficijent brzine prijenosa valina i treonina na $tRNA^{Val}$ čak je oko 50 puta veći od koeficijenta brzine prijenosa izoleucina i valina na $tRNA^{Ile}$. Obzirom na navedene razlike, postavljen je model kinetičke razdiobe aminoacil-adenilata[11] prema kojem je udio tRNA-ovisnog popravka pogreške prije prijenosa aminokiseline u ukupnom popravku pogreške određen omjerima koeficijenta brzine hidrolize aminoacil-adenilata te koeficijenta brzine prijenosa aminokiseline s aminoacil-adenilata na tRNA (Slika 2.10).



Slika 2.10 Kinetička razdioba Val-AMP i Thr-AMP u sintetskom mjestu IleRS odnosno ValRS. k_{trans}-koeficijent brzine prijenosa aminokiseline, $k_{cat,\ hyd}$ – koeficijent brzine hidrolize aminoacil-adenilata u ustaljenom stanju. Preuzeto i prilagođeno iz Dulic i sur. 2010[11].

Naime, što je veći koeficijent brzine hidrolize aminoacil-adenilata u odnosu na koeficijent brzine prijenosa aminokiseline, veća je vjerojatnost hidrolitičkog događaja prije nastanka misacilirane tRNA. U slučaju ValRS, koeficijent brzine prijenosa valina značajno je brži u odnosu na koeficijent brzine hidrolize treonil-adenilata, zbog čega se ne događa hidrolitički

popravak prije prijenosa. Model je dodatno poduprt istraživanjem na ThrRS gdje je mutacijom u sintetskom mjestu usporen prijenos nepripadnog serina, zbog čega je seril-adenilat postao dulje dostupan molekuli vode i time je povećana učestalost tRNA-ovisnog popravka pogreške prije prijenosa aminokiseline[13].

2.5 Leucil-tRNA-sintetaza

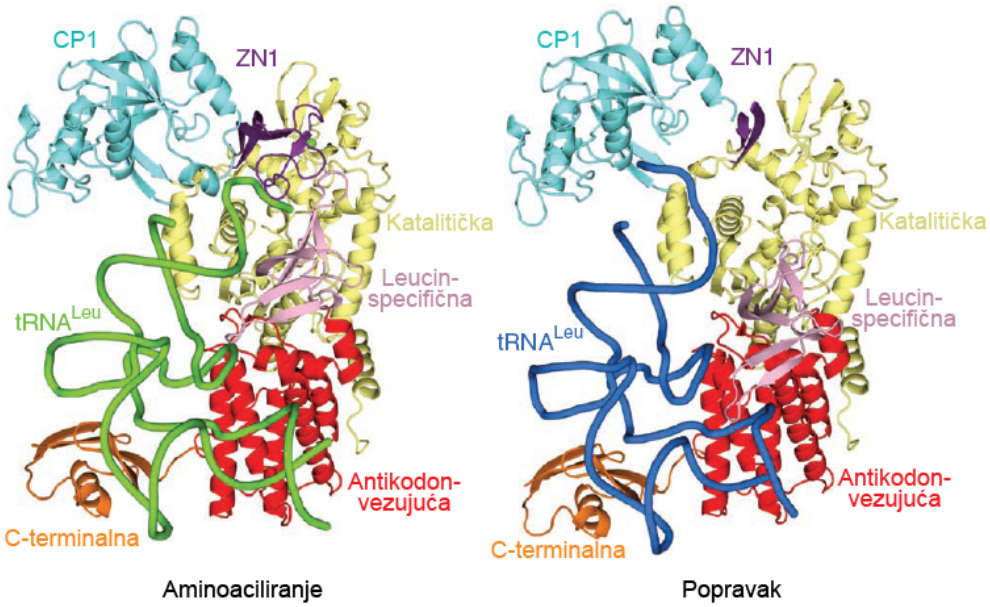
2.5.1 Strukturna obilježja LeuRS

Leucil-tRNA-sintetaza je aaRS razreda I čija uloga je esterifikacija pripadnog leucina na izoakceptore $tRNA^{Leu}$. LeuRS je uglavnom monomerni enzim, tipične strukture aaRS razreda Ia, uz poneke varijacije poput insercija ili rearanžmana polipeptidnih slijedova[56, 57]. Sintetsko aktivno mjesto enzima smješteno je u središte molekule, a građeno je kao Rossmannova struktura. Okosnicu, odnosno tijelo enzima čine aktivno mjesto i antikodon-vezujuća domena koja je karakteristična za sintetaze razreda Ia. Dodatne fleksibilne domene su cink-vezujuća domena (ZN1), domena CP1, domena specifična za leucin (engl. *leucine specific domain*, LSD) i C-terminalna domena.

Prva utvrđena kristalna struktura LeuRS je iz bakterije *Thermus thermophilus*[56, 58]. Usporedbom struktura LeuRS s vezanim nehidrozabilnim analogom leucil-adenilata 5'-O-[N-(leucil)-sulfamoil]adenozinom (Leu-AMS) ili leucinom u odnosu na apostrukturu, dobivene su informacije o konformacijskim promjenama koje se odvijaju prilikom vezanja supstrata, odnosno aktivacije aminokiseline. Sintetsko mjesto je u prisustvu intermedijera (analoga leucil-adenilata) zatvorene konfiguracije, dok je u odsustvu intermedijera ili supstrata otvorene konfiguracije. Zatvaranje aktivnog mjesta prilikom stvaranja intermedijera ima ulogu zaštite Leu-AMP od disocijacije u otopinu. LeuRS iz bakterije *T. thermophilus* ponešto se razlikuje od LeuRS iz bakterije *E. coli*. Naime, osim domene CP1 i domene ZN1, u Rossmannovu strukturu umetnuta je još jedna domena koja omogućava vezanje cinka – domena ZN2. Uloga cinka kod LeuRS je strukturna te je svaki cink tetraedarski koordiniran s četiri bočna ogranka, uglavnom cisteina.

Antikodon-vezujuća domena izgrađena je od pet (*T. thermophilus*) ili šest (*E. coli*) α-zavojnica, a enzim putem te domene ostvaruje interakcije s antikodonskom rukom $tRNA^{Leu}$. Tipično za sintetaze razreda Ia je direktna interakcija i prepoznavanje antikodona molekule tRNA kao kod npr. IleRS iz *E. coli*, no LeuRS ne ostvaruje direktne interakcije i ne

prepoznaje baze antikodona. Nije iznenađujuće da antikodon kod $tRNA^{Leu}$ nije element identiteta, budući da šest kodona kodira za leucin, a čak pet izoakceptorskih $tRNA^{Leu}$ ih dekodira ($tRNA^{Leu}_{CAG}$, $tRNA^{Leu}_{UAA}$, $tRNA^{Leu}_{CAA}$, $tRNA^{Leu}_{GAG}$ i $tRNA^{Leu}_{UAG}$). Domena CP1 je dosta izdvojena, a s ostatkom enzima povezana je dvjema fleksibilnim i otapalu izloženim β-lancima[56, 57] (Slika 2.11).



Slika 2.11 Struktura LeuRS-$tRNA^{Leu}$ iz *E. coli* prilikom aminoaciliranja (lijevo, tRNA je prikazana zelenom bojom) i popravka pogreške nakon prijenosa aminokiseline na $tRNA^{Leu}$ u domeni CP1 (desno, tRNA je prikazana plavom bojom). Domene su prikazane različitim bojama: narančasto: C-terminalna domena, crveno: antikodon-vezujuća domena, ružičasto: leucin-specifična domena, žuto: katalitička domena, ljubičasto: domena ZN1, cinkov ion prikazan je zeleno, plavo: domena CP1. Slika je preuzeta i prilagođena iz Palencia i sur 2012 [57].

Kod LeuRS je domena CP1 građena kao β-bačva (Slika 2.11), slično kao i domena CP1 kod IleRS. Karakteristično za LeuRS je mjesto umetanja domene CP1 u primarni aminokiselinski slijed. Naime, kod IleRS, ValRS, arhejskih te eukariotskih LeuRS, domena CP1 umetnuta je u domenu ZN1, dok je kod prokariotskih i mitohondrijskih LeuRS umetnuta u aminokiselinski slijed koji prethodi domeni ZN1[56]. Smatra se da se premještanje domene CP1 dogodilo u bakterijskoj razvojnoj liniji prije razvoja mitohondrija po endosimbiontskoj teoriji[59].

Za LeuRS je svojstveno i postojanje domene specifične za leucin (LSD, engl. *leucine specific domain*) koju posjeduje jedino prokariotski tip LeuRS. Veličina i aminokiselinski slijed se razlikuju ovisno o organizmu iz kojeg LeuRS potječe. Domena LSD iz *T. thermophilus* sastoji se od 58 aminokiselina i građena je od pet β-lanaca i dvije α-zavojnice, te uz domenu LSD iz hipertermofilne bakterije *Aquifex aeolicus* tvori jednu od najvećih do sad

poznatih domena LSD [56]. Domena LSD iz *E. coli* duga je 51 aminokiselinu, i sastoji se od pet β-lanaca povezanih omčama. Funkcija domene LSD nije posve razjašnjena, no pokazano je da ima važnu ulogu u aminoaciliranju[60]. Zanimljiva iznimka kanonskoj monomernoj LeuRS je LeuRS iz *A. aeolicus* koja je heterodimer, sastavljen od dvije podjedinice – α (634 aminokiseline) i β (289 aminokiselina)[61]. Svaka podjedinica kodirana je zasebnim genom, a čitav protein sastavlja se u nekovalentni kompleks upravo preko domene LSD [61, 62].

C-terminalna domena (CTD) nije bila vidljiva u utvrđenoj kristalnoj strukturi LeuRS iz *T. thermophilus*[56]. Tek 2005. godine, kada je utvrđena kokristalna struktura LeuRS i $tRNA^{Leu}$ iz *T. thermophilus* uočena je i uređena C-terminalna domena[63]. Pretpostavlja se da uređivanju i stabilizaciji domene pridonosi upravo interakcija s tRNA. C-terminalna domena velika je oko šezdeset aminokiselina i sastavljena od α-zavojnica i β-lanaca, a s ostatkom enzima povezana je pomoću fleksibilnih linkera. Smatra se da CTD ima ulogu u aminoaciliranju, vjerojatno putem pozicioniranja tRNA, budući da njeno uklanjanje narušava aminoacilacijsku aktivnost enzima[63-65]. Zanimljivo je da kvaščev mitohondrijski LeuRS katalizira izrezivanje introna RNA, te da je pokazano da CTD ima ključnu ulogu u toj nekanonskoj funkciji LeuRS[65-67].

2.5.2 Točnost reakcije aminoaciliranja

Za LeuRS je poznato da pogrešno aktivira i prenosi na tRNA čitav niz proteinogenih aminokiselina koje su strukturno slične leucinu, poput izoleucina, valina, metionina, ali i neproteinogene aminokiseline poput norvalina (Nva), norleucina ili α-aminobutirata (Aba)[15-17, 19, 20, 68-70]. Budući da u sintetskoj reakciji ne razlikuje dovoljno dobro leucin od strukturno sličnih alifatskih aminokiselina, LeuRS koristi mehanizme popravka pogreške kako bi spriječio greške u dekodiranju leucinskih kodona (mehanizmi popravka pogreške opisani su u poglavlju 2.3.4).

Izoleucin je često istaknut kao značajna prijetnja točnosti dekodiranja leucinskih kodona [16, 20, 68, 70, 71]. Međutim, do sada su objavljeni faktori diskriminacije izoleucina i leucina u rasponu prema kojem izoleucin djeluje kao izuzetno dobar nepripadni supstrat (faktor diskriminacije je svega 630 [15]) ili supstrat koji se učinkovito uklanja već putem diskriminacije u sintetskoj reakciji (faktor diskriminacije[2] je 5400 [17]). Uzrok razlika u eksperimentalnim

[2] Faktor diskriminacije definiran je kao omjer konstanti specifičnosti (k_{cat}/K_M) za pripadnu i nepripadnu aminokiselinu u reakciji aktivacije aminokiseline.

rezultatima u rasponu od čak jednog reda veličine nije jasan, te unosi sumnju o valjanosti dosadašnjih rezultata.

Znatno bolje je okarakteriziran norvalin kao nepripadni supstrat LeuRS. Norvalin je neproteinogena aminokiselina čija stanična koncentracija značajno ovisi o uvjetima uzgoja bakterija, a može narasti i do koncentracije 1 mmol dm^{-3} u uvjetima sa smanjenom količinom kisika i dostupnom glukozom[18] (norvalin je opisan u poglavlju 2.7 Literaturnog pregleda). Relativno nizak faktor diskriminacije (objavljeni faktor diskrimnacije norvalina u reakciji aktivacije je 114)[17] upućuje da je za sprječavanje ugradnje norvalina umjesto leucina nužan popravak pogreške LeuRS.

2.5.2.1 Popravak pogreške prije prijenosa aminokiseline

Pitanje postojanja i važnosti tRNA-ovisnog popravka pogreške prije prijenosa aminokiseline kod LeuRS nije posve razjašnjeno. Starija istraživanja pokazala su da je popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline glavni hidrolitički mehanizam kod LeuRS iz *E. coli*, dok kvaščev citoplazmatski LeuRS (*S. cerevisiae*) popravlja pogrešku uglavnom kroz hidrolizu aminoacil-adenilata, odnosno prije prijenosa aminokiseline[20, 72]. Nije neobično da enzimi iz različitih organizama upotrebljavaju različite mehanizme popravka pogreške, međutim kada je u pitanju LeuRS iz *E. coli*, različite istraživačke grupe na temelju svojih eksperimentalnih rezultata upućuju na prisustvo (istraživačka grupa dr. sc. En Duo Wang), odnosno odsustvo (istraživačka grupa dr. sc. Susan Martinis) popravka pogreške prije prijenosa aminokiseline. Glavna razlika u eksperimentalnom pristupu obje grupe je upotreba različitih mutanata u testiranju popravka pogreške prije prijenosa aminokiseline. Istraživačka grupa dr. sc. En Duo Wang koristila je varijantu *E. coli* LeuRS s naizgled ugašenim popravkom pogreške nakon prijenosa aminokiseline, kojoj je treonin 252, tzv. determinanta specifičnosti hidrolitičkog popravka, zamijenjena s argininom[21]. Okarakterizirali su i popravak pogreške u prisustvu ireverzibilnog inhibitora LeuRS - 5-fluoro-1,3-dihidro-1-hidroksi-2,1-benzoksaborola (AN2690) koji kovalentno veže 3'-kraj tRNA u domenu CP1, te s mutantom Y330D koji posve blokira ulaz 3'-kraja tRNA u domenu CP1. Temeljni zaključci njihovih istraživanja su da *E. coli* LeuRS posjeduje tRNA-ovisan popravak pogreške prije prijenosa aminokiseline koji je ovisan o prisustvu 3'-kraja tRNA u domeni CP1[21, 73, 74]. Sumnju u rezultate njihovih istraživanja unosi činjenica da su ispitivali mehanizam popravka pogreške u prisustvu norvalina, a testirali sposobnost popravka pogreške mutanata LeuRS u prisustvu Ile-$tRNA^{Leu}$.

Iako se mutant T252R pokazao inaktivnim u deacilaciji Ile-tRNA^{Leu}, to ne znači da je zaista inaktivna i deacilacija Nva-tRNA^{Leu} jer mehanizam popravka pogreške nije nužno jednak za različite nepripadne aminokiseline.

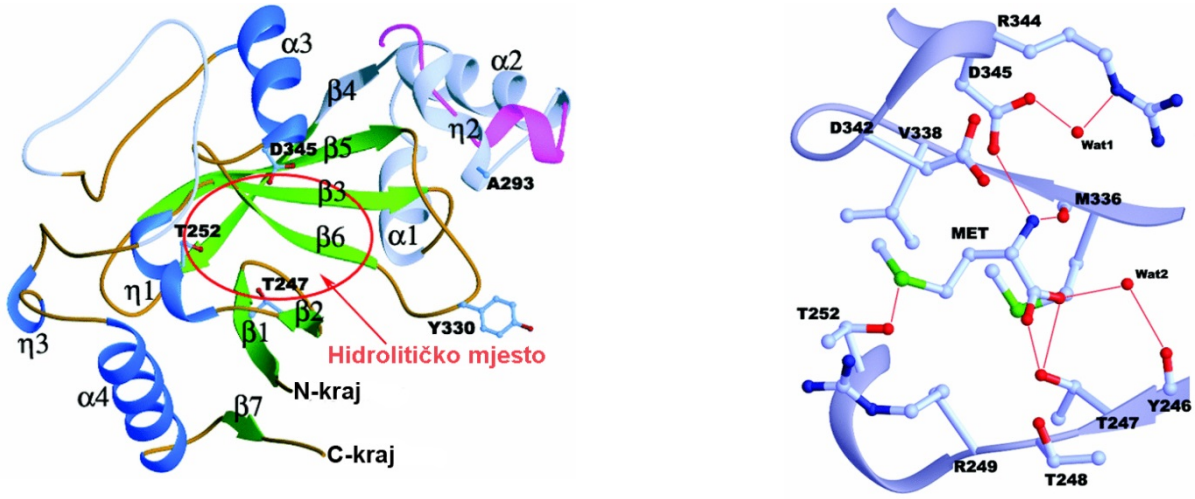
Paralelno s grupom dr. sc. En Duo Wang, istraživanja je radila i američka grupa pod vodstvom dr. sc. Susan Martinis, a istraživali su mehanizam popravka pogreške u prisustvu izoleucina. Američka grupa je u skladu s rezultatima Englischa[72], pokazala da točkastim mutacijama u domeni CP1, poput T252Y, LeuRS gubi sposobnost popravka pogreške nakon prijenosa aminokiseline, i time u potpunosti gubi sposobnost popravka pogreške[75]. Daljnjim istraživanjima varijante LeuRS kojoj je odstranjena domena CP1, pokazali su da krnji enzim ima aktiviran tRNA-ovisan popravak pogreške prije prijenosa aminokiseline. Autori su rezultate svojih istraživanja interpretirali u skladu s translokacijskim modelom prema kojem se hidroliza nepripadnih aminoacil-adenilata odvija u domeni CP1. Budući da je taj model nedavno opovrgnut, a postavljen je i novi model koji tRNA-ovisan popravak pogreške smješta u aktivno mjesto, upitna je i publicirana interpretacija rezultata. Primjerice, u skladu s modelom objavljenim na homolognim IleRS i ValRS[11] – odstranjivanje domene CP1 moglo je negativno utjecati na brzinu prijenosa aminokiseline, zbog čega bi hidroliza aminoacil-adenilata došla do izražaja.

Kako su rezultati navedenih dviju grupa oprečni, a korišteni su i različiti nepripadni supstrati (izoleucin ili norvalin) u ispitivanju popravka pogreške, te nisu napravljene detaljne kinetičke analize, dosadašnji publicirani rezultati na *E. coli* LeuRS nisu razriješili temeljna pitanja poput važnosti ili postojanja tRNA-ovisnog popravka pogreške prije prijenosa aminokiseline.

2.5.2.2 Popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline

Popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline odvija se u hidrolitičkom aktivnom mjestu unutar domene CP1, koje je prepoznatljivo po prisustvu brojnih treonina zbog čega je i prozvano regija bogata treoninom (Thr^{247}Thr^{248}Arg^{249}Pro^{250}Asp^{251}Thr^{252}). Biokemijska analiza mutagenezom izmijenjenih varijanti LeuRS otkrila je nekoliko ključnih bočnih ogranaka u domeni CP1. Treonin na poziciji 252 određuje specifičnost domene CP1 prema aminoaciliranoj tRNA. Naime, ukoliko se taj treonin zamijeni alaninom, LeuRS hidrolizira i pripadnu Leu-tRNA^{Leu} [76]. Na temelju kristalografskih analiza[56] i računalnih modela[77] predloženo je da Thr252 sprječava vezanje leucina (Leu-tRNA^{Leu}) u domenu CP1 tako da

fizički blokira ulaz zbog preklapanja bočnog ogranka s γ-razgranatom metilnom skupinom (Slika 2.12). Budući da se Leu-tRNA^{Leu} ne može vezati u hidrolitičko mjesto unutar domene CP1, spriječena je njena hidroliza i direktno disocira u otopinu[71, 76].

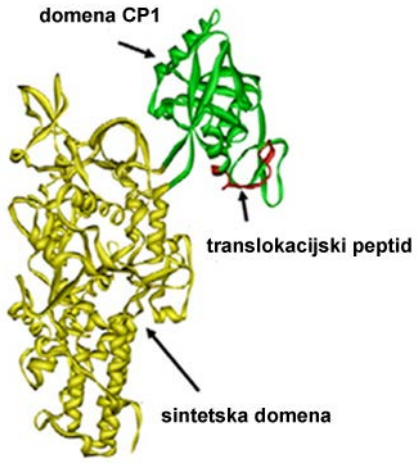


Slika 2.12 Lijevo: Kristalna struktura domene za popravak LeuRS iz bakterije *E. coli*. Hidrolitičko mjesto je označeno crvenim, a tri očuvane aminokiseline aktivnog mjesta domene za popravak (Thr247, Thr252 i Asp345) prikazane su bočnim ograncima. Plavo - α-zavojnice, Zeleno - β-ploče, Smeđe - omče. Desno: Kristalna struktura domene za popravak LeuRS iz bakterije *E. coli* s vezanom aminokiselinom Met u aktivnom mjestu. Vodikove veze bočnog ogranka Met i bočnih ogranaka aminokiselina u aktivnom mjestu domene za popravak LeuRS označena su crvenim linijama[78].

Kada je utvrđena kokristalna struktura LeuRS s analogom norvalil-adenilata (Nva-AMS) u domeni CP1, računalnim modeliranjem uveden je leucin umjesto norvalina, a pokazano je i da postoje steričke smetnje koje sprječavaju vezanje leucina u hidrolitičko mjesto domene CP1[20]. Daljnja biokemijska istraživanja potvrdila su da je hidrolitičko mjesto rigidno i stereokemijski optimirano za vezanje nepripadnih izoleucina i metionina te isključivanje leucina, a predloženo je da mehanizam vezanja misaciliranih tRNA odgovara slaganju ključa i brave[78].

Već je prethodno spomenuto da je domena CP1 strukturno izdvojena od ostatka enzima, te da je s tijelom enzima povezana fleksibilnim β-linkerima (Slika 2.11) koji su važni za ostvarivanje konformacijskih promjena koje prate aminoaciliranje, popravak pogreške nakon prijenosa te disocijaciju aminoacilirane tRNA[79]. Pokazano je da zasebno eksprimirana domena CP1 ne hidrolizira misaciliranu tRNA[15, 80], a da je duža varijanta domene CP1, s uključenim fleksibilnim linkerima i β-lancima, aktivna u deacilaciji misacilirane tRNA[81]. Pretpostavlja se da β-lanci i fleksibilni linkeri imaju ulogu u translokaciji 3'-kraja tRNA^{Leu} iz

sintetskog u hidrolitičko mjesto u domeni CP1, a moguće je i da ostvaruju direktne interakcije s tRNA[81, 82]. Translokacija 3'-kraja tRNA iz sintetskog u hidrolitičko mjesto u domeni CP1 preduvjet je za hidrolizu esterske veze misacilirane tRNA. Translokaciju je teško biokemijski okarakterizirati jer je vjerojatno vrlo brz i kratkotrajan proces, pa je i mehanizam i dalje nepoznanica. Kroz mutacijsku analizu identificiran je peptid u domeni CP1 koji potpomaže translokaciju 3'-kraja tRNA, i nazvan je tzv. translokacijskim peptidom[83] (Slika 2.13). Promjena pojedinih aminokiselina translokacijskog peptida u alanin uzrokovala je zaobilaženje hidrolitičkog mjesta, odnosno disocijaciju intaktne misacilirane tRNA u otopinu.



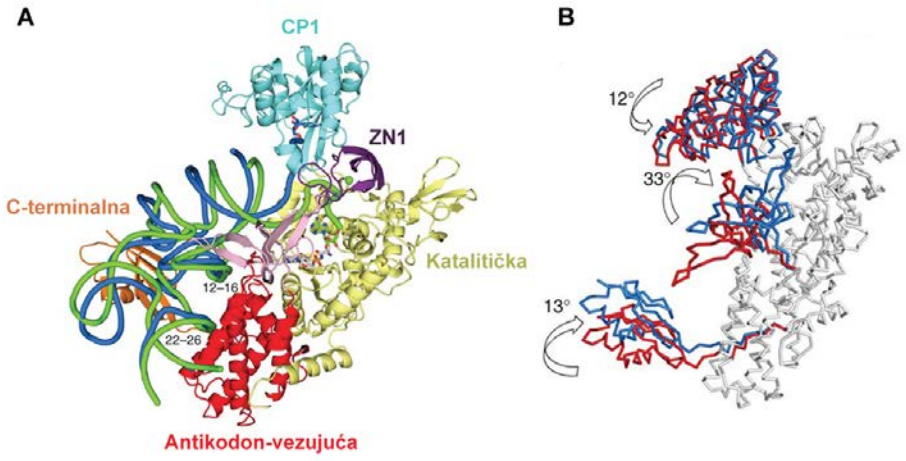
Slika 2.13 Homologni model *E. coli* LeuRS prema strukturi *T. thermophilus* LeuRS. Naznačen je translokacijski peptid u domeni CP1. Preuzeto i prilagođeno iz Hellmann i sur. 2009[83].

LeuRS kao i ostale aaRS razreda I aminoacilira 2'OH skupinu tRNA. Međutim, to ne znači da se i deacilacija odvija s 2'OH skupine, obzirom na mogućnost transacilacije aminokiseline s 2'OH skupine na 3'OH skupinu i obrnuto. Indikacije na kojoj OH skupini se nalazi aminokiselina prilikom deacilacije dobivene su indirektno iz kristalografskih eksperimenata. Utvrđena je kokristalna struktura LeuRS s analogom norvalil-tRNA^{Leu} kao supstratom za popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline. Korišteni su analozi 2-(L-norvalil)amino-2'deoksiadenozin (Nva-2AA) i 3-(L-norvalil)amino-2'deoksiadenozin (Nva-3AA). Budući da autori nisu mogli dobiti kokristal LeuRS s Nva-3AA vezanim u CP1 domenu, a riješili su strukturu s Nva-2AA, zaključili su da se deacilacija odvija s 2'OH skupine[20]. Međutim, jedino je kod IleRS eksperimentalno dokazano da se deacilacija nužno odvija s 3'OH skupine, iako IleRS, kao i LeuRS, izvorno aminoacilira 2'OH skupinu[84-86].

Obzirom da IleRS koji deacilira s 3'OH skupine nije vezao Val-3AA, već samo Val-2AA, upitno je na kojoj je OH skupini nepripadna aminokiselina prilikom deacilacije kod LeuRS.

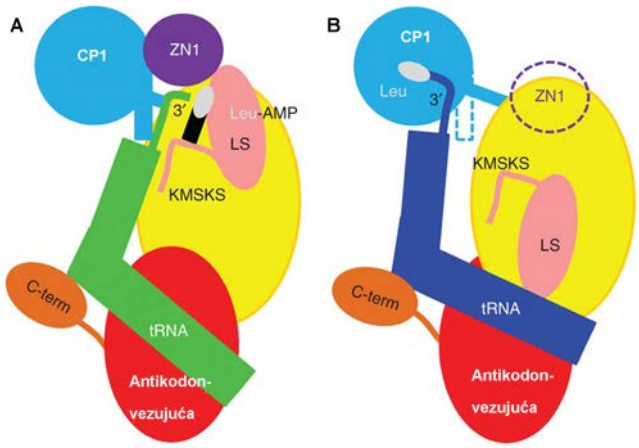
2.5.3 Funkcionalni ciklus *E. coli* LeuRS

Nedavno su utvrđene kristalne strukture *E. coli* LeuRS u kompleksu s tRNA kojoj je 3'-kraj usmjeren u sintetsko mjesto (aminoacilacijski kompleks), odnosno u kompleksu s tRNA kojoj je 3'-kraj usmjeren u hidrolitičko mjesto u domeni CP1 (hidrolitički kompleks)[57]. Obje utvrđene kokristalne strukture imaju i nehidrozabilni analog Leu-AMP (Leu-AMS) vezan u sintetsko aktivno mjesto. Usporedbom struktura opisan je funkcionalni ciklus *E. coli* LeuRS koji uključuje strukturne rearanžmane enzima i tRNA prilikom aminoaciliranja i sukcesivne translokacije 3'-kraja tRNA iz sintetskog mjesta u hidrolitičko mjesto u domeni CP1. Glavna razlika u konformaciji aminoacilacijskog u odnosu na hidrolitički kompleks je u rotaciji domene specifične za leucin prema sintetskom mjestu za 33°. Čitava tRNA okreće se za 15°, 3'-kraj tRNA usmjerava se u sintetsko mjesto, a pritom uglavnom ostaju očuvane interakcije tRNA s C-terminalnom i antikodon-vezujućom domenom koje su ostvarene i u hidrolitičkom kompleksu. Domena CP1 se otvara rotacijom za 12° i time omogućava prolaz 3'-kraju iz hidrolitičkog u sintetsko mjesto (Slika 2.14).



Slika 2.14 Usporedba kokristalnih struktura LeuRS:tRNA^{Leu} s 3'-krajem tRNA u sintetskom ili hidrolitičkom mjestu. A) LeuRS:tRNA^{Leu} aminoacilacijski kompleks. tRNA prikazana zelenom bojom odgovara tRNA u aminoacilacijskom kompleksu, a tRNA prikazana plavom bojom odgovara tRNA u hidrolitičkom kompleksu. B) dijagram koji prikazuje rotacije fleksibilnih domena LeuRS prilikom prijelaza iz hidrolitičke (crveno) u sintetsku konformaciju (plavo). Superponiran je ostatak tijela enzima (sivo). Preuzeto i prilagođeno iz Palencia i sur. 2012[57].

Usporedbom aminoacilacijskog i hidrolitičkog kompleksa LeuRS pokazana je vrlo važna uloga očuvanog motiva KMSKS koji je karakterističan za sve sintetaze razreda I. Prijelazom u aminoacilacijski kompleks, omča KMSKS pomiče se zajedno s domenom specifičnom za leucin i ostvaruje interakcije s 3'-krajem tRNA, usmjeravajući ga u sintetsko mjesto. Kao što je već spomenuto u poglavlju 2.5.1, smatra se da omča KMSKS može biti u tri položaja – otvoreni, poluotvoreni i zatvoreni. Pod zatvaranjem se smatra pristajanje omče uz aminoacil-adenilat. Omča je u otvorenom položaju kada je tRNA usmjerena s 3'-krajem u domenu CP1. Ako je vezan aminoacil-adenilat, a nije vezana tRNA, omča KMSKS je u poluotvorenom položaju, dok kada su vezani aminoacil-adenilat i tRNA, omča je u zatvorenom položaju. Uslijed zatvaranja omče, aminoacil-adenilat je u energetski nepovoljnom napregnutom položaju, a prijenos aminokiseline na tRNA omogućava relaksaciju strukture, otvaranje omče KMSKS i istovremeno odmicanje domene specifične za leucin, zbog čega se gube interakcije s 3'-krajem tRNA i CCA-kraj može translocirati u domenu CP1 (Slika 2.15).



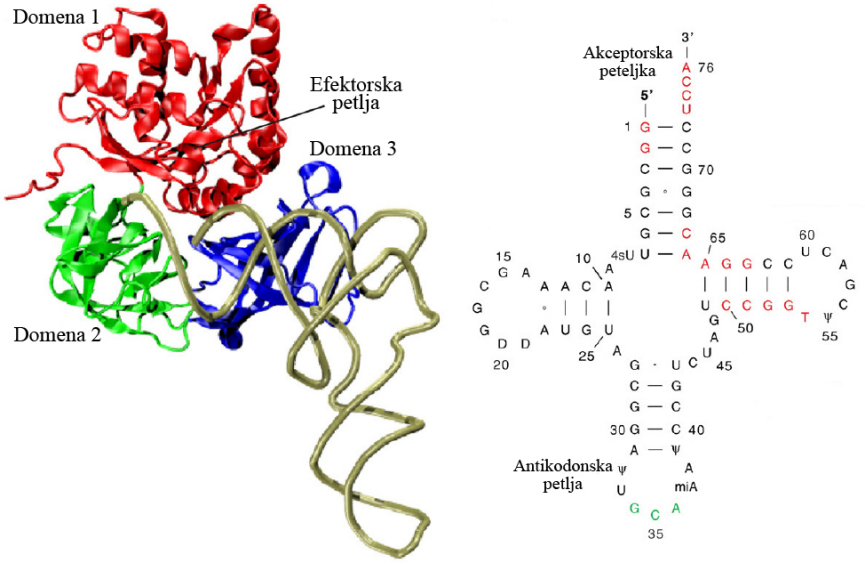
Slika 2.15 Shematski dijagram strukturnih promjena prilikom prijelaza iz aminoacilacijskog u hidrolitički kompleks LeuRS:tRNA^{Leu}. Leucin je prikazan ovalnog oblika bijele boje, a AMP kao crni četverokut. Slika je preuzeta i prilagođena iz Palencia i sur. 2012[57].

2.6 Uloga elongacijskog faktora Tu u sprječavanju pogrešne biosinteze proteina

Kada aminoacil-tRNA-sintetaze pogriješe i otpuste misaciliranu tRNA, translacijska mašinerija koja dovodi aminoaciliranu tRNA na ribosom uglavom ne može razlikovati tRNA aminoaciliranu pripadnom od tRNA aminoacilirane nepripadnom aminokiselinom. U većini slučajeva pogrešna aminokiselina koja dovodi misaciliranu tRNA završava ugrađena u

polipeptidni lanac umjesto aminokiseline određene kodonom koji je komplementaran antikodonu misacilirane tRNA.

Prije otprilike deset godina, grupa profesora Olke Uhlenbecka pokazala je kroz istraživanje prokariotskog elongacijskog faktora Tu (*T. thermophilus*) da EF-Tu ima različit afinitet prema različitim molekulama tRNA[87] i prema različitim aminokiselinama [88, 89]. Razlika u afinitetu i nije neočekivana obzirom na raznolikost tRNA i aminokiselina te činjenice da sve ostvaruju interakcije s istim veznim mjestom. Međutim, obzirom na ulogu u biosintezi proteina, EF-Tu mora dovoditi sve aminoacilirane tRNA na ribosom s jednakom vjerojatnošću (Slika 2.16 prikazuje područje interakcije EF-Tu i aa-tRNA). Uhlenbeck i suradnici pokazali su da EF-Tu to postiže zahvaljujući fenomenu termodinamske kompenzacije. Naime, iako EF-Tu ima različit afinitet za različite aminokiseline, odnosno tRNA, ukupni afinitet za svaki ispravni par aminoacilirane tRNA približno je jednak jer vrijedi da će molekule tRNA s manjim termodinamskim doprinosom biti esterificirane aminokiselinom s većim termodinamskim doprinosom i obrnuto. Posljedica termodinamske kompenzacije je da EF-Tu na neki način diskriminira nepripadne parove aminoacil-tRNA. Obzirom da kombinacije pripadnih parova daju optimalan afinitet, EF-Tu veže kombinacije nepripadnih parova prejako (do 120 puta jače) ili preslabo (do 60 puta slabije) i time pridonosi translacijskoj točnosti[87]



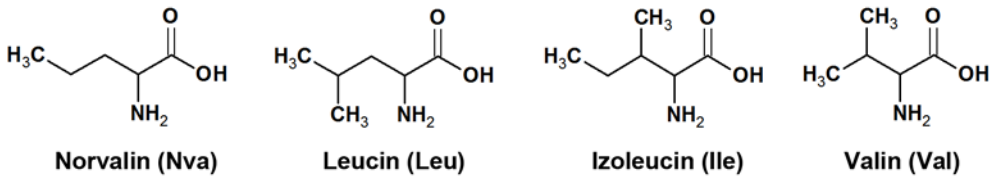
Slika 2.16 Lijevo: struktura kompleksa EF-Tu iz *Thermus aquaticus* s GDPNP-om (nehidrozabilnim analogom GTP-a) i Cys-tRNA^{Cys} iz *E. coli* (PDB ID: 1b23). Tri domene EF-Tu označene su crvenom, zelenom i plavom bojom, a Cys-tRNA^{Cys} sivom bojom. Za efektorsku petlju se smatra da sudjeluje u alosteričkoj komunikaciji GTP-a s tRNA-veznim mjestom. Desno: sekundarna struktura tRNA^{Cys} iz *E.*

coli. Istaknuti su položaji modificiranih baza, crveno su označeni nukleotidi u kontaktu s EF-Tu, a zelenom bojom je označen antikodon[90].

Prejako vezani parovi aa-tRNA presporo disociraju s EF-Tu, usporavaju translaciju i češće u obliku ternarnog kompleksa EF-Tu:GTP:aa-tRNA disociraju s ribosoma, dok preslabo vezani parovi češće disociraju iz ternarnog kompleksa EF-Tu:GTP:aa-tRNA prije ostvarivanja produktivnih interakcija na ribosomu. Važno je spomenuti da misacilirane tRNA koje bi se bitno jače ili slabije vezale za EF-Tu rijetko nastaju u uvjetima *in vivo* zbog specifičnosti aaRS te mehanizama popravka vlastitih pogrešaka. Međutim, neosporiva uloga EF-Tu je u sprječavanju pogrešne translacije glutaminskih ili asparaginskih kodona, budući da iz translacije isključuje prirodno prisutne misacilirane tRNA koje su intermedijeri u biosintezi glutamina – Glu-tRNA^{Gln}, ili asparagina – Asp-tRNA^{Asn} [87, 91-94]. No, temeljna uloga elongacijskog faktora Tu je ipak razlikovanje aminoacilirane od neaminoacilirane tRNA. Konstanta disocijacije za kompleks EF-Tu:GTP i aa-tRNA iznosi između 10^{-10} i 10^{-9} mol dm^{-3}, a za EF-Tu:GTP i neaminoaciliranu tRNA veća je od 10^{-4} mol dm^{-3} [95].

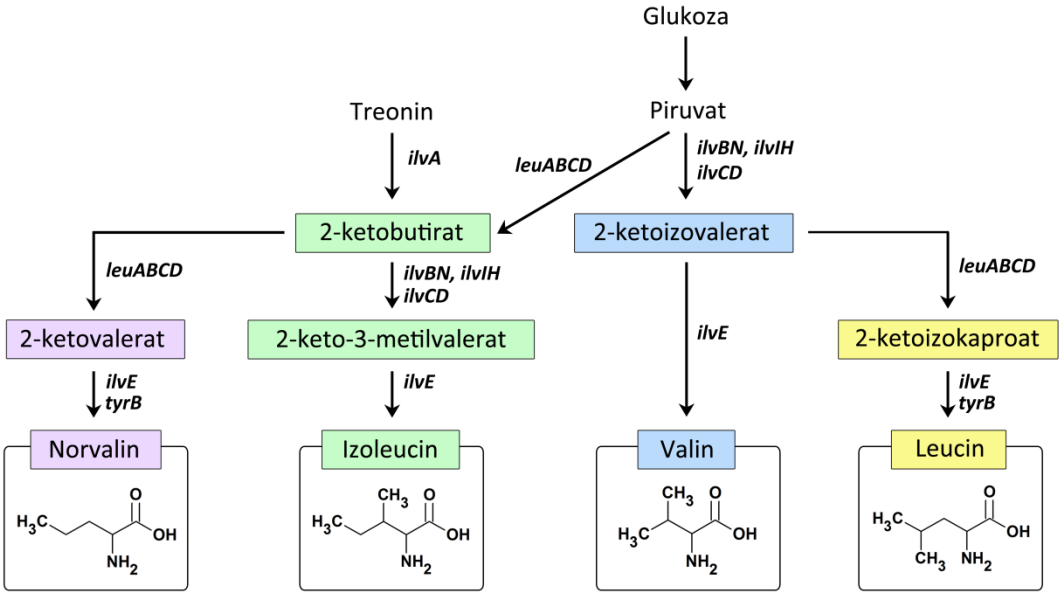
2.7 Norvalin

Uz dvadeset standardnih aminokiselina koje prema uputi mRNA i genetičkom kodu izgrađuju sve proteine, ponekad se i nekanonske aminokiseline mogu pronaći kao sastavni dijelovi proteina. Norvalin je prirodna neproteinogena nerazgranata aminokiselina, koja je slična leucinu, valinu i izoleucinu (Slika 2.17). 1953. godine je prvi put predstavljen kao prirodna sastavnica antifugalnog peptida iz gram pozitivne bakterije *Bacillus subtilis*[96]. Norvalin u stanici nastaje kao nusprodukt biosinteze razgranatih aminokiselina[18, 19, 97, 98]. Enzimi koji sudjeluju u biosintezi leucina (operon *leuABCD*), zbog niske supstratne specifičnosti prepoznaju niz keto-kiselina te omogućavaju direktnu elongaciju ugljikovog lanca.



Slika 2.17. Norvalin i strukturno slične standardne aminokiseline – leucin, izoleucin i valin.

Smatra se da se biosinteza norvalina odvija direktnom elongacijom piruvata u 2-ketobutirat, a zatim i u 2-ketovalerat (Slika 2.18) putem enzima koji uobičajeno sudjeluju u biosintezi leucina - izopropilmalat-sintaza (IPMS, gen *leuA*), izopropilmalat-izomeraza (IPMI, geni *leuCD*) i izopropilmalat-dehidrogenaza (IPMD, gen *leuB*). Direktna elongacija je moguć, ali u normalnim staničnim uvjetima manje vjerojatan biosintetski put zbog visokih vrijednosti K_M za piruvat te 2-ketobutirat u odnosu na njihove stanične koncentracije. Većinom su istraživanja nespecifičnosti enzima IPMS napravljena na enzimu iz bakterije *Salmonella typhimurium*[99], te *Serratia marcescens*[100], ali pretpostavlja se da je jednako nespecifična i varijanta iz *E. coli*. Na kraju, iz 2-ketovalerata transaminacijom pomoću aminotransferaze koju kodira gen *IlvE* ili *TyrA* nastaje norvalin.



Slika 2.18. Biosintetski put norvalina i razgranatih aminokiselina u *E. coli*. Prikazana su imena gena koji kodiraju enzime.

Obzirom na nešto viši K_M za piruvat, odnosno 2-ketobutirat u odnosu 2-ketoizovalerat kao uobičajeni supstrat enzima IPMS, do nakupljanja norvalina dolazi u specifičnim fiziološkim uvjetima. Eksperimentalno je pokazano nakupljanje norvalina do čak milimolarne koncentracije u citoplazmi *E. coli* prilikom rasta bakterija u uvjetima smanjene koncentracije kisika, tzv. mikroaerobni uvjeti, uz konstantnu opskrbu glukozom[18]. Biosinteza norvalina je u tim uvjetima posljedica premašivanja kapaciteta metabolizma glukoze zbog čega se nakuplja piruvat. U uvjetima aerobnog uzgoja bez dodatka glukoze, nije zamijećena akumulacija norvalina.

Pojačani interes za istraživanje nekanonskih aminokiselina pojavio se kada je zamijećena ugradnja nekanonskih aminokiselina u proteine, i to prilikom proizvodnje farmaceutski značajnih rekombinantnih proteina fermentacijom u *E. coli*[19]. Iako su takve kulture aerirane, prilikom proizvodnih procesa uglavnom se postižu visoke gustoće bakterija gdje u pojedinim dijelovima kulture može biti nepotpunog miješanja i time stvaranja mikrookoline sa smanjenom količinom kisika. Dosadašnja istraživanja usmjerena su na: 1) sprječavanje ugradnje norvalina u proteine kroz dodatak leucina, budući da se time umanjuje mogućnost misacilacije $tRNA^{Leu}$ putem LeuRS; 2) sprječavanje akumulacije norvalina u citoplazmi kroz inhibiciju enzima važnih za njegovu biosintezu. Pokazalo se da je jednostavna strategija za sprječavanje akumulacije norvalina dodatak metalnih iona poput molibdena, nikla ili selena u medij za uzgoj bakterija. Navedeni metalni ioni imaju ulogu u stvaranju funkcionalnog kompleksa metaloproteina format-hidrogen-lijaze (engl. *formate hydrogen lyase*), enzima ključnog u anaerobnom metabolizmu piruvata. Autori pretpostavljaju da se akumulacija norvalina sprječava zbog odvođenja viška piruvata kroz disproporcioniranje formata u ugljični dioksid i vodik[101].

Norvalin je izuzetno zanimljiva nekanonska prirodna aminokiselina i zbog evolucijskih razloga. Koji procesi su uvjetovali izbor dvadeset aminokiselina koje izgrađuju proteine? To važno pitanje o podrijetlu i razvoju života je i dalje nerazriješeno, no eksperimenti tipa Muller-Urey omogućili su ispitivanje uvjeta u kojima se neenzimski stvaraju aminokiseline, ali i istraživanje i kvantifikaciju spektra aminokiselina koje se mogu stvoriti. Smatra se da su aminokiseline poput α-aminobutirata, norvalina, i norleucina u prebiotsko doba bile prisutne u okolišu u značajnijim količinama od ostalih aminokiselina, a također su i među najbrojnijim aminokiselinama pronađenim na meteoritima.[102] Zanimljivo je da su unatoč brojnosti u prebiotsko doba, posve isključene iz genetičkog koda. Njihovo odsustvo iz građe proteina opravdava se povećanom slobodom rotacije bočnog ogranka u odnosu na razgranate hidrofobne aminokiseline, a smatra se i da bi zato ugradnja ravnolančanih hidrofobnih aminokiselina mogla imati negativne posljedice za strukturnu stabilnost. Međutim, budući da ne postoje eksperimentalni dokazi, moguće je da je isključenje norvalina iz genetičkog koda posljedica slučajnosti. Postoji nekoliko radova u kojima je modelnom proteinu zamijenjeno nekoliko leucinskih pozicija s norvalinom, te je ispitana stabilnost takvog supstituiranog proteina. Istraživana je uloga leucinskog bočnog ogranka u održavanju hidrofobne srži T4 lizozima kroz sukcesivne zamjene s bočnim ograncima manjim za metilnu skupinu.

Računalnim modeliranjem pokazano je da norvalin održava približno jednaku konformaciju bočnog ogranka kao leucin. Iako su razlike u diedarskim kutovima i vrijednostima rms bočnih ogranaka u neposrednoj blizini supstituiranog leucina relativno male, zamjena leucina u hidrofobnoj srži s norvalinom uzrokovala je smanjenje temperaturne stabilnosti lizozima[103]. Sličan efekt pokazan je i pri zamjenama leucina s norvalinom u hidrofobnoj srži citokroma C[104]. Bilo bi zanimljivo sustavno ispitati može li norvalin funkcionalno zamijeniti leucin, odnosno koji strukturni motivi podnose manji ili veći stupanj takve zamjene.

2.8 Pogrešna biosinteza proteina

2.8.1 Točnost biosinteze proteina

Mnogim eksperimentima se do sada nastojala odrediti razina pogreške u biosintezi proteina. Izmjerena pogreška značajno ovisi o eksperimentalnom pristupu, no okvirno se smatra da je sveukupna pogreška biosinteze proteina negdje u rasponu 10^{-3}-10^{-4}. Najcitiraniji je eksperiment Loftfielda i Vaderjagta u kojem su analizirali zečji hemoglobin i mjerili učestalost ugradnje valina umjesto izoleucina[105]. Inkubirali su zečje retikulocite s radioaktivnim valinom i pratili njegovu ugradnju u određene triptičke peptide hemoglobina koji bi trebali sadržavati samo jedan izoleucin i nijedan valin. Raspon pogreške u njihovim eksperimentima seže preko tri reda veličine, no često citirani broj je medijan - 3×10^{-4}. Sličan pristup su imali i Edelmann i Gallant koji su pratili pojavnost cisteina u flagelinu kao modelnom proteinu koji ne sadrži cistein. Zamjena arginina s cisteinom posljedica je dekodiranja argininskog kodona s $tRNA^{Cys}$ koja ima antikodon blizak komplementarnom. Autori su izmjerili pogrešku u rasponu 6×10^{-5} - 2×10^{-4} [106].

Drugi pristup u mjerenju pogreške je korištenje modelnog proteina koji služi kao reporter mistranlacije. Kramer i Farabaugh proučavali su luciferaze F- i R-luc. Napravili su niz varijanti luciferaze F-luc promjenom kodona za lizin koji je ključan za aktivnost u niz bliskih kodona. Kroz luciferaznu aktivnost varijanti F-luc u odnosu na R-luc, mjerena je globalna mistranslacija lizinom, tj. ugradnja lizina umjesto aminokiselina uvedenih kodiranjem bliskim kodonima. Procjenjena pogreška u translaciji iznosila je $3{,}4 \times 10^{-4}$ [107]. Stansfield i suradnici pratili su povrat aktivnosti inaktivne mutirane varijante H195Y kloramfenikol-acetiltransferaze iz *S. cerevisiae*, a izmjerena učestalost pogreške iznosila je 5×10^{-6} [108]. Prednost eksperimentalnog dizajna Kramera i Farabaugha je u mjerenju mistranslacije na

skupini od 24 kodona, što ipak realnije odražava razinu globalne mistranslacije u odnosu na mjerenja na samo jednom kodonu, kao kod pristupa Stansfielda.

Usporedba publiciranih razina pogreške upućuje na varijaciju kroz tri reda veličine, što može biti posljedica mjerenja različitih razina pogreški, poput pogreške aaRS u slučaju Loftfielda i Vanderjagta u odnosu na greške u sparivanju kodona s antikodonom kao kod ostalih spomenutih eksperimenata, ili nesigurnosti korištene metodologije. Kako je pogreška u biosintezi proteina vrlo mala, broj ispravno sintetiziranih proteina je veći čak nekoliko redova veličine od broja mistranslatiranih proteina, pa mjerenje razine pogreške za većinu metoda postaje izazov, pogotovo na razini čitavog proteoma. Eksperimentalni pristup uglavnom unosi pristranost, budući da se zaključci o razini globalne pogreške u translaciji donose na temelju mjerenja jedne aminokiselinske supstitucije, pogrešnog dekodiranja jednog kodona ili u najboljem slučaju skupine kodona. Idealan pristup omogućavao bi istovremeno mjerenje razine mistranslacije svih kodona u jednom eksperimentu. Obećavajuća metodologija je analiza čitavog proteoma kvantitativnom spektrometrijom masa visoke razlučivosti koja bi spregnuta s analizom transkriptoma i genoma mogla razlučiti globalnu pogrešku mistranslacije od grešaka koje su posljedica transkripcije ili replikacije[109-112].

2.8.2 Učinak mistranslacije na stanicu

Temeljna pretpostavka je da prijenos genetičke informacije mora biti savršeno točan i da svako odstupanje ima negativan učinak na preživljenje stanice. Većina eksperimenata pokazala je da inducirana mistranslacija doista ima negativan učinak. U brojnim studijama testirana je toksičnost nepripadnih aminokiselina za bakterijske sojeve u kojima određena aaRS ima ugašen popravak pogreške. Bacher i suradnici pokazali su smanjenu vijabilnost u prisustvu norvalina kod *E. coli* soja gdje IleRS ima ugašen popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline. Pretpostavljeno je da je uzrok zamjena izoleucina norvalinom na razini čitavog proteoma. Bakterije s mistranslatiranim proteomom bile su manje vijabilne u raznim uvjetima uzgoja poput različitih temperatura ili medija, te osjetljivije na tretman antibioticima[113]. Mistranslacija je čak uzrokovala pojačanu stopu mutacija uslijed indukcije bakterijskog SOS odgovora što je uputilo na direktnu vezu mistranslacije i nasljednih genetičkih promjena[114]. Slično istraživanje na LeuRS iz *E. coli* pokazalo je da su stanice s ugašenim popravkom pogreške nakon prijenosa osjetljive na niz nepripadnih aminokiselina poput proteinogenih izoleucina, metionina, valina ili neproteinogenih norvalina, norleucina,

homocisteina ili homoserina[115] . Istraživane su i posljedice mistranslacije u stanicama sisavaca. Pokazano je da gubitak sposobnosti popravka pogreške kod AlaRS uzokuje mistranslaciju alanina serinom. Zanimljivo je da su se miševi koji su homozigoti za mutaciju koja gasi popravak pogreške mogli razviti u odrasle jedinke. Kod tih jedinki zamijećene su značajne fenotipske promjene u obliku propadanja Purkinjeovih stanica malog mozga, što vodi k ataksiji i naposlijetku smrti jedinki[116]. Pretpostavlja se da su neuroni osjetljiviji na mistranslaciju od ostalih staničnih tipova jer su dugoživući i nemaju aktivnu diobu. Ostale stanice se rješavaju dijela mistranslatiranih i eventualno krivo smotanih proteina jer se diobom ukupni proteom dijeli na dvije stanice, dok se kod neurona mistranslatirani i krivo smotani proteini konstantno akumuliraju.

Predloženi mehanizmi toksičnosti pogrešno translatiranih proteina su gubitak ili stjecanje funkcije. Smatra se da je najčešća posljedica mistranslacije gubitak funkcije, no u rijetkim slučajevima mistranslatirani protein može uslijed drugačije strukture obavljati alternativnu funkciju, nekanonsku za normalan protein[109].

Novija istraživanja pokazuju da stanice mogu podnijeti viši postotak mistranslacije bez značajnih fenotipskih posljedica. Pokazano je da nediskriminirajuća *E. coli* AspRS omogućava akumulaciju Asn-tRNA^{Asp} i zamjenu aspartata asparaginom u proteomu. Razina mistranslacije utvrđena je praćenjem reporter proteina, a pokazano je da *E. coli* podnosi razinu supstitucije do čak 10 %[117]. Kod *E. coli* i *S. cerevisiae* PheRS s ugašenim popravkom pogreške sintetizira značajnu količinu Tyr-tRNA^{Phe} u bakterijskoj citoplazmi. Mistranslacija nije imala značajan učinak na rast *E. coli* u bogatom mediju, ni na rast *S. cerevisiae* ukoliko je PheRS eksprimirana u citosolu. Međutim, ukoliko se točnija mitohondrijska PheRS zamjeni netočnom citosolnom PheRS bez popravka pogreške, stanice imaju smanjenu vijabilnost. Takvi eksperimenti pokazali su da različiti stanični odjeljci zahtjevaju različitu minimalnu točnost translacije za održavanje funkcionalnog proteoma. Poznat je i prirodni primjer dvomislenog dekodiranja koji vodi heterogenosti proteina. Naime, otkriveno je da *Candida albicans* kodon CUG, koji kod svih ostalih organizama određuje leucin, uglavnom dekodira kao serin jer posjeduje izoakceptor tRNA^{Ser} s komplementarnim antikodonom CAG. Budući da je u stanicama prisutna i izoakceptorska tRNA^{Leu} s antikodonom CAG, u 97 % slučajeva se CUG dekodira kao serin, a u 3-5 % kao leucin. Uvođenjem dodatne tRNA^{Leu} (CAG) u *C. albicans*, povećana je ugradnja leucina diktirana kodonom CUG na čak 28 %. Takva reverzija kodona nije imala uočljiv učinak na vijabilnost *C. albicans*[118]. Kada je tRNA^{Ser} s

antikodonom CAG eksprimirana u *S. cerevisiae*, umjesto leucina se u određenom postotku ugrađivao serin. Takve stanice nisu imale značajno smanjenu vijabilnost, a čak su i lakše podnosile uvjete stresa poput povišene koncentracije arsena, kadmija, cikloheksimida, vodikovog peroksida i natrijevog klorida jer su već pripremile zaštitne mehanizme u odgovoru na mistranslaciju[119, 120]. Utvrđen je i transkripcijski odgovor na mistranslaciju uvedenu putem takve mutatorske $tRNA^{Ser}$. Mistranslacija potiče ekspresiju proteina koji imaju ulogu u odgovoru na stres i aktivira odgovor krivo smotanih proteina[121] (engl. *unfolded protein response*).

Nedavno otkriće iz grupe Tao Pana otvorilo je novo područje namjerne, odnosno regulirane mistranslacije. Kod stanica sisavaca, uočena je namjerna mismetionilacija tRNA koje nisu specifične za metionin[122]. Bazalna razina mismetionilacije je oko 1%, što je značajno više od tipične pogreške u mistranslaciji (~ 0,01 %), a u uvjetima stresa ta razina poraste na čak 10 %. Mismetionilacija je potaknuta reaktivnim kisikovim vrstama i selektivna je za određene tRNA izoakceptore koje MetRS može prepoznati i vezati. Isti učinak pokazan je i kod drugih organizama, poput *S. cerevisiae*[123] i *E. coli*[124]. Smatra se da mehanizam regulirane mismetionilacije ima ulogu zaštite organizma od oksidativnog stresa. Metionin se može oksidirati i time zaštititi ostale bočne ogranke, a jednostavno se redukcijom vraća u izvorno stanje putem peptidil-Met-sulfoksid-reduktaze. Nastala biblioteka metioninom supstituiranih proteina uslijed regulirane mismetionilacije pruža raznovrsnost potrebnu za preživljenje oksidativnog stresa. Npr. metionin pozicioniran blizu aktivnog centra može zaštititi enzim od ireverzibilne inaktivacije[110]. Mismetionilacija je kod stanica sisavaca regulirana putem fosforilacije. U uvjetima oksidativnog stresa, kinaza ERK1/2 fosforilira MetRS na pozicijama Ser209 i Ser825. Fosforilirani oblik MetRS ima povećani afinitet prema nepripadnim tRNA, a smanjeni afinitet za pripadnu $tRNA^{Met}$ zbog čega raste sadržaj metionina u trenutno sintetiziranim staničnim proteinima[125]. Na temelju regulirane mismetionilacije kao primjera, postavljen je općeniti model regulirane odnosno adaptivne mistranslacije koji obuhvaća prilagodbu razine točnosti translacije u odgovoru na stanične podražaje ili stanični stres. Prednost takve vrste staničnog odgovora je u brzini. Već u nekoliko sekundi stanice mogu kroz mistranslaciju sintetizirati statistički proteom i uvesti varijabilnost koja možda omogućava lakše preživljenje do ostvarivanja sporijeg staničnog odgovora putem transkripcije i translacije potrebnih gena[110].

3 Materijali i metode

3.1 Materijali

3.1.1 Standardne kemikalije

Agar (*Sigma*), agaroza (*Sigma*), akrilamid (*Sigma*), amonijev acetat (CH_3COONH_4) (*Kemika*), amonijev klorid (NH_4Cl) (*Kemika*), amonijev peroksodisulfat (APS) (S*erva*), amonijev sulfat ($NH_4(SO_4)_2$) (*Kemika*), ampicilin (*Sigma*), 1,4-bis(2-(4-metil-5-fenil)oksazolil)benzen (POPOP) (*Calbiochem*), borna kiselina (*Zorka* Šabac), cinkov klorid ($ZnCl_2$) (Sigma), 2,5-difenil oksazol (PPO) (Merck), dimetilsulfoksid (DMSO) (*Sigma*), ditiotreitol, DTT (*Sigma*), etanol, (*Kemika*), etilendiamintetraoctena kiselina, EDTA (*Sigma*), fenilmetilsulfonil-fluorid (PMSF) (*Sigma*), fenol (*Kemika*), glicerol (*Kemika*), glicin (*USB Corporation*), N-(2-hidroksietil)piperazin-N'-2-etansulfonska kiselina (Hepes) (*USB Corporation*), imidazol (*Sigma*), izopropil-β-tiogalaktozid (IPTG) (*Sigma*), izopropanol (*Kemika*), kalijev acetat (CH_3COOK) (*Kemika*), kalcijev klorid ($CaCl_2$) (*Kemika*), kanamicin (*Sigma*), kloridna kiselina (HCl) (*Kemika*), kloroform (*Kemika*), kvaščev ekstrakt (*BD Difco*), magnezijev acetat ($(CH_3COO)_2Mg$) (*Sigma*), magnezijev klorid ($MgCl_2$) (*Fluka*), magnezijev sulfat ($MgSO_4$) (*Kemika*), β-merkaptoetanol (*Serva*), N,N'-metilenbisakrilamid (*Merck*), natrijev acetat (CH_3COONa) (*Kemika*), natrijev dodecilsulfat (SDS) (*Merck*), natrijev hidroksid (NaOH) (*Kemika*), natrijev klorid (NaCl) (*Kemika*), natrijev pirofosfat ($Na_4P_2O_7$) (*Sigma*), octena kiselina (CH_3COOH) (*Kemika*), polietilenglikol 8000 (PEG 8000) (*Sigma*), saharoza (*Sigma*), tetraciklin (*Sigma*), *N*,*N*,*N*',*N*'-tetrametiletilendiamin (TEMED) (*Serva*), trifluoroctena kiselina (TFA) (*Sigma*), trikloroctena kiselina (TCA) (*Kemika*), toluen (*T. T. T.*), tripton (*BD Difco*), Tris(hidroksimetil)-aminometan (Tris) (*Sigma*), ureja (*Kemika*).

3.1.2 Aminokiseline i nukleotidi

α-aminobutirat (*Sigma*), ATP (*Sigma*), CTP (*Sigma*), dNTP (smjesa dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (*Sigma*), GDP (*Sigma*), GTP (*Sigma*), izoleucin (*Sigma*), leucin (*Sigma*), metionin (*Sigma*), norvalin (*Sigma*), UTP (*Sigma*).

3.1.3 Boje

Bromfenol plavo (*Serva*), Coomassie Brilliant Blue R-250 (*Merck*), Coomassie Brilliant Blue G-250 (*Merck*), etidijev bromid (*Boehringer Mannheim*), ksilencijanol fluorofosfat (XCFF) (*Serva*), toluidinsko modrilo (*Sigma*).

3.1.4 Enzimi, proteini i nukleinske kiseline

Albumin iz goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumin*; BSA) (*NEB*), DNaza I s pripadnim puferom (*Sigma*), DNaza I (oslobođena od RNaza) (*NEB*), *Pfu* DNA-polimeraza (*Fermentas*), piruvat-kinaza (*Sigma*), restrikcijske endonukleaze s pripadnim puferima (*NEB*), ribonukleaza A iz goveđe gušterače (*USB Corporation*), RNasin (*Promega*), *Taq* DNA-polimeraza (*Fermentas*), T4 DNA-ligaza (*Fermentas*) T4 polinukleotid-kinaza (*NEB*), T7 RNA-polimeraza (*Sigma*), termostabilna anorganska pirofosfataza (TIPP) (*NEB*).
Oligonukleotidi (*Sigma* ili *Macrogen*) korišteni kao početnice u lančanoj reakciji polimeraze ili sintetski geni za željenu molekulu tRNA, sintetizirani su prema potrebi.

3.1.5 Komercijalni kompleti za pročišćavanje DNA

QIAprep Spin Miniprep Kit (*Qiagen*) za izolaciju plazmidne DNA, *QIAquick PCR Purification Kit* (*Qiagen*) za pročišćavanje DNA iz reakcijskih smjesa lančane reakcije polimeraze, *QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)* za izolaciju DNA iz agaroznih gelova.

3.1.6 *Radioaktivno obilježeni spojevi*

α-[^{32}P]-ATP (*Perkin Elmer*), [^{32}P]-PP_i (*Perkin Elme*r), [^{14}C]-izoleucin (*Perkin Elmer*), [^{14}C]-leucin (*Perkin Elmer*)

3.1.7 Hranjive podloge i mediji za uzgoj bakterije E. coli

3.1.7.1 Tekuća hranjiva podloga Luria-Bertani (LB):

kvaščev ekstrakt (γ = 5 g dm^{-3}) , tripton (γ = 10 g dm^{-3}), NaCl (γ = 10 g dm^{-3}).

3.1.7.2 Minimalni medij M9

Sastav medija M9 korištenog u testovima toksičnosti aminokiselina i mikroaerobnom uzgoju

Na_2HPO_4 (c = 50 mmol dm^{-3}), KH_2PO_4 (c = 25 mmol dm^{-3}), NaCl (c = 10 mmol dm^{-3}), NH_4Cl (c = 20 mmol dm^{-3}), $CaCl_2$ (c = 0,1 mmol dm^{-3}), $MgSO_4$ (c = 2 mmol dm^{-3}), glukoza (γ = 20 g dm^{-3}), tiamin (c = 1 mmol dm^{-3}).

Sastav medija M9 korištenog u proteomskim eksperimentima

1 × M9 soli (M6030, *Sigma*), glukoza (γ = 5 g dm^{-3}), tiamin (c = 0,05 mmol dm^{-3}).

3.1.7.3 Krute hranjive podloge LB

kvaščev ekstrakt (γ = 5 g dm^{-3}), tripton (γ = 10 g dm^{-3}), NaCl (γ = 10 g dm^{-3}), agar (γ = 15 g dm^{-3}). Antibiotici se dodaju po potrebi do standardne preporučene konačne masene koncentracije (kanamicin – 0,020 ili 0,030 mg mL^{-1}, ampicilin - 0,100 mg mL^{-1}, tetraciklin – 0,010 mg mL^{-1}, kloramfenikol – 0,020 ili 0,034 mg mL^{-1}).

3.1.8 E. coli sojevi i plazmidi

3.1.8.1 Sojevi

BL21 (DE3) (*F^- ompT hsdS_B* (r_B^- m_B^-) *ga dcm* (DE3), Novagen): soj korišten za prekomjernu ekspresiju gena ukloniranih u vektore iz serije pET. Soj sadrži gen za T7 polimerazu integriran u bakterijski kromosom pod kontrolom inducibilnog promotora *lacUV5* i ne eksprimira aktivne proteaze *lon* i *ompT*.

DH5α ((*supE44 ΔlacU169* (*Φ80 lacZ*) *ΔM15*) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi1 relA1*): soj rutinski korišten za umnožavanje plazmidne DNA te za kloniranje. Pogodan je zbog delecije gena *endA1* (kodira za endonukleazu I) čime se izbjegava nespecifična razgradnja DNA, a omogućava i α-komplementacije s plazmidima iz serije pUC.

MG1655 (*F- lambda- ilvG- rfb-50 rph-1*): laboratorijski soj koji je najsličniji divljem tipu *E. coli*. Dobiven je iz centra *E. coli Genetic Stock Center*. U disertaciji je korišten za zamjenu gena *leuS* s genom koji kodira za deacilacijski defektnu varijantu LeuRS.

JW5807-2 (*Δ(araD-araB)567 ΔleuB780::kan ΔlacZ4787*(::rrnB-3) *λ^- rph-1 Δ(rhaD-rhaB)568 hsdR514*): auksotrof za leucin zbog unesene kanamicinske kazete u gen *leuB*. Soj je korišten

za zamjenu gena *leuS* s genom koji kodira za deacilacijski defektnu varijantu LeuRS. Dobiven je iz centra *E. coli Genetic Stock Center*.

3.1.8.2 Plazmidi

ΔpET3a – derivat pET3a plazmida iz serije vektora pET za prekomjernu ekspresiju proteina pod kontrolom inducibilnog promotora. Omogućava ekpresiju rekombinantnih proteina s T7-privjeskom na N-kraju s ciljem imunoafinitetnog pročišćavanja na agarozi za koju su vezana monoklonska antitijela za T7-privjesak. Plazmid je niskog broja kopija i nosi gen za rezistenciju na ampicilin. U ovom radu korišten je za prekomjernu ekspresiju molekula tRNA.

pET28b – plazmid iz serije vektora pET, rutinski korišten za prekomjernu ekspresiju proteina pod kontrolom inducibilnog promotora *T7lac*. Omogućava ekspresiju rekombinantnih proteina s histidinskim privjeskom (skraćeno: His-privjesak) na N- ili C-kraju s ciljem pročišćavanja afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozi. Plazmid je niskog broja kopija i nosi gen za rezistenciju na kanamicin.

pKOV – derivat vektora pKO3[126]. U vektor pKO3 je genetičkim inženjerstvom dodan nukleotidni slijed veličine 3 kb koji služi za lakšu pripremu vektora za kloniranje. Dodana nukleotidna sekvenca izrezuje se odgovarajućim restrikcijskim enzimima i omogućava lakše odvajanje vektora razgrađenog s oba restrikcijska enzima, od vektora razgrađenog samo s jednim restrikcijskim enzimom. pKOV se koristi za zamjenu gena u genomu *E. coli*. Značajke vektora pKOV odgovaraju značajkama vektora pKO3. pKOV sadrži temperaturno osjetljivo ishodište replikacije, gen *cat* koji kodira za kloramfenikol-acetiltransferazu (rezistencija na kloramfenikol) i gen *sacB* koji kodira za enzim levansaharazu (engl. *levansucrase*).

pUC18 – plazmid visokog broja kopija, često upotrebljavan za kloniranje ili sekvenciranje. Njegove osnovne značajke su gen za rezistenciju na ampicilin, zatim regija *lac* u kojoj se nalazi višestruko mjesto za kloniranje (engl. *multiple cloning site*, MCS) te početak replikacije *ori* iz plazmida pBR322. Ugradnjom željenog inserta u višestruko mjesto za kloniranje inaktivira se gen za β-galaktozidazu što omogućava selekciju rekombinantnih plazmida na temelju plave ili bijele boje kolonija na podlozi koja sadrži 5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktozid.

3.1.9 Kromatografske kolone, punila i ostali kromatografski materijali

DEAE-celuloza DE-52 (*Whatman*), Ni-NTA agaroza (*Qiagen*), polietilenimin-celuloza pločice za tankoslojnu kromatografiju (PEI) (*Fluka*), Superdex 200 HR 10/30 (*GE Healthcare*)

3.1.10 Ostali materijal

Celulozna membrana za dijalizu (D9277 i D9777, *Sigma*), centrikoni *Amicon® Ultra centrifugal filters* (*Milipore*), 0,22 μm celuloza acetat, filter papir (*Whatman 3MM*), mikrotitarske pločice (*Falcon*), zaslon s uskladištenim fosforom (engl. *storage phosphor screen, Amersham Biosciences*).

3.2 Metode

3.2.1 Metode rada s bakterijama

3.2.1.1 Priprema elektrokompetentnih stanica bakterije Escherichia coli

Elektrokompetentne stanice su stanice kojima je omogućen unos strane DNA metodom elektroporacije (elektroporacija je opisana u idućem poglavlju 3.2.1.2). Najvažnije svojstvo takvih stanica je da su dobro isprane od hranjivog medija, odnosno soli koje medij sadrži kako pri primjeni električnog pulsa ne bi došlo do električnog pražnjena, tj. iskrenja. Sva manipulacija s bakterijskim stanicama odvijala se u laminaru, uz upaljeni plamen. Najprije je uzgojena zasićena bakterijska suspenzija u mediju LB (5 mL zasićene kulture za inokulaciju 500 mL medija LB). Po potrebi, dodani su antibiotici ukoliko je pripreman soj *E. coli* koji na plazmidu ili u genomu nosi gen za otpornost na antibiotik. Stanice su uzgajane na 37 °C uz aeraciju potresanjem pri 200 rpm, sve dok nije postignuta vrijednost optičke gustoće pri 600 nm (OD_{600}) u rasponu od 0.4-0.6. Navedena optička gustoća indikator je da se stanice *E. coli* nalaze u eksponencijalnoj fazi rasta. Stanice su po završetku uzgoja ohlađene na 4 °C, te istaložene centrifugiranjem pri 5000 g i 4 °C u trajanju od 15 min. Talog stanica ispran je vodom tako da je dva puta resuspendiran u 500 mL sterilne redestilirane vode i pretaložen centrifugiranjem. Talog stanica resuspendiran je u 10 mL 10 % v/v glicerola, pretaložen centrifugiranjem, i konačno resuspendiran u 1-1,5 mL 10 % v/v glicerola. Bakterijska suspenzija je razdjeljena u alikvote od 40 μL, a alikvoti su čuvani do upotrebe na -80 °C.

3.2.1.2 Transformacija bakterijskih stanica elektroporacijom

Elektroporacija je metoda unosa strane molekule DNA u bakterijske stanice koja se zasniva na kratkotrajnom povećanju propusnosti bakterijske stanične stijenke uslijed izlaganja bakterija električnom pulsu. U 40 µl elektrokompetentnih bakterija dodano je 50-100 ng plazmidne DNA i prebačeno u ohlađenu kivetu za elektroporaciju. Priprema elektrokompetentnih stanica opisana je u poglavlju 3.2.1.1. Za elektroporaciju je korišten uređaj MicroPulser (*Biorad*) gdje je na suspenziji stanica primijenjen puls od 2,5 kV cm^{-1} u trajanju od 4,5 ms. Bakterije su zatim resuspendirane u 1 mL tekućeg medija LB i inkubirane 1 h na 37 °C. Odgovarajući alikvoti bakterijske suspenzije (15-200 µL) naneseni su na selektivne hranjive podloge, koje su zatim inkubirane preko noći na 30 ili 37 °C. U slučaju transformacije bakterijskih stanica ligacijskom smjesom (opisano u poglavlju 3.2.2.6), stanice su najprije istaložene centrifugiranjem, a zatim resuspendirane u 100 µL medija LB i nasađene na odgovarajuću selektivnu hranjivu podlogu. Budući da plazmidi sadrže gen za rezistenciju na određeni antibiotik, preživljavaju samo transformirane bakterije.

3.2.1.3 Zamjena gena u genomu bakterije Escherichia coli homolognom rekombinacijom

Zamjena kromosomskog divljeg tipa gena *leuS* genom koji kodira za deacilacijski defektni LeuRS – D345A LeuRS, napravljena je na soju *E. coli* MG1655 koji je dobiven iz centra „*E. coli Genetic Stock Center*“. U postupku zamjene korišten je vektor $pKOV^{126}$ koji ima temperaturno senzitivno izvorište replikacije, te markere za pozitivnu (Cam^R- rezistencija na kloramfenikol) i negativnu (gen *sacB* – toksičnost saharoze u mediju) selekciju ugradnje i izgradnje plazmida iz genoma bakterije *E. coli*. Rekombinantni plazmid pKOV koji sadrži gen za D345A LeuRS napravljen je ligacijom NotI-XbaI kazete koja sadrži gen koji kodira D345A LeuRS i plazmida pKOV ragrađenog s NotI i XbaI. Elektrokompetentne stanice MG1655 (napravljene prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.1.1), transformirane su rekombinantnim pKOV-D345A LeuRS plazmidom te nasađene na krute hranjive podloge LB s kloramfenikolom (LB^{Cam}, korišten je kloramfenikol konačne masene koncentracije 20 µg mL^{-1}). Pojedinačna transformirana kolonija resuspendirana je u 100 µL 10 % (w/v) $MgSO_4$, i napravljena su decimalna razrjeđenja. Po 100 µL decimalnih razrjeđenja (3.-5.) nasađeno je na krute hranjive podloge LB^{Cam} i inkubirano preko noći na 42 °C kako bi se izdvojile bakterijske kolonije koje su homolognom rekombinacijom ugradile rekombinantni pKOV-D345A LeuRS plazmid u genom. Po šest kolonija je zatim resuspendirano u 500 µL tekućeg

medija LB bez NaCl i napravljena su decimalna razrjeđenja bakterijske suspenzije. Po 100 µL decimalnih razrjeđenja (3.-5.) nasađeno je na krute hranjive podloge LB koje sadrže saharozu (γ = 50 g dm^{-3}), a ne sadrže NaCl. Kolonije koje su narasle na krutim hranjivim podlogama sa saharozom, provjerene su na krutim hranjivim podlogama LB^{Cam} kako bi se potvrdilo da su izgradile rekombinantni plazmid pKOV iz genoma i izgubile rezistenciju. Mogućnost izgradnje plazmida pKOV s divljim tipom gena ili mutiranom varijantom je u teoriji jednaka i iznosi 50 %. Početna selekcija potencijalnih pozitiva sa zamijenjenim genom *leuS* za verziju koja kodira za deacilacijski defektni enzim, napravljena je na temelju osjetljivosti na norvalin. Najprije su pojedinačne kolonije uzgojene do zasićenja pri 37 °C u mediju LB. Svaka kultura nasađena je 1:50 u minimalni medij M9 s dodanim proteinogenim aminokiselinama konačne masene koncentracije 50 µg mL^{-1}, uracilom i adeninom konačne masene koncentracije 40 µg mL^{-1} te sa ili bez norvalina konačne koncentracije 10 mmol dm^{-3}. Kulture su uzgajane na 37 °C, aerirane potresanjem pri 200 rpm, a OD_{600} je izmjeren nakon 6-8 sati rasta. Prisutnost gena koji kodira za D345A LeuRS u bakterijskim kolonijama kojima je norvalin bio toksičan za rast, potvrđena je umnažanjem gena *leuS* pomoću lančane reakcije polimeraze i sekvenciranjem produkta. Navedenim postupkom napravljena su barem dva neovisna soja D345A LeuRS MG1655 koja su u disertaciji korištena kao neovisne biološke replike deacilacijski defektnog soja *E. coli*. Dvije kolonije koje nisu pokazale osjetljivost na norvalin također su testirane pomoću reakcije PCR i sekvenciranja kako bi se potvrdilo da posjeduju divlji tip gena *leuS* i korištene su u ovoj disertaciji kao soj WT LeuRS MG1655. Na jednak način uveden je gen koji kodira za D345A LeuRS u soj *E. coli* koji je auksotrof za leucin - JW5807-2.

3.2.1.4 Testovi toksičnosti nepripadnih aminokiselina in vivo (određivanje IC50)

U testovima toksičnosti nepripadnih aminokiselina *in vivo*, korišteni su sojevi WT i D345A LeuRS MG1655. Prekonoćne kulture pripremljene su u mediju LB, a eksperiment toksičnosti postavljen je razrjeđivanjem u minimalnom mediju M9 s glukozom (γ = 2 g dm^{-3}) i različitim koncentracijama norvalina ili izoleucina (početni OD_{600} iznosio je 0,02). Bakterijske kulture su uzgajane na 37 °C, aerirane pri 200 rpm i konstruirane su krivulje rasta praćenjem optičke gustoće bakterijskih suspenzija pri 600 nm. Primjenom logističkog modela rasta stanica (Jednadžba 3.1) na izmjerene podatke, dobiven je koeficijent brzine rasta stanica.

$$y = \frac{A}{\left(1 + e^{(4 \times \frac{\mu}{A} \times (\lambda - t) + 2)}\right)}$$

Jednadžba 3.1 Logistički model diobe stanica. *A* predstavlja maksimalni rast stanica, λ predstavlja duljinu lag faze, a μ predstavlja koeficijent brzine rasta bakterijskih stanica.

Svi eksperimenti napravljeni su najmanje dva puta, a iz ovisnosti koeficijenta brzine rasta bakterijskih stanica i koncentracija nepripadnih aminokiselina dodanih u medij, konstruirana je sigmoidna krivulja i izražen IC50 (engl. *half maximal inhibitory concentration*, Jednadžba 3.2). IC50 odražava koncentraciju testiranog inhibitora pri kojoj se postiže 50 % učinka inhibicije.

$$y = y_0 + \frac{(y_{max} - y_0)}{1 + 10^{(\log IC50 - x) \times HillSlope}}$$

Jednadžba 3.2 Sigmoidna ovisnost koncentracije inhibitora (aminokiseline) i učinka na koeficijent brzine rasta stanica. *y* je koeficijent brzine rasta bakterijskih stanica, *x* je logaritam koncentracije aminokiseline, y_0 je koeficijent brzine rasta stanica u odsustvu inhibitora, y_{max} je minimalni koeficijent brzine rasta stanica pri maksimalnoj inhibiciji, *Hillslope* je koeficijent koji određuje nagib krivulje, a IC50 je koncentracija inhibitora pri kojoj se postiže 50 % maksimalnog učinka.

3.2.1.5 Uzgoj bakterija u mikroaerobnim uvjetima

Pretkulture su pripremljene u mediju LB uzgojem na 37 °C i aerirane pri 200 rpm. Za proteomske eksperimente spektrometrije masa, pretkulture su pripremljene u minimalnom mediju M9 (sastav je u poglavlju 3.1.7.2). Uzgoj u mikroaerobnim uvjetima pokrenut je razrjeđivanjem pretkultura 1:50 u minimalnom mediju M9 volumena 50 mL u polipropilenskoj epruveti volumena 50 mL na 37 °C, pri 150 rpm. Rast je praćen mjerenjem OD_{600}, a ulaskom u stacionarnu fazu rasta, aeracija je dodatno onemogućena smanjenjem potresanja na 100 rpm. Po potrebi, u medij je u pravilnim vremenskim intervalima dodavana glukoza. Vijabilnost stanica u stacionarnoj fazi provjeravana je testom sposobnosti stvaranja kolonija na krutim hranjivim podlogama (opisano u idućem poglavlju).

3.2.1.6 Test vijabilnosti stanica - sposobnost stvaranja kolonija na krutim hranjivim podlogama

Napravljena su decimalna i serijska razrjeđenja bakterijskih kultura u fosfatnom puferu. Po 100 µL odgovarajućih razrjeđenja nasađeno je na krute hranjive podloge LB i inkubirano otprilike 16 h. Broj kolonija određen je na krutim hranjivim podlogama koje su imale više od

30, a manje od 300 vidljivih kolonija. Vijabilnost stanica izražena je kao broj kolonija po mL nasađene bakterijske kulture. Testovi su napravljeni najmanje četiri puta, koristeći dvije neovisne biološke replike soja s barem dva neovisna razrjeđenja.

3.2.2 Metode rada s DNA

3.2.2.1 Izolacija plazmidne DNA

Za izolaciju plazmidne DNA korišten je komercijalni QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), a izolacija je provedena prema uputama proizvođača.

3.2.2.2 Agarozna gel-elektroforeza

Agarozni gelovi (1 % (w/v) agaroza) pripremljeni su otapanjem 1 g agaroze u 100 mL pufera 1 x TAE (c (Tris) = 40 mmol dm^{-3}, c (EDTA) = 1 mmol dm^{-3} - titrirana octenom kiselinom do pH = 8,0 i γ (etidijev bromid) = 0,5 mg dm^{-3}) i grijanjem u mikrovalnoj pećnici nekoliko minuta. Uzorcima je prije nanašanja na gel, dodana 1/10 volumena pufera za nanošenje uzoraka. Pufer za nanošenje uzoraka priprema se otapanjem 25 mg ksilencijanolfluorofosfata i 25 mg bromfenol plavo u 7 mL EDTA (c = 0,1 mol dm^{-3}, pH = 8,0) te 3 mL glicerola. Elektroforeza je provedena u elektroforetskom puferu 1 x TAE pri 130 V u trajanju 30-40 min. Jakost električnog polja iznosila je oko 8-10 V cm^{-1}.

3.2.2.3 Određivanje koncentracije nukleinskih kiselina

Koncentracije DNA ili RNA određene su spektrofotometrijski, mjerenjem apsorbancije na uređaju NanoDrop 1000. Rezultati mjerenja su apsorpcijski spektri, a koncentracija nukleinske kiseline izračunata je pomoću apsorbancije pri valnoj duljini od 260 nm i odnosa u kojem A_{260} = 1 odgovara 50 µg čiste DNA, odnosno 40 µg čiste RNA. Mjerno područje instrumenta za mjerenje koncentracije nukleinskih kiselina je 2-3700 ng μL^{-1}.

3.2.2.4 Lančana reakcija polimeraze

Lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) je u ovom radu korištena za umnažanje gena *leuS* i *tufB* iz genomske DNA bakterije *E. coli*. Početnice su osmišljene tako da sadržavaju bar 40 % GC nukleotida i da se na krajevima nalazi jedan (ili više) C ili G nukleotida kako bi vezanje početnica na kalup bilo stabilnije. Mogućnost

nastanka sekundarnih struktura početnica zbog prisutnosti palindromskih, ponavljajućih ili obrnuto ponavljajućih sljedova provjerena je analizom odabranog para početnica programom OligoCalc. Sinteza početnica naručena je od tvrtke *Sigma* ili *Macrogen*. Reakcijska smjesa za PCR sadržavala je genomsku DNA masene koncentracije do 1 ng μL^{-1}, početnice (c = 1 µmol dm^{-3}), dNTP-ove (c = 0,2 mmol dm^{-3}), pufer za polimerazu Pfu (c (Tris) = 20 mmol dm^{-3}, pH = 8,8, c ($(NH_4)_2SO_4$) = 10 mmol dm^{-3}, c (KCl) = 10 mmol dm^{-3}, γ (BSA) = 0,1 mg mL^{-1}, φ (Triton X-100) = 0,1 %, c ($MgSO_4$) = 2 mmol dm^{-3}) i polimerazu Pfu (2,5 U μL^{-1}) u ukupnom volumenu 50-100 µL. Reakcija se provodila u uređaju za PCR (Thermal Cycler, *Eppendorf*) kroz 25-30 ciklusa denaturacije, sparivanja početnica i produljenja. Produkti lančane reakcije polimeraze provjereni su elektroforezom na 1 % agaroznom gelu.

3.2.2.5 Ciljana mutageneza

Mutacije u gen *leuS* uvođene su pomoću komercijalnog kompleta *QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene).* Za umnažanje pET28bLeuRS plazmida lančanom reakcijom polimeraze, korištene su oligonukleotidne početnice koje u sredini sadrže točkastu mutaciju od interesa. Rezultat takvog umnažanja je linearni vektor sa stršećim krajevima koji sadrži željenu točkastu mutaciju u genu *leuS.* Za uklanjanje izvornog plazmida pET28bLeuRS (kalup za PCR), korištena je restrikcijska endonukleaza DpnI koja razgrađuje hemimetiliranu i metiliranu DNA. Budući da je plazmidna DNA proizvedena *in vivo* metilirana zbog aktivne Dam metilaze, a DNA proizvedena *in vitro* nemetilirana i rezistentna na DpnI, kalup se može selektivno ukloniti. Produktom reakcije PCR transformiraju se elektrokompetentne bakterijske stanice DH5α (elektroporacija je opisana u poglavlju 3.2.1.2), pojedinačne kolonije se umnože za izolaciju ciljnog plazmida, i prisutnost mutacije se provjeri sekvenciranjem (poglavlje 3.2.2.7). U slučaju dvostrukih mutanata, mutacije su uvođene jedna po jedna, tj. mutirani plazmid, rezultat prve reakcije PCR, korišten je kao kalup za sljedeću reakciju PCR. Produkti lančane reakcije polimeraze provjereni su elektroforezom na 1 % agaroznom gelu.

3.2.2.6 Ligacija DNA pomoću T4 DNA-ligaze

T4 DNA-ligaza korištena je prema uputama proizvođača s odgovarajućim komercijalno dostupnim puferom. Ligacija razgrađenog vektora i inserta rutinski je napravljena u volumenu od 20 µL, inkubacijom reakcijske smjese na 22 °C u trajanju od dva sata. Omjer količine

razgrađenog vektora i inserta u ligacijskoj smjesi postavljen je 1:1 do 1:5. Kao negativna kontrola za utvrđivanje kvalitete razgrađenog vektora, postavljena je uvijek i reakcija ligacije u kojoj je umjesto inserta u ligacijsku smjesu stavljena redestilirana voda. Po završetku reakcije, ligaza je inaktivirana inkubacijom 10 minuta pri 65 °C. Ligacijska smjesa elektroporirana je u bakterijski soj DH5α.

3.2.2.7 Analiza nukleotidnih sljedova dobivenih sekvenciranjem

Rekombinantni plazmidi sekvencirani su u DNA-servisu Instituta Ruđer Bošković na četverokapilarnom sekvenatoru ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*). Uobičajeno je pripremljeno 500 ng plazmida u ukupnom volumenu od 13 µL i dodano je 1 µL početnice za sekvenciranje množinske koncentracije 3,2 µmol dm^{-3}. Alternativno, korišten je servis za sekvenciranje tvrtke *Macrogen*. Analiza sekvenci napravljena je pomoću sučelja NCBI BLAST (engl. *Basic Local Alignment Search Tool*) usporedbom nukleotidnih ili aminokiselinskih sljedova. Kromatogrami su analizirani u programu *Chromas Lite*.

3.2.3 Metode rada s tRNA

3.2.3.1 Izolacija i pročišćavanje ukupne tRNA obogaćene s $tRNA^{Leu}$

Budući da je gen za $tRNA^{Leu}$ ukloniran u plazmidni vektor ΔpET3a pod kontrolom T7 promotora, transkripcija je potaknuta dodatkom IPTG-a. Za jednostavnije pročišćavanje, poželjno je postići što veću koncentraciju željenog produkta u staničnom ekstraktu, u ovom slučaju ciljne molekule tRNA. Metodologija za prekomjernu ekspresiju tRNA uspostavljena je ranije u laboratoriju za $tRNA^{Ile}$ i $tRNA^{Val\ 11}$. Najprije je uzgojena pretkultura u u tekućem mediju LB s ampicilinom konačne masene koncentracije 100 µg mL^{-1}. 0,5 L medija LB s dodatkom ampicilina, inokulirano je s 5 mL pretkulture te inkubirano na 37 °C, uz aeraciju pri 200 rpm. Kada je bakterijska suspenzija dosegla OD_{600} = 0,5-0,6, inducirana je ekspresija molekula tRNA dodatkom IPTG-a (c = 1 mmol dm^{-3}). Bakterije su uzgajane 15 h na 30 °C u inducirajućim uvjetima, nakon čega su stanice istaložene centrifugiranjem 15 min na 5000 g, pri 4 °C. Talog dobiven iz 0,5 L bakterijske suspenzije resuspendiran je u 15 mL pufera za izolaciju tRNA (c (Tris) = 10 mmol dm^{-3}, pH = 8,0, c $(CH_3COO)_2Mg$) = 10 mmol dm^{-3}), nakon čega je dodan 1 volumen fenola zasićenog vodom. Smjesa je vorteksirana 6 puta po 30

sekundi s pauzama od 30 sekundi inkubacije na ledu, nakon čega su slojevi odvojeni centrifugiranjem 15 min, 10000 g. Gornji vodeni sloj ekstrahiran je jednakim volumenom fenol-kloroforma (smjesa fenola zasićenog vodom i kloroforma u volumnom omjeru 1:1), a nakon 10 min laganog miješanja, slojevi su razdvojeni centrifugiranjem. Za povećanje prinosa ukupne izolirane tRNA, ostaci tRNA u fenolnom i fenol-kloroformnom sloju ponovno su ekstrahirani puferom za izolaciju tRNA. Kako bi se iz ukupne tRNA uklonile nukleinske kiseline visokih molekulskih masa (DNA, mRNA i rRNA), u ekstrakt su dodani PEG 8000 konačne masene koncentracije 70 g dm^{-3} i NaCl konačne množinske koncentracije 0,5 mol dm^{-3}. Smjesa je inkubirana 10 min na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugirana 15 min pri 10000 g. Iz supernatanta je ukupna tRNA istaložena standardnim postupkom - uz dodatak natrijevog acetata i etanola i inkubaciju na -20 °C preko noći. Nakon centrifugiranja i sušenja, talog tRNA je otopljen u Tris-u (c = 0,125 mol dm^{-3}, pH = 8,5-9,0) i inkubiran 1,5 h na 37 °C s ciljem deacilacije ukupne tRNA. Reakcija deacilacije zaustavljena je dodatkom octene kiseline (konačni pH je približno 5). tRNA je dijalizom pri 4 °C prevedena u Hepes (c = 5 mmol dm^{-3}, pH = 7,5, dijaliza je opisana u poglavlju 3.2.3.3). Koncentracija izolirane tRNA određena je spektrofotometrijski (postupak je opisan u poglavlju 3.2.2.3). tRNA je prije upotrebe uvijek renaturirana zagrijavanjem 3 min pri 80 °C, nakon čega je dodan jednak volumen $MgCl_2$ (c = 20 mmol dm^{-3}) predgrijan na 80 °C i uzorak je ostavljen da se sporo ohladi do sobne temperature.

3.2.3.2 Denaturirajuća poliakrilamidna gel-elektroforeza u prisustvu ureje

Uzorci molekula tRNA analizirani su poliakrilamidnom gel-elektroforezom u prisustvu denaturirajućeg sredstva – ureje. Nukleinske kiseline u tim uvjetima imaju jednak omjer naboja i mase, pa je temelj razdvajanja razlika u molekulskoj masi. Sastav pripremljenih gelova je: akrilamid:bisakrilamid 19:1 (6-8 % w/v), c (ureja) = 8 mol dm^{-3}, c (Tris) = 90 mmol dm^{-3}, c (borna kiselina) = 90 mmol dm^{-3}, c (EDTA) = 2 mmol dm^{-3}, pH = 8,0. Polimerizacija gela potaknuta je dodatkom amonijevog peroksodisulfata (APS) do konačne masene koncentracije 0,7 μg mL^{-1} i *N, N, N′, N′*-tetrametiletilendiamina (TEMED) do konačnog volumnog udjela 0,05 %. Nakon polimerizacije gela, jažice su zbog nataložene ureje isprane elektroforetskim puferom 1 x TBE (c (Tris) = 90 mmol dm^{-3}, c (borna kiselina) = 90 mmol dm^{-3}, c (EDTA) = 2 mmol dm^{-3}, pH = 8,0). Prije nanošenja na gel, uzorci su denaturirani 5 min na 80 °C uz dodatak jednakog volumena pufera za nanošenje uzorka (γ

(ureja) = 8 mol dm^{-3}, γ (bromfenol plavo) = 2 mg mL^{-1}, γ (ksilencijanolfluorofosfat) = 2 mg mL^{-1}, c (EDTA) = 10 mmol dm^{-3}, pH = 8,0). Elektroforeza je trajala 1 h pri 120-150 V, a jakost električnog polja iznosila je oko 10-12 V cm^{-1}. tRNA je vizualizirana potresanjem gela 15-20 min u otopini toluidinskog modrila (γ (toluidinsko modrilo) = 40 μg mL^{-1}, φ (EtOH) = 50 %, φ (CH_3COOH) = 0,1 %). Nespecifično vezana boja uklonjena je kuhanjem gela u vrućoj destiliranoj vodi do pojave jasnih vrpci. Ovom metodom bojanja mogu se vizualizirati vrpce koje sadrže minimalno 0,2 μg nukleinskih kiselina.

3.2.3.3 Dijaliza tRNA

Uzorci tRNA su prije skladištenja na -20 °C prevedeni dijalizom u odgovarajući pufer. Crijevo u kojem se provodi dijaliza pripremljeno je kuhanjem 1 min pri 100 °C u EDTA (c = 1 mmol dm^{-3}) radi uklanjanja metalnih iona s površine polupropusne celulozne membrane. Neaminoacilirana $tRNA^{Leu}$ rutinski je prevedena u Hepes (c = 5 mmol dm^{-3}, pH = 7,5) dijalizom u tri obroka pufera u trajanju od barem tri sata. Aminoacilirana $tRNA^{Leu}$ prevedena je istim postupkom u natrijev acetat (c = 5 mmol dm^{-3}, pH = 5,0), a čuva se u kiselom, kako bi se minimizirala neenzimska hidroliza esterske veze. Nakon dijalize, tRNA je do korištenja čuvana na -20 °C.

3.2.3.4 Obilježavanje tRNA radioaktivnim izotopom [^{32}P]

U enzimskim testovima poput prijenosa aminokiseline na tRNA, varijanti aminoaciliranja u ustaljenom stanju i deacilacijskim testovima, rabljena je tRNA radioaktivno obilježena izotopom [^{32}P]. [^{32}P]-tRNA pripremljena je prema publiciranom postupku[127, 128] korištenjem enzima tRNA-nukleotidil-transferaze i radioaktivnog ATP-a obilježenog na α-fosfatu. Produkt reakcije obilježavanja je tRNA s [^{32}P] smještenim u fosfatu koji povezuje nukleotide C75 i A76. Reakcija izmjene zasniva se na uklanjanju posljednjeg nukleotida tRNA (A76) pirofosforolizom i ugradnji α-[^{32}P]-ATP na njegovo mjesto, pri čemu je izlazna skupina PP_i. Reakcijska smjesa za obilježavanje sadrži Tris (c = 200 mmol dm^{-3}, pH = 8,0), $MgCl_2$ (c = 20 mmol dm^{-3}), natrijev pirofosfat (c = 5 mmol dm^{-3}), ditiotreitol (c = 0,5 mmol dm^{-3}) te tRNA (c = 5 μmol dm^{-3}), α-[^{32}P]-ATP (c = 1 μmol dm^{-3}, specifična aktivnost 3000 Ci $mmol^{-1}$) i tRNA-nukleotidil-transferazu (c = 10 μmol dm^{-3}). Reakcija je pokrenuta dodatkom radioaktivnog ATP-a u reakcijsku smjesu, nakon čega je smjesa inkubirana 1 minutu pri 37 °C. Tada se pretežno odvija pirofosforoliza kojom se uklanja terminalni adenozin tRNA zbog količine

pirofosfata prisutne u reakcijskoj smjesi u odnosu na količinu ATP-a. Po isteku vremena, dodana je u reakcijsku smjesu anorganska pirofosfataza (konačna koncentracija 0,1 U μL^{-1}) koja hidrolizira pirofosfat, te je reakcijska smjesa inkubirana dvije minute na sobnoj temperaturi, tijekom čega se odvija ugradnja α-[^{32}P]-ATP-a na 3'-kraj tRNA. Reakcija je zaustavljena i radioaktivno obilježena tRNA izdvojena dodatkom jednakog volumena fenol-kloroforma (ekstrakcija je ponovljena dva puta). Preostali radioaktivni α-[^{32}P]-ATP uklonjen je uzastopnim propuštanjem vodene faze kroz dvije gel-filtracijske kolone *Micro Bio-Spin 30 (BioRad)* te je [^{32}P]-tRNA prevedena dijalizom u Hepes (c = 10 μmol dm^{-3}, pH = 7,5) (prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.3.3) i pohranjena na -20 °C.

3.2.4 Metode rada s proteinima

3.2.4.1 Prekomjerna ekspresija rekombinantnih proteina

Za pročišćavanje proteina LeuRS ili EF-Tu u preparativnim količinama, pripremljeno je 5 mL pretkulture. Medij LB (0,5 L) u koji je prethodno dodan odgovarajući antibiotik, inokuliran je s 5 mL pretkulture (volumni omjer 1:100). Bakterijska kultura uzgajana je u tresilici na 37 °C dok vrijednost OD_{600} nije dosegla 0,5 – 0,8, a zatim je prekomjerna ekspresija proteina inducirana dodatkom IPTG-a konačne množinske koncentracije 0,25 mmol dm^{-3}. Bakterije su rasle u inducirajućim uvjetima 4 sata na 37 °C, zatim su oborene centrifugiranjem 15 min pri 5000 g i 4 ^{o}C, i talog bakterijskih stanica je pohranjen na -20 °C do korištenja.

3.2.4.2 Priprema proteinskih ekstrakata

Talog stanica resuspendiran je u 5 mL pufera A (c (Hepes) = 20 mmol dm^{-3}, pH = 7,0, c (NaCl) = 500 mmol dm^{-3}, c ($MgCl_2$) = 5 mmol dm^{-3}, c (imidazol) = 10 mmol dm^{-3}, c (β-merkaptoetanol) = 10 mmol dm^{-3}) za afinitetno pročišćavanje na Ni-NTA agarozi. Za lizu bakterijskih stanica i oslobađanje proteina u otopinu korištena je sonikacija. Prethodno sonikaciji, bakterijskoj suspenziji dodani su PMSF – inhibitor serinskih proteaza (c = 0,1 mmol dm^{-3}), lizozim (γ = 50 ng μL^{-1}) i DNaza I (γ = 3 ng μL^{-1}). Stanice su razbijane sonikacijom 8 puta po 45 sekundi u razmacima od 1 minute pri čemu je suspenzija stanica inkubirana na ledu. Lizat je odmah centrifugiran 1 h pri 10000 g na 4 °C, a dobiveni supernatant (proteinski ekstrakt) profiltriran protiskivanjem kroz sterilni filtar te podvrgnut pročišćavanju na Ni-NTA agarozi (opisano u sljedećem poglavlju).

3.2.4.3 Afinitetna kromatografija na Ni-NTA agarozi

Specifične reverzibilne interakcije između His-privjeska i liganda vezanog na kromatografski materijal omogućavaju izdvajanje proteina s His-privjeskom od ostatka proteinskog ekstrakta afinitetnom kromatografijom. Budući da je His-privjesak neutralan pri fiziološkom pH te uglavnom ne utječe na strukturu i funkciju rekombinantnih proteina, izrazito je koristan za vezanje proteina na površinama kao što je Ni-NTA. Nitrilotrioctena kiselina (NTA) je tetradentatni kelirajući adsorbens koji zauzima četiri koordinacijska mjesta Ni^{2+} iona, dok dva koordinacijska mjesta ostaju slobodna za interakciju s imidazolnim prstenovima dvaju susjednih histidina sadržanih u polihistidinskom privjesku. Kao punilo za kolone koristi se Ni-NTA agaroza koja se sastoji od Sepharoze CL-6B na koju je vezana Ni-NTA. Kapacitet smole je 5-10 mg proteina po mililitru.

Svi puferi korišteni u pročišćavanju imaju temeljno jednak sastav – *c* (Hepes) = 20 mmol dm^{-3}, pH = 7,0, *c* (NaCl) = 500 mmol dm^{-3}, *c* ($MgCl_2$) = 5 mmol dm^{-3} i *c* (β-merkaptoetanol) = 10 mmol dm^{-3}. Puferi A-D razlikuju se po konačnoj množinskoj koncentraciji imidazola - redom 10, 20, 30 ili 200 mmol dm^{-3} imidazola. Kromatografska kolona naprije je napunjena s 1 mL Ni-NTA, a zatim isprana s redestiliranom vodom (10 mL) i uravnotežena u puferu A (10 mL). Radi postizanja učinkovitijeg vezanja proteina s His-privjeskom, proteinski ekstrakt propušten je kroz kolonu tri puta. Kako bi se uklonili nevezani proteini, kolona je isprana puferom A (30 mL), a zatim i puferima B (10 mL) i C (10 mL) za uklanjanje slabo vezanih proteina. Protein je s kolone eluiran puferom D (6 mL) koji sadrži imidazol množinske koncentracije 200 mmol dm^{-3}, a uspješnost pročišćavanja i pojedinačne frakcije eluiranog proteina (1 mL) provjerene su SDS poliakrilamidnom gel-elektroforezom (opisano u sljedećem poglavlju). Postupak pročišćavanja proteina proveden je u hladnoj sobi na 4 °C.

3.2.4.4 Denaturirajuća poliakrilamidna gel-elektroforeza u prisustvu natrijevog dodecil sulfata

Analiza proteinskih uzoraka provedena je metodom diskontinuirane denaturirajuće poliakrilamidne gel-elektroforeze. Budući da svi denaturirani proteini zbog nastalog kompleksa sa SDS-om imaju jednak oblik i jednak omjer naboja i mase, razdvajanje pojedinih proteina rezultat je razlike u molekulskoj masi. Za izlijevanje SDS-poliakrilamidnih gelova i elektroforezu uzoraka korištena je aparatura za elektroforezu Mini PROTEAN TETRA (*Biorad*). SDS-gel se sastojao od dva dijela: gel za razdvajanje (9 % (w/v) akrilamid-

bisakrilamid (29:1), *c* (Tris) = 0,375 mol dm^{-3}, pH = 8,8, 0,1 % (w/v) SDS) i gel za sabijanje (4 % (w/v) akrilamid-bisakrilamid (29:1), *c* (Tris) = 0,125 mol dm^{-3}, pH = 6,8, 0,1 % (v/w) SDS). Prije nanošenja na gel, uzorcima je dodan pufer za denaturaciju i nanošenje na gel (*c* (Tris) = 62,5 mmol dm^{-3}, pH = 6,8, *c* (β-merkaptoetanol) = 12,5 mmol dm^{-3}, φ (glicerol) = 6,25 % , 1,25 % (w/v) SDS, 0,002 % (w/v) bromfenol plavo), a denaturirani su inkubacijom 5 min u termobloku. Elektroforeza se odvijala 15 min pri 120-130 V s ciljem sabijanja uzoraka (jakost električnog polja iznosila je oko 10 V cm^{-1}), a zatim se razdvajanje odvijalo 45 min pri 180-200 V na sobnoj temperaturi u puferu sastava γ (glicin) = 14,4 g dm^{-3}, γ (Tris) = 3,03 g dm^{-3}, 0,1 % (w/v) SDS, pH = 8,3 (jakost električnog polja pri razdvajaju proteina iznosila je oko 16 V cm^{-1}). Za vizualizaciju proteina, gel je inkubiran u otopini boje Coomassie Brillant Blue R-250 (γ (CBB R-250) = 2,5 g dm^{-3}, φ (octena kiselina) = 10 %, φ (EtOH) = 45 %), nakon čega je višak vezane boje uklonjen odbojavanjem u vrućoj vodi.

3.2.4.5 Ugušćivanje proteina ultrafiltracijom

Za ugušćivanje uzoraka proteina, korišten je Centricon®-centrifugal filter device (Milipore) s porama koje propuštaju čestice manje od 10 kDa ili 30 kDa prema uputama proizvođača.

3.2.4.6 Dijaliza proteina

Pročišćen i ugušćen LeuRS dijaliziran je prema puferu za skladištenje (*c* (Tris) = 20 mmol dm^{-3}, pH = 7,5), *c* (NaCl) = 50 mmol dm^{-3}, *c* (β-merkaptoetanol) = 5 mmol dm^{-3}, φ (glicerol) = 10 %) te pohranjen na -80 °C nakon što mu je koncentracija određena metodom po Bradfordu ili spektrofotometrijski pomoću uređaja NanoDrop 1000 (opisano u sljedećem poglavlju). Pročišćen i ugušćen EF-Tu dijaliziran je prema puferu za skladištenje sastava *c* (Hepes) = 50 mmol dm^{-3}, pH = 7,5, *c* ($MgCl_2$) = 10 mmol dm^{-3}, *c* (KCl) = 50 mmol dm^{-3}, φ (glicerol) = 10 %, *c* (GDP) = 50 μmol dm^{-3} i c (β-merkaptoetanol) = 5 mmol dm^{-3}. Volumni udio glicerola je nakon dijalize povećan na 50 % i EF-Tu je pohranjen na -20 °C.

3.2.4.7 Određivanje koncentracije proteina

3.2.4.7.1 Metoda po Bradfordu

Ova metoda temelji se na reakciji proteina i boje Coomassie Brilliant Blue G-250 pri čemu se apsorpcijski maksimum boje pomiče s 465 nm na 595 nm[129]. Apsorbancija smjese je pri

valnoj duljini od 595 nm u određenom rasponu linearno proporcionalna koncentraciji proteina u uzorku. Da bi se mogla odrediti koncentracija proteina, nužno je napraviti baždarni pravac s poznatim koncentracijama proteinskog standarda (npr. albumina goveđeg seruma, engl. *bovine serume albumine*, BSA) u rasponu unutar kojeg se očekuje koncentracija proteina od interesa. Pomoću dobivene jednadžbe pravca, odredi se koncentracija ispitivanog proteina. Rutinski su svi uzorci razrjeđeni u destiliranoj vodi do konačnog volumena 100 μL i dodano im je po 1 mL Bradfordovog reagensa (γ (Coomassie Brilliant Blue G-250) = 0,1 g dm^{-3}, φ (EtOH) = 5 %, φ (H_3PO_4) = 8,5 %). Apsorbancija pri valnoj duljini od 595 nm mjerena je 15-20 min kasnije.

3.2.4.7.2 Mjerenje koncentracije proteina na spektrofotometru NanoDrop 1000

U svrhu mjerenja koncentracije proteina spektrofotometrom NanoDrop 1000, potrebno je nanijeti 2 μL uzorka na postolje instrumenta te unijeti u program spektrofotometra ekstinkcijski koeficijent i molekulsku masu ispitivanog proteina. Kao slijepa proba za nuliranje instrumenta, koristi se pufer u kojem se protein nalazi. Rezultati mjerenja su apsorpcijski spektar i koncentracija uzorka proteina izražena u mg mL^{-1}, a izračunata pomoću apsorbancije pri valnoj duljini od 280 nm. Mjerno područje instrumenta za mjerenje koncentracije proteina je 0,10 – 100 mg mL^{-1}.

3.2.5 Kinetičke metode

3.2.5.1 Aktivacija aminokiselina mjerena metodom izmjene pirofosfata

Aktivacija aminokiselina rutinski se mjeri metodom izmjene pirofosfata (Reakcijska shema 3.1). Ovaj enzimski test se temelji na mjerenju koeficijenta brzine ugradnje radioaktivnog [^{32}P]-PP_i u ATP, odnosno mjerenju pirofosforolize kao povratne reakcije aktivacije. Do pirofosforolize dolazi jer se u reakcijsku smjestu uz radioaktivni [^{32}P]-PP_i prisutan u manjoj količini kao biljeg, stavlja i neradioaktivni PP_i (c = 1 mmol dm^{-3}), čime se potiče povratna reakcija. Supstrat reakcije pirofosforolize je aminoacil-adenilat, produkt aktivacije aminokiseline (Reakcijska shema 3.1). Budući da je pirofosforoliza izuzetno brza reakcija, dok je nastajanje aminoacil-adenilata znatno sporije, mjerenjem pirofosforolize zapravo se mjeri nastajanje aminoacil-adenilata, koje ograničava ukupnu brzinu pirofosforolize.

Izmjereni koeficijent brzine nastajanja radioaktivnog [^{32}P]-ATP-a funkcija je koeficijenata brzine aktivacije aminokiseline i koeficijenta brzine pirofosforolize.

$$aaRS + aa + ATP \rightleftharpoons aaRS{:}\,aa\text{-}AMP + PP_i$$
$$aaRS{:}\,aa\text{-}AMP + \left[^{32}P\right]\text{-}PP_i \rightleftharpoons aaRS + aa + \left[^{32}P\right]\text{-}ATP$$

Reakcijska shema 3.1 Reakcija izmjene pirofosfata – ATP-PP$_i$.

Izmjena pirofosfata korištena je za određivanje kinetičkih parametara K_M i k_{cat} u uvjetima ustaljenog stanja za reakciju aktivacije pripadne aminokiseline leucina, te raznih nepripadnih aminokiselina – izoleucina, valina, metionina, norvalina, te α-aminobutirične kiseline. Reakcijska smjesa je sadržavala standardni LeuRS reakcijski pufer – *c* (Hepes) = 100 mmol dm^{-3}, pH = 7,5, *c* ($MgCl_2$) = 10 mmol dm^{-3}, *c* (KCl) = 150 mmol dm^{-3}, *c* (DTT) = 5 mmol dm^{-3}, *γ* (BSA) = 0,1 mg mL^{-1} za stabilizaciju enzima te *c* (ATP) = 4 mmol dm^{-3}. Koncentracija enzima je prilagođena u ovisnosti o koeficijentu brzine aktivacije pojedine ispitivane aminokiseline, a reakcija je praćena u vremenskom intervalu koji je omogućavao akumulaciju [^{32}P]-ATP u uvjetima ustaljenog stanja. Za određivanje kinetičkih parametara, korišten je raspon koncentracija aminokiselina koji odgovara otprilike 0,1 – 10 × K_M. Reakcija je standardno pokrenuta dodavanjem aminokiseline u reakcijsku smjesu. U određenim vremenskim intervalima po pokretanju reakcije, uzet je alikvot reakcijske smjese volumena 1,5 µL i dodan u 3 µL otopine za zaustavljanje reakcije sastava *c* (CH_3COONa) = 0,75 mol dm^{-3}, pH=4,5 te 0,15 % (w/v) SDS. Prikupljene vremenske točke analizirane su tankoslojnom kromatografijom. Naneseno je po 1,5 µL svake točke na polietileniminske pločice za tankoslojnu kromatografiju (Fluka) koje su predrazvijene u redestiliranoj vodi i posušene na sobnoj temperaturi. Radvajanje produkata ([^{32}P]-ATP, [^{32}P]-P$_i$) i supstrata ([^{32}P]-PP$_i$) reakcije napravljeno je razvijanjem pločice u puferu sastava *c* (KH_2PO_4) = 750 mmol dm^{-3}, pH = 3,5 i *c* (ureja) = 4 mol dm^{-3}. Pločice su nakon razvijanja posušene fenom, i izložene preko noći na zaslonu s uskladištenim fosforom. Ploča s uskladištenim fosforom je nakon izlaganja snimljena na uređaju PhoshorImager Typhoon 9410. Rezultati su kvantificirani programom *ImageQuant 5.2* i obrađeni pomoću programa *Excel* i *Graphpad Prism 5.0.* Koncentracija nastalog [^{32}P]-ATP određena je umnoškom koncentracije ATP-a dodanog u reakcijsku smjesu i udjela radioaktivnog [^{32}P]-ATP u ukupnoj radioaktivnosti (Jednadžba 3.3).

$$\chi([^{32}P]\text{-}ATP) = \frac{intenzitet\ signala\ ([^{32}P]\text{-}ATP)}{\left(intenzitet\ signala[^{32}P]\text{-}ATP + intenzitet\ signala[^{32}P]\text{-}PP_i\right)}$$

Jednadžba 3.3 Množinski udio nastalog [^{32}P]-ATP u reakciji izmjene pirofosfata. Intenzitet signala proporcionalan je količini radioaktivno obilježene molekule, a odnosi se na ukupni intenzitet signala određen denzitometrijskom analizom slike snimljene laserskim skenerom Typhoon 9410.

Primjenom linearne regresije na vremenskim tijekovima nastanka $[^{32}P]-ATP$, dobivena je početna brzina nastanka $[^{32}P]-ATP$ za svaku koncentraciju korištene aminokiseline. Koristeći ovisnost početnih brzina o koncentraciji korištene aminokiseline, nelinearnom regresijom prema jednadžbi Michaelis-Menten (Jednadžba 3.4) dobiveni su kinetički parametri K_M i k_{cat} za pojedinu aminokiselinu.

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

Jednadžba 3.4 Jednadžba Michaelis-Menten. v_0 predstavlja početnu brzinu reakcije, V_{max} predstavlja maksimalnu brzinu reakcije, [S] je početna koncentracija supstrata, a K_M je Michaelisova konstanta – koncentracija supstrata pri kojoj je početna brzina reakcije jednaka polovini maksimalne brzine reakcije.

U ovom radu je kao važan parametar istaknut obrtni broj k_{cat}, koji je odgovara maksimalnoj brzini reakcije normiranoj s koncentracijom enzima korištenom prilikom mjerenja (Jednadžba 3.5) i predstavlja maksimalni broj molekula supstrata prevedenih u produkt po aktivnom mjestu enzima u jedinici vremena u uvjetima zasićenja enzima supstratom.

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E_0]}$$

Jednadžba 3.5 Izračun obrtnog broja enzima (k_{cat}) iz maksimalne brzine enzimske reakcije (V_{max}). [E_0] označava početnu koncentraciju enzima.

3.2.5.2 Reakcija aminoaciliranja

3.2.5.2.1 Aminoaciliranje uz [^{14}C]-aminokiselinu

Ova metoda korištena je za određivanje udjela molekula $tRNA^{Leu}$ u ukupnoj tRNA obogaćenoj s $tRNA^{Leu}$. Mjerena je količina radioaktivnosti ugrađene iz [^{14}C]-aminokiseline u aminoacil-tRNA ([^{14}C]-aa-tRNA, Reakcijska shema 3.2).

$$[^{14}C]\text{-}aa + ATP + tRNA^{aa} \rightarrow [^{14}C]\text{-}aa\text{-}tRNA^{aa} + AMP + PP_i$$

Reakcijska shema 3.2 Aminoaciliranje uz [^{14}C]-aminokiselinu.

Broj udaraca u minuti izmjeren uz pomoć scintilacijskog brojača proporcionalan je količini nastale $[^{14}C]\text{–}\,aa\text{–}\,tRNA^{aa}$. Za kvantifikaciju nastale aminoacilirane tRNA, potrebno je znati specifičnu radioaktivnost aminokiseline koja se koristi u aminoacilacijskom testu, tj. broj udaraca u minuti po određenoj količini aminokiseline. S ciljem određivanja specifične radioaktivnosti, na diskiće Whatman 3MM naneseni su različiti alikvoti aminokiseline korištene u aminoaciliranju (smjesa radioaktivne i neradioaktivne), tako da odgovaraju proizvoljnim zadanim koncentracijama aminokiseline. Diskići se posuše, stave u staklene bočice s 2,5 mL scintilacijske otopine (γ (2,5-difenilovog oksazola) = 5 g dm^{-3} i γ (1,4-bis(2-(4-metil-5-fenil)oksazolil)benzen) = 0,3 g dm^{-3}, otopljeno u toluenu) te se u scintilacijskom brojaču izmjeri radioaktivnost. Na kraju se konstruira baždarni pravac ovisnosti ukupne količine aminokiseline o izmjerenim udarcima u minuti (engl. *counts per minute*, cpm), a iz nagiba pravca odredi se specifična radioaktivnost aminokiseline – tj. koliko pmol aminokiseline odgovara 1 cpm.

3.2.5.2.2 Aminoaciliranje uz [^{32}P]-tRNA

Sastav reakcijske smjese aminoaciliranja uz [^{32}P]-tRNA odgovara sastavu reakcijske smjese aminoaciliranja uz [^{14}C]-aminokiselinu. Glavna razlika je u konačnoj koncentraciji aminokiseline. Budući da se tRNA koristi kao radioaktivni biljeg (Reakcijska shema 3.3), u ovakvom dizajnu eksperimenta mogu se koristiti znatno veće koncentracije aminokiselina.

$$aa + ATP + \left[^{32}P\right]\text{-}tRNA^{aa} \rightarrow aa\text{-}\left[^{32}P\right]\text{-}tRNA^{aa} + AMP + PP_i$$

Reakcijska shema 3.3 Aminoaciliranje uz [^{32}P]-tRNA.

Reakcija aminoaciliranja tipično je pokrenuta dodatkom odgovarajuće koncentracije aminokiseline volumena 5 µL na 15 µL ostatka reakcijske smjese i tada je započeto mjerenje vremena. U određenim vremenskim intervalima, alikvoti reakcijske smjese volumena 1,5 µL pomiješani su s 3 µL otopine za zaustavljanje reakcije sastava *c* (CH_3COONa) = 0.75 mol dm^{-3}, pH = 4,5 te 0,15 % (w/v) SDS. Od toga je uzeto 1,5 µL i dodano u 3 µL otopine nukleaze P1 pripremljene otapanjem u natrijevom acetatu (*c* = 0,3 mol dm^{-3}, pH = 5,0).

Nakon inkubacije 1 h na sobnoj temperaturi, 1,5-4,5 µL naneseno je na TLC pločicu i posušeno. Produkti reakcije aminoaciliranja, odnosno razgradnje tRNA nukleazom P1 razdvojeni su tankoslojnom kromatografijom u puferu za razvijanje sastava (c (CH_3COONH_4) = 0,1 mol dm^{-3} i φ (CH_3COOH) = 5 % . U radu su izražene vrijednosti opaženi koeficijenti brzine aminoaciliranja (Jednadžba 3.6).

$$k_{obs} = \frac{v_0}{[E_0]}$$

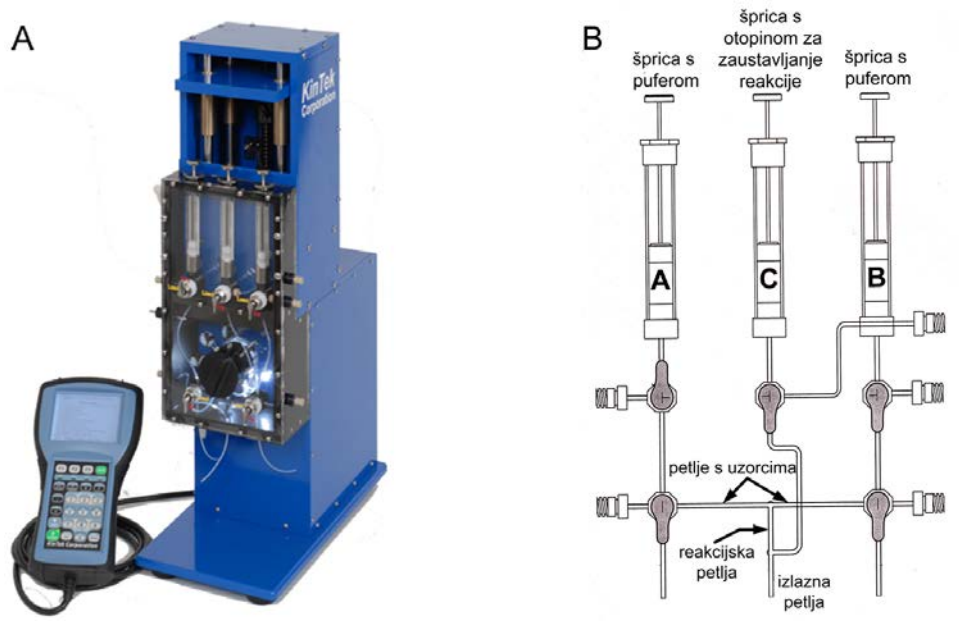
Jednadžba 3.6 Izračun opaženog koeficijenta brzine reakcije (k_{obs}). v_o je početna brzina enzimske reakcije, a $[E_0]$ je početna koncentracija enzima.

3.2.5.3 Određivanje akceptorske aktivnosti tRNA

Određivanje akceptorske aktivnosti tRNA odnosi se na određivanje postotka aktivnih molekula tRNA u uzorku, odnosno koliki postotak molekula je moguće aminoacilirati. U te svrhe, modificirana je standardna reakcija aminoaciliranja na način da je u aminoacilacijsku smjesu dodano znatno više enzima kako bi se sva prisutna tRNA aminoacilirala. Korišten je već navedeni reakcijski pufer te uobičajeno c (tRNA) = 1-2 µmol dm^{-3} i c (LeuRS) = 2-5 µmol dm^{-3}. Alikvoti su uglavnom uzimani 25 i 40 min nakon pokretanja reakcije.

3.2.5.4 Prijenos aminokiseline na tRNA

Izolirani korak prijenosa aminokiseline na molekulu tRNA tipično se mjeri miješanjem prethodno stvorenog nekovalentnog kompleksa aaRS:aa-AMP s molekulama tRNA. Za reakcije prijenosa aminokiseline koje su prebrze da bi se mogle izmjeriti ručno, korišten je instrument za brzo miješanje i zaustavljanje reakcije (engl. *rapid chemical quench*) KinTek RQF-3. Instrument ima motoriziranu platformu kojom u zadanom trenutku potisne klipove šprica napunjenih puferom. Prilikom potiskivanja pufera, pogurnu se do tada razdvojeni uzorci iz omči za uzorke 1 i 2, pomiješaju se u reakcijskoj petlji i time je započeta reakcija. U zadanom vremenskom periodu, motorizirana platforma ponovno potiskuje šprice, no ovaj put je potisnut klip jedino središnje šprice koja sadrži otopinu za zaustavljanje reakcije. Otopina za zaustavljanje reakcije se pomiješa s reakcijskom smjesom u reakcijskoj petlji, i alikvot zaustavljene reakcijske smjese potiskuje se kroz izlaznu cjevčicu u mikroepruvetu za prikupljanje uzorka (Slika 3.1). Najkraće vrijeme u kojem je moguće pokrenuti i zaustaviti reakcijsku smjesu u ovakvom instrumentu je 2,8 ms.



Slika 3.1 Instrument za brzo miješanje i zaustavljanje reakcije (engl. *rapid chemical quench*) KinTek RQF-3. A) vanjski izgled instrumenta. B) Shema reakcijske kutije instrumenta. Preuzeto i prilagođeno s http://www.kintek-corp.com.

Prijenos aminokiseline na molekulu $tRNA^{Leu}$ mjeren je miješanjem kompleksa LeuRS:aa-AMP stvorenog *in situ* te [^{32}P]-obilježene $tRNA^{Leu}$ (postupak obilježavanja opisan je u poglavlju 3.2.3.4). Kompleks LeuRS:aa-AMP stvoren je inkubacijom LeuRS (c = 20 μmol dm^{-3}) s odgovarajućom aminokiselinom (c (leucin) = 5 mmol dm^{-3}, c (norvalin) = 30 mmol dm^{-3}, c (izoleucin) = 10 mmol dm^{-3}, c (α-aminobutirat) = 100 mmol dm^{-3}) u standardnom LeuRS puferu – c (Hepes) = 100 mmol dm^{-3}, pH = 7,5, c ($MgCl_2$) = 10 mmol dm^{-3}, c (KCl) = 150 mmol dm^{-3}, c (DTT) = 5 mmol dm^{-3}; uz c (ATP) = 8 mmol dm^{-3} i anorgansku pirofosfatazu (0,008 U μL^{-1}) u trajanju od 5 minuta pri 37 °C. U KinTek RQF-3 instrumentu miješani su jednaki volumeni kompleksa LeuRS:aa-AMP (c = 20 μmol dm^{-3}) i [^{32}P]-obilježene $tRNA^{Leu}$ (c = 2 μmol dm^{-3}). Reakcija je zaustavljana u određenim vremenskim intervalima dodatkom natrijevog acetata (c = 2 mol dm^{-3}, pH = 4,5), a mikroepruvete u kojima je skupljana zaustavljena reakcijska smjesa sadržavale su 9 μL 1 % (w/v) SDS-a. Zaustavljene reakcijske smjese prikupljene u različitim vremenskim točkama tretirane su nukleazom P1, a produkti su razdvojeni tankoslojnom kromatografijom i analizirani kao što je opisano u poglavlju aminoaciliranje uz [^{32}P]-tRNA (poglavlje 3.2.5.2.2). Množinski udio produkta, tj. aminoacilirane tRNA računa se kao udio intenziteta signala radioaktivnog područja koje

odgovara migraciji aa-[^{32}P]-Ap, u ukupnom intenzitetu signala radioaktivnosti (Jednadžba 3.7).

$$\chi\left(aa\text{-}[^{32}P]\text{-}Ap\right) = \frac{intenzitet\ signala\ (aa\text{-}[^{32}P]\text{-}Ap)}{\left(intenzitet\ signala\ \left(aa\text{-}[^{32}P]\text{-}Ap\right) + intenzitet\ signala\ ([^{32}P]\text{-}Ap)\right)}$$

Jednadžba 3.7 Izračun množinskog udjela aminoacilirane-tRNA. [^{32}P]-Ap: krajnji adenozin-[^{32}P]-fosfat tRNA. aa-[^{32}P]-Ap: krajnji adenozin-[^{32}P]-fosfat tRNA esterificiran aminokiselinom. Intenzitet signala proporcionalan je količini radioaktivno obilježene molekule, a odnosi se na ukupni intenzitet signala određen denzitometrijskom analizom slike snimljene laserskim skenerom Typhoon 9410.

Iz ovisnosti množinskog udjela aminoacilirane tRNA o vremenu, nelinearnom regresijom određen je koeficijent brzine prijenosa aminokiseline (Jednadžba 3.8).

$$y = Y_0 + A \times (1 - e^{-k_{trans} \times t})$$

Jednadžba 3.8 Monoeksponencijalna jednadžba koja opisuje prijenos aminokiseline na tRNA. *y* predstavlja mjereni udio aminoacilirane tRNA, Y_0 predstavlja odsječak na y-osi, *A* odražava amplitudu aminoacilirane tRNA, a k_{trans} predstavlja opaženi koeficijent brzine prijenosa aminokiseline na tRNA.

3.2.5.5 Određivanje kinetičkog K_D za aminokiselinu pri aminoaciliranju u uvjetima jednog obrtaja enzima

Korišteni su jednaki reakcijski uvjeti kao pri određivanju koeficijenta brzine prijenosa aminokiseline na tRNA. Za izvođenje eksperimenta korišten je instrument za brzo miješanje i zaustavljanje reakcije. U jednoj šprici je inkubiran LeuRS (c = 20-40 μmol dm^{-3}) s ATP-om (c = 8 mmol dm^{-3} ATP), anorganskom pirofosfatazom (aktivnost = 0,008 U μL^{-1}) te [^{32}P]-tRNA^{Leu} u standardnom LeuRS puferu (c (Hepes) = 100 mmol dm^{-3}, pH = 7,5, c ($MgCl_2$) = 10 mmol dm^{-3}, c (KCl) = 150 mmol dm^{-3}, c (DTT) = 5 mmol dm^{-3}), a u drugoj šprici su inkubirane različite koncentracije aminokiseline, također u istom puferu. Mjeren je opaženi koeficijent brzine aminoacilacije pri određenoj koncentraciji aminokiseline (k_{obs}). Iz hiperbolne ovisnosti k_{obs} o koncentraciji aminokiseline, mogu se odrediti parametri k_{chem} i K_D (Jednadžba 3.9).

$$k_{obs} = \frac{k_{chem} \times [aa]}{K_D + [aa]}$$

Jednadžba 3.9 Hiperbolna ovisnost k_{obs} – koeficijent brzine aminoacilacije o koncentraciji aminokiseline. k_{chem} je maksimalni koeficijent brzine aminoacilacije, [aa] je početna koncentracija aminokiseline, a K_D je kinetička konstanta disocijacije koja odražava afinitet prema aminokiselini.

3.2.5.6 Reakcija deacilacije

Mjerenjem koeficijenta brzine deacilacije testira se sposobnost enzima u vršenju popravka pogreške nakon prijenosa aminokiseline na tRNA. Test se provodi tako da se enzimu ponudi kao supstrat prethodno stvorena i pročišćena misacilirana tRNA. Misacilirana tRNA napravi se pomoću varijanti enzima koje su nesposobne deacilirati jer imaju uvedenu mutaciju u aktivnom mjesto za popravak pogreške nakon prijenosa. Test reakcije deacilacije izvođen je u uvjetima ustaljenog stanja i u uvjetima jednog obrtaja enzima.

3.2.5.6.1 Deacilacija u uvjetima ustaljenog stanja

Deacilacija u uvjetima ustaljenog stanja napravljena je na sličan način kao reakcija aminoaciliranja s [^{32}P]-tRNA^{Leu} u uvjetima ustaljenog stanja. Reakcijska smjesa sadržavala je Hepes (c = 200 mmol dm^{-3}, pH = 7,5), $MgCl_2$ (c = 10 mmol dm^{-3}), KCl (c = 150 mmol dm^{-3}), DTT (c = 1 mmol dm^{-3}) i BSA (γ = 100 µg mL^{-1}, dodano s enzimom i služi stabilizaciji razrijeđenog enzima). Aminoacilirana/misacilirana tRNA standardno je bila prisutna u reakcijskoj smjesi u množinskoj koncentraciji 8-15 µmol dm^{-3} i renaturirana je prije upotrebe (opisano u poglavlju 3.2.3.1). Reakcije deacilacije su započete dodatkom aa-tRNA i zaustavljane u određenim vremenskim intervalima miješanjem po 2 µL reakcijske smjese s otopinom za zaustavljanje reakcija sastava c (CH_3COONa) = 0,75 mmol dm^{-3}, pH = 4,5 i 0,15 % (w/v) SDS. Iz udjela intenziteta radioaktivnog područja koje odgovara migraciji aa-tRNA u ukupnom intenzitetu radioaktivnosti, te poznate koncentracije aminoacilirane/misacilirane tRNA stavljene u reakcijsku smjesu, određena je koncentracija preostale misacilirane tRNA u svakoj vremenskoj točci. Linearnom regresijom je iz ovisnosti nestanka aminoacilirane/misacilirane tRNA o vremenu određena početna brzina deacilacije aminoacilirane/misacilirane tRNA. Budući da su reakcije rađene u uvjetima zasićenja sa svim supstratima, početna brzina približno odgovara maksimalnoj brzini deacilacije, odnosno k_{obs} (Jednadžba 3.6) odgovara k_{cat}.

3.2.5.6.2 Deacilacija u uvjetima jednog obrtaja enzima

Brze reakcije, poput onih kataliziranih s divljim tipom enzima, mjerene su KinTek RQF-3 instrumentom, dok su spore reakcije, poput onih kataliziranih s deacilacijski defektnim varijantama enzima, mjerene ručno. Aminoacilirana i misacilirana tRNA, standardno su renaturirane prije upotrebe (opisano u poglavlju 3.2.3.1). Princip mjerenja i izvedbe kinetičkog testa deacilacije u uvjetima jednog kruga odgovara izvedbi mjerenja prijenosa aminokiseline na tRNA. LeuRS (c = 20 μmol dm^{-3}) pripremljen u reakcijskom puferu sastava c (Hepes) = 200 mmol dm^{-3}, pH = 7,5, c (KCl) = 150 mmol dm^{-3}, c ($MgCl_2$) = 10 mmol dm^{-3} i c (DTT) = 1 mmol dm^{-3}, pomiješan je s jednakim volumenom renaturirane misacilirane ili aminoacilirane tRNA prisutne u $MgCl_2$ (c = 10 mmol dm^{-3}) i CH_3COONa (c = 2-3 mmol dm^{-3}, pH = 5,0). Reakcije su zaustavljane ručno ili automatski u KinTeK-RQF3 instrumentu pomoću CH_3COONa (c = 2 mol dm^{-3}, pH = 4,5) i 0,1 % (w/v) SDS-a. Prikupljene reakcijske točke analizirane su kao što je već opisano u poglavlju 3.2.5.4. Iz ovisnosti udjela preostale aminoacilirane ili misacilirane tRNA o vremenu, primjenom nelinearne regresije izračunava se koeficijent brzine deacilacije k_{deacyl} (Jednadžba 3.10).

$$y = Y_0 + A \times e^{-k_{deacyl} \times t}$$

Jednadžba 3.10 Monoeksponencijalna jednadžba koja opisuje nestajanje aa-tRNA u uvjetima jednog obrtaja enzima. y predstavlja mjereni udio aminoacilirane tRNA, Y_0 predstavlja odsječak na y-osi, A odražava amplitudu deacilirane tRNA, a k_{deacyl} predstavlja opaženi koeficijent brzine hidrolize esterske veze aa-tRNA.

3.2.5.7 Test utroška ATP-a

Reakcija popravka pogreške (prije ili poslije prijenosa aminokiseline) može se pratiti korištenjem radioaktivno obilježenog ATP-a. Upotreba [α-^{32}P]-ATP-a omogućava direktno praćenje nastanka i nestanka aa-AMP te AMP-a koji nastaje hidrolizom aa-AMP-a ili uslijed prijenosa aminokiseline s aa-AMP-a na tRNA[130] (Reakcijska shema 3.4). Produkti i supstrati reakcije utroška ATP-a (aa-AMP, AMP i ATP) mogu se razdvojiti tankoslojnom kromatografijom i zasebno kvantificirati[11, 130].

$$aaRS + aa + [\alpha\text{-}^{32}P]\text{-}ATP \rightarrow aaRS{:}\,aa\text{-}[^{32}P]\text{-AMP} + PP_i$$

$$aaRS{:}\,aa\text{-}[^{32}P]\text{-AMP} + tRNA^{aa} \rightarrow aa\text{-}tRNA^{aa} + [\alpha\text{-}^{32}P]\text{-}AMP + PP_i$$

Reakcijska shema 3.4 Praćenje popravka pogreške uz [α-^{32}P]-ATP.

Budući da je za sintezu pripadnog aa-AMP-a, odnosno pripadne aa-tRNA potreban samo jedan ATP, povećani utrošak ATP-a, odnosno nastanak AMP-a u prisustvu nepripadne aminokiseline u odnosu na reakciju u prisustvu pripadne aminokiseline, predstavlja indikator popravka pogreške. Reakcijska smjesa sadržavala je *c* (Hepes) = 50 mmol dm^{-3}, pH = 7,5, *c* (KCl) = 150 mmol dm^{-3}, *c* ($MgCl_2$) = 20 mmol dm^{-3}, *c* (DTT) = 5 mmol dm^{-3}, γ (BSA) = 0,1 mg mL^{-1}, anorganska pirofosfataza (aktivnost = 0,004 U μL^{-1}), *c* ([α-^{32}P]-ATP) = 0,5 mmol dm^{-3} (specifične aktivnosti 0,01 – 0,1 mCi mL^{-1}), *c* (aktivne $tRNA^{Leu}$) = 12-15 µmol dm^{-3} te različite koncentracije aminokiselina i varijanti LeuRS. Nakon inkubacije reakcijske smjese bez aminokiseline 1 min na 37 °C, reakcija utroška ATP započinje dodatkom aminokiseline. U određenim vremenskim intervalima uzeti su alikvoti reakcijske smjese od 1,5 µL i reakcija je zaustavljena u 3 µL 1,5 mol dm^{-3} mravlje kiseline. 1,5 µL nastale smjese naneseno je na PEI pločice za tankoslojnu kromatografiju koje su prethodno predrazvijene u redestiliranoj vodi. Razdvajanje tankoslojnom kromatografijom aa-[^{32}P]-AMP, [^{32}P]-AMP i [^{32}P]-ATP, postignuto je u razvijaču sljedećeg sastava: *c* (CH_3COONH_4) = 0,1 mol dm^{-3} i φ (CH_3COOH) = 5 %. Nakon izlaganja razvijenih pločica, zaslon s uskladištenim fosforom snimljen je na uređaju Typhoon 9410 (*GE Healthcare Life Sciences*), a kvantifikacija je napravljena pomoću pripadnog programa ImageQuant.

3.2.5.8 Neenzimska hidroliza aminoacil-adenilata u otopini

Za određivanje stabilnosti aminoacil-adenilata u otopini, korišten je pristup razvijen u radu Gruic-Sovulj i suradnici, 2005[130]. LeuRS je inkubiran s ATP-om, uz dodatak [α-^{32}P]-ATP i aminokiseline kako bi se u otopini akumulirao radioaktivno obilježeni aminoacil-adenilat. U određenom trenutku dodaje se neradioaktivni ATP kako bi se spriječilo dodatno nastajanje radioaktivno obilježenog aminoacil-adenilata. U ovisnosti o vremenu prati se stabilnost aminoacil-adenilata, tako da se uzmu alikvoti volumena 2 µL koji se miješaju s 4 µL mravlje kiseline (*c* = 1,5 mol dm^{-3}). Zakiseljavanjem se stabilizira anhidridna veza i zaustavlja neenzimska hidroliza. 1,5-2 µL alikvoti nanose se na TLC pločicu i analiziraju kao što je već opisano (poglavlje 3.2.5.7). Za određivanje koeficijenta brzine neenzimske hidrolize aminoacil-adenilata, podaci su utočnjeni na monoeksponencijalnu jednadžbu (Jednadžba 3.11).

$$y = Y_0 + A \times e^{(-k \times t)}$$

Jednadžba 3.11 Monoeksponencijalna jedadžba koja opisuje neenzimsku hidrolizu aminoacil-adneilata. *y* odražava udio [^{32}P]-aa-AMP, Y_0 je odsječak na y-osi, *A* je amplituda, a *k* je opaženi koeficijent brzine neenzimske hidrolize aa-AMP.

U reakcijskim smjesama korišten je standardni LeuRS reakcijski pufer sastava *c* (Hepes) = 100 mmol dm^{-3}, pH = 7,5, *c* ($MgCl_2$) = 10 mmol dm^{-3}, *c* (KCl) = 150 mmol dm^{-3} i *c* (DTT) = 1 mmol dm^{-3}. Reakcije su započete dodatkom aminokiseline, i to konačnih množinskih koncentracija 50 mmol dm^{-3} ili 10 mmol dm^{-3} u slučaju norvalina, odnosno leucina i trajale su 15, odnosno 30 min do dodatka neradioaktivnog Mg^{2+}-ATP-a. U reakcijama gdje se testirala stabilnost Leu-AMP, dodana je anorganska pirofosfataza konačne koncentracije 0,004 U μL^{-1}, kako bi se omogućila akumulacija veće količine Leu-[^{32}P]-AMP u otopini.

3.2.5.9 Paralelno praćenje nastanka AMP-a i aminoacilirane ili misacilirane tRNA

Prilikom testiranja utroška ATP-a s varijantama enzima koje ne mogu popravljati pogrešku nakon prijenosa aminokiseline, ili im je ta aktivnost oslabljena (npr. D345A ili T252R LeuRS), nužno je odrediti koji udio AMP-a je oslobođen u otopinu uslijed prijenosa aminokiseline na tRNA i otpuštanja stabilne aminoacilirane/misacilirane tRNA, a ne uslijed popravka pogreške prije ili nakon prijenosa aminokiseline koji rezultira neaminoaciliranom tRNA. Cilj ovakvog kinetičkog testa je utvrditi omjer utrošenog ATP-a po aminoaciliranoj/misaciliranoj tRNA otpuštenoj u otopinu. Ukoliko je omjer utrošenog ATP-a po aminoaciliranoj tRNA otprilike jednak jedan, rezultat upućuje na stehiometrijski utrošak nastalog aminoacil-adenilata za stvaranje aminoacilirane tRNA, odnosno takav rezultat govori da nema hidrolitičke aktivnosti na razini aminoacil-adenilata (popravak pogreške prije prijenosa), niti na razini misacilirane tRNA – popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline. Za mjerenje omjera utroška ATP-a po aminoaciliranoj tRNA, reakcije su napravljene u identičnim uvjetima. Za praćenje nastanka AMP tj. utroška ATP-a dodan je [α-^{32}P]-ATP u tragovima, dok je za mjerenje nastajanja misacilirane ili aminoacilirane tRNA, [^{32}P]-tRNA^{Leu} dodana u tragovima. Reakcijske smjese napravljene su u standardnom reakcijskom puferu za LeuRS – *c* (Hepes) = 100 mmol dm^{-3}, pH = 7,5, *c* ($MgCl_2$) = 10 mmol dm^{-3}, *c* (KCl) = 150 mmol dm^{-3}, *c* (DTT) = 1 mmol dm^{-3}, *γ* (BSA) = 100 μg mL^{-1} (dodano s enzimom), anorganske pirofosfataze (0,004 U μL^{-1}) i *c* (tRNA^{Leu}) = 15 μmol dm^{-3}. U reakcijama je korištena smanjena množinska koncentracija ATP-a u odnosu na standardni test

utroška ATP-a (200 μmol dm^{-3} umjesto 500 μmol dm^{-3}) kako bi se osigurao bolji omjer signala produkta u odnosu na pozadinski signal. Reakcije u kojima se pratilo nastajanje AMP-a zaustavljane su alikvotiranjem dijela reakcijske smjese u mravlju kiselinu, te su vremenske točke obrađene kao što je opisano u poglavlju Test utroška ATP-a (poglavlje 3.2.5.7), dok su reakcijske smjese u kojima je praćeno nastajanje aminoacilirane tRNA zaustavljane u otopini CH_3COONa i SDS-a i tretirane kao što je opisano u poglavlju aminoaciliranje uz [^{32}P]-$tRNA^{Leu}$ (poglavlje 3.2.5.2.2).

3.2.5.10 Kinetički test za određivanje udjela pripadne aminokiseline u uzorku nepripadne aminokiseline

Budući da su korištene analitičke metode poput HPLC-a ili NMR-a nedovoljno osjetljive za određivanje nivoa kontaminacije leucina s izoleucinom koji je manji od oko 0,5 %, razvijen je kinetički test za procjenu udjela leucina u izoleucinu, koji je primjenjiv za procjenu udjela bilo koje pripadne aminokiseline u nepripadnoj ukoliko odgovarajuća aminoacil-tRNA-sintetaza ne misacilira značajno pripadnu tRNA, odnosno ima aktivan popravak pogreške. Test se zasniva na određivanju udjela stabilno aminoacilirane tRNA pri različitim koncentracijama nepripadne aminokiseline. Pritom je važno da je korištena koncentracija aktivne tRNA veća od moguće razine kontaminacije nepripadne aminokiseline pripadnom, da razina kontaminacije ne bi bila podcijenjena. Akceptorska se određuje u nekoliko vremenskih točaka i važno je da se ona ne mijenja u vremenu, te da je postignut maksimum, također kako razina kontaminacije ne bi bila podcijenjena. Linearna ovisnost udjela aminoacilirane tRNA pri različitim koncentracijama nepripadne aminokiseline upućuje na prisutnost kontaminacije, budući da misacilacija u uvjetima u kojima se određuje akceptorska aktivnost (brza aminoacilacija) ne ovisi o koncentraciji nepripadne aminokiseline. Nagib pravca ovisnosti udjela aminoacilirane tRNA o koncentraciji nepripadne aminokiseline odražava udio pripadne aminokiseline u nepripadnoj aminokiselini.

3.2.5.11 Aktivacija elongacijskog faktora Tu

Elongacijski faktor Tu tipično je izoliran u GDP-veznom obliku, zbog intrinzične hidrolitičke aktivnosti prema GTP-u. Kako bi bio funkcionalan u vezanju aminoacilirane tRNA, potrebno ga je prevesti u aktivan EF-Tu:GTP vezani oblik. Standardno je aktiviran EF-Tu:GDP (c = 15 μmol dm^{-3}) u aktivacijskom puferu sastava c (Hepes) = 70 mmol dm^{-3} , pH = 7,5, c (CH_3CO_2

NH_4) = 52 mmol dm^{-3}, *c* ($(CH_3CO_2)_2$ Mg) = 8 mmol dm^{-3}, *c* (KCl) = 30 mmol dm^{-3}, *c* (DTT) = 0.8 mmol dm^{-3}, *c* (fosfoenolpiruvat) = 10 mmol dm^{-3}, *c* (GTP) = 1 mmol dm^{-3} uz piruvat-kinazu (0,08 U μL^{-1}) na 37 °C u trajanju od dva sata. EF-Tu:GTP korišten je odmah nakon aktivacije.

3.2.5.12 Određivanje aktivnog udjela EF-Tu

Aktivna frakcija elongacijskog faktora Tu, odnosno frakcija koja je sposobna vezati aminoaciliranu tRNA određena je metodom zaštite tRNA od djelovanja ribonukleaza. Ukoliko je aminoacilirana tRNA vezana na elongacijski faktor Tu, razgradnja tRNA djelovanjem ribonukleaze biti će onemogućena, odnosno EF-Tu štiti tRNA od razgradnje. Različite koncentracije EF-Tu:GTP u aktivacijskom puferu pomiješane su s Leu-[^{32}P]-$tRNA^{Leu}$ (*c* = 600 nmol dm^{-3}) u trajanju od 20 min pri 4 °C, kako bi se omogućilo stvaranje nekovalentnog ternarnog kompleksa EF-Tu:GTP:aa-tRNA. Zatim je smjesi volumena 30 µL dodano 3 µL RNaze A (γ = 10 mg mL^{-1}) kako bi se razgradila nevezana aa-tRNA, odnosno aa-tRNA slobodna u otopini. U nekoliko kratkih vremenskih točaka, uzet je alikvot od 2 µL i zaustavljena je reakcija razgradnje miješanjem s 4 µL mravlje kiseline (*c* = 1,5 mol dm^{-3}). Po 2-3 µL nanesena su na TLC pločicu, a za razdvajanje korišten je razvijač sastava *c* (CH_3COONH_4) = 0,1 mol dm^{-3} i φ (CH_3COOH) = 5 %. Rezultati su analizirani kao što je već opisano u poglavlju 3.2.5.7. Postotak zaštićene tRNA odgovara udjelu radioaktivnosti koja ostaje na startnoj liniji u ukupnoj radioaktivnosti prisutnoj na TLC pločici za pojedinu vremensku točku jer nerazgrađena tRNA ne migrira tijekom razdvajanja. Iz vremenski ovisnog postotka aa-[^{32}P]-tRNA zaštićene od razgradnje ribonukleazom A u ovisnosti o vremenu, utočnjavanjem na monoeksponencijalnu jednadžbu i ekstrapolacijom na $t = 0$, dobiven je postotak aa-tRNA početno zaštićene od djelovanja RNaze A. Budući da je koeficijent brzine disocijacije aa-tRNA iz ternarnog kompleksa brz (vrijeme poluživota je oko 1,5 min), razgradnjom slobodne aa-tRNA potiče se disocijacija aa-tRNA pa je za određivanje točne aktivne frakcije nužno analizirati nekoliko vremenskih točaka kako bi se mogla napraviti ekstrapolacija na $t = 0$. Postotak aa-tRNA zaštićen pri pojedinoj koncentraciji EF-Tu:GTP u ovisnosti o koncentraciji EF-Tu:GTP omogućava određivanje udjela EF-Tu:GTP sposobnog vezati aa-tRNA. Aktivnost EF-Tu:GTP varirala je od 10-15 %. Sve koncentracije EF-Tu:GTP izražene u ovoj doktorskoj disertaciji odnose se na koncentraciju EF-Tu:GTP aktivnu u vezanju aa-tRNA. Uz svaki eksperiment napravljena je i kontrola koja omogućava

korekciju udjela slobodne aa-tRNA koja ostane nerazgrađena unatoč djelovanju RNaze A. U kontrolnoj reakciji je iz reakcijske smjese izuzet EF-Tu i dodana je RNaza A. Količina preostale nerazgrađene tRNA iznosila je oko 4-5 %, i nije se mijenjala kroz vrijeme te je oduzeta je od svake vremenske točke. Dodatne kontrole napravljene su i s neaktiviranim kompleksom EF-Tu:GDP. Takve reakcijske smjese odgovarale su TLC-kromatogramom negativnoj kontroli napravljenoj u odsustvu EF-Tu.

3.2.5.13 Određivanje konstante disocijacije ternarnog kompleksa EF-Tu:GTP:aa-tRNA pri 4 °C metodom zaštite aa-tRNA od djelovanja ribonukleaze

Stvaranje ternarnog kompleksa EF-Tu:GTP:aa-tRNA praćeno je pomoću metode zaštite vezane aa-tRNA od djelovanja RNaze A (opisano u poglavlju 3.2.5.12). Niske koncentracije aa-tRNA (c = 1-5 nmol dm^{-3}) pomiješane su s aktiviranim EF-Tu:GTP u aktivacijskom puferu i predinkubirane oko 20 min pri 4 °C prije dodatka RNaze A kako bi se omogućilo stvaranje ternarnog kompleksa. Množinske koncentracije EF-Tu:GTP varirane su u rasponu od 5-1400 nmol dm^{-3} kako bi se što točnije odredio K_D. Množinski udio zaštićene aa-[^{32}P]-tRNA prikazan je u ovisnosti o koncentraciji EF-Tu:GTP. Nelinearnom regresijom određen je K_D za aa-tRNA (Jednadžba 3.12).

$$y = \frac{Y_0 \times [EF\text{-}Tu{:}\,GTP]}{(K_D + [EF\text{-}Tu{:}\,GTP])}$$

Jednadžba 3.12 Hiperbolna ovisnost udjela zaštićene aa-tRNA o koncentraciji EF-Tu:GTP. y je udio aa-[^{32}P]-tRNA zaštićen od razgradnje RNazom A, Y_0 je maksimalni udio zaštićene tRNA, a K_D je konstanta disocijacije.

3.2.5.14 Određivanje koeficijenta brzine disocijacije aa-tRNA iz ternarnog kompleksa EF-Tu:GTP:aa-tRNA pri 4°C

Ternarni EF-Tu:GTP:aa-tRNA kompleks napravljen je miješanjem aa-[^{32}P]-tRNA (c = 600 nmol dm^{-3}) i aktivnog EF-Tu:GTP množinske koncentracije oko 1,5 µmol dm^{-3} u aktivacijskom puferu (sastav je prikazan u potpoglavlju 3.2.5.11). Stabilnost kompleksa praćena je na temelju zaštite vezane aa-tRNA od razgradnje ribonukleazom A (opisano u poglavlju 3.2.5.12). RNaza A dodana je nakon 20 minuta uravnoteživanja ternarnog kompleksa pri 4 °C, i uzimane su vremenske točke u rasponu od 0,15-15 min, a reakcija razgradnje RNazom A zaustavljana je miješanjem 2 µL alikvota reakcijske smjese s 4 µL

mravlje kiseline (c = 1,5 mol dm^{-3}). Udio zaštićene/nerazgrađene aa-[^{32}P]-tRNA u ovisnosti o vremenu utočnjen je na monoeksponencijalnu jednadžbu (Jednadžba 3.13).

$$y = Y_0 + A \times e^{-k_{off} \times t}$$

Jednadžba 3.13 Monoeksponencijalna jednadžba koja opisuje ovisnost udjela aa-tRNA zaštićene od RNaze o vremenu. y je udio zaštićene aa-tRNA, Y_0 je odsječak na y-osi, A predstavlja amplitudu, k_{off} je opaženi koeficijent brzine disocijacije, a t je vrijeme.

3.2.5.15 Određivanje konstante disocijacije ternarnog kompleksa EF-Tu:GTP:aa-tRNA pri 37 °C metodom zaštite aa-tRNA od neenzimske hidrolize

Metoda određivanja konstante disocijacije ternarnog kompleksa EF-Tu:GTP:aa-tRNA pri 37 °C temelji se na mjerenju zaštitnog učinka EF-Tu:GTP na neenzimsku hidrolizu aa-tRNA[94, 131]. Reakcije zaštite napravljene su inkubacijom EF-Tu:GTP s aa-[^{32}P]-tRNA^{Leu} pri 37 °C u puferu za aktivaciju EF-Tu (sastav je prikazan u potpoglavlju 3.2.5.11). Množinska koncentracija aa-[^{32}P]-tRNA^{Leu} u reakcijskoj smjesi iznosila je 5-10 nmol dm^{-3}, a množinska koncentracija aktivnog EF-Tu:GTP u reakcijskoj smjesi korištena je u rasponu od 30-1700 nmol dm^{-3} (određivanje udjela aktivnog EF-Tu opisano je u potpoglavlju 3.2.5.12). Reakcije su zaustavljane u određenim vremenskim intervalima miješanjem 2 µL reakcijske smjese s 4 µL otopine za zaustavljanje reakcije sastavljene od natrijevog acetata (c = 0,75 mol dm^{-3}, pH = 4,5), i 0,15 % (w/v) SDS. Udio aa-[^{32}P]-tRNA u svakoj vremenskoj točki utvrđen je razgradnjom s nukleazom P1 te analizom razgrađenih produkata tankoslojnom kromatografijom kao što je opisano u poglavlju 3.2.5.2.2. Podaci su utočnjeni na monoeksponencijalnu krivulju (Jednadžba 3.14).

$$y = A \times e^{-k_{obs} \times t}$$

Jednadžba 3.14 Monoeksponencijalna jednadžba koja opisuje ovisnost udjela aminoacilirane tRNA (y) o vremenu (t). A je amplituda neenzimske deacilacije, a k_{obs} je opaženi koeficijent brzine neenzimske deacilacije.

Iz ovisnosti opaženog koeficijenta brzine neenzimske deacilacije o koncentraciji aktivnog EF-Tu:GTP u reakcijskoj smjesi, dobiva se konstanta disocijacije aa-tRNA iz ternarnog kompleksa EF-Tu:GTP:aa-tRNA (Jednadžba 3.15).

$$k_{obs} = \frac{k_{unprotected}}{1 + \frac{[EF\text{-}Tu:GTP]}{K_D}}$$

Jednadžba 3.15 Hiperbolna ovisnost opaženog koeficijenta brzine neenzimske deacilacije (k_{obs}) o koncentraciji aktivnog EF-Tu:GTP. $k_{unprotected}$ je maksimalni koeficijent brzine neenzimske deacilacije aa-tRNA i odgovara deacilaciji u odsustvu EF-Tu:GTP. [EF-Tu:GTP] je koncentracija aktivnog EF-Tu:GTP u reakcijskoj smjesi, a K_D je konstanta disocijacije aa-tRNA iz ternarnog kompleksa EF-Tu:GTP:aa-tRNA.

Specifičnost interakcije EF-Tu:GTP i aa-tRNA potvrđena je kroz kontrolne reakcije napravljene s EF-Tu:GDP. Bez obzira na korištenu konačnu koncentraciju, EF-Tu:GDP nije pokazivao učinak zaštite aa-tRNA od neenzimske hidrolize.

3.2.6 Pročišćavanje izoleucina od tragova leucina

Pročišćavanje izoleucina od tragova leucina napravljeno je prema modificiranom patentu Bertholet i Hirsbrunner[132]. Osnova postupka razdvajanja je pretvaranje aminokiselina u odgovarajuće seksvisulfate, pri čemu je leucinski seskvisulfat topljiviji od izoleucinskog seskvisulfata u otopini sumporne kiseline i otapala niske polarnosti poput etil-metil-ketona (EMK). Seskvisulfat sadrži tri izoleucinska kationa po jednom sulfatnom i hidrogensulfatnom anionu - $(HIle)_3(SO_4)(HSO_4)$, pri čemu HIle predstavlja protonirani Ile. Komercijalni izoleucin je pročišćen u nekoliko koraka, a čista aminokiselina izdvojena je iz seksvisulfata pretaloživanjem sulfatnog aniona s vodenom otopinom barijevog hidroksida. Broj ponovljenih koraka pročišćavanja ovisio je o čistoći početnog materijala. Pročišćavanje je napravljeno u suradnji s dr. sc. Ivanom Halaszom (Institut Ruđer Bošković).

Korak 1: 3,957 g izoleucina (*Sigma*, šarža II) otopljeno je u 80 mL etil-metil-ketona. 2,4 mL koncentrirane sumporne kiseline dodavano je kap po kap tijekom 10 min i miješano na magnetskoj miješalici. Stvaranje izoleucinskog seskvisulfata vidljivo je kao stvaranje taloga. Suspenzija je sonicirana 30 minuta kako bi se omogućila što veća dodirna površina taloga s otopinom i time pospješilo uklanjanje leucinskog seskvisulfata. Miješanje suspenzije nastavljeno je tijekom noći. Idući dan je smjesa ponovno sonicirana 1 h, što je uzrokovalo potpuno otapanje taloga. Talog seskvisulfata, koji se ponovno pojavio nakon dodatnog miješanja otopine, izdvojen je filtracijom, a dobiveno je 1,8 g.

Korak 2: U idućem koraku, 1,711 g seskvisulfata otopljeno je u 25 mL etil-metil-ketona, i 0,21 mL koncentrirane sumporne kiseline dodano je kap po kap. Nastala suspenzija miješana

je jedan sat, zatim sonicirana 1 sat, i ponovno miješana tijekom noći. Idući dan, suspenzija je ponovno sonicirana 1 sat, miješana 2 sata i filtrirana za izdvajanje seksvisulfata.

Korak 3: 1,157 g seskvisulfata dobivenog iz prethodnog koraka, otopljeno je u 20 mL etil-metil-ketona, i 0,1 mL koncentrirane sumporne kiseline dodano je kap po kap. Stvorena suspenzija tretirana je kao što je već opisano.

Korak 4: U idućem koraku, 0,630 g dobivenog seskvisulfata, resuspendirano je u 12 mL etil-metil-ketona, a 0,14 mL koncentrirane sumporne kiseline dodano je kap po kap. Stvorena suspenzija tretirana je kao što je opisano.

Korak 5: Konačno je dobiveno 244 mg seskvisulfata, iz kojeg je izoleucin izdvojen nakon taloženja sulfatnih aniona pomoću barijevog hidroksida. Vodena otopina $Ba(OH)_2$ dodavana je kap po kap, a nastali precipitat $BaSO_4$ uklonjen je centrifugiranjem pri 5000 g, u trajanju od 5 minuta. $Ba(OH)_2$ dodavan je, uz periodično uklanjanje $BaSO_4$ sve dok postizanja pH otopine oko 6, i dok nije bilo vidljivo daljnje stvaranje $BaSO_4$. Volumen vodene otopine izoleucina, smanjen je na ¼ početnog volumena uparavanjem u peći pri 80 °C. Izoleucin je zatim istaložen iz vodene otopine dodatkom 100 mL acetona u malim obrocima uz miješanje na magnetskoj miješalici. Talog je filtriran kroz Büchnerov lijevak (poroznost razine B3), ispran acetonom, posušen vakumom i odvagan u sterilne mikroepruvete. Ukupno je dobiveno 122 mg pročišćenog izoleucina.

Čistoća početnog komercijalnog izoleucina (*Sigma*, šarža II), i konačnog pročišćenog izoleucina nije se mogla odrediti nuklearnom magnetskom rezonancijom, budući da je nivo kontaminacije leucinom bio ispod razine detekcije metode. Međutim, kinetičkim testom analize čistoće pokazano je da je faktor razine smanjenja prisustva leucina u izoleucinu 5,4 puta - početni komercijalni izoleucin (*Sigma*, šarža II) sadržavao je 0,0019 % leucina, dok je pročišćeni izoleucin sadržavao 0,00035 % leucina.

3.2.7 Kvantitativna spektrometrija masa

3.2.7.1 Uzgoj E. coli i obilježavanje proteoma metodom SILAC

Za obilježavanje proteoma metodom SILAC (engl. *Stabile Isotope Labelling with Amino acids in Cell culture*) korištene su teške varijante aminokiselina lizin (Lys4) ili leucina (LeuD3). Korištene su varijante soja MG1655 ili JW5807-2 (auksotrof za leucin, inaktiviran gen *leuB*, opisan u potpoglavlju 3.1.8.1) pripremljene u sklopu ove doktorske disertacije (poglavlje 3.2.1.3). U analizi proteoma kojoj je cilj bio odrediti stupanj zamjene leucina

norvalinom na razini proteoma, korištene su varijante prototrofnog MG1655 soja – i to WT LeuRS- i D345A MG1655 sojevi. U analizi proteoma za provjeru ugradnje izoleucina umjesto leucina korištene su varijante soja koji je auksotrof u biosintezi leucina. Korištenjem auksotrofnog soja osigurava se potpuno obilježavanje proteoma teškim leucinom (LeuD3) kojeg se dodaje u medij, i onemogućava se ugradnja norvalina, budući da soj s inaktiviranim genom *leuB* ne može sintetizirati norvalin. Prednost korištenja soja koji je auksotrof u biosintezi leucina je i mogućnost regulacije omjera egzogeno dodanog izoleucina i leucina u medij, te time poticanje ugradnje izoleucina. Svi sojevi uzgajani su u minimalnom mediju M9 (sastav je naveden u poglavlju 3.1.7.2).

3.2.7.2 Ekstrakcija proteoma iz E. coli u denaturirajućim uvjetima

Prilikom ekstrakcije proteoma *E. coli* iz smrznutih staničnih taloga, za količinu taloga iz otprilike 10 mL bakterijske kulture u stacionarnoj fazi, korišteno je oko 2 mL komercijalnog ekstrakcijskog pufera na bazi detergenta naziva YPER (engl. *Yeast Protein Extraction Reagent, Pierce*). Za razaranje bakterijske stanične stijenke, u ekstrakcijski pufer je dodan lizozim do konačne masene koncentracije 50 μg mL^{-1} i suspenzija bakterijskih stanica inkubirana je 20 min pri 37 °C. Dodatno razaranje stanica i fragmentacija DNA provedena je sonikacijom u trajanju od 30 sekundi (40 % amplituda, Branson Sonyfier 250; Microtip 5). Topivi proteini izdvojeni su od ostataka razbijenih stanica centrifugiranjem pri 11,500 g u trajanju od 10 minuta na sobnoj temperaturi. Iz izdvojenog supernatanta, volumena oko 500 μL, proteini su pretaloženi standardnim postupkom (opisano u sljedećem poglavlju).

3.2.7.3 Precipitacija proteina

Proteini su pretaloženi standardnim postupkom ekstrakcije metanolom i kloroformom. Otopini proteina volumena oko 500 μL dodano je četiri volumena (2 mL) metanola. Smjesa je promiješana vorteksiranjem, zatim je dodan jednak volumen kloroforma (0,5 mL) i ponovno je smjesa vorteksirana. Dodano je i tri volumena redestilirane vode (1,5 mL), smjesa je vorteksirana, a organska i vodena faza izdvojene su centrifugiranjem pri 5000 g u trajanju od 10 minuta. Vodena faza je oprezno uklonjena da se ne uznemiri međusloj proteina, i dodano je 4 volumena metanola (2 mL) te je čitava smjesa vorteksirana, a zatim i centrifugirana pri 5000 g u trajanju od 10 minuta. Metanol je uklonjen, a precipitat proteina posušen na zraku. Precipitirani proteini otopljeni su u minimalnoj količini denaturacijskog puferu sastava *c*

(ureja) = 6 mol dm^{-3}, *c* (tioureja) = 2 mol dm^{-3} i *c* (Tris) = 10 mmol dm^{-3}, pH = 8,0. Koncentracija proteina određena je po Bradfordu (opisano u poglavlju 3.2.4.7.1), a konačna masena koncentracija proteina iznosila je oko 1-2 µg μL^{-1}.

3.2.7.4 Provjera razine ugradnje „teških" aminokiselina (SILAC)

U proteomima bakterija izoliranih iz taloga stanica pripremljenih uzgajanjem u prisustvu teške aminokiseline (LeuD3 ili Lys4) provjeren je stupanj ugradnje teške aminokiseline. Za SILAC ili SuperSILAC eksperimente nužno je gotovo potpuno obilježavanje proteoma, odnosno ugradnja teške aminokiseline > 95 %. Standardno je 25 µg proteina razrijeđeno u denaturacijskom puferu do ukupnog volumena 100 µL. Razgradnja proteina na peptide napravljena je kao što je opisano u idućem poglavlju (3.2.7.5). Smjesa peptida zakiseljena je dodatkom 10 µL CF_3COOH (φ = 10 %) do konačnog pH = 2,5 i peptidi su pročišćeni na C_{18} kromatografskom materijalu, kao što je opisano u poglavlju 3.2.7.7. Peptidi su do korištenja čuvani vezani na C_{18} kromatografskom materijalu na tzv *StageTip*-u [133] pri 4 °C, a eluirani su neposredno prije snimanja. Oko 10 % uzorka injektirano je u nano-HPLC-MS/MS na LTQ-Orbitrap ELITE spektrometar mase s gradijentom razdvajanja u trajanju od 60 min (opisano u poglavlju 3.2.7.8). Dobiveni spektri su analizirani koristeći program MaxQuant (verzija 1.2.2.9). Postavke u programu su bile *multiplicity* je jednak 2, i izabrane su odgovarajuće oznake kao Lys4 ili LeuD3, a opcije *Re-quantify* i *second peptide* su bile isključene. Daljnja analiza napravljena je pomoću statističkog paketa R i skripte napravljene u laboratoriju dr. sc. Borisa Mačeka. Omjer detektiranih biljega/teških aminokiselina (Lys4 ili LeuD3) u odnosu na odgovarajuće lake aminokiseline (Lys0 ili Leu0) izražen je pomoću formule medijana H/L pojavnost peptida (engl. *Evidences, H*: *heavy peptides* – sadrže „tešku" aminokiselinu, L: *light peptides* – sadrže „laku" aminokiselinu).

3.2.7.5 Razgradnja proteina na peptide u otopini

Proteini za provjeru ugradnje teških aminokiselina, ili smjese proteina za eksperimente tipa SILAC ili SuperSILAC razgrađivani su na jednak način. Varijante eksperimenata SILAC ili SuperSILAC obuhvaćaju najprije miješanje proteoma izoliranog iz soja uzgojenog uz dodatak teške amnokiseline (standard, „teški" proteom) i proteoma iz soja uzgojenog uz dodatak „lake" varijante aminokiseline u omjeru 1:1. Zatim se pomiješani uzorak razgrađuje na peptide i nadalje tretira jednako kao i ostali uzorci. Proteini za razgradnju razrijeđeni su na

masenu koncentraciju 0,25 mg mL^{-1} i razgrađivani na peptide endoproteazom LysC, čime su dobiveni peptidi s lizinom na C-kraju. Tijekom tretmana, uzorci su inkubirani pri 25 °C i izbjegavano je zagrijavanje uzoraka zbog moguće karbamilacije slobodnih amino skupina (Lys ili Arg) u prisustvu ureje. Navedena modifikacija mogla bi ometati razgradnju endoproteazama, budući da obuhvaća mjesta hidrolitičke razgradnje. Disulfidne veze reducirane su dodatkom redukcijskog pufera (c (DTT) = 1 mol dm^{-3}, pripremljen u otopini amonijevog bikarbonata (c = 50 mmol dm^{-3})) do konačne množinske koncentracije DTT-a 1 mmol dm^{-3}. Uzorci su inkubirani 1 h pri 25 °C, uz potresanje pri 750 rpm. U sljedećem koraku, reducirani cisteini su prevedeni u karbamidometilirani oblik, kako bi se spriječilo ponovno stvaranje disulfidnih veza. Dodan je alkilacijski pufer (c (jodacetamid) = 550 mmol dm^{-3}, pripremljen u otopini amonijevog bikarbonata (c = 50 mmol dm^{-3})) do konačne množinske koncentracije jodacetamida 5,5 mmol dm^{-3}. Uzorci su zbog fotosenzitivnosti jodacetamida prekriveni aluminijskom folijom, inkubirani pri 25 °C, i potresani 1 h u mraku. Prije dodataka endoproteinaze LysC, provjeren je pH smjese i po potrebi prilagođen na pH = 8,0 dodatkom c (Tris) = 100 mmol dm^{-3}, pH = 8,0 (optimalan pH za rad endoproteaze LysC). Uzorak je zatim razrijeđen s 4 volumena amonijevog bikarbonata (c = 20 mol dm^{-3}). pH je po potrebi prilagođen na 8,0 i dodan je LysC (1 µg LysC na 100 µg proteina). Smjesa je uz potreskivanje pri 25 °C inkubirana preko noći.

3.2.7.6 Frakcioniranje proteoma izoelektričnim fokusiranjem u otopini (OffGel)

Za potrebe frakcioniranja proteoma, prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.7.5, 100 µg proteina razgrađeno je na peptide. U *OffGel* frakcioniranju, razgrađeni peptidi razdvajaju se izoelektričnim fokusiranjem prema vrijednostima izoelektrične točke (pI) na linearnom gradijentu pH u području 3-10, koristeći komercijalni nosač za uzorke i amfolite dugačak 13 cm (*DryStrip, GE Healthcare*, Uppsala, Sweden). Nakon izoelektričnog fokusiranja, dvanaest frakcija je zasebno analizirano spektrometrijom masa. U prvom koraku, *Drystrip*-ovi su rehidrirani inkubacijom u 280 µL 6 % (v/v) glicerol, 7 µL amfolita (pH = 3-10), i 63 µL MiliQ vode u trajanju od 15 minuta pri sobnoj temperaturi. Aparatura je složena prema uputama proizvođača (*Agilent*). Peptidi su nakon razgradnje nadopunjeni na ukupni volumen od 324 µL s MiliQ vodom, i dodano je 1,44 mL 6 % (v/v) glicerola i 36 µL amfolita (pH = 3-10). Uzorak je jednoliko raspodijeljen u dvanaest komora na koje je *Drystrip* pregrađen plastičnim nosačem. Za fokusiranje je korištena standardna metoda s tvorničkim postavkama,

oznake OG12PE01. Jakost struje je ograničena na 50 µA, a frakcioniranje je završeno kada je postignuto 20 kVh. Svaka od dvanaest frakcija zasebno je prebačena u mikroepruvetu i zakiseljena dodatkom 10 µL otopine koja sadrži 30 % (v/v) acetonitril, 5 % (v/v) octenu kiselinu i 10 % (v/v) trifluoroctenu kiselinu. Peptidi su pročišćeni iz smjesa na kromatografskom materijalu C_{18} prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.7.7. Nakon elucije, po 2 µL od 20 µL uzorka injektirano je na nano-HPLC-MS/MS spektrometar mase LTQ-Orbitrap ELITE s gradijentom razdvajanja u trajanju od 90 min.

3.2.7.7 Pročišćavanje razgrađenih peptida na kromatografskom materijalu C_{18}

Sve smjese peptida su prije nanošenja na nano-HPLC-MS/MS pročišćene/odsoljene na kromatografskom materijalu C_{18} pomoću, tzv. *StageTip*-ova prema protokolu kojeg su razvili Rappsilber i suradnici 2007. godine[133]. *StageTip* se napravi tako da se po dva diskića Empore™ C_{18} materijala stavi u nastavak za automatske mikropipete volumena 200 µL. Prethodno stavljanju uzorka, *StageTip* je aktiviran i uravnotežen. Za aktivaciju je dodano 200 µL metanola, a otopina je propuštena kroz *StageTip* centrifugiranjem u modificiranoj centrifugi za obaranje uzoraka (*TOMY*), sve dok metanol nije prošao. Zatim je *StageTip* uravnotežen otopinom A* sastava 2 % (v/v) acetonitril i 1 % (v/v) trifluoroctena kiselina s oprezom da se „StageTip“ ne posuši prije stavljanja uzorka. Nakon nanošenja peptida, *StageTip* je ispran s 200 µL otopine A sastava 0,5 % (v/v) octena kiselina i spremljen do korištenja na 4 °C. Neposredno prije analize spektrometrijom masa, peptidi su eluirani sa *StageTip*-a pomoću 50 µL otapala B sastava 80 % (v/v) acetontril i 0,5 % (v/v) octena kiselina. Volumen eluata smanjen je upravanjem pod sniženim tlakom (tzv. *speedvac* uređaj) do volumena oko 10 µL. Zatim je volumen dopunjen do 18 µL otapalom A, i zakiseljen s 2 µL otapala A*. Uzorci su naneseni u mikrotitarsku pločicu nano-HPLC-a.

3.2.7.8 Nano-HPLC-ESI MS/MS analiza proteoma

Analiza proteoma rađena je na nano-HPLC MS/MS sustavu. Korišten je EASY-nLC II sustav (*Proxeon Biosystems*),spojen na LTQ Orbitrap ELITE spektrometar mase (*Thermo Scientific*). Kao mobilne faze, korištena su otapala A (0,5 % (v/v) octena kiselina) i B (80 % (v/v) acetonitril i 0,5 % (v/v) octena kiselina) Za razdvajanje peptida, po 2 µL uzorka naneseno je automatski na nano-HPLC kolonu duljine 15 cm, s promjerom C_{18} sfera od 3 µm, pri toku od 500 nL min^{-1} u HPLC otapalu A. U metodi je eluiranje trajalo 90 minuta pri čemu je korišten

gradijent 5-44 % otapala B u otapalu A , u trajanju od 76 minuta pri konstantnom protoku 200 nL/min. Nakon gradijenta i elucije, kolona je isprana mobilnom fazom sastava 90 % otapala B u otapalu A i ponovno uravnotežena otapalom A. Nakon svake tri kromatografije, napravljen je dodatni korak pranja kolone u trajanju od 30 minuta s gradijentom 5-90 % otapala B u otapalu A i trajanju od 15 minuta. Razdvojeni peptidi ionizirani su metodom elektroraspršenja (ESI, engl. *electrospray ion source, Proxeon Biosystems*) s primijenjenom voltažom 2,3 kV. Način rada spektrometra mase bio je namješten za pozitivne ione. Detekcija je obuhvaćala jedno početno sveobuhvatno skeniranje u analizatoru Orbitrap (MS) nakon čega je slijedila fragmentacija 15 najintenzivnijih višestruko nabijenih prekursor iona kroz ćeliju za sudarom potpomognutu disocijaciju (engl. *collision induced dissociation*, CID). Korišten je helij kao plin za fragmentaciju sudarima (engl. *collision gas*), a normalizirana energija sudara je iznosila 35 %. Fragmentni ioni su analizirani (MS/MS) u linearnoj ionskoj stupici (LTQ). Sveobuhvatno skeniranje je imalo raspon m/z 300-2000.

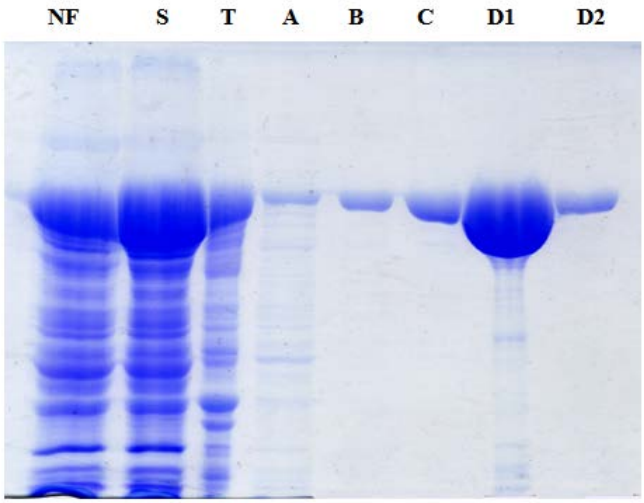
3.2.7.9 Procesiranje podataka i analiza

Svi sirovi podatci/spektri procesirani su pomoću programa otvorenog izvora (engl. *open source*) MaxQuant (verzija 1.2.2.9.). Za identifikaciju peptida korištena je Andromeda *target-decoy* proteinska baza podataka *E. coli* K-12 (UniProt pristupni broj organizma 83333) koja sadrži 4309 aminokiselinskih sljedova proteina, te je nadodano 248 proteina koji čine tipične kontaminacije pomoću alata *Mascot Deamon* (*Matrix Science Ltd*). Korišteni su sljedeći parametri za pretraživanje proteoma: endoproteaza LysC postavljena je kao korištena endoproteinaza, a dozvoljena su dva propuštena cijepanja; kao fiksne modifikacije uneseni su karbamidometilacija cisteina, te Lys4 (teški lizin) ili LeuD3 (teški leucin). Oksidacija metionina i N-terminalna acetilacija proteina postavljene su kao varijabilne modifikacije. Postavljeno je dozvoljeno odstupanje u masi prekursor iona na 6 ppm i 0,5 Da za fragmentne ione MS/MS spektra. Jedino peptidni ioni duljine sedam ili više aminokiselina korišteni su za kvantifikaciju, i minimalno dva kvantificirana peptida (engl. *ratio counts*) bila su potrebna za kvantifikaciju proteina, Dodatno, PEP (engl. *posterior error probability*) je izračunan za svaki identificirani peptid. Prag tolerancije FDR (engl. *false discovery rate*) za identifikaciju proteina postavljen je na 1 %.

4 Rezultati

4.1 Proizvodnja i pročišćavanje divljeg tipa i mutiranih varijanti *E. coli* LeuRS

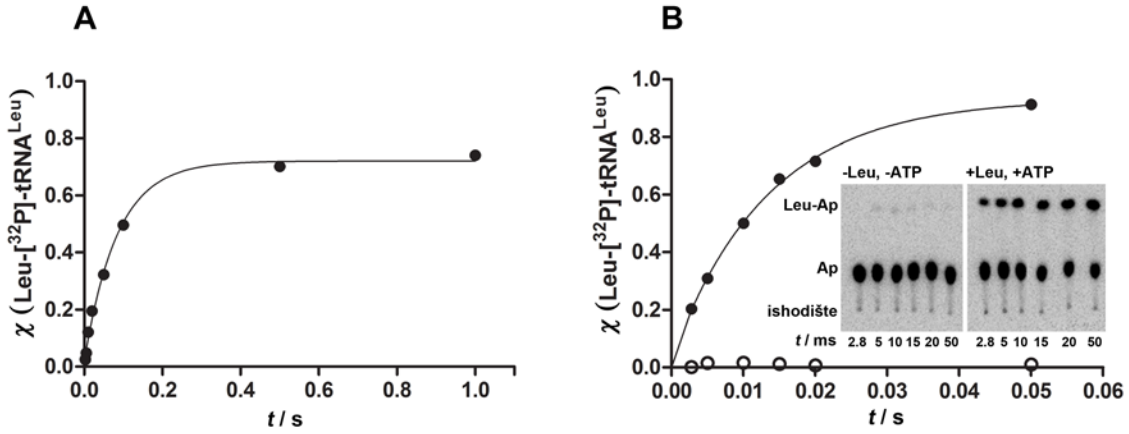
Za proizvodnju divljeg tipa i mutiranih varijanti *E. coli* LeuRS korišten je ekspresijski sustav pET. Prekomjerna ekspresija napravljena je uzgojem bakterijskih stanica soja BL21(DE3) transformiranih odgovarajućim plazmidima (opisano u poglavlju 3.2.4.1) na 37 °C, uz dodatak IPTG-a konačne množinske koncentracije 0,25 mol dm^{-3} i inkubaciju u trajanju od 4 h. Pročišćavanje je provedeno prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.4.3. Tijek pročišćavanja praćen je analizom frakcija SDS-denaturirajućom poliakrilamidnom elektroforezom (Slika 4.1).



Slika 4.1 Pročišćavanje LeuRS koji je prekomjerno eksprimiran u soju *E. coli* BL21(DE3). NF: nevezana frakcija; S: supernatant nakon sonikacije i centrifugiranja bakterijskih stanica; T: talog nakon sonikacije i centrifugiranja bakterijskih stanica; A-C: frakcije prikupljene ispiranjem kolone puferima A, B i C; D1 i D2: frakcije volumena 4 mL prikupljene eluiranjem proteina puferom D (*c* (imidazol) = 200 mmol dm^{-3}). Korišten je 9 % (w/v) SDS-PAGE.

Vidljivo je da je LeuRS uspješno prekomjerno eksprimiran i pročišćen do razine čistoće oko 99 % (Slika 4.1, frakcije D1 i D2). Glavnina proizvedenog proteina je topiva (Slika 4.1, frakcija S), a vrlo mali dio završava netopiv u inkluzijskim tijelima (Slika 4.1, frakcija T). Standardno je iz 1 L bakterijske kulture pročišćeno oko 25 mg LeuRS proteina na 2 mL Ni-NTA smole. Ekspresija i pročišćavanje bili su jednako efikasni za divlji tip i mutirane varijante enzima.

U kinetičkim testovima prijenosa aminokiseline na tRNA u odsustvu potrebnih supstrata - leucina i ATP-a, uočeno je značajno nastajanje leucilirane $tRNA^{Leu}$ (Slika 4.2A). Takav rezultat upućuje da se LeuRS supročišćava s intermedijerom aminoaciliranja - leucil-adenilatom. Kontaminacija leucil-adenilatom predstavlja problem za kinetičke testove u kojima se enzim koristi u koncentraciji koja je približna ili čak veća od koncentracije tRNA, kao što su npr. testovi koji prate jedan krug katalize enzima ili preparativna misacilacija tRNA. Supročišćeni leucil-adenilat nije se mogao ukloniti ekstenzivnom dijalizom pa je razvijena metoda za njegovo uklanjanje. Metoda se zasniva na reakciji aminoaciliranja s ciljem potrošnje leucil-adenilata kroz prijenos leucina na dodanu $tRNA^{Leu}$ (detaljno opisano u poglavlju 3.2.4). Stvorena Leu-$tRNA^{Leu}$ uklonjena je modificiranim postupkom pročišćavanja na Ni-NTA agarozi. Reakcijskoj smjesi dodani su NaCl i ureja konačnih množinskih koncentracija 1 mol dm^{-3}, odnosno 2 mol dm^{-3}, kako bi se omogućila disocijacija kompleksa LeuRS:Leu-$tRNA^{Leu}$. LeuRS je pri niskoj koncentraciji imidazola (c = 10 mmol dm^{-3}) vezan na Ni-NTA smolu, a zatim je smola isprana puferom koji sadrži NaCl (c = 1 mol dm^{-3}), ureju (c = 2 mol dm^{-3}) i imidazol (c = 10 mmol dm^{-3}). Eluirani protein je ukoncentriran ultrafiltracijom (poglavlje 3.2.4.5) i dijaliziran prema skladišnom puferu (poglavlje 3.2.4.6). Pročišćeni protein testiran je reakcijom prijenosa aminokiseline na tRNA bez dodatka aminokiseline i ATP-a, te standardno s dodatkom aminokiseline i ATP-a (Slika 4.2B, postupak je detaljno opisan u poglavlju 3.2.5.4).



Slika 4.2 Supročišćavanje LeuRS s Leu-AMP. A) nastajanje Leu-[^{32}P]-$tRNA^{Leu}$ u prisustvu c (LeuRS) = 10 µmol dm^{-3} i c ([^{32}P]-$tRNA^{Leu}$) = 1 µmol dm^{-3} i odsustvu leucina i ATP-a u reakcijskoj smjesi. Visok udio nastale aminoacilirane tRNA upućuje na supročišćavanje LeuRS s Leu-AMP. B) kontrolna reakcija prijenosa leucina s c (LeuRS) = 10 µmol dm^{-3} kojem je uklonjen Leu-AMP iz aktivnog mjesta na [^{32}P]-$tRNA^{Leu}$ (c = 1 µmol dm^{-3}) u prisustvu (●) ili odsustvu (○) leucina i ATP-a. Umetnuta slika prikazuje TLC-kromatogram iz kojeg je denzitometrijskom analizom konstruiran prikazan vremenski tijek. Leu-Ap označava pokretljivost leuciliranog nukleozida A76. Preuzeto i prilagođeno iz Cvetesic i sur. 2012[47].

Prvi test je pokazao da je iz aktivnog mjesta LeuRS uspješno uklonjen leucil-adenilat, jer Leu-tRNA^{Leu} nije nastajala u odsustvu leucina i ATP-a. Drugi test je pokazao da je LeuRS aktivan i prikladan za korištenje u kinetičkim testovima koji prate jedan krug katalize enzima jer je koeficijent brzine prijenosa leucina odgovarao koeficijentu brzine prijenosa leucina s enzimom koji nije podvrgnut postupke za uklanjanje Leu-AMP. Test aminoaciliranja u uvjetima ustaljenog stanja pokazao je da je enzim ipak prilikom tretmana izgubio nešto aktivnosti jer je s pročišćenim enzimom koeficijent brzine aminoaciliranja u ustaljenom stanju 30 % niži u odnosu na aktivnost nepročišćenog enzima. U eksperimentima nije bilo potrebno uvođenje faktora korekcije aktivnosti jer je pročišćena preparacija enzima korištena isključivo u eksperimentima gdje se koristi znatno veća koncentracija enzima u odnosu na koncentraciju tRNA, odnosno gdje točna koncentracija aktivne frakcije LeuRS-a nije važna. Pri mjerenju reakcija u uvjetima jednog kruga katalize enzima, LeuRS je prisutan u vrlo visokoj koncentraciji i njime se postiže zasićenje pa mala razlika u koncentraciji nema utjecaj (koncentracija korištenog enzima otprilike iznosi 5-10 × K_D vrijednosti za ograničavajući supstrat – tRNA ili aa-tRNA).

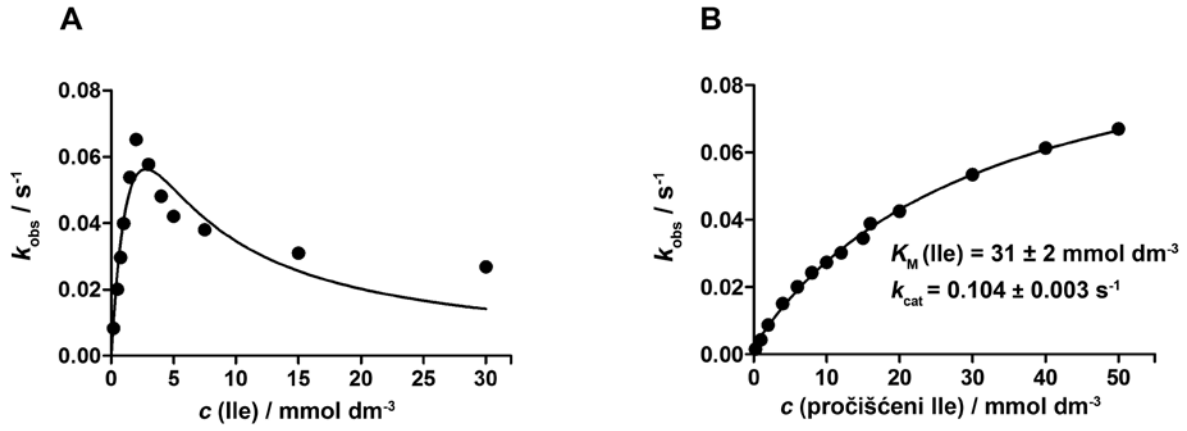
4.2 Proizvodnja i pročišćavanje tRNA^{Leu}

Postoji pet izoakceptora tRNA^{Leu}, a u sklopu ove doktorske disertacije rabljen je rijetki (engl. *minor*) izoakceptor tRNA$^{Leu}_{UAA}$ budući da je postojala javno dostupna utvrđena kristalna struktura kompleksa LeuRS:tRNA$^{Leu}_{UAA}$ iz *T. thermophilus*[56]. Naručen je sintetski gen za tRNA$^{Leu}_{UAA}$ s odgovarajućim restrikcijskim mjestima koja omogućavaju kloniranje gena u pUC18 vektor za tranksripciju *in vitro*, te ΔpET3a vektor za transkripciju *in vivo*. Očekivano bi tRNA^{Leu} sintetizirana transkripcijom *in vitro* trebala biti aktivna unatoč nedostatku posttranskripcijskih modifikacija, jer nijedna posttranskripcijska modifikacija ne predstavlja značajan element identiteta i u prethodnim istraživanjima je pokazano da je transkript aktivan. Transkripcija tRNA$^{Leu}_{UAA}$ *in vitro* napravljena je prema standardnom postupku. tRNA$^{Leu}_{UAA}$ pročišćena je ionskom izmjenom na stupcu DEAE celuloze, pretaložena standardnim postupkom i dijalizirana prema Hepes-u (c = 5 mmol dm^{-3}, pH = 7,5). Transkripcija, odnosno prekomjerna ekspresija tRNA^{Leu} *in vivo* napravljena je kao što je opisano u poglavlju 3.2.3.1. Iz ukupne tRNA obogaćene s tRNA^{Leu} uklonjene su nukleinske kiseline velike molekulske mase taloženjem pomoću PEG-a, i tRNA je dijalizirana prema Hepes-u (c = 5 mmol dm^{-3}, pH

= 7,5). Objema preparacijama tRNA testirana je akceptorska aktivnost s [^{14}C]-leucinom, a određen je i koeficijent brzine aminoaciliranja u prisustvu [^{14}C]-leucina koji približno odražava k_{cat} aminoaciliranja jer je reakcija napravljena u uvjetima zasićenja sa svim supstratima. Rezultati upućuju da je tRNA^{Leu} proizvedena prekomjernom ekspresijom *in vivo* kvalitetnija od tRNA^{Leu} proizvedene *in vitro* jer ima veću akceptorsku aktivnost (85 % u odnosu na 50 %) te veći koeficijent brzine aminoaciliranja (5 s^{-1} u odnosu na 4 s^{-1}). Nadalje je u ovom radu korištena samo tRNA^{Leu} proizvedena *in vivo*. Uočeno je da tRNA^{Leu} značajno gubi aktivnost uslijed postupka izolacije, pa je prije upotrebe uvijek renaturirana metodom renaturacije uz sporo hlađenje (opisano u poglavlju 3.2.3.1 Materijala i metoda).

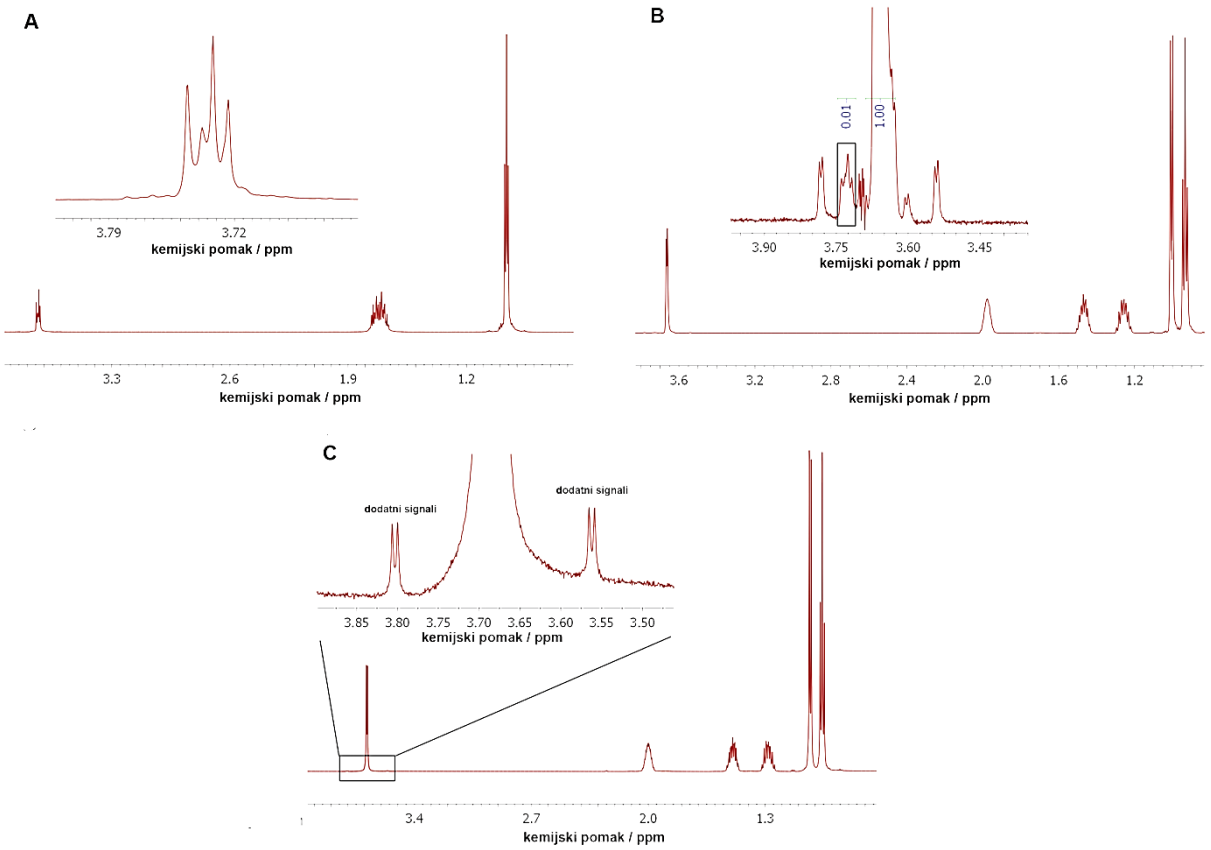
4.3 Kontaminacija izoleucina tragovima leucina i priprema pročišćenog izoleucina

Kinetičke analize sugerirale su da je komercijalni uzorak izoleucina onečišćen tragovima leucina. U mjerenjima utroška ATP-a u prisustvu izoleucina, uočena je neobična inhibicija supstratom (Slika 4.3), a zamijećena je i ovisnost k_{cat} o koncentraciji enzima korištenoj u eksperimentu.



Slika 4.3 Prisutnost leucina u izoleucinu može uzrokovati kinetičke artefakte u mjerenjima utroška ATP-a u ukupnom popravku pogreške. A) k_{obs} za nastajanje AMP u ovisnosti o koncentraciji nepročišćenog izoleucina koji sadrži 0,38 % leucina (utvrđeno kinetičkim testom). Podaci su utočnjeni na jednadžbu inhibicije supstratom: $k_{obs} = k_{max} \times [S]/(K_M + [S] \times (1+[S]/K_i))$, ali odstupaju od klasičnog modela. B) k_{obs} za nastajanje AMP u ovisnosti o koncentraciji pročišćenog izoleucina (sadrži 0,00035 % leucina). Podaci su utočnjeni na jednadžbu Michaelis-Menten: $k_{obs} = k_{max} \times [S]/(K_M + [S])$. Preuzeto i prilagođeno iz Cvetesic i sur. 2014[134].

Analiza standardnim postupkom aminokiselinske analize na HPLC uređaju, pokazala je da komercijalno dostupan izoleucin sadrži čak 0,5-1 % leucina[3]. Rezultat je poduprt i analizom NMR spektara izoleucina pri čemu je određena početna razina kontaminacije leucinom u jednom od uzoraka izoleucina čak oko 1 % (Sigma, BioUltra, > 99 %, Slika 4.4). Određivanje udjela leucina u izoleucinu spektroskopijom NMR zasniva se na izdvajanju signala vodikovog atoma prisutnog na α-C-atomu leucina u odnosu na ekvivalentni vodik u izoleucinu. Prekristalizacijom se izoleucin nije izdvajao od leucina, vrlo vjerojatno zbog efikasnog pakiranja leucina u kristalnu rešetku s izoleucinom. Konačno pročišćavanje provedeno je prema modificiranom patentu autora Hirsbrunner i Bertolet (detaljan opis metode u poglavlju 3.2.6). Za praćenje tijeka pročišćavanja izoleucina, razvijen je kinetički test za određivanje udjela leucina u izoleucinu, budući da korištene analitičke metode (HPLC, NMR) nisu dovoljno osjetljive za detekciju kontaminacija manjih od 0,5 %. Princip i izvedba kinetičkog testa detaljno su opisani u poglavlju 3.2.5.10 Materijala i metoda. Maksimalno pročišćeni izoleucin sadržavao je (3,5 ± 0,7) x 10^{-4} % leucina.

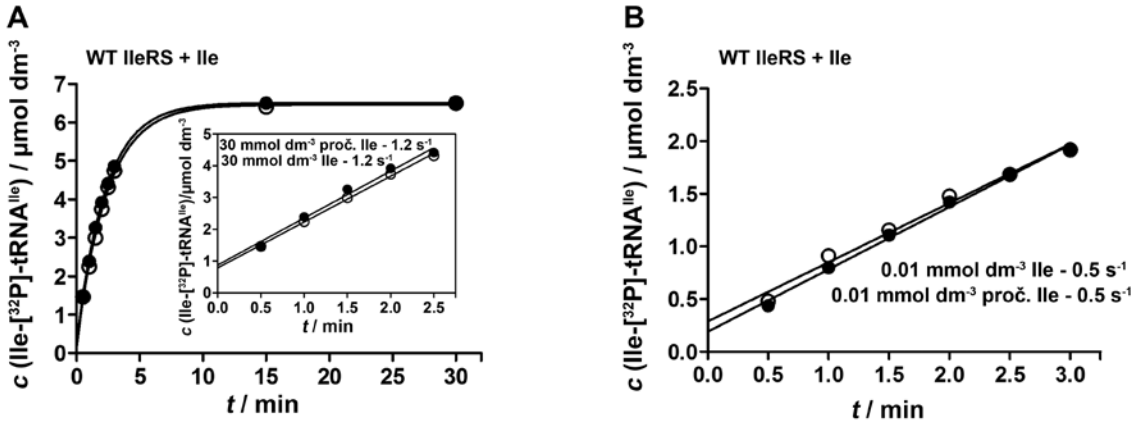


Slika 4.4 Određivanje udjela leucina u uzorcima izoleucina NMR spektroskopijom. Signal atoma vodika vezanog za α-C atom leucina odvojen je od istovjetnog signala izoleucina i ne prekrivaju ga

[3] HPLC analiza napravljena je u suradnji s dr. sc. Mariom Cindrićem (Institut Ruđer Bošković).

spinski dodatni signali izoleucina. A) spektar ^{1}H NMR L-leucina. Kvartet vodikovog atoma vezanog na α-C atom je prikazan povećan (središte kvarteta je pri 3,735 ppm). B) spektar ^{1}H NMR komercijalnog uzorka L-izoleucina s istaknutim kvartetom koji potječe od vodikovog atoma vezanog na α-C atom L-leucina. Signal je prikazan uvećan u umetnutoj slici. Prema signalima je procjenjeni udio leucina nešto manji od 1 %. C) spektar ^{1}H NMR pročišćenog L-izoleucina. Nije vidljiv kvartet vodikovog atoma vezanog na α-C atom L-leucina. Dubleti oko glavnog signala su spinski dodatni signali. NMR je napravljen u suradnji s dr. sc. Ivanom Halaszom (Institut Ruđer Bošković). Preuzeto i prilagođeno iz Cvetesic i sur. 2014[134].

Kvaliteta pročišćenog izoleucina provjerena je aminoaciliranjem $tRNA^{Ile}$ s izoleucil-tRNA-sintetazom. Uspoređena je aktivnost IleRS u reakciji aminoaciliranja s ograničavajućom (c = 10 μmol dm^{-3}) ili vrlo visokom koncentracijom (c = 30 mmol dm^{-3}) pročišćenog ili izvornog komercijalnog izoleucina (Sigma, BioUltra > 99 %). Testiranje s niskom koncentracijom izoleucina (oko vrijednosti K_M u reakciji aktivacije izoleucina u prisustvu tRNA; Cvetesic, Bilus, Gruic-Sovulj neobjavljeni podaci) upućuje na točnost koncentracije izoleucina, dok testiranje s visokom koncentracijom upućuje na prisutnost inhibitornih tvari ukoliko su tijekom postupka pročišćavanja uvedene u uzorak izoleucina. Testovi su pokazali da je koncentracija pročišćenog izoleucina odgovarajuća, te da nema inhibitornih tvari jer pročišćeni i izvorni komercijalni izoleucin daju jednake rezultate u obje testirane koncentracije (Slika 4.5).



Slika 4.5 Aminoaciliranje $tRNA^{Ile}$ s pročišćenim izoleucinom. A) testirana je čistoća pročišćenog izoleucina, odnosno je li postupkom pročišćavanja uvedena kontaminacija koja može inhibirati enzimsku aktivnost. Određen je koeficijent brzine aminoacilacije (k_{obs}) $tRNA^{Ile}$ u prisustvu 30 mmol dm^{-3} pročišćenog (●) ili nepročišćenog (○) izoleucina. Umetnuta slika prikazuje dio krivulje u kojem je reakcija u ustaljenom stanju B) testirana je točnost koncentracije pročišćenog izoleucina određivanjem k_{obs} u aminoaciliranju $tRNA^{Ile}$ s niskom i ograničavajućom količinom pročišćenog (●) ili nepročišćenog (○) izoleucina – 0,01 mmol dm^{-3}. Korišten je WT IleRS konačne koncentracije 20 nmol dm^{-3} i $tRNA^{Ile}$ konačne koncentracije 10 μmol dm^{-3}. Preuzeto i prilagođeno iz Cvetesic i sur. 2014[134].

Pročišćeni izoleucin testiran je u testu utroška ATP-a pri ukupnom popravku pogreške s WT LeuRS. Rezultati s pročišćenim izoleucinom potvrdili su da je učinak inhibicije supstratom zapravo kinetički artefakt uzrokovan tragovima leucina koji se može objasniti gubitkom $tRNA^{Leu}$ aktivne u stimulaciji popravka pogreške jer se u tim uvjetima prevodi u Leu-$tRNA^{Leu}$ (Slika 4.3).

4.4 Diskriminacija aminokiselina u reakciji aktivacije

Iako su parametri u aktivaciji raznih nepripadnih aminokiselina, ali i pripadnog leucina već publicirani u nizu radova, aktivacija je ponovljena u sklopu ove doktorske disertacije. Motivacija za ponovnu evaluaciju sposobnosti *E. coli* LeuRS u diskriminaciji raznih aminokiselina proizlazi iz nedosljednosti podataka napravljenih s izoleucinom. Istraživanje u sklopu ove disertacije pokazalo je da je glavni problem rada s izoleucinom u kontaminaciji komercijalnih uzoraka izoleucina leucinom te da udio kontaminacije varira u ovisnosti o proizvođaču i proizvodnoj šarži. Što je veći udio kontaminacije izoleucina leucinom, kinetički parametri za izoleucin su prividno bolji, jer zapravo odražavaju aktivaciju leucina prisutnog u izoleucinu (Tablica 4.1).

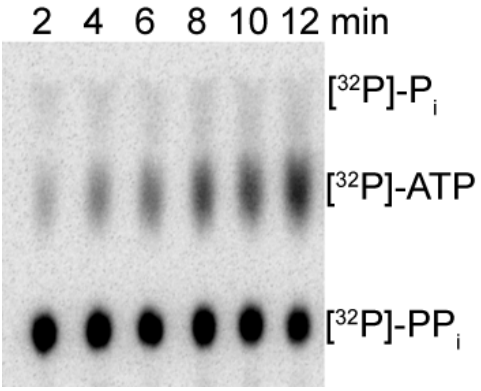
Tablica 4.1 Kinetički parametri u aktivaciji različitih uzoraka izoleucina s WT LeuRS[a].

aminokiselina (aa)	**% Leu[b]**	K_M **(aa)**	k_{cat}	k_{cat}/K_M	**diskr. faktor[c]**
		mmol dm^{-3}	s^{-1}	$mmol^{-1}\ dm^3\ s^{-1}$	
komercijalni Ile (*Sigma* BioUltra šarža I)	0,38 ± 0,03	5,0 ± 0,4	65 ± 2	13	102
komercijalni Ile (*Sigma* BioUltra šarža II)	$(19 \pm 2)\times10^{-4}$	23	3,8	0,17	7765
pročišćeni Ile (*Sigma* BioUltra šarža II)	$(3,5 \pm 0,7)\times10^{-4}$	26 ± 7	1,1 ± 0,1	0,042	31429

[a] Izmjereno izmjenom pirofosfata.
[b] Udio leucina je određen kinetičkim testom.
[c] Faktor diskriminacije izračunat je kao $(k_{cat}/K_M)_{leucin}/(k_{cat}/K_M)_{izoleucin}$.
Mjerenja su ponovljena tri puta, a vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost ± standardna pogreška.

Zbog navedenog problema, a i radi usporedivosti s reakcijskim uvjetima u kojima su rađeni kinetički eksperimenti u sklopu ove doktorske disertacije, određeni su kinetički parametri u reakciji aktivacije leucina, izoleucina, valina, norvalina, metionina i α-aminobutirične kiseline (Tablica 4.2). Aktivacija aminokiselina mjerena je standardnom metodom praćenja aktivacije aminokiselina (izmjena pirofosfata, ATP-PP_i) prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.5.1.

Ovaj enzimski test temelji se na mjerenju pirofosforolize, povratne reakcije aktivacije, odnosno mjerenju koeficijenta brzine ugradnje radioaktivnog [^{32}P]-PP_i u AMP pri čemu nastaje [^{32}P]-ATP. Do pirofosforolize dolazi jer se u reakcijsku smjesu uz radioaktivni [^{32}P]-PP_i koji se dodaje u manjoj količini kao biljeg, stavlja i 1 mmol dm^{-3} neradioaktivnog PP_i, čime se potiče povratna reakcija. Supstrat za reakciju pirofosforolize je aa-AMP, produkt aktivacije aminokiseline. Budući da je pirofosforoliza izuzetno brza reakcija, dok je nastajanje aa-AMP znatno sporije, mjerenjem pirofosforolize zapravo se mjeri nastajanje aminoacil-adenilata koje ograničava ukupnu brzinu pirofosforolize. Izmjereni koeficijent brzine nastajanja radioaktivnog [^{32}P]-ATP-a je funkcija koeficijenata brzine aktivacije aminokiseline i koeficijenta brzine pirofosforolize. Mogućnost da stvoreni produkt [^{32}P]-ATP sudjeluje u reakciji aktivacije je vrlo mala, budući da je u reakcijskoj smjesi prisutna velika količina neradioaktivnog ATP-a. Radioaktivni produkt je od supstrata izdvojen tankoslojnom kromatografijom, a kromatogram je vizualiziran izlaganjem TLC pločice zaslonu s uskladištenim fosforom koji je potom snimljen na laserskom skeneru *Typhoon PhophorImager* (Slika 4.6 prikazuje reprezentativni kromatogram).

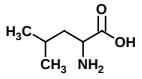
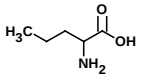
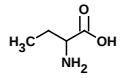
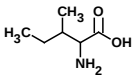
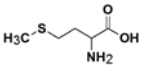
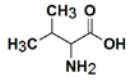


Slika 4.6 Reprezentativni kromatogram razdvajanja [^{32}P]-PP_i, [^{32}P]-ATP i [^{32}P]-P_i. Nastajanje ortofosfata nije enzimski katalizirano, tj. njegova koncentracija je mala i ne mijenja se u vremenu. U slučaju lošijeg razdvajanja, signali [^{32}P]-ATP i [^{32}P]-P_i su zajedno kvantificirani.

Dobiveni kromatogrami su kvantificirani u programu ImageQuant i iz omjera intenziteta signala koji odražava količinu radioaktivnih produkata i supstrata, određena je koncentracija nastalog produkta ATP-a. Iz vremenskih tijekova ATP-a nastalog pri različitim koncentracijama aminokiseline, određene su početne brzine aktivacije i konstruiran je Michaelis-Menten prikaz ovisnosti početne brzine aktivacije o koncentraciji dodane aminokiseline. Kinetički parametri K_M i k_{cat} određeni su nelinearnom regresijom iz Michaelis-

Menten prikaza pomoću programa GraphPad Prism. Michaelisova konstanta K_M je funkcija svih pojedinačnih koeficijenata brzine reakcije koraka koji čine reakcijski mehanizam i kumulativna je konstanta disocijacije produkta i svih intermedijera reakcije. Praktičnija definicija je da je K_M iznosom jednak koncentraciji supstrata pri kojoj je početna brzina reakcije jednaka polovini maksimalne početne brzine (V_{max}) i često služi kao mjera približnog afiniteta enzima prema supstratu. Obrtni broj enzima, k_{cat}, je koeficijent brzine katalize ukupne reakcije u ustaljenom stanju, i predstavlja kumulativni koeficijent brzine svih pojedinačnih koraka u kojima sudjeluje enzim:supstrat kompleks. k_{cat} predstavlja maksimalni broj molekula supstrata koji se pretvore u produkt po molekuli enzima u jedinici vremena u uvjetima zasićenja supstratom i pruža informacije o procesivnosti enzima. Omjer k_{cat}/K_M naziva se konstantom specifičnosti i predstavlja mjeru učinkovitosti enzima prema nekom supstratu.

Tablica 4.2 Kinetički parametri u aktivaciji aminokiselina s divljim tipom LeuRS[a]

aa	**struktura aa**	**K_M (aa)**	**k_{cat}**	**k_{cat}/K_M**	**diskr. faktor**[b]
		mmol dm^{-3}	s^{-1}	$mmol^{-1}$ dm^3s^{-1}	
			WT LeuRS		
Leu		0,05 ± 0,01	66 ± 2	1320	
Nva		4,9 ± 0,4	56 ± 1	11,4	116
Aba		85 ± 9	20 ± 1	0,24	5500
Ile[c]		26 ± 7	1,1 ± 0,1	0,042	31429
Met		n.o.[d]	n.o.	0,42	3143
Val		n.o.	n.o.	0,07	18857

[a] Izmjereno izmjenom pirofosfata.
[b] Faktor diskriminacije izračunat je kao $(k_{cat}/K_M)_{leucin}/(k_{cat}/K_M)_{nepripadna\ aa}$.
[c] Korišten je pročišćeni izoleucin s najmanjim udjelom leucina – 0,00035 %.
[d] n.o.- vrijednost nije određena.
Mjerenja su ponovljena tri puta, a vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost ± standardna pogreška.

Tablica 4.2 prikazuje rezultate mjerenja kinetičkih parametara u aktivaciji različitih aminokiselina s divljim tipom LeuRS. Uočljivo je da je razlika u vrijednosti K_M za pripadnu aminokiselinu leucin i ostale nepripadne aminokiseline glavni doprinos faktoru diskriminacije aminokiselina. Obrtni broj (k_{cat}) u aktivaciji norvalina jednak je obrtnom broju u aktivaciji

pripadnog leucina, što znači da LeuRS razlikuje norvalin i leucin isključivo na temelju vezanja aminokiseline u osnovnom stanju (engl. *ground state binding*). Norvalin se nakon vezanja u aktivno mjesto LeuRS jednako učinkovito prevodi u aminoacil-adenilat kao i leucin. Uslijed 100 x veće vrijednosti K_M za norvalin u odnosu na leucin, konačni faktor diskriminacije norvalina iznosi svega 116, što upućuje na nužnost popravka pogreške LeuRS za održavanje niske sveukupne pogreške biosinteze proteina (10^{-3}-10^{-4}, opisano u poglavlju 2.8.1). Diskriminacija izoleucina također je izražena na nivou K_M koji je za izoleucin čak 1700 × veći u odnosu na leucin. Dodatno je diskriminacija izoleucina povećana i razlikom u koraku katalize jer je k_{cat} u aktivaciji izoleucina 1 s^{-1}, što je čak oko 55 puta manje u odnosu na k_{cat} u prisustvu leucina ili norvalina. Obzirom na diskriminaciju i na nivou k_{cat}, ukupni faktor diskriminacije izoleucina iznosi 31000 x, što znači da je izoleucin učinkovito isključen u sintetskoj reakciji LeuRS. Zanimljivo je da je i najmanji supstrat, α-aminobutirat, ispravno pozicioniran za reakciju aktivacije budući da je k_{cat} približno jednak k_{cat} u prisustvu leucina (20 s^{-1} u odnosu na 66 s^{-1}), a glavni faktor diskriminacije odražava se na vrijednosti K_M koji iznosi čak 85 mmol dm^{-3}. Ostale testirane aminokiseline – metionin i valin, pokazale su se kao vrlo loši supstrati LeuRS, a pojedinačni kinetički parametri k_{cat} i K_M nisu mogli biti određeni zbog vrlo visoke vrijednosti K_M u odnosu na topivost aminokiseline. No, procijenjeni parametri upućuju da ih LeuRS isključuje na razini K_M, dok je vrijednost k_{cat} približno jednaka vrijednosti za pripadni leucin. Konstante specifičnosti k_{cat}/K_M su za metionin i valin određene iz nagiba pravca koji opisuje linearni dio ovisnosti koeficijenta brzine aktivacije aminokiselina pri niskim koncentracijama aminokiseline ($c(aa) < 0{,}1 \times K_M(aa)$). Faktori diskriminacije pokazuju da metionin i valin ne predstavljaju prijetnju točnosti dekodiranja leucinskih kodona jer su vrijednosti u razini ili iznad vrijednosti prirodne pogreške translacije. Određeni su i kinetički parametri u aktivaciji leucina s varijantom LeuRS mutiranom u domeni CP1 i pokazano je da mutacija u domeni CP1, ne utječe na reakciju aktivacije koja se odvija u 30 Å udaljenom sintetskom mjestu (kinetički parametri određeni s D345A LeuRS iznose: $K_M(Leu) = 0{,}05$ mmol dm^{-3}, $k_{cat}(Leu) = 66$ s^{-1}).

4.5 Diskriminacija aminokiselina u koraku prijenosa na $tRNA^{Leu}$

Radi utvrđivanja razine diskriminacije aminokiselina u koraku prijenosa aminokiseline s aminoacil-adenilata na $tRNA^{Leu}$, izmjereni su pojedinačni koeficijenti brzine prijenosa

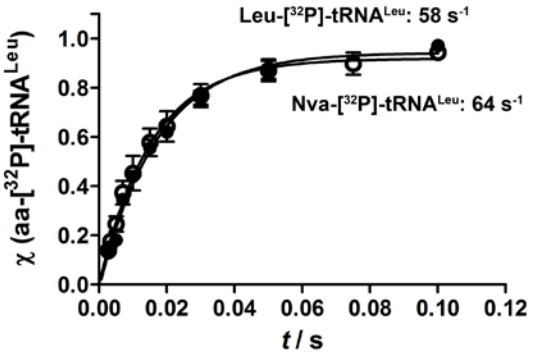
leucina, izoleucina, norvalina i α-aminobutirične kiseline. Metoda se temelji na akumulaciji nekovalentnog kompleksa LeuRS:aminoacil-adenilat inkubacijom enzima s odgovarajućom aminokiselinom, uz dodatak ATP-a i anorganske pirofosfataze u standardnom puferu za LeuRS, nakon čega se stvoreni kompleks pomiješa s tRNA. Važno je da je kompleks prisutan u značajnom suvišku kako bi se prijenos aminokiseline na tRNA ograničio na samo jedan krug katalize enzima (opisano u poglavlju 3.2.5.4). Za brze reakcije korišten je instrument za brzo miješanje i zaustavljanje reakcije (engl. *rapid chemical quench*).

Kako bi nastala misacilirana tRNA ostala očuvana, prijenos nepripadnih aminokiselina rađen je s mutiranom varijantom LeuRS-a kojem je ugašen popravak pogreške nakon prijenosa supstitucijom aspartata 345 u alanin. Utvrđene kristalne strukture pokazale su da je Asp-345 ključan za pozicioniranje amino skupine aminokiseline u hidrolitičko mjesto u domeni CP1[20]. Nekovalentni kompleks LeuRS:aminoacil-adenilat napravljen je *in situ* - inkubacijom enzima s aminokiselinom, ATP-om i anorganskom pirofosfatazom. Nastali kompleks nije izoliran od reakcijske smjese kako bi se omogućilo opetovano nastajanje aminoacil-adenilata, budući da sve varijante enzima imaju aktivnu hidrolizu aminoacil-adenilata u sintetskom mjestu koja je značajna prema nepripadnom aminoacil-adenilatu (tRNA-neovisni popravak pogreške prije prijenosa, opisano u poglavlju Rezultata 4.7.1). Aktivacija je u korištenim reakcijskim uvjetima znatno brža od hidrolize aminoacil-adenilata, pa je nastajanje nekovalentnog kompleksa LeuRS:aa-AMP brzo i ne ograničava reakciju prijenosa aminokiseline. Ovakvim pristupom izmjeren je pojedinačni koeficijent brzine prijenosa aminokiseline s aa-AMP na tRNA ili sporija konformacijska promjena koja prethodi prijenosu. Izmjereni su i koeficijenti brzine prijenosa pripadnog leucina s divljim tipom (WT, engl. *wild type*) i deacilacijskim mutantom LeuRS (D345A LeuRS). Iz rezultata je vidljivo su izmjereni koeficijenti brzine prijenosa leucina vrlo slični što pokazuje da mutacija D345A u domeni CP1 ne utječe na reakciju prijenosa (Tablica 4.3) i opravdava upotrebu mutiranog enzima. Nadalje, D345A LeuRS jednako brzo prenosi pripadni leucin i nepripadni norvalin, a sličnom brzinom prenosi i α-aminobutirat. Također, i amplitude u prijenosu nepripadnih aminokiselina jednake su kao za pripadni leucin (Slika 4.7, Slika 4.8).

Tablica 4.3 Koeficijenti brzine prijenosa aminokiselina na $tRNA^{Leu}$.

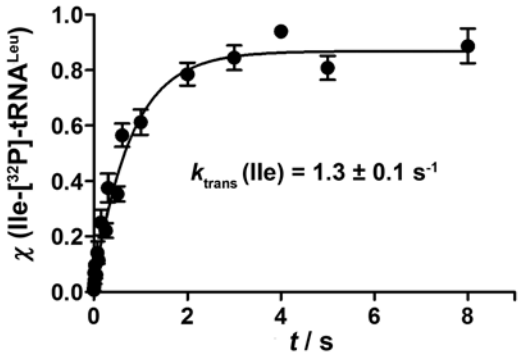
LeuRS	k_{trans}			
	s^{-1}			
	Leu[a]	Nva	Aba	Ile
D345A	58 ± 5	64 ± 8	26 ± 3	1,3 ± 0,1

[a] k_{trans} leucina izmjeren s WT LeuRS je 59 s^{-1}.
Mjerenja su ponovljena tri puta, a vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost ± standardna pogreška.



Slika 4.7 Prijenos norvalina ili leucina s D345A LeuRS na $tRNA^{Leu}$. Prikazane točke su srednje vrijednosti od tri neovisna eksperimenta, a prečke predstavljaju standardnu pogrešku.

Rezultati upućuju da LeuRS ne ostvaruje dodatnu specifičnost u aminoaciliranju kroz diskriminaciju norvalina ili α-aminobutirata u koraku prijenosa aminokiseline na tRNA. Međutim, izmjereni prijenos izoleucina iznosio je 1,3 s^{-1}, što je oko 50 puta sporije od prijenosa leucina (Tablica 4.3, Slika 4.8).

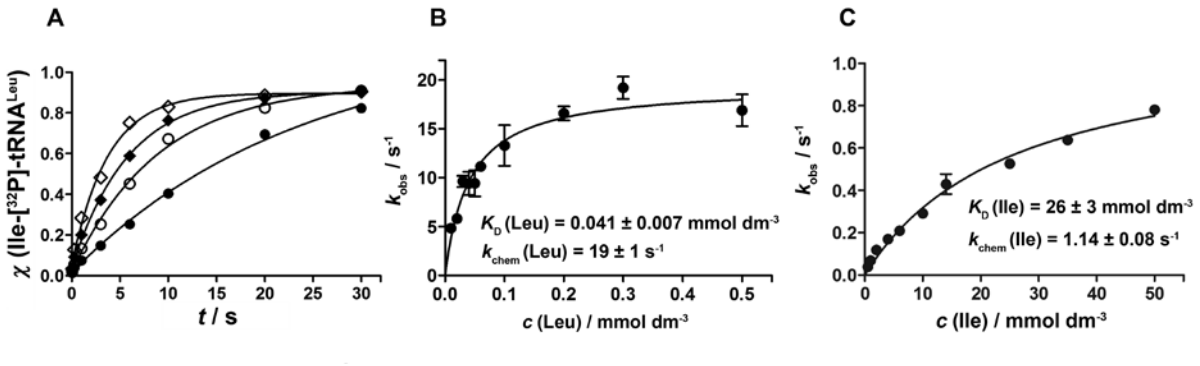


Slika 4.8 Prijenos izoleucina na $tRNA^{Leu}$ s D345A LeuRS. Mjerenje je napravljeno u tri neovisna eksperimenta. Prikazane su srednje vrijednosti, a prečka predstavlja standardnu pogrešku. Preuzeto i prilagođeno iz Cvetesic i sur. 2014[134].

Budući da se već aktivacija izoleucina pokazala sporom, kako bismo provjerili ograničava li spora aktivacija mjereni prijenos, izoliran je nekovalentni kompleks D345A LeuRS:Ile-AMP gel filtracijom na smoli Sephadex G-25, te je pomiješan u instrumentu RQF-3 s jednakim volumenom [^{32}P]-tRNA^{Leu}. Izmjereni koeficijent brzine prijenosa izoleucina s izoliranim kompleksom iznosio je 0,5 s^{-1}, što odgovara mjerenom koeficijentu brzine prijenosa s Ile-AMP stvorenim *in situ* (1,3 s^{-1}) i potvrđuje da je uistinu mjeren prijenos izoleucina.

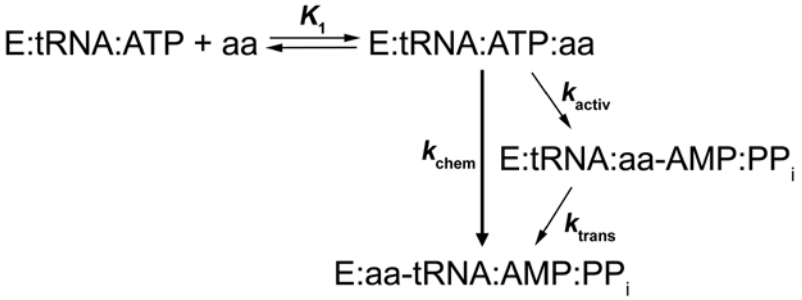
4.6 Diskriminacija izoleucina u ukupnom aminoaciliranju – određivanje kinetičkog K_D za izoleucin u uvjetima jednog obrtaja enzima

Poznato je da tRNA može utjecati na korak aktivacije aminokiseline, odnosno da pojedine aminoacil-tRNA-sintetaze u prisustvu tRNA imaju promijenjene kinetičke parametre u reakciji aktivacije aminokiseline[13, 45, 135-137]. Kako bismo provjerili je li diskriminacija izoleucina na razini aktivacije u prisustvu tRNA drugačija, odnosno je li možda izoleucin bolji supstrat ribonukleoproteinskom nekovalentnom kompleksu LeuRS:tRNA^{Leu}, određeni su i uspoređeni kinetički K_D-ovi za izoleucin, odnosno leucin. Praćeno je ukupno aminoaciliranje – vezanje, aktivacija i prijenos aminokiseline na tRNA u uvjetima jednog reakcijskog kruga koristeći oko 4 puta veću koncentraciju enzima u odnosu na tRNA. Također je, kao i kod mjerenja prijenosa aminokiselina, korišten deacilacijski defektni D345A LeuRS kako bi nastala izoleucil-tRNA bila stabilna. Korišten je suvišak svih sastojaka reakcijske smjese, a varirana je koncentracija izoleucina ili leucina u rasponu od 0,1 do 10 × K_D. Testirani su i načini miješanja uzoraka, a kako nije opažena razlika u reakcijskoj kinetici, zbog jednostavnosti je eksperiment izveden tako da su pomiješani jednaki volumeni različitih koncentracija aminokiseline s LeuRS predinkubiranim s ATP-om, anorganskom pirofosfatazom i [^{32}P]-tRNA^{Leu}. Vremenski tijekovi nastajanja aa-[^{32}P]-tRNA opisani su monoeksponencijalnom krivuljom (Slika 4.9A), a nelinearnom regresijom dobiveni su opaženi koeficijenti brzine aminoaciliranja.



Slika 4.9 Određivanje kinetičkog K_D za leucin i izoleucin u reakciji aminoaciliranja mjerenoj u uvjetima jednog obrtaja LeuRS. A) reprezentativni vremenski tijekovi nastajanja Ile-[^{32}P]-tRNA^{Leu} pri različitim koncentracijama izoleucina. B) Ovisnost koeficijenta brzine leuciliranja (k_{obs}) u uvjetima jednog obrtaja enzima o koncentraciji leucina. C) Ovisnost koeficijenta brzine izoleuciliranja (k_{obs}) o koncentraciji izoleucina u uvjetima jednog obrtaja enzima. Preuzeto i prilagođeno iz Cvetesic i sur. 2014[134].

Iz ovisnosti opaženih koeficijenata brzine aminoaciliranja (k_{obs}) o koncentraciji aminokiseline (izoleucin ili leucin), dobiveni su parametri k_{chem} i K_D nelinearnom regresijom (Slika 4.10B i C), postupak i jednadžba prikazani su u poglavlju 3.2.5.5). Ovisnost k_{obs} o koncentraciji aminokiseline može se opisati hiperbolom, što je u skladu s minimalnom, odnosno pojednostavljenom reakcijskom shemom, u kojoj je vezanje aminokiseline u brzoj ravnoteži (engl. *rapid equilibrium reaction*), a koraci nastajanja aminoacilirane tRNA – aktivacija aminokiseline i/ili prijenos, određuju maksimalni koeficijent brzine aminoaciliranja u jednom obrtaju (k_{chem}, Slika 4.10).



Slika 4.10 Mehanizam aminoaciliranja. Minimalna shema reakcije aminoaciliranja u kojoj je vezanje aminokiseline u brzoj ravnoteži. Maksimalni koeficijent brzine aminoaciliranja u uvjetima jednog obrtaja enzima sastavljen je od pojedinačnih koeficijenata aktivacije (k_{activ}) i prijenosa (k_{trans}). Preuzeto i prilagođeno iz Cvetesic i sur. 2014[134].

I na razini kinetičkog K_D je izmjerena diskriminacija leucina i izoleucina oko 600 puta (Slika 4.9) u skladu s razlikom na razini K_M u aktivaciji (Tablica 4.2).

Značajna razlika uočena je i u koeficijentu brzine ukupnog aminoaciliranja (k_{chem}) mjerenom u uvjetima jednog reakcijskog kruga – k_{chem}(Ile) je 1,14 s^{-1}, a k_{chem}(Leu) je 19 s^{-1}. Ukupna diskriminacija u aminoaciliranju izračunata je prema sljedećem izrazu (Jednadžba 4.1):

$$diskriminacijski\ faktor = \frac{\frac{k_{chem}}{K_D}(Leu)}{\frac{k_{chem}}{K_D}(Ile)}$$

Jednadžba 4.1 Diskriminacijski faktor u ukupnom aminoaciliranju mjerenom pri jednom obrtaju enzima.

Izračunati faktor diskriminacije usporediv je s faktorom diskriminacije na razini aktivacije izoleucina (11000 u odnosu na 31000), što upućuje da $tRNA^{Leu}$ ne utječe na specifičnost aktivnog mjesta LeuRS.

4.7 Popravak pogreške u prisustvu nepripadnih aminokiselina

4.7.1 Popravak pogreške prije prijenosa aminokiseline

Najprije je ispitana aktivnost tRNA-neovisnog popravka pogreške mjerenjem utroška ATP-a u prisustvu nepripadnih aminokiselina. Korišteni su WT LeuRS i D345A LeuRS – varijanta enzima kojem je ugašen popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline. Test utroška ATP-a u kojem se koristi [α-^{32}P]-ATP omogućava istovremeno praćenje nastajanja [α-^{32}P]-AMP i aa-[α-^{32}P]-AMP i određivanje koeficijenta brzine njihove akumulacije u otopini[130]. U prisustvu norvalina nastaje znatno više AMP, nego u prisustvu pripadnog leucina (0,2 s^{-1} u odnosu na 0,010 s^{-1}, Tablica 4.4 i Slika 4.11), što upućuje na aktivnost tRNA-neovisnog popravka pogreške. Tijekom tRNA-neovisnog popravka pogreške, AMP može nastati hidrolizom u sintetskom mjestu enzima, ali i neenzimskom hidrolizom aminoacil-adenilata izbačenog u otopinu (Slika 2.9, putevi popravka pogreške 1 i 2). Kako bismo utvrdili značaj popravka pogreške putem izbacivanja Nva-AMP u otopinu, zasebno je izmjerena neenzimska hidroliza Nva-AMP u otopini. Koeficijent brzine neenzimske hidrolize je 140 puta sporiji od

izmjerenog nastajanja AMP u prisustvu norvalina (14×10^{-4} s^{-1} u odnosu 0,2 s^{-1}), što upućuje da AMP uglavnom potječe od enzimske hidrolize Nva-AMP.

Tablica 4.4 Kinetički parametri u ustaljenom stanju za nastajanje AMP u prisustvu norvalina.

LeuRS	**-tRNA**			**+tRNA**		
	K_M **(Nva)**	k_{cat}	k_{cat}/K_M	K_M **(Nva)**	k_{cat}	k_{cat}/K_M
	mmol dm^{-3}	s^{-1}	$mmol^{-1}$ dm^3 s^{-1}	mmol dm^{-3}	s^{-1}	$mmol^{-1}$ dm^3 s^{-1}
WT	3,6 ± 0,6	0,20 ± 0,01	0,05	4,5 ± 0,5	6,2 ± 0,2	1,4
D345A	3,7 ± 0,1	0,17 ± 0,01	0,05	3,1 ± 0,8	0,23 ± 0,02	0,07

Prikazana je srednja vrijednost ± standardna pogreška od tri neovisna mjerenja.

Istovremeno je izmjereno i nastajanje Nva-AMP, a usporedba koeficijenata brzine nastajanja Nva-AMP i AMP u prisustvu norvalina, a u odsustvu tRNA (0,052 s^{-1} u odnosu na 0,2 s^{-1}, Tablica 4.4 i Tablica 4.5), upućuje da izbacivanje Nva-AMP nije beznačajan mehanizam tRNA-neovisnog popravka pogreške jer se Nva-AMP akumulira u otopini 4 puta sporije od AMP.

Tablica 4.5 Kinetički parametri u ustaljenom stanju za nastajanje Nva-AMP.

LeuRS	**-tRNA**			**+ tRNA**		
	K_m **(Nva)**	k_{cat}	k_{cat}/K_m	K_m **(Nva)**	k_{cat}	k_{cat}/K_m
	mmol dm^{-3}	s^{-1}	$mmol^{-1}$ dm^3 s^{-1}	mmol dm^{-3}	s^{-1}	$mmol^{-1}$ dm^3 s^{-1}
WT	3,8 ± 0,9	0,052 ± 0,003	0,014	n.o.[a]	n.o.	n.o.
D345A	3,7 ± 1,2	0,043 ± 0,004	0,012	7,1 ± 1,5	0,050 ± 0,003	0,007

[a] vrijednost nije određena.
Prikazana je srednja vrijednost ± standardna pogreška od tri neovisna mjerenja.

Ekvivalentni eksperimenti izvedeni su s deacilacijski defektnim D345A LeuRS. Gašenje popravka pogreške u domeni CP1 nije imalo nikakav utjecaj na parametre u tRNA-neovisnom popravku pogreške (Tablica 4.4 i Tablica 4.5), što potvrđuje model postavljen na homolognim IleRS i ValRS te smješta tRNA-neovisan popravak pogreške u aktivno mjesto LeuRS.

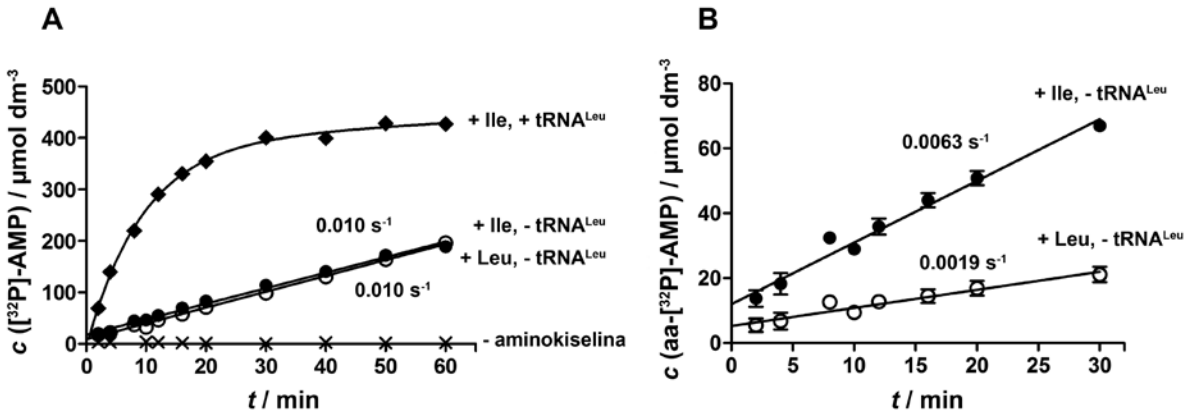
Ekvivalentan eksperiment napravljen je u prisustvu metionina i α-aminobutirata. U skladu s rezultatima aktivacije, LeuRS ima nisku konstantu specifičnosti za oba supstrata zbog niskog k_{cat} (Met) ili vrlo visokog K_M (Aba, Tablica 4.6). Kinetičke parametre za tRNA-

neovisan popravak pogreške u prisustvu valina nije bilo moguće odrediti zbog vrlo niske aktivnosti.

Tablica 4.6 Kinetički parametri u ustaljenom stanju za nastajanje AMP u prisustvu metionina ili α-aminobutirata te WT LeuRS.

aa	K_M (aa)	k_{cat}	k_{cat}/K_M
	mmol dm^{-3}	s^{-1}	$mmol^{-1}$ dm^3 s^{-1}
Met	4,9 ± 0,6	0,032 ± 0,002	0,007
Aba	21 ± 3	0,33 ± 0,02	0,016

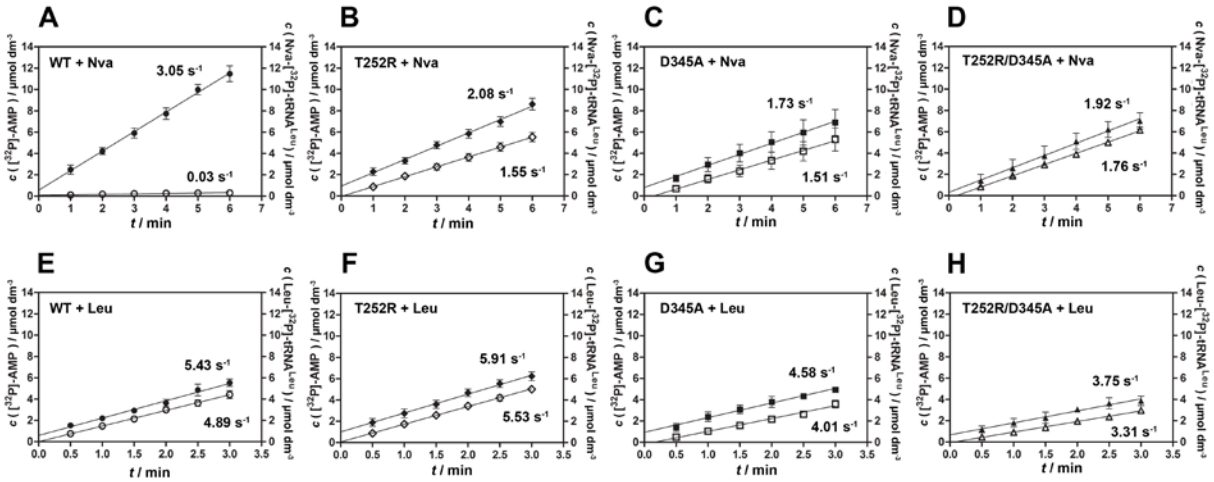
Za izoleucin također zbog niske aktivnosti nije bilo moguće odrediti kinetičke parametre, a zamijećeno je da je u prisustvu izoleucina i leucina nastajanje AMP jednako sporo (0,010 s^{-1}, s obje aminokiseline je postignuto zasićenje pa je k_{obs} približno jednak k_{cat}), Međutim, Ile-AMP se ipak nešto brže nakuplja u otopini u odnosu na Leu-AMP (0,0063 s^{-1} u odnosu na 0,0019 s^{-1}, Slika 4.11). Takvi rezultati pokazuju da LeuRS ne koristi enzimsku hidrolizu kao tRNA-neovisan popravak pogreške za uklanjanje Ile-AMP, već ga selektivno izbacuje u otopinu gdje se neenzimski hidrolizira.



Slika 4.11 Popravak pogreške u prisustvu izoleucina. A) nastajanje AMP u prisustvu 5 µmol dm^{-3} WT LeuRS i odsustvu aminokiseline **(×)**, prisustvu 50 mmol dm^{-3} leucina i odsustvu tRNA **(○)**, prisustvu 50 mmol dm^{-3} izoleucina i odsustvu tRNA (●) i prisustvu 50 mmol dm^{-3} izoleucina i prisustvu tRNA (♦). B) nastajanje aa-AMP u prisustvu 5 µmol dm^{-3} WT LeuRS, odsustvu tRNA i prisustvu 50 mmol dm^{-3} leucina(○) ili 50 mmol dm^{-3} izoleucina (●). Preuzeto i prilagođeno iz Cvetesic i sur. 2014[134].

Izmjereni su kinetički parametri za norvalin u reakciji utroška ATP-a i u prisustvu tRNA, pri čemu se s WT LeuRS mjeri ukupan popravak pogreške. Prisutnost $tRNA^{Leu}$ stimulira popravak pogreške 30 puta (k_{cat}/K_M = 1,4 $mmol^{-1}$ dm^3 s^{-1} u odnosu na k_{cat}/K_M = 0,05 $mmol^{-1}$ dm^3 s^{-1}), pri čemu je glavni učinak stimulacije na vrijednost k_{cat} (6,2 s^{-1} u odnosu na 0,2 s^{-1},

Tablica 4.4). Ispitana je i aktivnost popravka pogreške u prisustvu tRNA s deacilacijski defektnim D345A LeuRS i pokazano je da se gašenjem popravka pogreške nakon prijenosa aminokiseline gubi stimulacija popravka pogreške u prisustvu tRNA - k_{cat}/K_M u prisustvu tRNA jednak je k_{cat}/K_M određenom u odsustvu tRNA s D345A LeuRS (0,07 $mmol^{-1}$ dm^3 s^{-1} u odnosu na 0,05 $mmol^{-1}$ dm^3 s^{-1}, Tablica 4.4). Kako bismo ispitali postojanje tRNA-ovisnog popravka pogreške prije prijenosa aminokiseline, paralelno je praćeno nastajanje AMP i aa-tRNA (Slika 4.12). Takav test omogućava utvrđivanje podrijetla AMP, budući da AMP nastaje i hidrolizom aa-AMP u popravku pogreške, ali i prilikom prijenosa aminokiseline na tRNA. U eksperimentu su korišteni WT, D345A, T252R i T252R/D345A LeuRS. T252R LeuRS je varijanta enzima koja je u literaturi opisana kao LeuRS s ugašenim popravkom pogreške nakon prijenosa aminokiseline, pa bi funkcionalno trebao odgovarati D345A LeuRS [21].

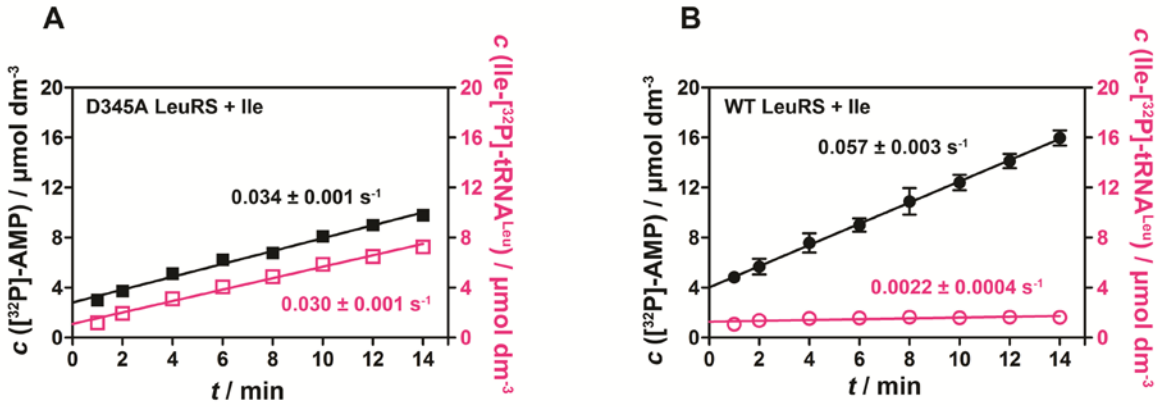


Slika 4.12 Stehiometrija nastajanja AMP i aa-$tRNA^{Leu}$ u paralelnim reakcijama u ustaljenom stanju. Vremenski tijekovi nastajanja AMP prikazani su punim simbolima, a vremenski tijekovi nastajanja aa-$tRNA^{Leu}$ prikazani su praznim simbolima. A)-D) paralelno nastajanje AMP i Nva-$tRNA^{Leu}$ u prisustvu 10 nmol dm^{-3} WT, T252R, D345A ili T252R/D345A LeuRS. E)-H) paralelno nastajanje AMP i Leu-$tRNA^{Leu}$ u prisustvu 10 nmol dm^{-3} WT, T252R, D345A ili T252R/D345A LeuRS. Prikazani koeficijenti brzina reakcija prestavljaju srednju vrijednost od tri neovisna eksperimenta. Standardna pogreška iznosila je oko 10 %. Preuzeto i prilagođeno iz Cvetesic i sur. 2012[47].

Stehiometrija utroška ATP po aminoaciliranoj tRNA koja je veća od 1 (k_{obs}(AMP)/k_{obs}(aa-$tRNA^{Leu}$), upućuje na aktivan popravak pogreške. U prisustvu pripadnog leucina, omjer utrošenog ATP po Leu-$tRNA^{Leu}$ iznosi oko 1, što znači da se svaki nastali Leu-AMP utroši za nastajanje Leu-$tRNA^{Leu}$ te da nema značajne hidrolitičke aktivnosti (Slika 4.12E-H). U prisustvu norvalina, divlji tip za sintezu jedne misacilirane $tRNA^{Leu}$ otpuštene u otopinu utroši

oko 100 ATP-a (3,05 s^{-1}/0,03 s^{-1} ≈ 100, Slika 4.12A). U istim uvjetima D345A LeuRS stehiometrijski iskorištava Nva-AMP za sintezu Nva-$tRNA^{Leu}$ (1,73 s^{-1}/1,51 s^{-1} ≈ 1,15, Slika 4.12B), što znači da D345A LeuRS ne posjeduje hidrolitičku aktivnost jer je ugašen popravak pogreške nakon prijenosa, a ne postoji popravak pogreške prije prijenosa aminokiseline. Nešto veći omjer utroška ATP, koji govori u prilog postojanja aktivnog popravka pogreške pokazuje jedino T252R LeuRS u prisustvu norvalina (2,08 s^{-1}/1,55 s^{-1} ≈ 1,34, Slika 4.12C). Uvođenjem dodatne mutacije koja zasigurno gasi deacilaciju u domeni CP1 (varijanta T252R/D345A LeuRS, Slika 4.12D), omjer je smanjen na oko 1 (1,92s^{-1}/1,76 s^{-1} ≈ 1,09). Zasebno je izmjerena sposobnost popravka pogreške hidrolizom misaciliranih tRNA (poglavlje Rezultata 4.7.2). Pokazano je da mutacija T252R ne gasi posve popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline, zbog čega se taj mutant ne može koristiti za testiranje popravka pogreške prije prijenosa aminokiseline.

Ispitano je postojanje mehanizma popravka pogreške prije prijenosa aminokiseline i u prisustvu izoleucina (Slika 4.13). LeuRS D345A stehiometrijski iskorištava i Ile-AMP za sintezu Ile-$tRNA^{Leu}$, odnosno ne koristi popravak pogreške prije prijenosa aminokiseline za uklanjanje Ile-AMP. WT LeuRS zbog aktivnog popravka pogreške nakon prijenosa aminokiseline, utroši oko 26 ATP-a za sintezu Ile-$tRNA^{Leu}$ otpuštene u otopinu (Slika 4.13).



Slika 4.13 Stehiometrija nastajanja AMP i Ile-$tRNA^{Leu}$ u paralelnim reakcijama u ustaljenom stanju. Vremenski tijekovi nastajanja AMP prikazani su punim crnim simbolima, a vremenski tijekovi nastajanja Ile-$tRNA^{Leu}$ prikazani su praznim simbolima purpurne boje. Prikazani koeficijenti brzina reakcija prestavljaju srednju vrijednost od tri neovisna eksperimenta i izražena je standardna pogreška. Preuzeto i prilagođeno iz Cvetesic i sur. 2014[134].

4.7.2 Popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline

Popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline proučavan je metodom deacilacije *in trans*, u kojoj se enzimu kao supstrat doda aminoacilirana, odnosno misacilirana $tRNA^{Leu}$. U principu je to jedini način mjerenja izoliranog koraka deacilacije, međutim treba imati na umu da u reakcijskom mehanizmu enzima, misacilirana tRNA nastaje na enzimu te 3'-kraj tRNA translocira iz aktivnog sintetskog mjesta u domenu CP1 gdje se odvija deacilacija, bez koraka disocijacije tijela tRNA i vezanja *in trans*. Misacilirana [^{32}P]-tRNA pripremljena je pomoću deacilacijski defektne varijante enzima D345A LeuRS. Korištenje [^{32}P]-tRNA je za mjerenje deacilacije bilo nužno, jer [^{14}C]-norvalin nije komercijalno dostupan. Pripremljena misacilirana tRNA dijalizirana je prema 5 mmol dm^{-3} natrijevom acetatu pH = 5,0, a prije upotrebe je renaturirana standardnim postupkom renaturacije za $tRNA^{Leu}$ jer misacilirana tRNA nakon pripreme nije bila aktivna u testu deacilacije. Reakcije deacilacije napravljene su su u puferu povećanog puferskog kapaciteta (c (Hepes) = 200 mmol dm^{-3}, pH = 7,5), kako bi se pH održao konstatnim unatoč dodatku veće količine misacilirane tRNA otopljene u natrijevom acetatu. Važno je naglasiti da Tris nije povoljan pufer za ovakve reakcije jer molekule Trisa deaciliraju aminoaciliranu tRNA putem aminolize[138]. Reakcija deacilacije izvođena je u uvjetima ustaljenog stanja, ali i u uvjetima predustaljenog stanja, odnosno jednog kruga katalize enzima kako bi se odredio koeficijent brzine hidrolize misacilirane ili aminoacilirane tRNA. U uvjetima ustaljenog stanja, reakcije su izvođene u zasićenju s aminoaciliranom ili misaciliranom tRNA, stoga dobiveni opaženi koeficijenti brzine približno odgovaraju obrtnom broju reakcije deacilacije u ustaljenom stanju. U uvjetima ustaljenog stanja, koncentracija aminoacilirane ili misacilirane tRNA znatno je veća od koncentracije enzima i reakcija deacilacije mjerena je do 10 % utroška aa-tRNA. U tim uvjetima neenzimska hidroliza esterske veze aa-tRNA nije zanemariva i da bi se dobila prava brzina enzimski katalizirane deacilacije, od izmjerenih početnih brzina deacilacije oduzete su brzine neenzimske hidrolize aminoacilirane ili misacilirane tRNA određene u istim reakcijskim uvjetima, ali u odsustvu enzima. Izmjereni koeficijent brzine deacilacije je u ustaljenom stanju za Ile-[^{32}P]-$tRNA^{Leu}$ oko tri puta sporiji u odnosu na Nva-[^{32}P]-$tRNA^{Leu}$, dok je deacilacija Leu-[^{32}P]-$tRNA^{Leu}$ zamjetna, ali značajno sporija što upućuje na specifičnost domene CP1 (Tablica 4.7).

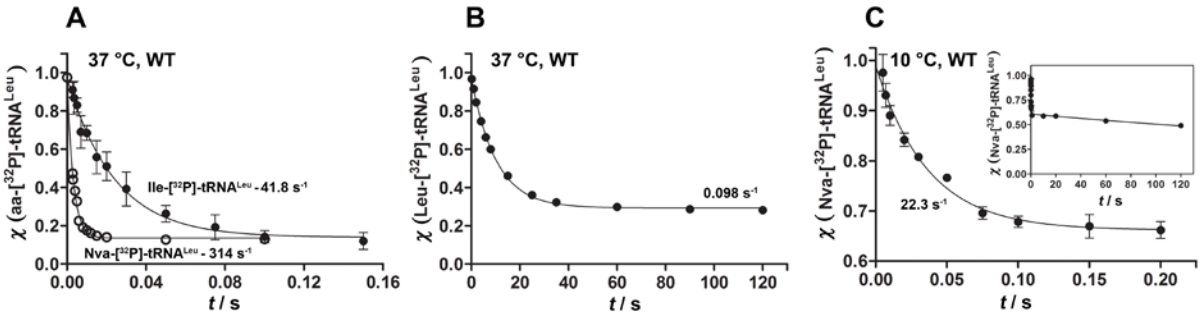
Tablica 4.7 Deacilacija aa-tRNA^{Leu} u uvjetima ustaljenog stanja.

LeuRS	k_{obs} / s^{-1}		
	Nva-tRNA^{Leu}	Ile-tRNA^{Leu}	Leu-tRNA^{Leu}
WT	5,8 ± 0.5	2,07 ± 0,05	$(10 \pm 3) \times 10^{-3}$
D345A	$(1,4 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	n.o.[a]	n.o

[a] vrijednost nije određena.
Mjerenja su ponovljena tri puta, a vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost ± standardna pogreška.

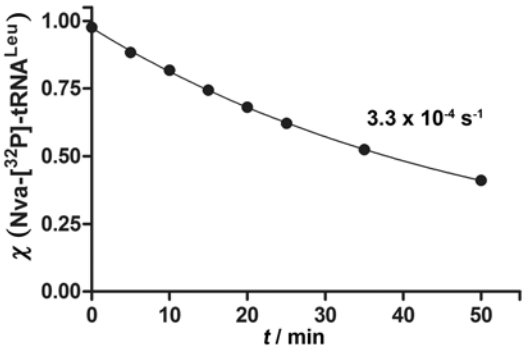
Potvrđeno je da je deacilacijski mutant D345A LeuRS inaktivan u popravku pogreške nakon prijenosa aminokiseline, jer je aktivnost prema svim varijantama aminoaciliranih tRNA značajno smanjena (Tablica 4.7).

Kako bismo istražili je li specifičnost prema pojedinom supstratu, odnosno aminokiselini vezanoj na tRNA izražena u samom kemijskom koraku hidrolize, napravljene su deacilacije u uvjetima jednog obrtaja enzima. Reakcije su izvedene kao što je opisano u poglavlju 3.2.5.6.2. U reakcijama jednog kruga deacilacije izuzetno je bitno korištenje čistog enzima, odnosno enzima s uklonjenim aminoacil-adenilatom iz aktivnog mjesta, jer bi deacilirana tRNA mogla biti ponovno aminoacilirana prenašanjem aminokiseline s aminoacil-adenilata supročišćenog s enzimom. Ukratko, 20 μmol dm^{-3} WT LeuRS lišen aminoacil-adenilata iz aktivnog mjesta prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.4.1 Materijala i metoda, pomiješan je s jednakim volumenom aminoacilirane ili misacilirane tRNA prisutne u značajno manjoj množinskoj koncentraciji. Budući da su reakcije deacilacije u uvjetima jednog obrtaja enzima izuzetno brze, u mjerenjima je korišten instument RQF-3. Krivulje deacilacije, odnosno nestanka misacilirane tRNA, utočnjene su na monoeksponencijalne krivulje iz kojih je dobiven opaženi koeficijent brzine deacilacije (opisano u poglavlju 3.2.5.6.2). Uočljivo je da je hidroliza Nva-tRNA^{Leu} izuzetno brza, čak 310 s^{-1}, zbog čega se unutar mrtvog vremena instrumenta (2,8 ms) odvije preko 50 % reakcije – poluvrijeme deacilacije Nva-tRNA^{Leu} iznosi 2,2 ms. Hidroliza Ile-tRNA^{Leu} je oko 10 puta sporija i iznosi 42 s^{-1}, dok je hidroliza Leu-tRNA^{Leu} očekivano najsporija i iznosi 0,098 s^{-1} (Slika 4.14).



Slika 4.14 Deacilacija mjerena u uvjetima jednog obrtaja LeuRS. A) deacilacija Ile-tRNA^{Leu} (●) ili Nva-tRNA^{Leu} (○) u prisustvu WT LeuRS pri 37 °C i pH = 7,5. B) deacilacija Leu-tRNA^{Leu} u prisustvu WT LeuRS pri 37 °C i pH = 7,5. C) deacilacija Nva-tRNA^{Leu} u prisustvu WT LeuRS pri 10°C i pH = 7,5. Umetnuta slika prikazuje bifaznu prirodu deacilacije Nva-tRNA^{Leu} pri 10 °C na dužoj vremenskoj skali. Preuzeto i prilagođeno iz Cvetesic i sur. 2012[47].

Opaženi koeficijenti brzine deacilacije su za svaku aa-tRNA^{Leu} znatno su sporiji u ustaljenom stanju od koeficijenata brzine deacilacije dobivenih u uvjetima jednog reakcijskog kruga. Takvi rezultati pokazuju da je najsporiji korak u mehanizmu deacilacije aminoacilirane ili misacilirane tRNA disocijacija produkta, ili konformacijska promjena koja prethodi disocijaciji produkta. Kako je pri mjerenju deacilacije Nva-tRNA^{Leu} u uvjetima jednog kruga više od pola reakcije već završeno u prvoj vremenskoj točki, da bi opisali cijeli vremenski tijek, reakcija je usporena izvedbom pri nižoj temperaturi. Deacilacija izmjerena pri 10 °C iznosila je 22 s^{-1}, a krivulja je, kao i pri 37 °C, pokazivala ovisnost deacilacije misacilirane tRNA o vremenu koja se utočnjava na monoeksponencijalnu krivulju. Neobična je bila pojava niske amplitude - samo 30 % Nva-tRNA^{Leu} se deaciliralo izmjerenim koeficijentom brzine deacilacije. Kako bismo istražili deacilira li se ipak ostatak Nva-tRNA^{Leu}, ali znatno sporijim koeficijentom brzine, deacilacija je pri 10 °C praćena u duljem vremenskom intervalu. Uočeno je postojanje druge vrlo spore faze deacilacije Nva-tRNA^{Leu}, a konačni podaci su utočnjeni na biekseponencijalnu krivulju. Bržoj fazi deacilacije odgovara koeficijent brzine deacilacije u iznosu 22 s^{-1}, a drugoj sporijoj fazi koeficijent brzine deacilacije 1,8 × 10^{-3} s^{-1}. Kako bi se utvrdilo podrijetlo spore faze deacilacije, izmjerena je i neenzimska hidroliza Nva-tRNA^{Leu} (Slika 4.15).



Slika 4.15 Neenzimska hidroliza Nva-tRNA^{Leu} pri 37 °C.

Druga faza deacilacije pri 10 °C je oko 6 puta veća od neenzimske hidrolize Nva-tRNA^{Leu} pri 37 °C ($1{,}8 \times 10^{-3}$ s^{-1} u odnosu na $3{,}3 \times 10^{-4}$ s^{-1}) što pokazuje da je i druga faza enzimski katalizirana. Bifazna priroda deacilacije aa-tRNA uočena je i u ranijim istraživanjima (deacilacija Val-tRNA^{Ile} u prisustvu IleRS), a njeno podrijetlo nije poznato[3, 55]. Različiti načini renaturacije aminoacilirane/misacilirane tRNA nisu imali utjecaj na omjer amplituda u brze ili spore faze deacilacije, a pogotovo je neobična veća amplituda spore faze pri niskoj temperaturi.

U sklopu ovog rada pokazano je da u mehanizmu deacilacije najsporiji korak predstavlja disocijacija produkta, ili konformacijska promjena koja prethodi disocijaciji produkta. Stoga, za donošenje zaključaka o utjecaju mutacija u domeni CP1 na mehanizam deacilacije, nužno je mutirane varijante enzima testirati u uvjetima jednog kruga katalize enzima kako bi se vidio učinak na kemijski korak hidrolize. S tim ciljem, ispitan je T252R LeuRS mutant koji je prethodno okarakteriziran u okviru istraživanja grupe dr. sc. En Duo Wang te s kojim je pokazano da *E. coli* LeuRS posjeduje tRNA-ovisan popravak pogreške[21] (rezultati tih istraživanja opisani su u Literaturnom pregledu, poglavlje 2.5.2.1). T252R LeuRS je u istraživanjima dr. sc. Wang prikazan kao deacilacijski mutant jer je eksperimentalno pokazano da ne može hidrolizirati Ile-tRNA^{Leu}. U ovom radu je mutant T252R ispitan u deacilaciji u uvjetima ustaljenog stanja, ali i u uvjetima jednog reakcijskog obrtaja enzima (Tablica 4.8). Napravljen je i dvostruki mutant T252R/D345A, a na jednak način testirana je i njegova aktivnost. Rezultati su pokazali da je T252R doista inaktivan u deacilaciji Ile-tRNA^{Leu}, što je očito u mjerenjima u uvjetima ustaljenog stanja i u uvjetima jednog obrtaja enzima (Tablica 4.8). Zanimljivo je da je uvođenjem mutacije T252R, reakcija deacilacije Nva-tRNA^{Leu} atenuirana, ali nije inaktivirana - k_{obs} izmjeren u ustaljenom stanju iznosi 0,38

s^{-1}, dok k_{obs} izmjeren u predustaljenom stanju iznosi 2,5 s^{-1} (Tablica 4.8). Činjenica da T252R nije hidrolitički inaktivan, isključuje mogućnost njegove upotrebe u istraživanju tRNA-ovisnog popravka pogreške prije prijenosa u prisustvu norvalina, jer se i dalje može odvijati i popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline. Tek uvođenjem D345A mutacije u T252R LeuRS, posve je ugašena deacilacija Nva-$tRNA^{Leu}$ (Tablica 4.8).

Tablica 4.8 Deacilacija aa-$tRNA^{Leu}$ s T252R i T252R/D345A LeuRS.

LeuRS	**Nva-$tRNA^{Leu}$**	**Ile-$tRNA^{Leu}$**	**Leu-$tRNA^{Leu}$**
		ustaljeno stanje k_{obs} / s^{-1}	
T252R	0,38 ± 0,02	(3,3 ± 0,3) × 10^{-3}	(3,8 ± 0,1)× 10^{-3}
T252R/D345A	(0,6 ± 0,1)×10^{-3}	n.o.[a]	n.o.
		predustaljeno stanje k_{obs} / s^{-1}	
T252R	2,5 ± 0,2	(13,2 ± 0,6) × 10^{-3}	(17 ± 1) × 10^{-3}
T252R/D345A	(1,5 ± 0,2) × 10^{-3}	(0,63 ± 0,03) × 10^{-3}	(0,4 ± 0,2) × 10^{-3}

[a] vrijednost nije određena zbog preniske aktivnosti.
Mjerenja su ponovljena tri puta, a vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost ± standardna pogreška.

4.8 Procjena koeficijenta brzine translokacije 3' kraja tRNA iz sintetskog mjesta u domenu CP1

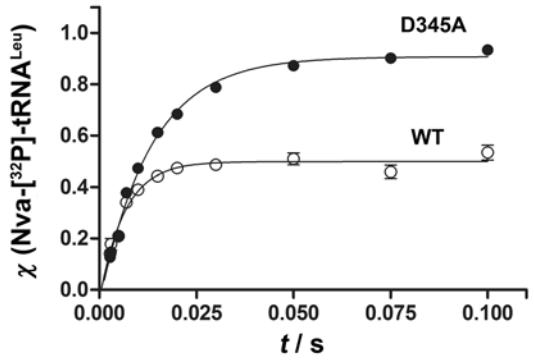
Translokacija 3'-kraja tRNA iz sintetskog u hidrolitičko mjesto u domeni CP1 je važan preduvjet popravka pogreške putem deacilacije misacilirane tRNA. Unatoč tome, slabo je istraživana jer je vrlo brz i kratkotrajan proces. U sklopu ove doktorske disertacije, procijenjen je koeficijent brzine translokacije 3'-kraja Nva-$tRNA^{Leu}$ korištenjem modificiranog kinetičkog testa prijenosa aminokiseline na tRNA u jednom reakcijskom obrtaju enzima (prijenos aminokiseline na tRNA opisan je u poglavlju 3.2.5.4). Enzim je prisutan u suvišku u odnosu na tRNA, što prividno osigurava jedan obrtaj enzima, dok je enzim u zasićenju s aminokiselinom i ATP-om kako bi se osigurala brza aktivacija, odnosno *in situ* nastajanje aminoacil-adenilata. Za procjenu koeficijenta brzine translokacije koristi se divlji tip enzima, i naizgled se mjeri prijenos nepripadne aminokiseline. Međutim, razlika u odnosu na mjerenje koeficijenta brzine prijenosa aminokiseline je u tome što izvođenje eksperimenta s divljim tipom enzima omogućava više obrtaja enzima jer tRNA nije ograničavajući faktor za osiguravanje jednog obrtaja enzima. Upotreba divljeg tipa enzima omogućava regeneraciju slobodnog 3'-kraja tRNA, jer se nakon prijenosa nepripadne aminokiseline odvija translokacija esterificiranog 3'-kraja tRNA iz aktivnog mjesta u

hidrolitičko mjesto u domeni CP1, gdje se misacilirana tRNA može deacilirati. Time se 3'-kraj tRNA regenerira i može ponovno, nakon translokacije u sintetsko mjesto, sudjelovati u prijenosu aminokiseline. U ovako dizajniranom eksperimentu, ravnotežni plato misacilirane tRNA je funkcija koeficijenata brzina sukcesivnih reakcija prijenosa aminokiseline, translokacije 3'-kraja iz aktivnog mjesta u hidrolitičko mjesto u domeni CP1 i deacilacije misacilirane tRNA (Jednadžba 4.2), pa se pomoću zasebno izmjerenih koeficijenata brzine prijenosa aminokiseline te deacilacije misacilirane tRNA može procijeniti koeficijent brzine translokacije 3'-kraja tRNA iz aktivnog mjesta u hidrolitičko mjesto u domeni CP1.

$$A_{eq} \approx \frac{k_{trans}}{k_{trans} + k_{hydr}}$$

Jednadžba 4.2 Ovisnost ravnotežnog platoa nastale misacilirane tRNA (A_{eq}) o pojedinačnim koeficijentima brzina reakcije k_{trans} – koeficijent brzine prijenosa aminokiseline i k_{hydr} – složeni koeficijent brzine translokacije 3'-kraja tRNA u domenu CP1 i deacilacije misacilirane tRNA u domeni CP1.

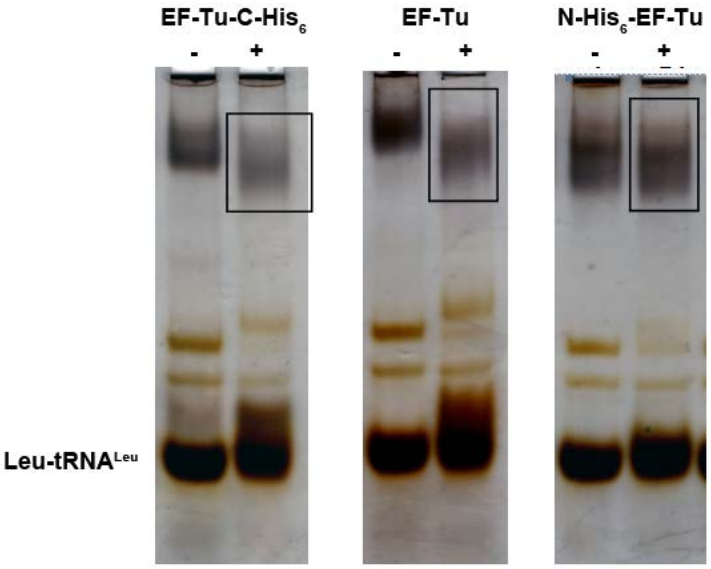
U mjerenju prijenosa norvalina s divljim tipom LeuRS, dobiven je ravnotežni plato Nva-tRNA^{Leu} u iznosu od otprilike 40-45 % (Slika 4.16). Obzirom da ravnotežni plato, odnosno akumulacija ovisi o koeficijentu brzine prijenosa i deacilacije, iz zasebno izmjerenog prijenosa norvalina i deacilacije Nva-tRNA^{Leu}, teorijski očekivani iznos akumulirane misacilirane tRNA trebao bi biti oko 17 % (k_{trans} = 64s^{-1}, k_{deacyl} = k_{hydr} = 310 s^{-1}; A_{eq} = 64 s^{-1}/(64s^{-1} + 314s^{-1}) = 0,17). Opaženi eksperimentalni plato misacilirane tRNA (40-45 %.) odgovarao bi koeficijentu brzine deacilacije u iznosu od 80 s^{-1}. Budući da je zasebno izmjereni kemijski korak deacilacije znatno brži (k_{deacyl} je 310 s^{-1}), može se zaključiti da izračunati koeficijent k_{hydr} koji iznosi 80 s^{-1} odražava koeficijent brzine translokacije koji ograničava deacilaciju *in cis*.



Slika 4.16 Prijenos Nva s WT ili D345A LeuRS. Preuzeto i prilagođeno iz Cvetesic i sur. 2012[47].

4.9 Proizvodnja i pročišćavanje elongacijskog faktora Tu iz *E. coli*

Rekombinantni plazmid za ekspresiju elongacijskog faktora Tu iz *E. coli* dizajniran je kako bi omogućio proizvodnju EF-Tu s N- ili C-terminalnim histidinskim privjeskom. Prema utvrđenoj kokristalnoj strukturi EF-Tu:aa-tRNA, pretpostavljeno je da bi histidinski privjesak na N-kraju mogao ometati vezanje aminoacilirane tRNA[90]. Zato je rekombinatni plazmid koji omogućava ekspresiju N-His_6-EF-Tu konstruiran tako da omogućava uklanjanje histidinskog privjeska pomoću proteaze TEV. Rekombinantna proteaza TEV s histidinskim privjeskom proizvedena je u laboratoriju prema standardnom postupku pročišćavanja na Ni-NTA agarozi. Aktivnost proteaze TEV uspoređena je s aktivnošću komercijalne proteaze TEV, i sukladno tome prilagođena je količina proteaze TEV koja se upotrebljavala za uklanjanje histidinskog privjeska. Aktivnost varijante EF-Tu s N-terminalnim (N-His_6-EF-Tu), C-terminalnim histidinskim privjeskom (EF-Tu-C-His_6) i bez privjeska (EF-Tu), uspoređena je testom vezanja aminoacilirane tRNA nativnom elektroforezom. Aktivirani EF-Tu (EF-Tu:GTP) s C-terminalnim histidinskim privjeskom ili bez privjeska, podjednako dobro ostvaruje interakcije s Leu-$tRNA^{Leu}$, dok najslabije interakcije ostvaruje EF-Tu s N-terminalnim histidinskim privjeskom (Slika 4.17). Nadalje je u radu korišten EF-Tu bez histidinskog privjeska.

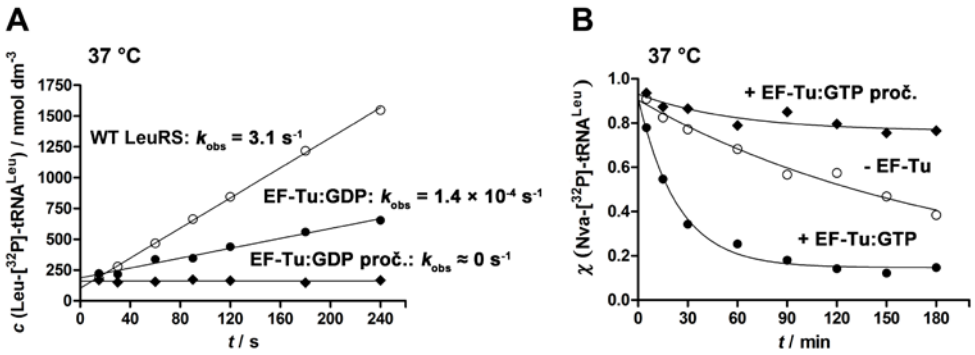


Slika 4.17 Ispitivanje interakcija EF-Tu:GTP s Leu-tRNA^{Leu} nativnom elektroforezom. Množinski omjer EF-Tu i Leu-tRNA^{Leu} je približno 1:2 i gel je vizualiziran bojanjem srebrom. Lijevo je prikazan dio nativnog gela s EF-Tu-C-His$_6$, u sredini s EF-Tu bez histidinskog privjeska, te desno N-His$_6$-EF-Tu. Uzorci EF-Tu:GTP označeni su s (-), dok su uzorci gdje su pomiješani EF-Tu:GTP i Leu-tRNA^{Leu} označeni s (+). Pravokutnikom je označen pomak EF-Tu:GTP uslijed interakcije s Leu-tRNA^{Leu}, a uočljiva je i smanjena mobilnost Leu-tRNA^{Leu}, uslijed interakcije s EF-Tu:GTP.

Budući da je krajnji cilj proizvodnje elongacijskog faktora Tu usporediti interakciju s Nva-tRNA^{Leu} i Leu-tRNA^{Leu}, izuzetno je važno proizvesti EF-Tu prikladan za ispitivanje interakcije s misaciliranom tRNA. U eksperimentima ispitivanja interakcija koristi se vrlo mala količina aminoacilirane tRNA jer je očekivani afinitet za aa-tRNA u nanomolarnom rasponu. Uobičajeno se koriste i visoke koncentracije EF-Tu (koncentracija ukupnog proteina) jer je mala frakcija molekula EF-Tu:GTP aktivna u vezanju aminoacilirane tRNA, pa nije neobično da je takva kinetička metoda vrlo osjetljiva na eventualne kontaminacije prisutne u proteinskom uzorku. Najveći problem predstavlja prisutnost tragova divljeg tipa LeuRS u pripravku elongacijskog faktora jer je njegova deacilacijska aktivnost vrlo visoka.

Kako bismo ispitali prisutnost tragova endogenog *E. coli* LeuRS u uzorku pročišćenog EF-Tu, standardnim aminoacilacijskim testom ispitana je sposobnost EF-Tu:GDP u sintezi Leu-tRNA^{Leu} (postupak je opisan u poglavlju 3.2.5.2.2). Uočena je značajna aminoacilacijska aktivnost kada je korišten EF-Tu konačne množinske koncentracije 12,5 μmol dm^{-3}. Usporedba koeficijenta brzine aminoacilacije s koeficijentom brzine aminoacilacije u prisustvu 2 nmol dm^{-3} LeuRS omogućava procjenu količine LeuRS prisutnog u uzorku EF-Tu. Procjenjeni udio LeuRS u uzorku EF-Tu iznosi oko 0,005 % (Slika 4.18A). Nadalje, kako

bi se ispitala upotrebljivost takvog kontaminiranog uzorka EF-Tu, testirana je interakcija aktiviranog EF-Tu:GTP s Nva-tRNA^{Leu} korištenjem testa zaštite aminoacilirane tRNA od neenzimske hidrolize (Slika 4.18B).



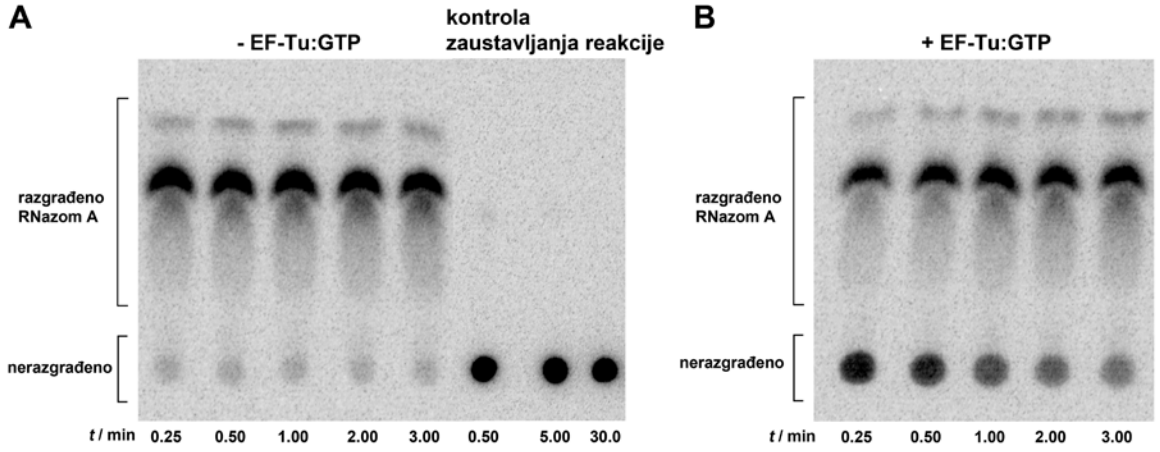
Slika 4.18 *E. coli* EF-Tu pripremljen standardnim pročišćavanjem na Ni-NTA agarozi sadrži tragove supročišćenog endogenog *E. coli* LeuRS. A) reprezentativno leuciliranje s 12,5 µmol dm^{-3} EF-Tu:GDP prije (●) i nakon (♦) dodatnog pročišćavanja gel-filtracijom. Udio LeuRS u EF-Tu:GDP procjenjen je usporedbom koeficijenta brzine leucilacije u prisustvu 12,5 µmol dm^{-3} EF-Tu:GDP (●) i 2 nmol dm^{-3} LeuRS (○). B) reprezentativna deacilacija Nva-[^{32}P]-tRNA^{Leu} u odsustvu EF-Tu (○) i u prisustvu aktiviranog (●) ili aktiviranog pročišćenog EF-Tu (♦). Preuzeto i prilagođeno iz Cvetesic i sur. 2013[139].

U prisustvu EF-Tu:GTP uočena je značajna hidroliza Nva-tRNA^{Leu} umjesto zaštite od hidrolize, što je potvrdilo da i niske razine kontaminacije EF-Tu s endogenim divljim tipom LeuRS, odnosno općenito kontaminacije s aaRS koje imaju aktivnu deacilaciju onemogućavaju istraživanje interakcije EF-Tu s misaciliranim varijantama tRNA. Kako bismo uklonili tragove endogenog LeuRS, EF-Tu je dodatno pročišćen standardnom gel-filtracijom na kromatografskoj koloni Sephadex G-200. Nakon tog koraka pročišćavanja, EF-Tu:GDP nije pokazivao aktivnost u leucilaciji, a aktivirani oblik EF-Tu:GTP štitio je Nva-tRNA^{Leu} od neenzimske hidrolize, što potvrđuje da su tragovi endogenog LeuRS uspješno uklonjeni gel-filtracijom (Slika 4.18B).

4.10 Razvoj modificiranog testa zaštite od razgradnje ribonukleazom

Test zaštite aminoacilirane tRNA od razgradnje ribonukleazom zasniva se na sposobnosti EF-Tu da fizički spriječi djelovanje ribonukleaza na vezanu aminoaciliranu tRNA. Navedeno svojstvo omogućava razlikovanje na EF-Tu vezane, odnosno nevezane frakcije aminoacilirane tRNA jer će sva slobodna tj. nevezana aminoacilirana tRNA biti brzo razgrađena djelovanjem ribonukleaza. Najčešće su do sada kao biljezi korištene [^{14}C]-aminokiseline, a razgrađena i nerazgrađena, odnosno zaštićena tRNA razlikuju se prema svojstvu topivosti, odnosno netopivosti u kiselim uvjetima – aa-tRNA koja je vezana za EF-Tu ostaje cjelovita i taloži u kiselom. Udio zaštićene aa-tRNA određuje se prema udjelu radioaktivnosti prisutne u talozima. Budući da [^{14}C]-norvalin nije komercijalno dostupan, za ispitivanje interakcija EF-Tu s Nva-tRNA^{Leu}, razvijen je modificirani protokol zaštite aminoacilirane tRNA od razgradnje ribonukleazom, prikladan za upotrebu radioaktivno obilježene [^{32}P]-tRNA. Vezana aa-tRNA razlikuje se od nevezane, odnosno RNazom A hidrolizirane tRNA prema pokretljivosti u tankoslojnoj kromatografiji. Prednost ovog pristupa je prikladnost za visoko protočne eksperimente jer se lako prilagođava na format mikrotitarskih pločica upotrebom višekanalne pipete, a izbjegavaju se i tehnički zahtjevniji eksperimentalni koraci poput taloženja kiselinom i filtriranja.

Kako bismo utvrdili kromatogram, odnosno izgled migracijskog uzorka u tankoslojnoj kromatografiji specifičan za aminoaciliranu [^{32}P]-tRNA^{Leu} razgrađenu ribonukleazom A, Nva-[^{32}P]-tRNA^{Leu} je inkubirana s RNazom A (Slika 4.19). Testirane su i koncentracije RNaze A pogodne za razgradnju tRNA prisutne u količini koja bi se inače koristila u testu zaštite tRNA od ribonukleaza pomoću EF-Tu. Iz rezultata se može uočiti da postoji značajna razlika u kromatografskoj mobilnosti koja omogućava zasebnu kvantifikaciju razgrađene i nerazgrađene aminoacilirane tRNA.



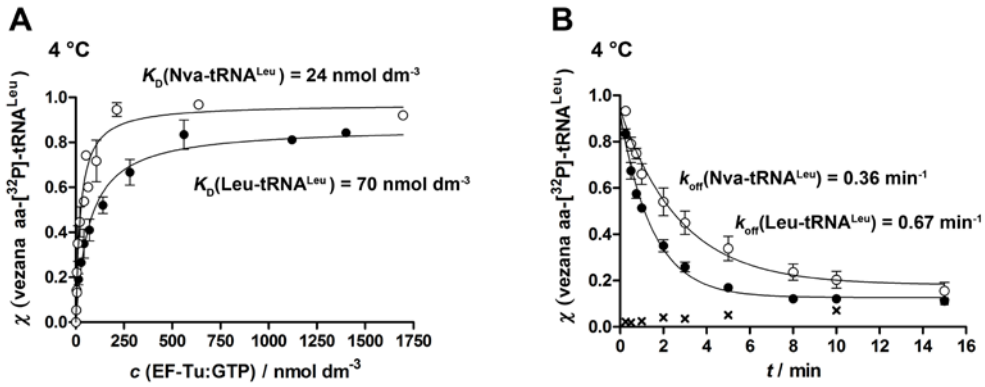
Slika 4.19 Uzorak kromatografske mobilnosti tRNA razgrađene RNazom A. A) kromatogram predstavlja vremenski tijek razgradnje Leu-[^{32}P]-tRNA^{Leu} RNazom A u odsustvu EF-Tu:GTP (lijeva strana slike, -EF-Tu:GTP). Kontrola pufera za zaustavljanje reakcije (desna strana slike) napravljena je dodatkom RNaze A u Leu-[^{32}P]-tRNA^{Leu} prethodno pomiješanu s mravljom kiselinom (c = 1 mol dm^{-3}). Razgrađena i nerazgrađena tRNA zasebno su kvantificirane softverom ImageQuant. Množinski udio nerazgrađene tRNA izračunat je kao udio intenziteta signala radioaktivne nerazgrađene tRNA u ukupnom intenzitetu signala radioaktivnosti. Množinski udio nerazgrađene aa-tRNA izračunat je tako da je množinski udio nerazgrađene tRNA podijeljen s množinskim udjelom aa-tRNA izvorno prisutne u uzorku. B) reprezentativni kromatogram vremenskog tijeka razgradnje Leu-[^{32}P]-tRNA^{Leu} u prisustvu EF-Tu:GTP. Leu-[^{32}P]-tRNA^{Leu} i EF-Tu:GTP predinkubirani su na 4 °C. Preuzeto i prilagođeno iz Cvetesic i sur. 2013[139].

RNaza A već unutar 15 sekundi postiže maksimum razgradnje u iznosu od 95 %. Svega 5 % aa-tRNA ostaje nerazgrađeno i ta količina se ne mijenja daljnjom inkubacijom. Za precizno mjerenje vremenskih tijekova, izuzetno je važno koristiti otopinu za zaustavljanje reakcije koja trenutno zaustavlja djelovanje RNaze A. Za brzo zaustavljanje reakcije, testirana je mravlja kiselina tako da je aminoaciliranoj tRNA pomiješanoj s mravljom kiselinom koncentracije 1 mol dm^{-3} dodana ribonukleaza A. U takvom postavu eksperimenta, ukoliko je mravlja kiselina dobra za brzo zaustavljanje reakcije, RNaza A biti će trenutno inaktivirana i neće doći do razgradnje tRNA. Budući da je 98 % tRNA ostalo nerazgrađeno (Slika 4.19), može se zaključiti da je mravlja kiselina odgovarajuća otopina, u vremenskim okvirima ovakvog eksperimenta, za brzo zaustavljanje reakcije razgradnje ribonukleaze A.

4.11 Afinitet EF-Tu za Nva-tRNA^{Leu} i Leu-tRNA^{Leu}

Ispitana je razlika u afinitetu elongacijskog faktora Tu prema Nva- i Leu-tRNA^{Leu}. Pritom je korišten modificirani test zaštite aminoacilirane tRNA od djelovanja ribonukleaza opisan u

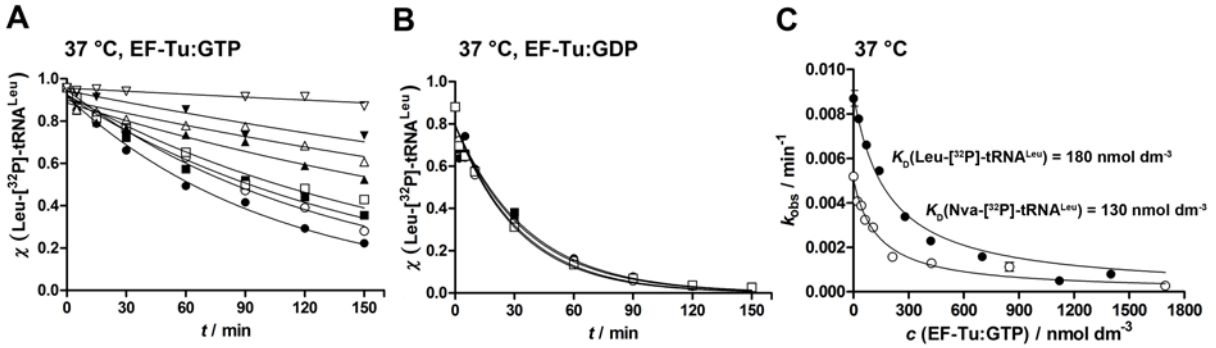
prethodnom poglavlju Rezultata (4.10) i poglavlju Materijala i metoda (3.2.5.13). Za određivanje točnog K_D potrebno je znati udio aktivnog EF-Tu:GTP, odnosno udio EF-Tu:GTP sposobnog vezati aminoaciliranu tRNA (detaljno opisano u Materijalima i metodama 3.2.5.12). Kako bismo odredili afinitet prema pojedinoj aminoaciliranoj tRNA, napravljena je predinkubacija aminoacilirane ili misacilirane tRNA s različitim koncentracijama aktivnog EF-Tu (koncentracija izražena prema udjelu EF-Tu:GTP koji je sposoban vezati aminoaciliranu tRNA, opisano u poglavlju Materijala i metoda 3.2.5.12). Udio zaštićene, odnosno na EF-Tu vezane aa-tRNA pri različitim koncentracijama EF-Tu:GTP određen je prema razdvajanju u tankoslojnoj kromatografiji i kvantificiran kao udio radioaktivnosti koja nije migrirala sa startne linije u ukupnoj radioaktivnosti. Iz ovisnosti udjela zaštićene aminoacilirane tRNA o koncentraciji aktivnog EF-Tu, izačunava se K_D – konstanta disocijacije aa-tRNA iz ternarnog kompleksa EF-Tu:GTP:aa-tRNA (opisano u potpoglavlju 3.2.5.13). Nelinearnom regresijom (Jednadžba 3.12) dobiven je K_D koji odražava afinitet elongacijskog faktora Tu prema aminoaciliranoj, odnosno misaciliranoj tRNA. Rezultati su pokazali da je afinitet elongacijskog faktora prema Nva- ili Leu-tRNA^{Leu} približno jednak – K_D za Leu-tRNA^{Leu} je 70 nmol dm^{-3}, dok je za Nva-tRNA^{Leu} 24 nmol dm^{-3} (Slika 4.20).



Slika 4.20 Interakcija *E. coli* EF-Tu:GTP i Leu- ili Nva-[^{32}P]-tRNA^{Leu} pri 4 °C. A) prikazana je krivulja vezanja EF-Tu:GTP i Leu-[^{32}P]-tRNA^{Leu} (●) te EF-Tu:GTP i Nva-[^{32}P]-tRNA^{Leu} (○). B) vremenski tijekovi disocijacije Leu-[^{32}P]-tRNA^{Leu} (●) ili Nva-[^{32}P]-tRNA^{Leu} (○) iz ternarnog kompleksa EF-Tu:GTP:aa-tRNA^{Leu}. Kontrola je napravljena s EF-Tu:GDP (×). Preuzeto i prilagođeno iz Cvetesic i sur. 2013[139].

Iako je afinitet jednak, postoji mogućnost da se razlikuju pojedinačni koeficijenti brzina vezanja (k_{on}), odnosno disocijacije (k_{off}), koji u konačnici daju jednak afinitet (k_{off}/k_{on}). Koristeći modificirani protokol zaštite aa-tRNA, određen je k_{off} za Nva-tRNA^{Leu} i Leu-tRNA^{Leu} s odgovarajućeg EF-Tu:GTP:aa-tRNA ternarnog kompleksa (detaljno opisano u

poglavlju 3.2.5.14). EF-Tu:GTP i aa-tRNA su inkubirani 25 min pri 4 °C, nakon čega je dodana ribonukleaza A, uzimani su uzorci smjese u određenim vremenskim intervalima, a reakcija razgradnje RNazom A zaustavljana je miješanjem s mravljom kiselinom. Razgrađena i zaštićena aa-tRNA razdvojene su tankoslojnom kromatografijom kao što je već opisano, i udio vezane, odnosno zaštićene aa-tRNA prikazan je u ovisnosti o vremenu. Koeficijent brzine disocijacije (k_{off}) određen je utočnjavanjem podataka na monoeksponencijalnu jednadžbu (opisano u potpoglavlju 3.2.5.14, Jednadžba 3.13). Rezultati upućuju da ne postoji značajna razlika u kinetici vezanja Leu-tRNA^{Leu}, odnosno Nva-tRNA^{Leu} jer su dobivene k_{off} vrijednosti približno jednake. Kako dobiveni rezultati odražavaju afinitet pri 4 °C, što nije uobičajena fiziološka temperatura za bakteriju *Escherichia coli*, određen je afinitet EF-Tu:GTP za Nva-tRNA^{Leu} i Leu-tRNA^{Leu} pri 37 °C. Pritom je korištena druga metodologija, jer je k_{off} za aa-tRNA iz ternarnog kompleksa EF-Tu:GTP:aa-tRNA prevelik pri 37 °C, odnosno disocijacija je prebrza da bi se mogao određivati udio vezane aa-tRNA u vremenu ručnim uzorkovanjem reakcijske smjese. Test zaštite od ribonukleaze mogao bi se prilagoditi i izvoditi u instrumentu s brzim gašenjem protoka, međutim, takva izvedba znatno poskupljuje i komplicira eksperimente, budući da je nužna upotreba do 20 puta većih reakcijskih volumena. Za istraživanje afiniteta EF-Tu prema aminoaciliranoj tRNA na fiziološki značajnoj temperaturi, odnosno pri 37 °C, korišten je eksperimentalni pristup zaštite aminoacilirane-tRNA od neenzimske hidrolize[94]. Naime, aminoacilirana tRNA u ternarnom kompleku EF-Tu:GTP:aa-tRNA, zaštićena je od neenzimske hidrolize, jer je molekuli vode onemogućen pristup esterskoj vezi. Određivanjem koeficijenata brzine neenzimske hidrolize aminoacilirane tRNA pri različitim koncentracijama dodanog EF-Tu:GTP (aktivnog u vezanju aminoacilirane tRNA), može se odrediti afinitet EF-Tu:GTP prema aa-tRNA (Slika 4.21). Pomiješani su jednaki volumeni EF-Tu:GTP i aa-tRNA i u određenim vremenskim razdobljima uzimani su alikvoti reakcijske smjese i pomiješani s puferom za zaustavljanje reakcije. Kao negativna kontrola, napravljen je eksperiment zaštite aminoacilirane tRNA s EF-Tu:GDP (Slika 4.21). Budući da neaktivirani EF-Tu:GDP zapravo ne veže aminoaciliranu tRNA, nema zaštite od neenzimske hidrolize, što podupire valjanost eksperimentalnog pristupa i specifičnost mjerenih interakcija.



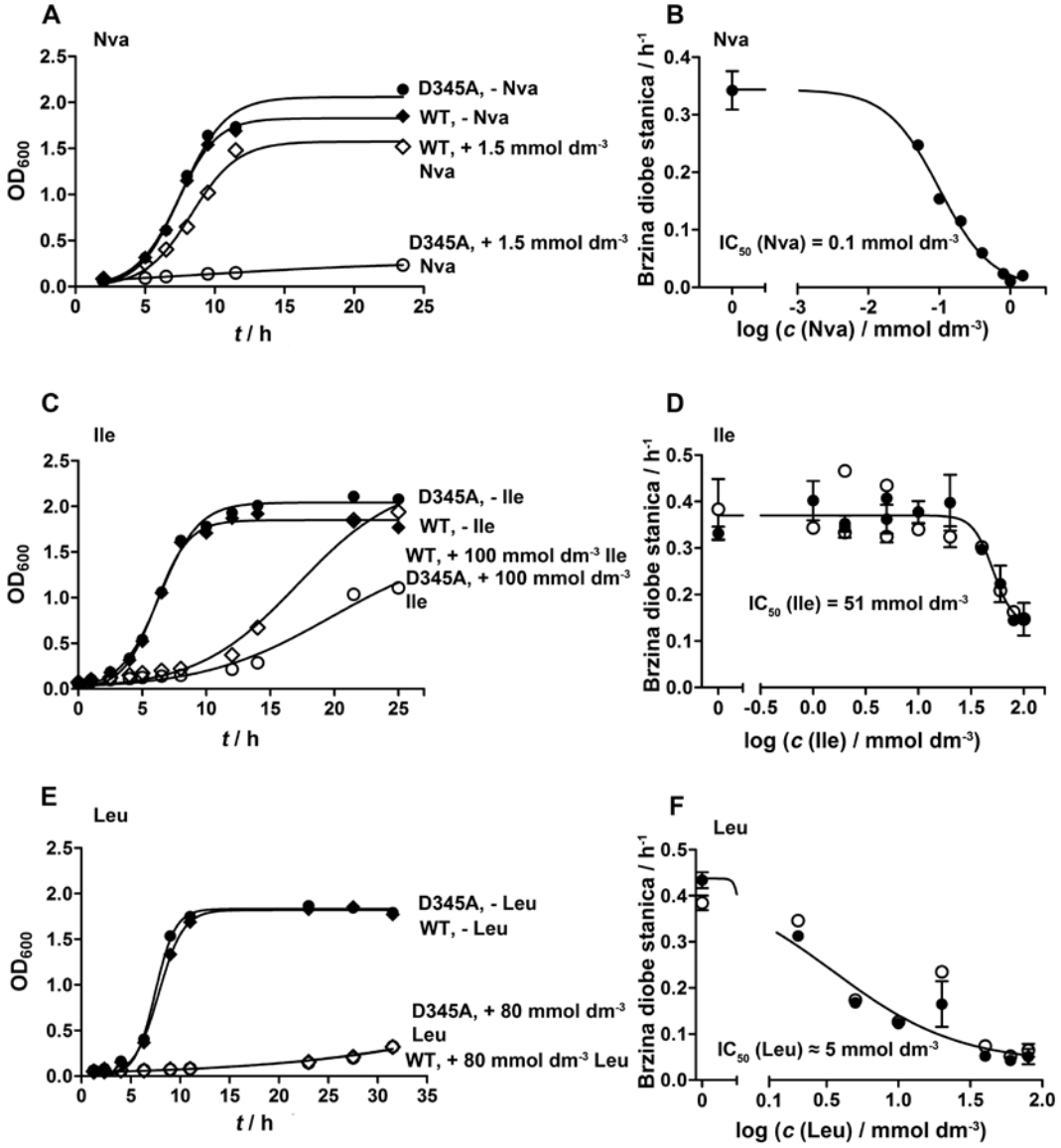
Slika 4.21 Interakcija *E. coli* EF-Tu:GTP s Leu- ili Nva-[^{32}P]-tRNA^{Leu} pri 37 °C. A) Reprezentativni vremenski tijekovi neenzimske deacilacije Leu-tRNA^{Leu} u prisustvu 0 (●), 28 (○), 70 (■), 140 (□), 280 (▲), 420 (△), 700 (▼) and 1120 (▽) nmol dm^{-3} aktivnog EF-Tu:GTP. B) negativna kontrola – neenzimska hidroliza Leu-[^{32}P]-tRNA^{Leu} u prisustvu 0 (●), 1 (○), 5 (■) and 10 (□) µmol dm^{-3} EF-Tu:GDP (ukupna koncentracija proteina). C) ravnotežne krivulje vezanja koje odražavaju afinitet *E.coli* EF-Tu:GTP i Leu-tRNA^{Leu} (●) ili Nva-tRNA^{Leu} (○). Preuzeto i prilagođeno iz Cvetesic i sur. 2013[139].

Iz ovisnosti k_{obs} neenzimske hidrolize o koncentraciji aktivnog EF-Tu:GTP, nelinearnom regresijom prema jednadžbi prikazanoj u poglavlju Materijala i metoda 3.2.5.15 (Jednadžba 3.15) određen je K_D kao konstanta disocijacije aa-tRNA iz ternarnog kompleksa EF-Tu:GTP. Rezultati pokazuju da EF-Tu ne razlikuje Leu-tRNA^{Leu} i Nva-tRNA^{Leu} pri 37 °C (K_D za Nva-tRNA^{Leu}: 130 nmol dm^{-3}, K_D za Leu-tRNA^{Leu}: 180 nmol dm^{-3}), kao ni pri 4 °C (K_D za Nva-tRNA^{Leu}: 24 nmol dm^{-3}, K_D za Leu-tRNA^{Leu}: 70 nmol dm^{-3}), odnosno da su obje aa-tRNA jednako dobri supstrati u biosintezi proteina.

4.12 Toksičnost norvalina i izoleucina za soj *E. coli* sa zamijenjenim genom *leuS* koji kodira za LeuRS s ugašenim popravkom pogreške

U testiranju toksičnosti aminokiselina koje su nepripadne enzimu LeuRS, korišteni su sojevi *E. coli* kojima je u genomu gen za divlji tip LeuRS zamijenjen genom koji kodira za varijantu LeuRS s ugašenim popravkom pogreške nakon prijenosa aminokiseline – D345A LeuRS (postupak zamjene gena opisan je u poglavlju 3.2.1.3). Stanice *E. coli* s D345A LeuRS nisu pokazale nikakvu razliku u rastu u minimalnom mediju M9 u odnosu na soj s divljim LeuRS. Međutim, značajnu razliku u koeficijentu brzine rasta pokazao je soj stanica D345A LeuRS MG1655 u odnosu na WT LeuRS MG1655 prilikom uzgoja u minimalnom mediju M9 s dodanim norvalinom. Norvalin množinske koncentracije 1,5 mmol dm^{-3} ima učinak inhibicije rasta soja D345A LeuRS MG1655, a nema učinak na rast soja WT LeuRS MG1655 (Slika

4.22 A)). Testiran je i utjecaj izoleucina te nije uočena značajna toksičnost ili razlika u učinku na WT odnosno D345A LeuRS MG1655 soj (Slika 4.22B). S ciljem precizne kvantifikacije toksičnosti norvalina i izoleucina, određene su vrijednosti IC50 za sojeve WT LeuRS MG1655 i D345A LeuRS MG1655 (Slika 4.22B i D). Vrijednost IC50 odražava koncentraciju testiranog inhibitora, u ovom slučaju aminokiseline, koja je potrebna za postizanje 50 % od maksimalnog učinka inhibicije. Iz usporedbe učinka norvalina na WT ili D345A soj, vidljivo je kako je norvalin izuzetno toksičan upravo soju s ugašenim popravkom pogreške LeuRS – soju D345A LeuRS MG1655 (Slika 4.22A i B, IC50 = 0,1 mmol dm^{-3}). Ti rezultati su u skladu s podacima *in vitro*, prema kojima je norvalin dobar supstrat LeuRS u sintetskoj reakciji (faktor diskriminacije leucina i norvalina iznosi 116), a za sprječavanje akumulacije Nva-$tRNA^{Leu}$ u citoplazmi *E. coli*, nužan je popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline. Također, IC50 određen za izoleucin približno je jednak za WT i D345A LeuRS MG1655 sojeve i iznosi 51 mmol dm^{-3}. Rezultat je u skladu s podacima dobivenim *in vitro* prema kojima je izoleucin loš supstrat za sintetsku reakciju LeuRS – visok K_M u aktivaciji mjerenoj izmjenom pirofosfata (K_M(Ile) = 26 mmol dm^{-3}, K_M(Leu) = 0,05 mmol dm^{-3}) te visok kinetički K_D u ukupnoj reakciji aminoaciliranja (K_D(Ile) = 26 mmol dm^{-3}, K_D(Leu) = 0,041 mmol dm^{-3}). Budući da visoka koncentracija izoleucina ima jednak toksični efekt na rast WT i D345A LeuRS MG1655 soja, određen je i IC50 za leucin (Slika 4.22F). Leucin se pokazao jednako toksičnim za testirane sojeve - IC50 je oko 5 mmol dm^{-3} (Slika 4.22E i F). Takav rezultat upućuje da je toksičnost izoleucina vjerojatno posljedica nespecifičnog učinka vrlo visoke nefiziološke koncentracije aminokiseline. Leucin je ipak značajno toksičniji od izoleucina, vjerojatno jer ima ulogu sekundarnog glasnika putem proteina osjetljivih na leucin[140] (engl. *leucine response protein*).



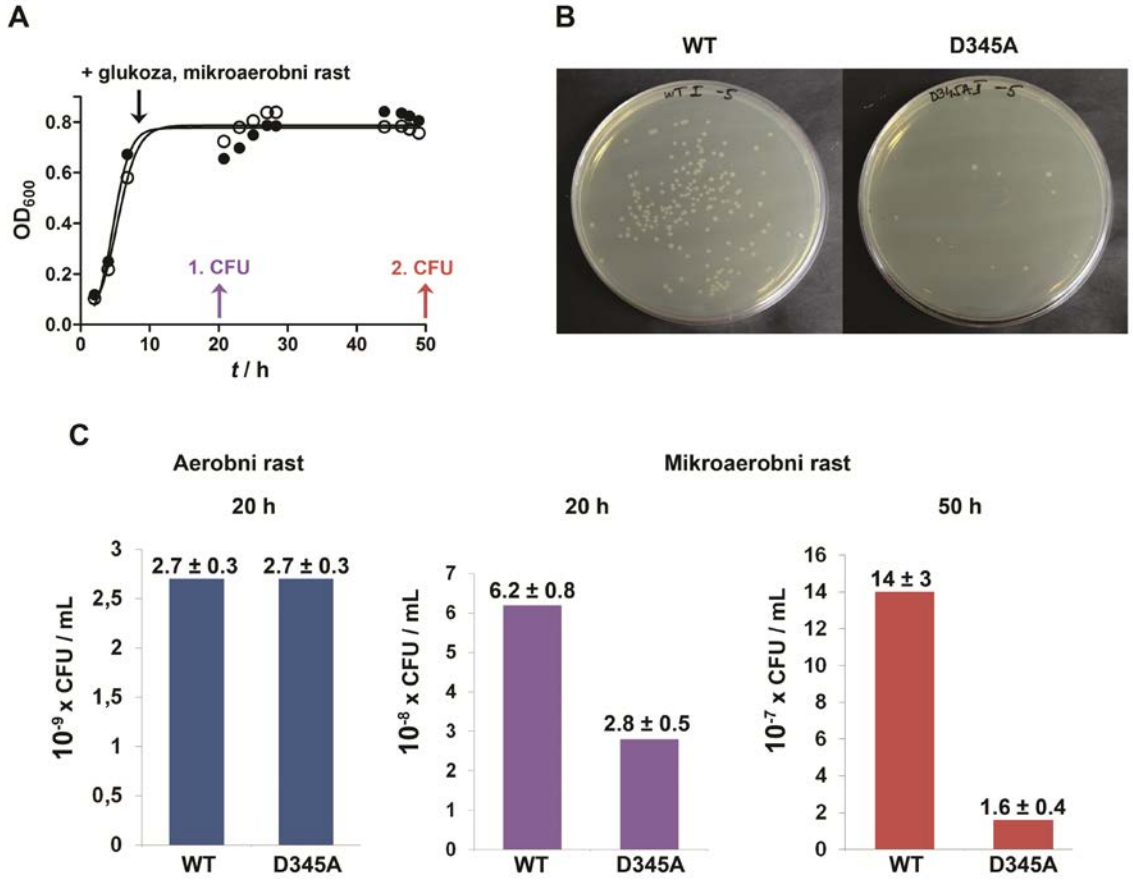
Slika 4.22 A), C), E) Krivulje rasta sojeva WT LeuRS (♦) ili D345A LeuRS MG1655 (●) u prisustvu (◊, ○) ili odsustvu (♦, ●): A) 1,5 mmol dm^{-3} norvalina (Nva), C) 100 mmol dm^{-3} izoleucina i E) 80 mmol dm^{-3} leucina. B), D), F) krivulje za određivanje vrijednosti IC50: B) norvalina s D345A MG1655 sojem (●), D) izoleucina s WT (○) ili D345A (●) MG1655 sojem i F) leucina s WT (○) ili D345A (●) MG1655 sojem. Preuzeto i prilagođeno iz Cvetesic i sur. 2014[134].

4.13 Vijabilnost soja *E. coli* s ugašenim popravkom pogreške LeuRS u mikroaerobnim uvjetima

Do sada prikazani rezultati *in vitro* i *in vivo* upućuju da je glavna prijetnja točnom dekodiranju leucinskih kodona upravo neproteinogena aminokiselina norvalin. Potreba za popravkom pogreške istražena je i *in vivo*, međutim u uvjetima s egzogenim dodatkom norvalina. Kako bismo pokazali staničnu potrebu za popravkom pogreške nakon prijenosa

aminokiseline kod LeuRS, odnosno pokazali je li popravak pogreške nužan za održavanje vijabilnosti *E. coli* u određenim uvjetima rasta, uspoređena je vijabilnost WT i D345A LeuRS MG1655 soja u aerobnim i mikroaerobnim uvjetima. Naime, poznato je da se norvalin nakuplja u uvjetima uzgoja sa smanjenom količinom kisika, tzv. mikroaerobnim uvjetima[18]. Ukoliko je popravak pogreške važan za preživljavanje *E. coli*, soj s ugašenim popravkom pogreške trebao bi u mikroaerobnim uvjetima imati smanjenu vijabilnost. Pokazano je da dodatak glukoze ima pozitivan utjecaj na nakupljanje unutarstaničnog norvalina[18] kod *E. coli*, pa je u mikroaerobnim uvjetima tijekom stacionarne faze uzgoja bakterija redovito dodavana glukoza. Mikroaerobni uvjeti postignuti su uzgojem bakterija u 50 mL medija M9 u polipropilenskoj epruveti volumena 50 mL kako bi se minimizirala količina zraka i dodirna površina medija sa zrakom. Bakterije su uzgajane pri 37 °C, a potresane su pri 150 okretaja u minuti do stacionarne faze. U mediju M9 u mikroaerobnim uvjetima, sojevi WT i D345A LeuRS MG1655 ulaze u stacionarnu fazu rasta pri OD_{600} oko 0,7, za razliku od uzgoja u aerobnim uvjetima gdje u stacionarnoj fazi postižu OD_{600} oko 2. Mikroaerobni uvjeti, a time i unutarstanično nakupljanje norvalina, dodatno su potaknuti nakon ulaska u stacionarnu fazu smanjenjem potresanja kulture na 100 okretaja u minuti, uz redoviti dodatak glukoze (1 mL 50 % (w/v) glukoze na 50 mL bakterijske kulture, otprilike svakih 2 sata tijekom prvih 12 h rasta, a zatim je 14 h kasnije nastavljen dodatak glukoze, Slika 4.23A). Napravljeni su testovi sposobnosti stvaranja bakterijskih kolonija nakon 20 i 50 sati rasta, kao što je opisano u poglavlju Materijala i metoda 3.2.1.6 (Slika 4.23B). Sposobnost stvaranja bakterijskih kolonija (engl. *colony forming units*, CFU) izražena je kao CFU po mL nasađene bakterijske kulture te izračunata kao prosjek dviju neovisnih bioloških replika s najmanje dvije replike razrjeđenja bakterijske kulture. Napravljen je i uzgoj sojeva WT i D345A MG1655 LeuRS u aerobnim uvjetima na 37 °C uz potresanje pri 200 okretaja u minuti, i s volumenom bakterijske kulture koji je činio najviše 20 % volumena bakteriološke tikve kako bi se maksimizirao prijenos kisika. Test CFU napravljen je nakon 20 h uzgoja. Gašenje popravka pogreške nije imalo nikakav utjecaj na vijabilnost soja s ugašenim popravkom pogreške prilikom uzgoja u aerobnim uvjetima, jer je rezultat testa CFU za WT i D345A MG1655 soj nakon 20 sati uzgoja u aerobnim uvjetima jednak, a iznosi $(2{,}7 \pm 0{,}3) \times 10^9$ CFU mL^{-1} (Slika 4.23C). Nedostatak popravka pogreške kod D345A LeuRS MG1655 imao je značajan efekt na vijabilnost bakterija u mikroaerobnim uvjetima rasta. Već nakon 20 sati uzgoja u mikroaerobnim uvjetima uočena je oko dva puta razlika u vijabilnosti – za WT LeuRS

MG1655 je dobiveno (6,2 ± 0,8) × 10^8 CFU mL^{-1}, a za D345A LeuRS soj (2,8 ± 0,5) × 10^8 CFU mL^{-1} (Slika 4.23B). Razlika u vijabilnosti se povećala na devet puta nakon još 30 sati uzgoja u mikroaerobnim uvjetima, i za WT MG1655 je iznosila (14 ± 3) × 10^7 CFU mL^{-1}, a za D345A MG1655 (1,6 ± 0,4) × 10^7 CFU mL^{-1} (Slika 4.23C).



Slika 4.23 A) Krivulja rasta WT LeuRS (●) ili D345A LeuRS MG1655 soja (○) Strelica crne boje označava početak dodatka glukoze u medij i poticanja mikroaerobnih uvjeta rasta. Ljubičasta i crvena strelica označavaju vremenske točke u krivulji rasta kada su napravljeni testovi vijabilnosti CFU. B) reprezentativne krute hranjive podloge na koje su nasađena razrjeđenja sojeva WT i D345A LeuRS MG1655 nakon 50 sati uzgoja u mikroaerobnim uvjetima. C) vijabilnost sojeva WT i D345A LeuRS MG1655 u aerobnim uvjetima uzgoja (graf sa plavim stupcima) i mikroaerobnim uvjetima uzgoja (20 sati rasta – graf s ljubičastim stupcima, 50 sati rasta – graf s crvenim stupcima). Preuzeto i prilagođeno iz Cvetesic i sur. 2014[134].

4.14 Analiza mistranslacije leucinskih kodona izoleucinom ili norvalinom kvantitativnom spektrometrijom masa na razini proteoma

Kvantitativna spektrometrija masa na razini proteoma *E. coli* napravljena je kako bismo ispitali valjanost rezultata dobivenih analizom *in vitro* te *in vivo*. Rezultati eksperimenata *in vitro* upućuju da je glavna prijetnja točnom dekodiranju leucinskih kodona neproteinogena

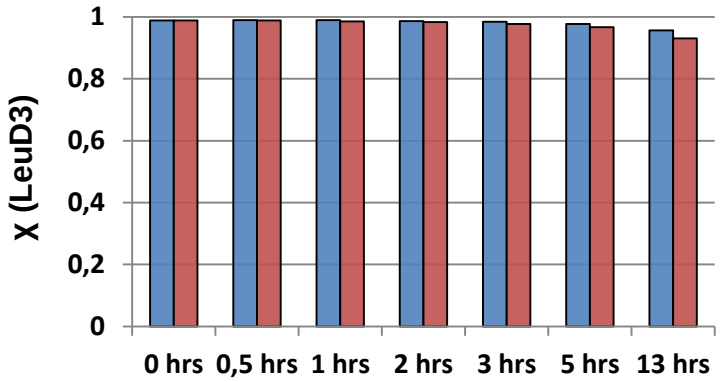
aminokiselina norvalin, te da je za LeuRS popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline nužan za isključivanje norvalina iz genetičkog koda. Podaci dobiveni *in vitro* također upućuju da je izoleucin vrlo loš supstrat u sintetskim reakcijama LeuRS, te da diskriminacija u sintetskoj reakciji omogućava očuvanje točnosti dekodiranja leucinskih kodona. Nadalje, i podaci dobiveni u testovima toksičnosti aminokiselina *in vivo* pokazuju da izoleucin nije opasan soju *E. coli* u kojem LeuRS ima ugašen popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline. Međutim, takav rezultat može se protumačiti na dva načina: izoleucin se ne ugrađuje umjesto leucina kada je ugašen popravak pogreške jer se učinkovito uklanja već u sintetskoj reakciji ili se supstitucija leucina izoleucinom događa, ukoliko je diskriminacija u sintetskoj reakciji *in vivo* lošija od diskriminacije izmjerene *in vitro*, ali supstitucija ne ugrožava vijabilnost bakterija.

Kako su izoleucin i leucin izobarne aminokiseline (jednake molekulske mase), ne mogu se jednostavno razlikovati spektrometrijom mase. Za potrebe kvantitativne spektrometrije mase s ciljem identifikacije i kvantifikacije supstitucija leucin → izoleucin u gotovo čitavom proteomu *E. coli*, korištena je metodologija stabilnog obilježavanja izotopima pomoću aminokiselina u staničnoj kulturi[141] (engl. *Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture*). Cilj je bio uvesti razliku u masi leucina i izoleucina, tako da čitav proteom *E. coli* sadrži isključivo „teški“ deuterirani leucin, L-leucin-5,5,5-d3 (LeuD3), umjesto normalnog „lakog“ leucina (Leu0). Na taj način uvodi se razlika u masi leucina odnosu na izoleucin u iznosu od 3 daltona. Kako bismo omogućili potpunu zamjenu leucina u proteomu *E coli* teškim leucinom LeuD3, korišteni su auksotrofni sojevi koji ne mogu sintetizirati leucin jer imaju nefunkcionalan gen *leuB* koji je ključan u biosintezi leucina (Slika 2.18 prikazuje shemu biosinteze razgranatih aminokiselina). U izvorni auksotrofni soj *E. coli* oznake JW5807-2 dobiven iz centra *Escherichia coli Genetic Stock Center*, homolognom rekombinacijom prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.1.3, zamijenjen je gen koji kodira za WT LeuRS, genom koji kodira za deacilacijski inaktivnu varijantu proteina D345A LeuRS. Sojevi su uzgajani u minimalnom mediju M9 uz dodatak aminokiseline LeuD3 u aerobnim uvjetima pri 37 °C do ulaska u stacionarnu fazu. Pri ulasku u stacionarnu fazu, sojevima WT i D345A LeuRS JW5807-2 dodan je izoleucin u medij do konačne koncentracije 100 mmol dm^{-3}. Prethodno dodatku, te u određenim vremenskim intervalima nakon dodatka izoleucina, uzeti su alikvoti bakterijskih kultura za izolaciju i analizu proteoma korištenjem spregnutog sustava nano-LC s Orbitrap Elite spektrometrom mase (*Thermo Fischer*). U svakoj

vremenskoj točki utvrđen je udio LeuD3 u uzorku proteoma prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.7.4. U teoriji, postoje četiri ishoda ovakvog eksperimenta:

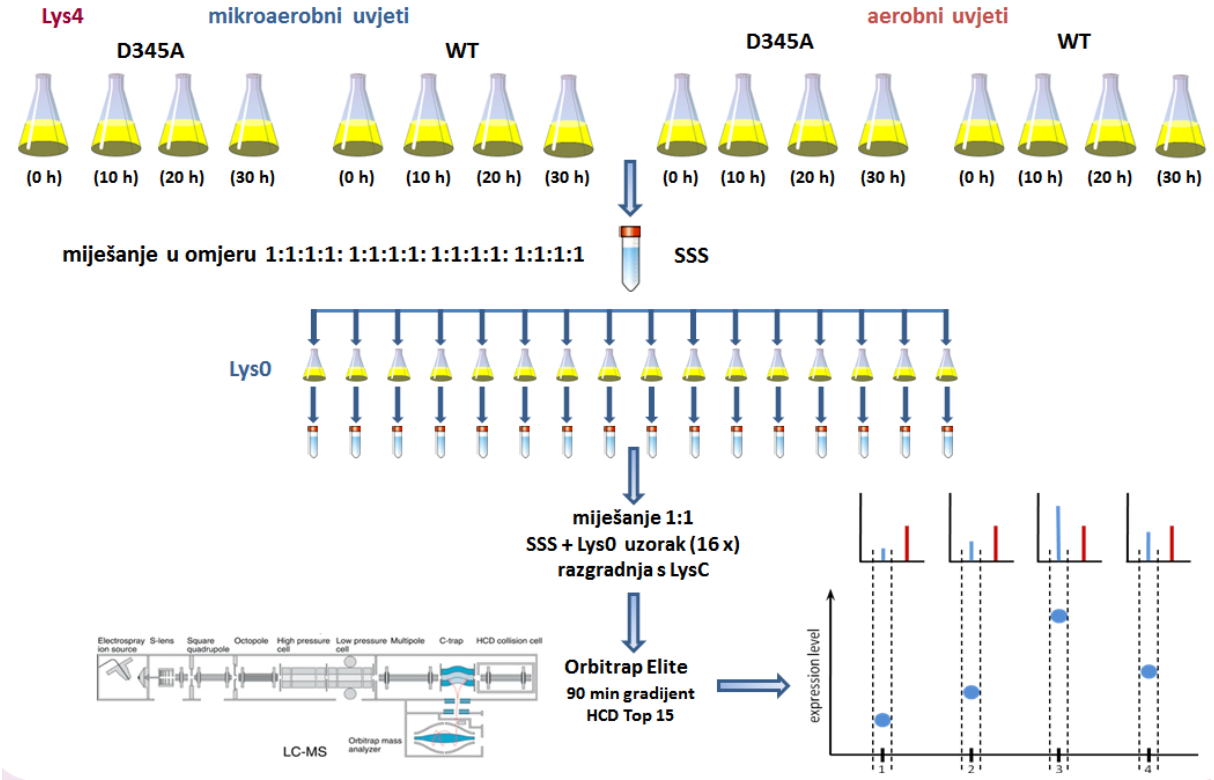
1) nema promjene udjela teške oznake LeuD3 u vremenu kod D345A ili WT LeuRS JW45807-2 soja, što upućuje se izoleucin ne ugrađuje umjesto leucina.
2) smanjenje udjela LeuD3 kod soja D345A LeuRS JW5807-2 koje nije vidljivo kod soja WT LeuRS JW5807-2. Takav rezultat pokazuje da soj D345A LeuRS JW5807-2 ugrađuje izoleucin umjesto leucina (LeuD3).
3) smanjenje udjela LeuD3 kod soja WT i D345A LeuRS JW5807-2 s naglašenijim smanjenjem udjela LeuD3 kod soja D345A LeuRS JW5807-2. Pad udjela LeuD3 kod soja WT LeuRS JW5807-2 je u tom slučaju vrlo vjerojatno posljedica ugradnje lakog leucina iz uzorka dodanog izoleucina (kontaminacija komercijalnog uzorka izoleucina tragovima leucina opisana je u poglavlju 4.3). Naglašeniji pad udjela LeuD3 prisutan kod soja D345A LeuRS JW5807-2 posljedica je ugradnje izoleucina, uz ugradnju lakog leucina kao onečišćenja uzorka izoleucina.
4) pad udjela LeuD3 prisutan u jednakoj mjeri kod sojeva WT i D345A LeuRS JW5807-2 Takav rezultat upućuje da je pad udjela LeuD3 posljedica ugradnje lakog leucina iz uzorka dodanog izoleucina te da nema značajne ugradnje izoleucina kod soja D345A LeuRS JW5807-2.

Dobiveni eksperimentalni rezultat slaže se upravo s četvrtom varijantom teorijskog rezultata – izmjereni pad udjela LeuD3 u proteomu iznosi oko 4-6 %, i približno je jednak za sojeve WT i D345A LeuRS JW5807-2 (Slika 4.24). Rezultat potvrđuje rezultate *in vitro*, te rezultate testiranja toksičnosti izoleucina *in vivo*. Izoleucin nije dobar supstrat LeuRS, isključuje se na temelju sintetske reakcije, te unatoč gašenju popravka pogreške LeuRS, ne ugrađuje se značajno umjesto leucina, čak ni pri vrlo visokoj nefiziološkoj koncentraciji izoleucina – 100 mmol dm^{-3}.



Slika 4.24 Udio LeuD3 u proteomu *E. coli* soja WT LeuRS JW5807-2 (plavi stupci) ili D345A LeuRS JW5807-2 (crveni stupci). Udio LeuD3 određen je prema udjelu pojavnosti peptida s teškim leucinom u odnosu na ukupnu pojavnost peptida.

Analizom proteoma kvantitativnom spektrometrijom mase testiran je i uzrok smanjene vijabilnosti D345A LeuRS MG1655 soja u mikroaerobnim uvjetima, odnosno ugrađuje li se doista norvalin umjesto leucina. Korišten je prototrofni soj MG1655 jer može sintetizirati norvalin u mikroaerobnim uvjetima rasta, što omogućava rad u prirodnim uvjetima, bez egzogenog dodatka norvalina. Uspoređeni su proteomi sojeva uzgojenih u aerobnim i mikroaerobnim uvjetima s dodatkom ili bez dodatka visoke koncentracije glukoze, i to u stadijima rasta prilikom ulaska u stacionarnu fazu (naznačeno kao 0 sati), te tijekom 10, 20 i 30 sati u stacionarnoj fazi. Kako bi se mogli međusobno uspoređivati svi uvjeti kroz različite vremenske točke, najprije je napravljen tzv. SuperSILAC eksperiment, koji omogućava relativnu i istovremenu usporedbu većeg broja uzoraka preko jedinstvenog standarda SuperSILAC[142] (Slika 4.25 prikazuje shemu eksperimentalnog pristupa SuperSILAC).

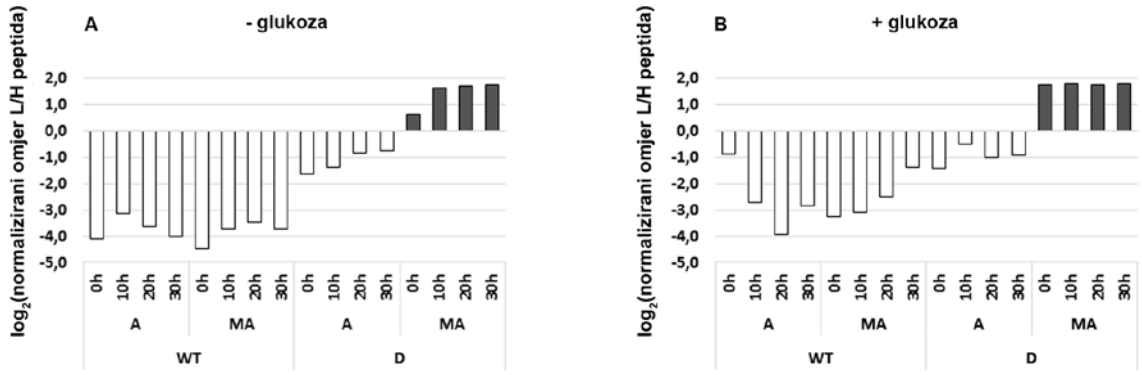


Slika 4.25 Shema postava eksperimenta SuperSILAC. Lys4- "teški" lizin, Lys0 –"laki" lizin, SSS – SuperSILAC standard, D345A – soj *E. coli* D345A LeuRS MG1655, WT – soj *E. coli* WT LeuRS MG1655.

Najprije su bakterijske kulture uzgojene u minimalnom mediju s „teškim" lizinom, Lys4 s ciljem potpunog obilježavanja proteoma sojeva i izrade proteomskog „teškog" standarda. Uzimani su uzorci volumena 10 mL sojeva WT i D345A LeuRS MG1655 uzgojenih u aerobnim i mikroaerobnim uvjetima, u vremenskim točkama ulaska u stacionarnu fazu (0 sati), a zatim i 10, 20 i 30 sati u stacionarnoj fazi. Napravljen je i uzgoj u istim uvjetima, ali s konstantnim dodatkom glukoze. Uzgoji u prisustvu ili odsustvu glukoze obrađeni su kao zasebni eksperimenti i pripremljena su dva zasebna standarda SuperSILAC. Za potrebe standarda, nužno je minimalno obilježavanje proteoma „teškim" lizinom" iznosa 95 % za svaki uvjet uzgoja (ugradnja teške aminokiseline testirana je prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.7.4). Svaki od standarda SuperSILAC pomiješan je u masenom omjeru 1:1 s izoliranim proteomom „lake" replike uzorka, a pomiješani uzorci su nadalje analizirani korištenjem spregnutog sustava nano-LC s Orbitrap Elite spektrometrom mase (*Thermo Fischer*).

Prikaz relativne količine peptida koji sadrže norvalin, u odnosu na količinu norvalinskih peptida u standardu SuperSILAC, jasno pokazuje da razina mistranslacije norvalinom ovisi o

soju (WT ili D345A LeuRS MG1655), ali i vremenu provedenom u stacionarnoj fazi u mikroaerobnim uvjetima (Slika 4.26). Standard SuperSILAC sadrži tešku varijantu proteoma izoliranih iz svih uvjeta, odnosno sadrži i peptide s norvalinom jer polovica proteinskog standarda potječe od soja D345A, pa je omjer količine peptida s norvalinom u soju WT u odnosu na standard manji od jedan (logaritam omjera je negativan). Uočljivo je da je razina mistranslacije, odnosno relativna količina peptida s norvalinom u soju D345A najviša u mikroaerobnim uvjetima, te da se maksimum mistranslacije postiže u vremenskoj točki deset sati u stacionarnoj fazi. Također, uočljivo je da mistranslacija kod soja D345A malo raste i u aerobnim uvjetima, što je objašnjivo obzirom na značajnu potrošnju kisika u stacionarnoj fazi zbog visoke gustoće bakterijskih stanica. Uzgojem u prisustvu glukoze, maksimum mistranslacije, odnosno maksimum relativne količine peptida s norvalinom, postignut je već pri ulasku u stacionarnu fazu.



Slika 4.26 Profili pojavnosti peptida s norvalinom kod soja WT LeuRS MG1655 (WT) i D345A LeuRS MG1655 (D) u aerobnim (A) i mikroaerobnim (MA) uvjetima uzgoja pri ulasku (0h) u stacionarnu fazu i nakon 10, 20 i 30 h u stacionarnoj fazi. A) uzgoj bez dodatka glukoze, B) uzgoj uz kontinuirani dodatak glukoze.

Eksperimenti SuperSILAC omogućili su usporedbu velikog broja uvjeta uzgoja i određivanje okvirnih uvjeta u kojima se očekuje najviši nivo mistranslacije. Međutim, u tim eksperimentima je analiziran manji dio proteoma *E. coli* zbog relativno kratkog kromatografskog razdvajanja peptida, odnosno niske razlučivosti peptida, te nije moguće jednostavno odrediti točan udio mistranslacije. Kako bismo utvrdili razinu mistranslacije u soju D345A LeuRS MG1655, s boljom pokrivenošću proteoma, zasebno su napravljeni eksperimenti SILAC. U SILAC tipu eksperimenta direktno su miješane „teške“ i „lake“ varijante proteoma vremenskih točaka 10 ili 30 sati s 0 sati u stacionarnoj fazi. U jednoj

replici eksperimenta je proteom iz 10 ili 30 sati bio obilježen teškim lizinom (Lys4), a 0 sati je bila „laka“ varijanta proteoma (Lys0) dok je u biološkim replikama eksperimenta obrnuta oznaka. Kako bismo identificirali i kvantificirali glavninu proteoma *E. coli*, uzorci svakog eksperimenta SILAC pretfrakcionirani su izoelektričnim fokusiranjem (postupak je opisan u poglavlju Materijala i metoda 3.2.7.6). Peptidi su razdvojeni u dvanaest frakcija prema vrijednosti pI, i svaka frakcija analizirana je korištenjem spregnutog sustava nano-LC s Orbitrap Elite spektrometrom mase (*Thermo Fischer*).

Norvalin je definiran kao varijabilna modifikacija leucina s gubitkom mase od 14 Da, a da bismo odredili udio norvalina na leucinskim pozicijama na razini čitavog detektiranog proteoma, napravljena je analiza brojanjem spektara. Metoda se temelji na brojanju MS/MS spektara peptida koji sadrže norvalin i peptida koji sadrže leucin (Tablica 4.9). Razina mistranslacije izračunata je dijeljenjem broja detektiranih norvalina (u svim peptidima koji sadrže norvalin) i broja detektiranih leucina (u svim peptidima koji sadrže leucin). Tako utvrđena razina mistranslacije predstavlja minimalnu vrijednost mistranslacije u testiranim uvjetima. Prema dobivenim rezultatima, u mikroaerobnim uvjetima rasta soj s ugašenim popravkom pogreške (D345A LeuRS MG1655) ugrađuje norvalin umjesto leucina s oko 5 % učestalosti.

Tablica 4.9 Razina mistranslacije izračunata metodom brojanja spektara. WT označava WT D345A LeuRS MG1655 soj, D označava D345A LeuRS MG1655 soj, A se odnosi na aerobne uvjete, MA na mikroaerobne uvjete, MA+G na mikroaerobne uvjete uz dodatak glukoze, a r. je biološka replika.

uzorak		**ukupni br. spektara**	**Nva spektri**	**Leu spektri**	**broj Nva**	**broj Leu**	**% (br.Nva/br.Leu)**
A, WT	10h	32646	123	25531	128	47268	**0.27**
	10h r.	36349	144	28432	155	52535	**0.30**
MA, WT	10h	47518	122	37854	152	72198	**0.21**
	10h r.	38358	186	30184	234	55447	**0.42**
MA, WT	30h	43380	182	34323	227	65348	**0.35**
	30h r.	36426	230	28703	271	53637	**0.51**
A, D	10h	42000	1152	33177	1165	61963	**1.88**
	10h r.	36713	816	28862	842	53953	**1.56**
MA, D	10h	52364	4030	42386	4205	81780	**5.14**
	10h r.	43458	3458	35057	3628	68238	**5.32**
MA, D	30h	51750	4321	41383	4553	79299	**5.74**
	30h r.	42977	3949	34366	4177	65254	**6.40**
MA+G, D	10h	31348	2352	25294	2415	48228	**5.01**

Rezultati pokazuju i da dodatak glukoze nije imao značajan učinak na razinu mistranslacije, iako je eksperimentalno dokazano da ima utjecaj na razinu akumulacije norvalina u mikroaerobnim uvjetima[18].

5 Rasprava

Aminoacil-tRNA-sintetaze su ključni enzimi za život svake stanice te zbog čestih razlika prokariotskih i eukariotskih varijanti, izrazito zanimljive mete za razvoj antibiotika[143-145]. Leucil-tRNA-sintetaza iz *E. coli* već je dugi niz godina predmet brojnih istraživanja. Čak dvije svjetski poznate grupe, predvođene s dr. sc. En Duo Wang, odnosno s dr. sc. Susan Martinis, intenzivno se bave kinetikom, mehanizmom i ulogom sintetskih i hidrolitičkih reakcija. Iako je puno rezultata i primarnih znanstvenih publikacija proizvedeno, glavne značajke LeuRS ostale su nejasne. Zbog oprečnih rezultata dviju spomenutih istraživačkih grupa, do sada nije bilo razjašnjeno koja je uloga tRNA-ovisnog popravka pogreške prije prijenosa u točnosti dekodiranja leucinskih kodona, te posjeduje li LeuRS taj tip popravka. Kroz dosadašnja istraživanja, istaknut je čitav niz proteinogenih – izoleucin, valin, metionin, i neproteinogenih – norvalin, norleucin, homocistein, homoserin i α-aminobutirat, aminokiselina kao opasnih nepripadnih supstrata LeuRS[115]. Izoleucin je kao potencijalni supstrat LeuRS vrlo neobičan jer su u literaturi prisutni publicirani faktori diskriminacije leucina i izoleucina koji variraju u rasponu od 630-5400 puta . Budući da su kinetički testovi poput aktivacije aminokiselina vrlo točni, te izvor razlike od čak jednog reda veličine ne može biti posljedica tehničke izvedbe, ostaje pitanje je li izoleucin uopće dobar supstrat LeuRS te koja je uloga popravka pogreške LeuRS.

5.1 Glavnu prijetnju točnosti dekodiranja leucinskih kodona ne predstavlja izoleucin, već norvalin

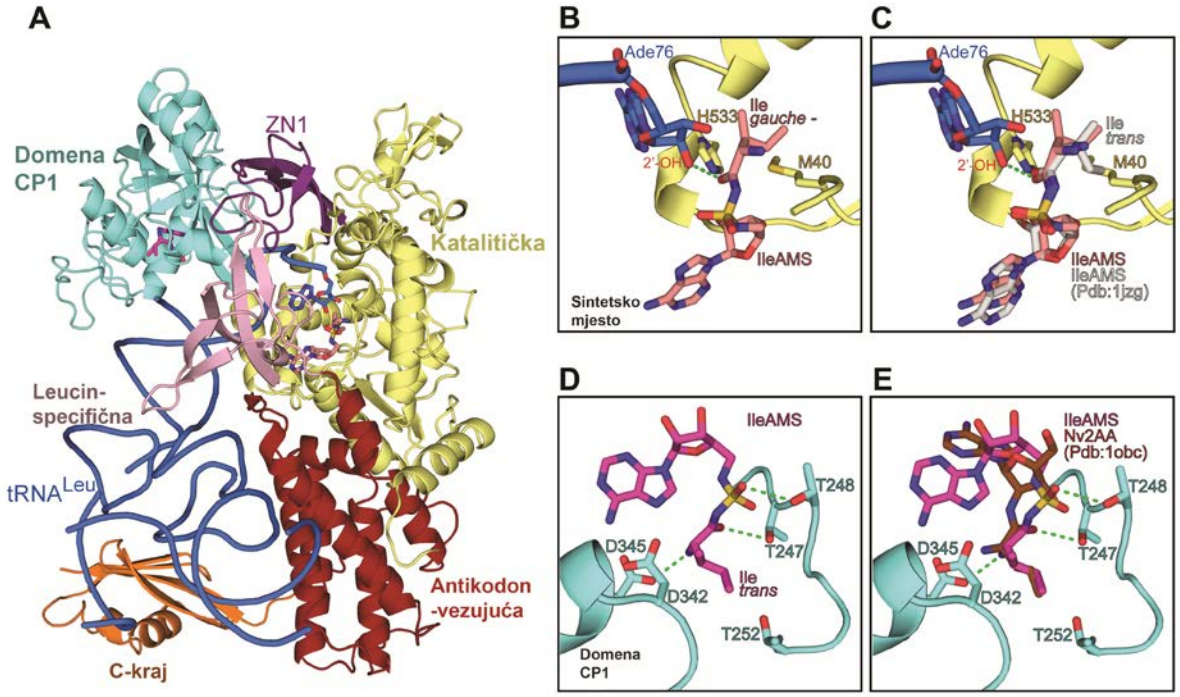
Obzirom na prethodno spomenute probleme s faktorom diskriminacije izoleucina, detaljno je okarakterizirana aktivacija niza nepripadnih supstrata LeuRS. Karakterizacija izoleucina aminokiselinskom analizom pomoću HPLC-a (napravljena u suradnji s dr. sc. Mariom Cindrićem, Institut Ruđer Bošković), NMR spektroskopijom (napravljena u suradnji s dr. sc. Ivanom Halaszem, Institut Ruđer Bošković) i kinetičkim testom razvijenim u sklopu ove disertacije, pokazala je da su komercijalni pripravci izoleucina kontaminirani leucinom. Udio leucina u izoleucinu razlikuje se u ovisnosti o proizvođaču te čak varira od šarže do šarže istog proizvođača u rasponu od 0,0019-0,38 %. Iako naizgled razina kontaminacije ne djeluje

značajna, učinak na kinetičke parametre u aktivaciji je značajan, te je izmjeren faktor diskriminacije 100 – s uzorkom izoleucina koji sadrži 0,38 % leucina, odnosno 8000 – s uzorkom izoleucina koji sadrži 0,0019 % leucina (detaljno prikazano u poglavlju Rezultata 4.3 i 4.4). Obzirom na varijacije u razini čistoće izoleucina, opažen utjecaj na faktor diskriminacije, te literaturne vrijednosti faktora diskriminacije izoleucina koji se razlikuju čak do deset puta, opravdana je sumnja u vjerodostojnost dosadašnjih rezultata. U sklopu ove disertacije, izoleucin je dodatno pročišćen od leucina prema postupku kojeg su patentirali Hirsbrunner i Bertholet[132], a postignuta je minimalna razina kontaminacije leucinom u iznosu od 0,00035 %. Određeni su kinetički parametri za izoleucin u aktivaciji i izračunat je faktor diskriminacije leucina i izoleucina. Iznenađujuće, pokazano je da LeuRS u aktivaciji vrlo učinkovito razlikuje leucin i izoleucin te da je faktor diskriminacije čak 31000. Ispitivanje učinkovitosti aktivacije ostalih nepripadnih supstrata (Tablica 4.2) pokazalo je da je najopasniji supstrat norvalin, jer je faktor diskriminacije svega 116. Rezultati dobiveni s norvalinom podudaraju se s do sada publiciranim vrijednostima i ističu da je za sprječavanje ugradnje norvalina umjesto leucina nužan popravak pogreške[21]. Uočljivo je da se razlikovanje supstrata uglavnom očituje u razlikama u vrijednosti K_M, odnosno diskriminacija supstrata temelji se na razlikama vezanja u osnovnom stanju (Tablica 4.2). Kod izoleucina je faktor diskriminacije dodatno povećan učinkom i na obrtni broj – k_{cat} u aktivaciji izoleucina je smanjen 60 puta zbog čega je krajnji faktor diskriminacije čak oko 30000. Neočekivano je da je k_{cat} u aktivaciji α-aminobutirata, supstrata najmanjeg bočnog ogranka, gotovo jednak kao za leucin, odnosno da je glavnina faktora diskriminacije ostvarena kroz utjecaj na K_M. Na temelju rezultata aktivacije, i izračunatih faktora diskriminacije, nepripadne supstrate LeuRS možemo grupirati u dvije skupine: za aminokiseline s faktorom diskriminacije manjim od otprilike 3300, LeuRS mora imati mehanizme popravka pogreške, dok za aminokiseline s faktorom diskriminacije većim od 3300, popravak pogreške nije nužan jer je diskriminacija u sintetskoj reakciji dovoljna za održavanje eksperimentalno izmjerene razine točnosti translacije (1 pogreška u 3300 sinteza peptidne veze[105]). Prema rezultatima aktivacije aminokiselina *in vitro*, popravak pogreške svakako nije nužan za isključivanje izoleucina iz genetičkog koda, niti metionina, valina ili α-aminobutirata, a apsolutno je nužan za isključivanje norvalina. Glavna razlika između dosadašnjih istraživanja i istraživanja u sklopu ove doktorske disertacije je testiranje čistoće nepripadnih supstrata te uvođenje dodatnog koraka pročišćavanja izoleucina zbog čega su dobiveni stvarni kinetički parametri za

izoleucin. Kontaminacije s pripadnom aminokiselinom predstavljaju problem u reakciji aktivacije jer se nepripadne aminokiseline za što preciznije određivanje vrijednosti K_M koriste u koncentracijskom rasponu od 0,1 do 10 vrijednosti K_M. Budući da je afinitet aaRS prema nepripadnoj aminokiselini uglavnom znatno lošiji od afiniteta prema pripadnoj aminokiselini, često se u enzimskim testovima koriste vrlo visoke koncentracije nepripadne aminokiseline. Upravo zato vrlo male kontaminacije nepripadnih aminokiselina s pripadnim aminokiselinama predstavljaju problem i mogu imati značajan učinak na kinetička mjerenja. Učinak kontaminacije izoleucina leucinom je precjenjivanje izoleucina kao efikasnog supstrata jer faktor diskriminacije raste sa smanjenjem udjela leucina u uzorku izoleucina (Tablica 4.1).

Poznato je da se pojedine aaRS ponašaju kao ribonukleoproteini koji u kompleksu s tRNA pokazuju drugačija kinetička svojstva, odnosno tRNA često može modulirati kinetičke parametre u aktivaciji aminokiselina[13, 45, 135-137]. Kako je u reakciji aktivacije izmjeren neočekivano visok faktor diskriminacije izoleucina, ispitana je diskriminacija izoleucina u binarnom kompleksu LeuRS:$tRNA^{Leu}$, tj. je li u prisustvu $tRNA^{Leu}$ izoleucin ipak bolji supstrat LeuRS. U uvjetima jednog obrtaja enzima određeni su kinetički K_D za izoleucin i leucin te pripadni k_{chem} – koeficijent brzine reakcije aminoaciliranja koji odražava koeficijente brzine aktivacije i prijenosa aminokiseline na tRNA. Omjer konstanti specifičnosti za leucin i izoleucin $(k_{chem}/K_D)_{Leu}/(k_{chem}/K_D)_{Ile}$ odražava faktor diskriminacije u aminoaciliranju. Budući da se pojedinačne vrijednosti K_D i k_{chem} podudaraju s kinetičkim parametrima u aktivaciji (K_M i k_{cat}), odnosno faktor diskriminacije u aminoaciliranju vrlo je sličan faktoru diskriminacije u aktivaciji (11000 u odnosu na 31400, Tablica 4.2, Slika 4.9), to pokazuje da $tRNA^{Leu}$ ne modulira afinitet prema aminokiselinama, niti sudjeluje u njihovom pozicioniranju za aktivaciju. Kako bismo utvrdili razlog učinkovite diskriminacije izoleucina, u suradnji s grupom dr. sc. Stephena Cusacka (Grenoble, Francuska), utvrđena je kristalna struktura LeuRS u kompleksu s nehidrozabilnim analogom izoleucil-adenilata (Ile-AMS). Strukturna analiza je pokazala da se konformacija izoleucina razlikuje u odnosu na konformaciju izoleucina kod Ile-AMS u aktivnom mjestu pripadne IleRS (Slika 5.1). Naime, L-izoleucin u otopini postoji u četiri konformacije: *trans* – diedarski kut *X*2 kojeg tvore ugljikovi atomi α, β, γ i δ1 iznosi 170°, *gauche* – – *X*2 je oko 300°, *gauche* + – *X*2 je 66°, *gauche 100* – *X*2 je 100°. Konformacija *trans* je energetski najpovoljnija pa je u otopini ujedno i najzastupljenija – čak oko 81 %, *gauche* – čini oko 15 %, dok je konformacijama gauche + i gauche 100

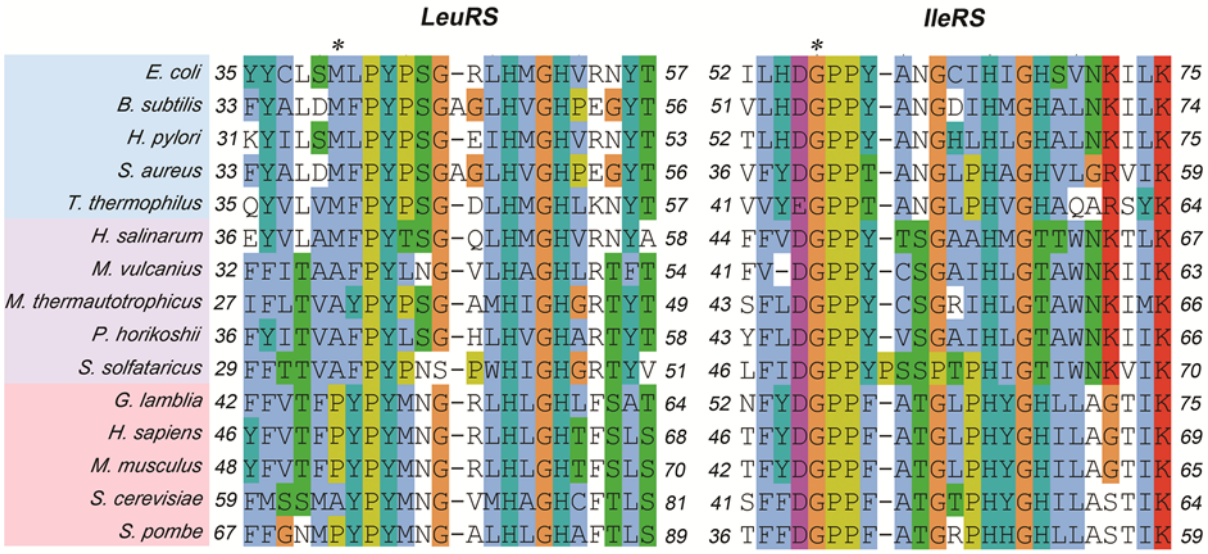
zastupljeno manje of 4 % izoleucina[146, 147]. U aktivnom mjestu LeuRS, izoleucin je u konformaciji koja nalikuje manje zastupljenoj konformaciji *gauche* – (*X*2 je 243°), dok je u aktivnom mjestu IleRS, izoleucin u konformaciji koja je najzastupljenija u otopini – konformaciji *trans*. Superpozicija Ile-AMS u aktivnom mjestu IleRS i Ile-AMS u aktivnom mjestu LeuRS, otkrila je da izoleucin zbog steričkih smetnji ne stane u aktivno mjesto u konformaciji *trans* jer je uočeno značajno preklapanje s bočnim ogrankom metionina na poziciji 40 (Slika 5.1C).



Slika 5.1 Struktura *E. coli* LeuRS:tRNA^{Leu} u kompleksu s analogom Ile-AMP (PDB ID: 4cqn) . A) ternarni kompleks LeuRS:tRNA^{Leu}:Ile-AMS. Proteinske domene prikazane su različitim bojama: žuto–katalitička domena, ljubičasto–domena ZN1, cijan–domena CP1, rozo–domena specifična za leucin, crveno-domena specifična za vezanje antikodona, narančasto–C terminalna domena. tRNA^{Leu} je prikazana plavim vrpčastim prikazom, a krajnji adenozin je prikazan štapičastim modelom. Ile-AMS vezan u sintetskom mjestu ili hidrolitičkom mjestu u domeni CP1 prikazan je štapičastim modelom roze ili ljubičaste boje. B) prikazani su A76 tRNA^{Leu} i Ile-AMS u sintetskom mjestu LeuRS. Izoleucin je u Ile-AMS u komformaciji *gauche*. Istaknuti su bočni ogranci koji sudjeluju u diskriminaciji izoleucina. C) prikaz kao i na slici B), ali s Ile-AMS iz IleRS:Ile-AMS strukture (PDB ID:1jzq) modeliranim u sintetsko mjesto LeuRS. Izoleucin je u konformaciji *trans* i ne stane u sintetsko mjesto. D) izoleucin je u Ile-AMS koji je vezan u hidrolitičko mjesto u domeni CP1 u konformaciji *trans*. Istaknuti su bočni ogranci važni za pozicioniranje misacilirane tRNA i isključivanje Leu-tRNA^{Leu} (T252). E) prikaz kao i na slici D), ali s analogom Nva-tRNA^{Leu} vezanim u hidrolitičko mjesto (Nva2AA). Norvalin i izoleucin su u jednakom položaju. Preuzeto i prilagođeno iz Cvetesic i sur. 2014[134].

Kako bismo ispitali ulogu metionina 40 u diskriminaciji izoleucina, pripremljene su varijante LeuRS s metioninom zamijenjenim u alanin – M40A LeuRS, odnosno u glicin – M40G LeuRS i određeni su kinetički parametri u aktivaciji leucina, izoleucina i norvalina. Uvođenje alanina nije imalo učinak na aktivaciju izoleucina, dok je promjena metionina 40 u glicin smanjila je K_M za izoleucin otprilike 2,5 puta, a nije imala utjecaj na obrtni broj. Takav rezultat je potvrdio da je vezanje izoleucina u konformaciji *trans* onemogućeno β-C atomom metionina, koji je očuvan i u alaninu. Zanimljivo je da M40G LeuRS prepoznaje izoleucin svega 175 puta lošije od pripadnog leucina. Čak 180 puta niži faktor diskriminacije u odnosu na divlji tip LeuRS (175 u odnosu na 31429) posljedica je značajne promjene kinetičkih parametara za pripadni leucin. K_M za leucin je povećan čak 10 puta, dok je obrtni broj (k_{cat}) smanjen 10 puta u odnosu na divlji tip LeuRS. Iz kokristalne strukture LeuRS iz *E. coli* u kompleksu s Leu-AMS[57], vidljivo je da β-C atom metionina ostvaruje Van der Waalsove interakcije s β-C atomom leucina. Obzirom na učinak koji supstitucija Met→Gly ima na korak aktivacije pripadnog leucina i nepripadnog izoleucina, metionin 40 ima dvojnu ulogu u sintetskom mjestu LeuRS. Met 40 pridonosi vezanju i produktivnom pozicioniranju leucina, a istovremeno sterički isključuje vezanje izoleucina u energetski najpovoljnijoj konformaciji *trans*. Metionin pritom nema utjecaj na produktivno pozicioniranje izoleucina, jer je obrtni broj aktivacije izoleucina s LeuRS M40G jednak kao za divlji tip enzima. Isključivanje najzastupljenijeg konformacijskog stanja nepripadne aminokiseline moglo bi se prozvati novim mehanizmom diskriminacije kod aaRS koji nadopunjuje Fershtov model dvostrukog sita[148], prema kojem sintetsko mjesto sterički isključuje veće nepripadne aminokiseline. Kako LeuRS može vezati izoleucin jedino u konformaciji *gauche* –, koja je u otopini zastupljena s 15 % molekula L-Ile, efektivna koncentracija izoleucina koja predstavlja prijetnju LeuRS niža je 6,7 puta od ukupne koncentracije. Međutim, da bi takav mehanizam vezanja konformera u višem energetskom stanju doista pridonosio selektivnosti, koeficijent brzine prijelaza izoleucina iz konformacije nižeg energetskog stanja - *trans*, u konformaciju višeg energetskog stanja - *gauche* –, trebao bi biti sporiji od koeficijenta brzine vezanja izoleucina konformacije *gauche* – u aktivno mjesto LeuRS. Ukoliko su prijelazi između konformacijskih stanja brži od vezanja, brzo se uspostavlja i nova ravnoteža pa je enzimu u konformaciji *gauche*– uvijek dostupno 15 % od ukupne koncentracije preostalog izoleucina i vezanje energetski nepovoljnijeg konformera nema učinak na selektivnost. Met40 zasigurno nije jedini bočni ogranak koji pridonosi geometrijskom isključivanju izoleucina u konformaciji *trans*. Iz

utvrđene kristalne strukture LeuRS u kompleksu s Ile-AMS (Slika 5.1) vidljivo je da i His533 vjerojatno ima ulogu u steričkom isključivanju, a za očekivati je i da je čitavo sintetsko mjesto optimirano za vezanje leucina i što efikasnije isključivanje najbrojnijeg konformera Ile. Zanimljivo je da Met40 očuvan jedino kod bakterijskih, ali ne i arhejskih ili eukariotskih LeuRS (Slika 5.2). Arhejske varijante LeuRS uglavnom imaju alanin umjesto metionina, dok eukariotske imaju prolin. Zanimljivo pitanje je isključuju li također učinkovito arhejske i eukariotske LeuRS izoleucin na temelju sintetske reakcije, ili im je zbog drugačije građe sintetskog mjesta izoleucin ipak bolji supstrat.



Slika 5.2 Sravnjenje aminokiselinskih sljedova reprezentativnih LeuRS i IleRS iz bakterija, arheja i eukariota. Sravnjeni su sljedovi LeuRS (lijeva strana) i IleRS (desna strana) iz pet bakterijskih vrsta: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus* i *Thermus thermophilus*; pet vrsta arheja: *Halobacterium salinarum*, *Methanocaldococcus vulcanius*, *Methanothermobacter thermautotrophicus*, *Pyrococcus horikoshii* i *Sulfolobus solfataricus*; i pet citosolnih eukariotskih enzima: *Giardia lamblia*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe*. Metionin na položaju 40 (numeriranje prema *E. coli* enzimu) strogo je očuvan u bakterijskim LeuRS, dok arhejski LeuRS uglavnom imaju alanin, a citosolni eukariotski prolin. IleRS na homolognom položaju ima strogo očuvani glicin. Preuzeto i prilagođeno iz Cvetesic i sur. 2014[134].

Prema svojstvu diskriminacije izoleucina, *E. coli* LeuRS nalikuje aaRS koje nemaju razvijen popravak pogreške te ostvaruju specifičnost kroz učinkovitu eliminaciju nepripadnih aminokiselina već u koraku aktivacije. Sintetsko mjesto kod aaRS bez popravka pogreške često je optimirano za ostvarivanje minimalnog broja kontakata s nepripadnim aminokiselinama, pa ostvarena vezna energija nije dovoljna za stabilizaciju osnovnog ili

prijelaznog stanja pri sintezi aminoacil-adenilata[2]. Drugi pristupi eliminacije nepripadnih supstrata su kroz steričko isključivanje[149] ili neproduktivno vezanje[150] što se očituje u povišenom K_M, smanjenom k_{cat}, ili kombinaciji oba efekta te omogućava konačni faktor diskriminacije u rasponu od 10^5-10^7 [50, 151].

5.2 LeuRS hidrolizira nepripadne aminoacil-adenilate putem tRNA-neovisnog popravka pogreške

tRNA-neovisni popravak pogreške obuhvaća enzimsku hidrolizu nepripadnih aminoacil-adenilata u odsustvu tRNA ili njihovo selektivno otpuštanje u otopinu gdje se neenzimski hidroliziraju. Iako su istraživanja na srodnoj IleRS iz *E. coli* pokazala da postoji mjerljiva tRNA-neovisna hidroliza Val-AMP[48], u području se dugo raspravljalo postoji li uopće takva aktivnost ili je artefakt nestabilnosti aminoacil-adenilata koju treba tretirati kao bazalnu i oduzimati pri mjerenju popravka pogreške[152, 153].

U tRNA-neovisnom popravku pogreške testiran je niz nepripadnih supstrata LeuRS. Učinkovitost popravka korelira s učinkovitošću aktivacije – aminokiseline koje su loši supstrati u aktivaciji, ujedno su loši supstrati u tRNA-neovisnom popravku (Tablica 4.2, Tablica 4.4, Tablica 4.6, Slika 4.11). Kroz ranija istraživanja aaRS koje ne posjeduju zasebnu domenu za popravak pogreške, sugerirano je da se hidroliza nepripadnih aminoacil-adenilata odvija u sintetskom mjestu. Primjer su pojedine sintetaze razreda II, poput SerRS iz *E. coli, S. cerevisiae* i arheje *Methanosarcina barkeri*[12], ljudska ProRS i ProRS iz arheje *Methanococcus jannaschii*[14, 154], LysRS razreda II[155] i MetRS[156, 157]. Iako je u literaturi već bilo pokazano da LeuRS iz *E.* coli može specifično hidrolizirati nepripadni norvalil-AMP[21], u sklopu ovog rada cilj je bio odrediti kinetičke parametre te utvrditi je li ta aktivnost smještena u sintetsko aktivno mjesto. Osim s divljim tipom enzima, ispitana je tRNA-neovisna aktivnost popravka pogreške s varijantom enzima D345A LeuRS kojoj je ugašen popravak pogreške u domeni CP1. Pokazano je da inaktivacija domene CP1 nema nikakav učinak na tRNA-neovisan popravak pogreške i time potvrđeno da se odvija u sintetskom mjestu, kao i kod srodnih IleRS i ValRS[11].

U tRNA-neovisni popravak pogreške ubrajaju se enzimska hidroliza, ali i selektivno otpuštanje aminoacil-adenilata koje prati neenzimska hidroliza u otopini. Zasebnim mjerenjem neenzimske hidrolize aminocil-adenilata u otopini, može se odrediti važnost tog

mehanizma u tRNA-neovisnom popravku[11, 130]. Izmjereno je da je neenzimska hidroliza Nva-AMP oko 140 puta sporija od enzimske (14×10^{-4} s^{-1} u odnosu na 0,2 s^{-1}), što upućuje da je enzimska hidroliza u sintetskom akivnom mjestu glavni mehanizam tRNA-neovisnog popravka pogreške LeuRS. Međutim, za bolju procjenu važnosti selektivnog otpuštanja nepripadnog aminoacil-adenilata kao mehanizma popravka pogreške, potrebno je usporediti akumulaciju nepripadnog aminoacil-adenilata s akumulacijom AMP koji nastaje hidrolizom, ali i s akumulacijom pripadnog Leu-AMP u otopini. Nva-AMP nakuplja se u otopini samo četiri puta sporije od AMP (0,052 s^{-1} u odnosu na 0,2 s^{-1}), a čak 30 puta brže od Leu-AMP (0,052 s^{-1} u odnosu na 0,0019 s^{-1}). Takvi rezultati upućuju da selektivno izbacivanje Nva-AMP može pridonositi tRNA-neovisnom popravku pogreške kod LeuRS. Zanimljivo je da aktivnost tRNA-neovisnog popravka pogreške ovisi o nepripadnoj aminokiselini. LeuRS se u prisustvu α-aminobutirata ponaša približno jednako kao u prisustvu norvalina. Kao i u aktivaciji, visok K_M izražen je i u tRNA-neovisnom popravku, dok je obrtni broj za nastajanje AMP približno jednak u prisustvo norvalina i α-aminobutirata. Obzirom na koeficijent brzine nakupljanja Aba-AMP u otopini (0,069 s^{-1}), selektivna disocijacija, odnosno neenzimska hidroliza Aba-AMP, kao i Nva-AMP (0,052 s^{-1}) izbačenog u otopinu može pridonositi uklanjanju tog nepripadnog intermedijera u tRNA-neovisnom putu popravka pogreške. U prisustvu izoleucina, LeuRS nakuplja AMP u otopini jednakim koeficijentom brzine kao i u prisustvu pripadnog leucina (0,010 s^{-1}), što upućuje da ne koristi enzimsku hidrolizu kao mehanizam tRNA-neovisnog popravka pogreške u prisustvu izoleucina. Međutim, uočljivo je da se Ile-AMP nakuplja u otopini četiri puta brže u odnosu na Leu-AMP (0,0063 s^{-1} u odnosu na 0,0019 s^{-1}), odnosno da LeuRS uklanja izoleucin kroz selektivno izbacivanje Ile-AMP u otopinu. Važno je naglasiti da je značaj tRNA-neovisnog popravka pogreške u održavanju točnosti aaRS nepoznat, pogotovo *in vivo*, obzirom na robustne tRNA-ovisne mehanizme popravka pogreške.

5.3 $tRNA^{Leu}$ ne stimulira hidrolizu nepripadnih aminoacil-adenilata

U području vladaju oprečni stavovi po pitanju postojanja tRNA-ovisnog popravka pogreške kod LeuRS iz *E. coli* (detaljno opisano u poglavlju 2.5.2.1 Literaturnog pregleda). Mjerenjem nastajanja AMP u prisustvu norvalina s varijantom LeuRS kojoj je inaktiviran popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline – D345A LeuRS, pokazano je da dodatak $tRNA^{Leu}$

ne stimulira popravak pogreške. k_{cat}/K_M za nastanak AMP u prisustvu norvalina i $tRNA^{Leu}$ koji je određen s varijantom enzima D345A istovjetan je k_{cat}/K_M određenom u odsustvu $tRNA^{Leu}$ (0,05 mM^{-1} s^{-1} u odnosu na 0,07 mM^{-1} s^{-1}). No, problem korištenja klasičnog testa popravka pogreške putem mjerenja utroška ATP-a u prisustvu nepripadne aminokiseline i $tRNA^{Leu}$ s varijantom enzima kojoj je inaktivirana deacilacija je u nemogućnosti razlikovanja podrijetla AMP-a. Naime, aminoacil-adenilat u sintetskom mjestu aaRS može doživjeti čak tri sudbine – disocirati u otopinu, hidrolizirati se ili se aminokiselina može prenijeti na tRNA. I u slučaju hidrolize i prijenosa aminokiseline, produkt reakcije je AMP. Budući da deacilacijski mutant može akumulirati misaciliranu tRNA, te za svaku misaciliranu tRNA nastaje i jedan AMP, jedino kroz paralelno mjerenje AMP i misacilirane tRNA u identičnim reakcijskim uvjetima može se utvrditi udio AMP koji potječe od popravka. Koeficijent brzine tRNA-ovisnog popravka pogreške prije prijenosa ($k_{ed,+tRNA}$) izračunava se oduzimanjem koeficijenta brzine nastanka misacilirane tRNA ($k_{aa\text{-}tRNA}$) od koeficijenta brzine nastanka AMP (k_{AMP}) određenog u prisustvu nepripadne aminokiseline s deacilacijskim mutantom enzima ($k_{ed,+tRNA} = k_{AMP} - k_{aa\text{-}tRNA}$). Rezultat takvog kinetičkog testa s D345A LeuRS pokazao je da AMP i norvalil-$tRNA^{Leu}$ nastaju jednako brzo, tj. da $tRNA^{Leu}$ ne stimulira popravak pogreške prije prijenosa aminokiseline. Istovjetni eksperimenti napravljeni su i u prisustvu izoleucina, a dobiven je jednak rezultat – hidroliza Ile-AMP nije pojačana u kompleksu LeuRS:$tRNA^{Leu}$ u odnosu na apoenzim. Pokazano je i da misacilirana tRNA ne stimulira popravak pogreške. Naime, pri višoj koncentraciji LeuRS, vrlo brzo se misacilira sva dostupna tRNA, te se nadalje može pratiti nastanak AMP u komleksu LeuRS:aa-$tRNA^{Leu}$. Uvjeti u kojima je određeno nastajanje AMP u prisustvu Nva, Ile, Aba ili Met omogućavaju brzu misacilaciju $tRNA^{Leu}$ jer je korišten D345A LeuRS koncentracije 0,5 µmol dm^{-3}. Usporedbom dobivenih k_{cat}/K_M vrijednosti u prisustvu i odsustvu tRNA, može se zaključiti da misacilirana tRNA, kao ni slobodna tRNA, ne potiče hidrolizu aa-AMP bez obzira na korišten nepripadni supstrat. Ovakvi rezultati upućuju da je nedostatak tRNA-ovisnog popravka pogreške prirođeno svojstvo LeuRS.

E. coli IleRS je za sada jedina aaRS kod koje je jasno pokazano postojanje tRNA-ovisnog popravka pogreške prije prijenosa. Pokazano je da $tRNA^{Ile}$ optimira sintetsko mjesto za nastajanje, ali i hidrolizu aminoacil-adenilata[11, 52] (Cvetesic, Bilus i Gruic-Sovulj, neobjavljeni rezultati). Kod LeuRS je obrtni broj u tRNA-neovisnom popravku pogreške u prisustvu norvalina ili α-aminobutirata 4-6 puta veći od tRNA-neovisnog popravka pogreške *E. coli* IleRS u prisustvu valina (0,2 s^{-1} i 0,4 s^{-1} u odnosu na 0,053 s^{-1}) te odgovara vrijednosti

obrtnog broja hidrolize Val-AMP stimulirane prisustvom $tRNA^{Ile}$ (0,28 s^{-1})[52]. Iz toga se može zaključiti da je sintetsko mjesto LeuRS već maksimalno optimirano za hidrolizu nepripadnih aminoacil-adenilata. No, zašto nije evoluirao učinkovitiji tRNA-ovisan ili tRNA-neovisan popravak pogreške prije prijenosa aminokiseline? Obzirom da i aaRS koje nemaju zasebnu domenu za popravak pogreške pokazuju hidrolitičku aktivnost prema pripadnim i nepripadnim aminoacil-adenilatima, te da su se izvorne primordijalne aaRS sastojale samo od katalitičke srži, smatra se da je popravak pogreške prije prijenosa aminokiseline prvi i evolucijski najstariji popravak pogreške koji je bar djelomično sprječavao mistranslaciju[52]. No, važno je naglasiti da sintetsko mjesto primarno služi sintezi aminoacil-adenilata te prijenosu aminokiseline na tRNA. Budući da aaRS u koraku vezanja teško razlikuju pojedine pripadne i nepripadne aminokiseline, za očekivati je da se ni u hidrolitičkoj aktivnosti u istom aktivnom mjestu ne mogu znatno bolje razlikovati pripadni i nepripadni intermedijeri. Smatra se da je razvoj učinkovitijeg popravka pogreške prije prijenosa aminokiseline spriječen upravo jer bi se vjerojatno značajno hidrolizirao i pripadni aminoacil-adenilat, što bi stanicama bilo nepovoljno jer se uzalud troši ATP[52].

Rezultati grupe dr. sc. S. Martinis (poglavlje 2.5.2.1) pokazuju da cjeloviti *E. coli* LeuRS nema tRNA-ovisan popravak pogreške prije prijenosa, no da se taj put popravka aktivira u sintetskom mjestu krnje varijante LeuRS kojoj je domena CP1 uklonjena. Takav mehanizam djeluje neobično, no treba uzeti u obzir da je uklonjena čitava domena CP1 koja ipak kroz interakciju s tRNA utječe na aminoaciliranje[68]. Ukoliko je koeficijent brzine prijenosa nepripadne aminokiseline narušen dovoljno da postane usporediv s koeficijentom brzine hidrolize nepripadnog aa-AMP, prema modelu kinetičkog particioniranja aa-AMP[11], za očekivati je da tRNA-ovisan popravak pogreške prije prijenosa dođe do izražaja. Rezultati istraživačke grupe dr. sc. En Duo Wang su sasvim suprotni – pokazano je da *E. coli* LeuRS koristi robustan tRNA-ovisan popravak pogreške prije prijenosa aminokiseline[21]. Autori su kao deacilacijski mutant za ispitivanje tRNA-ovisnog popravka prije prijenosa aminokiseline koristili T252R LeuRS, što je prva očita razlika u odnosu na mutant korišten u ovom radu. Pozicija T252 je kod *E. coli* LeuRS zanimljiva jer izravno utječe na specifičnost domene CP1. Zamjena treonina s aminokiselinom manjeg bočnog ogranka omogućava hidrolizu Leu-$tRNA^{Leu}$, dok zamjena aminokiselinom većeg bočnog ogranka, poput arginina, sprječava ulaz 3'-kraja tRNA u hidrolitičko mjesto. Autori su ispitali aktivnost T252R u deacilaciji, međutim kao supstrat za deacilaciju koristili su Ile-$tRNA^{Leu}$, a zapravo su istraživali popravak pogreške

u prisustvu norvalina. Temeljni nedostatak takvog pristupa je neopravdana pretpostavka da su mehanizmi reakcija neovisni o supstratu. Rezultati detaljne kinetičke karakterizacije T252R LeuRS potvrdili su da je deacilacija Ile-tRNA^{Leu} posve inaktivirana, no deacilacija Nva-tRNA^{Leu} nije posve inaktivirana, već je samo oslabljena (poglavlje 4.7.2). Neznajući da T252R ima aktivan popravak pogreške nakon prijenosa, autori su stimulaciju nastanka AMP u prisustvu tRNA^{Leu} pogrešno pripisali tRNA-ovisnom popravku pogreške prije prijenosa aminokiseline.

Izostanak tRNA-ovisnog popravka pogreške kod LeuRS u skladu je s nedavno predloženim modelom gdje je pokazano da je značaj tRNA-ovisnog popravka pogreške prije prijenosa određen kinetičkim particioniranjem aminoacil-adenilata u sintetskom mjestu[11, 13]. U sintetskom mjestu se odvija kompeticija nukleofilnog napada hidrolitičke vode i 2'OH skupine riboze krajnjeg adenozina tRNA na aminoacil-adenilat. Kod IleRS je koeficijent brzine prijenosa valina na tRNA^{Ile} usporediv s koeficijentom brzine hidrolize Val-AMP (k_{trans} = 0,4 s^{-1} u odnosu na $k_{cat,hidr.}$= 0,48 s^{-1}), zbog čega su obje sudbine Val-AMP jednako vjerojatne. *E. coli* ValRS, za razliku od IleRS, specifičan je po brzom prijenosu aminokiselina, čak 200 puta bržem od hidrolize nepripadnog Thr-AMP (k_{trans} = 55 s^{-1} u odnosu na $k_{cat,hidr.}$= 0,28 s^{-1}) pa hidrolitička voda ne može konkurirati nukleofilnom napadu 2'OH skupine. Bitno je napomenuti da su koeficijenti brzine hidrolize određeni u ustaljenom stanju, zbog čega te vrijednosti predstavljaju najmanju procjenjenu vrijednost hidrolize, dok je koeficijent brzine prijenosa određen u uvjetima predustaljenog stanja i odražava kemijski korak prijenosa aminokiseline. LeuRS se, kada je u pitanju norvalin, ponaša kao i ValRS s treoninom – prijenos norvalina je oko 320 puta brži od hidrolize Nva-AMP i u skladu s time tRNA ne stimulira hidrolizu Nva-AMP. Međutim, budući da je prijenos izoleucina čak 50 puta sporiji od prijenosa norvalina ili leucina, neočekivano je da tRNA^{Leu} ne stimulira hidrolizu Ile-AMP, pogotovo jer je tRNA-neovisna hidroliza Ile-AMP izuzetno spora i odgovara hidrolizi Leu-AMP (0,010 s^{-1}). Na koeficijent brzine hidrolize mogu utjecati i pozicioniranje aa-AMP te hidrolitičke vode. LeuRS jednako loše hidrolizira Ile-AMP i Leu-AMP i analizom utvrđenih kristalnih struktura LeuRS:Leu-AMS te LeuRS:Ile-AMS nije uočena razlika u pozicioniranju aa-AMP. Za usporedbu nedostaje utvrđena struktura s Nva-AMP (LeuRS:Nva-AMS) koji se čak 200 puta učinkovitije hidrolizira. Kako pozicioniranje aa-AMP utječe i na koeficijent brzine prijenosa, koji je jednak za leucin i norvalin, izglednije je da položaj hidrolitičke vode ima značajniji utjecaj na koeficijent brzine hidrolize aa-AMP,

a time i važnost tRNA-ovisnog popravka pogreške prije prijenosa aminokiseline. Moguće je da identitet aminokiseline uvjetuje pozicioniranje hidrolitičke vode, budući da rezultati mjerenja tRNA neovisne hidrolize aa-AMP pokazuju da su aminokiseline nerazgranatog bočnog ogranka (Nva, Aba) bolji supstrati od aminokiselina razgranatog bočnog ogranka (Leu, Ile, Val). Iako je metionin je također aminokiselina nerazgranatog bočnog ogranka, vjerojatno je zbog duljine ipak lošiji supstrat.

5.4 Popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline LeuRS sprječava mistranslaciju leucinskih kodona

U sklopu ove disertacije, razvijen je kinetički test [^{32}P]-tRNA za praćenje hidrolize esterske veze aa-tRNA *in trans* u uvjetima jednog obrtaja enzima, što omogućava direktno određivanje koeficijenta brzine hidrolize. Pokazano je da su hidrolize Nva-tRNA^{Leu} i Ile-tRNA^{Leu} izuzetno brze – 310 s^{-1}, odnosno 42 s^{-1}. Uočena je i značajna hidroliza Leu-tRNA^{Leu} koja je oko dva reda veličine veća od neenzimske hidrolize aa-tRNA u otopini (0,098 s^{-1} u odnosu na 0,00033 s^{-1}). Do sada se smatralo da je ulaz 3'-kraja Leu-tRNA^{Leu} u hidrolitičko mjesto domene CP1 sterički spriječen, odnosno da se 3'-kraj tRNA^{Leu} esterificiran leucinom ne može vezati u hidrolitičko mjesto. Zaključci su temeljeni na mjerenjima hidrolize u ustaljenom stanju pri čemu opaženi koeficijenti brzine reakcije odražavaju najsporiji korak u mehanizmu reakcije, a ne nužno koeficijent brzine kemijske reakcije. Dodatni dokaz da se 3'-kraj tRNA^{Leu} pozicionira u aktivno mjesto proizlazi iz utjecaja supstitucije aspartata na poziciji 345 alaninom. Prema utvrđenoj kristalnoj strukturi LeuRS s analogom supstrata deacilacije, predloženo je da aspartat na poziciji 345 ima ulogu u pozicioniranju aminokiseline esterificirane na 3'-kraj tRNA kroz ionske interakcije s amino skupinom aminokiseline[20]. Obzirom da kinetički test u uvjetima jednog obrtaja enzima omogućava direktno mjerenje koeficijenta brzine hidrolize, testirana je hidroliza Nva-, Ile, i Leu-tRNA^{Leu} s D345A LeuRS. Zamjena aspartata 345 alaninom uzrokovala je smanjenje koeficijenta brzine hidrolize Nva- i Ile-tRNA^{Leu} čak 10^5 puta, te 50 puta slabiju hidrolizu Leu-tRNA^{Leu}. Time je direktno dokazana uloga aspartata 345 u mehanizmu deacilacije i potvrđeno je da se 3'-kraj tRNA esterificiran leucinom doista može pozicionirati i hidrolizirati u domeni CP1. Zanimljivo je da je domena CP1 specifičnija prema supstratima hidrolitičkog popravka u odnosu na sintetsko mjesto kojem je hidrolitička uloga sekundarna. Ako se usporede koeficijenti hidrolize

nepripadnih aa-AMP u odnosu na hidrolizu Leu-AMP, sintetsko mjesto je za hidrolizu Nva-AMP 20 puta, Aba-AMP 30 puta te Met-AMP 3 puta učinkovitije, dok je hidroliza Ile-AMP istovjetna hidrolizi Leu-AMP. Hidrolitičko mjesto domene CP1 značajno je učinkovitije u isključivanju pripadne Leu-tRNA^{Leu}: hidroliza Nva-tRNA^{Leu} je čak oko 3000 puta brža, a hidroliza Ile-tRNA^{Leu} je oko 400 puta brža. Razlike u specifičnosti su vjerojatno posljedica dvojne uloge sintetskog mjesta. U sintetskom mjestu su smještene dvije oprečne aktivnosti – sinteza i hidroliza aa-AMP, pa je evolucija boljeg hidrolitičkog mjesta u smislu prepoznavanja nepripadnog, odnosno isključivanja pripadnog intermedijera, zasigurno bila ograničena optimacijom sintetske reakcije, koja ima sasvim suprotnu ulogu – dobro prepoznavanje pripadne, odnosno isključivanje nepripadnih aminokiselina. Domena CP1 služi isključivo za hidrolizu esterske veze pa je razvoj hidrolitičkog mjesta mogao biti usmjeren postizanju ravnoteže učinkovitosti i specifičnosti.

Provjerena je i uloga elongacijskog faktora Tu u održavanju točnosti dekodiranja leucinskih kodona. Pokazano je da EF-Tu ne razlikuje Leu- i Nva-tRNA^{Leu} jer je izmjeren jednak K_D za obje aminoacilirane tRNA pri 4 °C i pri 37 °C, a mjerenjem vrijednosti koeficijenta brzine disocijacije (k_{off}) pokazano je da se i kinetika vezanja tih dviju aa-tRNA ne razlikuje (opisano u poglavlju Rezultata 4.11). Rezultati istraživanja u sklopu ove disertacije upućuju da je jedini mehanizam za sprječavanje mistranslacije leucinskih kodona popravak pogreške nakon prijenosa LeuRS i ako se greškom otpusti misacilirana tRNA, ne postoje nizvodni mehanizmi u procesu biosinteze proteina koji bi sprječili ugradnju norvalina umjesto leucina u proteine.

5.5 Fiziološka uloga popravka pogreške LeuRS

Karakterizacija mehanizama popravka pogreške *in vitro* omogućava vrijedne mehanističke spoznaje o načinima funkcioniranja enzima. Međutim, obzirom na razlike uvjeta *in vitro* i staničnog konteksta *in vivo* (ionska jakost, učinak nagomilavanja molekula – engl. *crowding effect,* interakcijske partnere)[158] moguće je da rezultati istraživanja *in vitro* ne odgovaraju realnom staničnom mehanizmu. S ciljem ispitivanja fiziološke uloge deacilacije kao glavnog mehanizma popravka pogrešaka, napravljen je soj *E. coli* kojemu je divlji tip gena u genomu zamijenjen varijantom gena koji kodira za LeuRS s ugašenom deacilacijom - D345A LeuRS (soj D345A LeuRS MG1655). Testirana je osjetljivost soja na prisutnost nepripadnih

aminokiselina norvalina i izoleucina. D345A LeuRS se pokazao izuzetno osjetljivim na norvalin (IC_{50} = 0,1 mmol dm^{-3}) i otporan na vrlo visoke nefiziološke koncentracije izoleucina. Prosječna koncentracija izoleucina[159] u bakterijskoj citoplazmi je oko 0,3 mmol dm^{-3}, a izmjeren IC_{50} izoleucina iznosi oko 51 mmol dm^{-3}. Blagi inhibicijski učinak izoleucina u jednakoj je mjeri prisutan kod divljeg tipa i D345A LeuRS MG1655 soja, što upućuje da nije vezan uz mistranslaciju. Važno je naglasiti da mehanizam netoksičnosti izoleucina nije vezan uz nemogućnost nakupljanja u bakterijskoj citoplazmi. Kako je izoleucin mala hidrofobna molekula, uz transportne sustave razgranatih aminokiselina LIV-I i LIV-II[160] prijenos izoleucina preko membrane u velikoj mjeri se odvija pasivnom difuzijom[161]. Specifičan eksporter izoleucina nije identificiran u *E. coli*, pa bi se ulaz izoleucina u stanicu trebao odvijati do postizanja ravnoteže unutar- i izvanstanične koncentracije. Istraživanjima na *Corynebacterium glutamicum* pokazano je da ako je u mediju izoleucin koncentracije 50, 100, 200 ili 250 mmol dm^{-3}, u citoplazmi je izoleucin koncentracije 32, 75, 145, 195 mmol dm^{-3} [162]. Rezultati *in vivo* se dobro slažu s rezultatima *in vitro* i upućuju da je norvalin i u staničnim uvjetima glavna prijetnja točnom dekodiranju leucinskih kodona te obzirom na toksičnost norvalina soju D345A MG1655, sugeriraju da je za učinkovito sprječavanje mistranslacije ključna aktivna deacilacija. Međutim, takav eksperiment i dalje ne razjašnjava pitanje koja je fiziološka uloga popravka pogreške LeuRS jer je u mediju, odnosno citoplazmi bakterija umjetno povišena koncentracija norvalina. Zanimljivo je da u normalnim aerobnim uvjetima rasta, bez dodatka aminokiselina, gašenje popravka pogreške nema nikakav učinak na krivulju rasta stanica, odnosno popravak pogreške LeuRS nije potreban. Takav rezultat značajan je jer objašnjava razvoj rezistencije na skupinu antibiotika koji inhibiraju LeuRS. Nedavno su razvijeni antibiotici benzoksaboroli koji u strukturi sadrže atom bora i specifično inhibiraju bakterijski LeuRS[163] i LeuRS podrijetlom iz kvasaca ili plijesni[82]. Mehanizam inhibicije temelji se na kovalentnom vezanju 3' kraja tRNA unutar domene CP1. Nastali kovalentni kompleks LeuRS:$tRNA^{Leu}$ je ireverzibilno inhibiran i ne može aminoacilirati tRNA jer se 3' kraj tRNA ne može smjestiti u sintetsko mjesto. Zamijećeno je da bakterije vrlo brzo razvijaju otpornost na benzoksaborol, te je pažljivom analizom nukleotidnog slijeda gena koji kodira za LeuRS rezistentnih bakterija utvrđeno da su rezistentne bakterije stekle mutacije u domeni CP1 koje inaktiviraju popravak pogreške[163]. Gašenje popravka pogreške LeuRS zbunjivalo je znanstvenu zajednicu jer se do sada smatralo da je neophodan za sprječavanje mistranslacije izoleucinom. Kako je u ovom

radu razjašnjeno da LeuRS koristi popravak pogreške za isključivanje norvalina iz genetičkog koda, bakterijama bi se razvoj rezistencije putem gašenja popravka možda mogao umanjiti nametanjem selektivnog pritiska dodatkom norvalina uz antibiotik.

Nedavno je objavljen rad u kojem je pokazano da *E. coli* u uvjetima rasta sa smanjenom količinom kisika, tzv. mikroaerobnim uvjetima, i u prisustvu glukoze, može akumulirati norvalin do milimolarne koncentracije[18]. U ovom radu pokazano je da soj D345A MG1655 ima smanjenu vijabilnost u mikroaerobnim uvjetima u odnosu na divlji tip soja s aktivnim popravkom pogreške LeuRS. Takvi rezultati pokazuju da popravak pogreške LeuRS omogućava bakterijama prilagodbu na život u uvjetima sa smanjenom količinom kisika ili posve anaerobnim uvjetima. Slično ovdje prikazanim rezultatima, za PheRS i ProRS iz *E. coli* pokazano je da posjeduju mehanizme popravka pogreške, iako nepripadne aminokiseline učinkovito isključuju i u sintetskim reakcijama[154, 164, 165]. Istraživanjima *in vivo* utvrđeno je da PheRS ne treba popravak pogreške za održavanje vijabilnosti bakterija u normalnim uvjetima rasta, a sve više istraživanja upućuje da različiti organizmi, stanični odjeljci pa i okoliš uvjetuju važnost popravka pogreške[164].

Kroz ispitivanje toksičnosti izoleucina i norvalina za divlji tip soja *E. coli* i D345A MG1655 soja, indirektno je pokazano da je norvalin toksičan zbog mistranslacije leucinskih kodona. Takav zaključak je opravdan starijim istraživanjima koja su pokazala da se norvalin ugrađuje umjesto leucina u rekombinantni hemoglobin[19]. Međutim, izostanak toksičnosti izoleucina nije sasvim jasan jer postoji mogućnost da se ugradnja izoleucina umjesto leucina u D345A LeuRS MG1655 soju ipak događa, ali da zamjena leucina izoleucinom nije štetna. Kako bismo razriješili to pitanje, provedena je analiza proteoma *E. coli* kvantitativnom spektrometrijom mase. Nedavno je razvijena metodologija za kvantitativnu spektrometriju mase koja koristi aminokiseline obilježene teškim izotopima (SILAC). Metodologija je izvorno razvijena za eukariotske stanice jer ne mogu sintetizirati esencijalne aminokiseline pa je moguće 100 % obilježavanje proteoma teškom aminokiselinom, no pokazano je da se može postići ugradnja pojedinih teških aminokiselina veća od 95 % i kod bakterija s aktivnom sintezom aminokiselina. U ovom radu je korištena metodologija aminokiselina obilježenih teškim izotopima za razlikovanje izobarnih leucina i izoleucina. Potpunim obilježavanjem proteoma „teškim“ leucinom LeuD3, dobiva se razlika u masi u odnosu na izoleucin u iznosu od tri daltona i omogućava detekciju izoleucina na leucinskim pozicijama. Mistranslacija izoleucinom trebala bi se uočiti kao smanjenje udjela teškog leucina LeuD3 u proteomu. Kako

nije uočena razlika u udjelu LeuD3 između divljeg tipa soja i D345A LeuRS MG1655, ovaj eksperiment jasno pokazuje da se izoleucin ne ugrađuje umjesto leucina. LeuRS isključuje izoleucin kroz sintetsku reakciju, pa gašenje popravka pogreške nema značajan utjecaj. Kvantitativnom spektrometrijom masa dokazana je i kvantificirana razina mistranslacije leucinskih kodona norvalinom u mikroaerobnim uvjetima. Ugradnja norvalina je izražena jedino u soju s ugašenim popravkom pogreške LeuRS, a ukupna mistranslacija norvalinom iznosi oko 5 % (Tablica 4.9). Soj s divljim tipom LeuRS ugrađuje umjesto leucina oko 0,4 % norvalina (Tablica 4.9). Dobiveni rezultati su u skladu s rezultatima Apostola i suradnika[19] koji su pokazali da zbog pogreške divljeg tipa LeuRS dolazi do oko 0,5 % ugradnje norvalina. Važno je naglasiti da su Apostol i suradnici inducirali nakupljanje norvalina i mistranslaciju norvalinom deregulacijom biosinteze leucina zbog prekomjerne ekspresije hemoglobina kao proteina bogatog leucinom.

Zanimljivo je da pogreška divljeg tipa LeuRS - 0,4 %, odstupa od vrijednosti ukupne dozvoljene greške mistranslacije - 0,03 %[105]. Razlika može biti posljedica različite razine mistranslacije pojedinih kodona ili eksperimentalnog pristupa. U ovom radu je korištena kvantitativna spektrometrija masa kojom je određen udio mistranslacije leucinskih kodona na razini cijelog proteoma. Uobičajeno su greške u translaciji mjerene na jednom proteinu reporteru, te je rezultat predstavljan kao ukupna pogreška mistranslacije. Problem takvog pristupa je što izabrani protein reporter ne mora nužno odražavati medijan greške translacije čitavog proteoma. Obzirom na značajan razvoj kvantitativne spektrometrije masa po pitanju razlučivosti i dinamskog raspona, upotreba takve metodologije u istraživanju uloge popravka pogreške aaRS pružit će bolje razumijevanje dinamike mistranslatiranog proteoma.

6 Zaključak

- Dosadašnji rezultati publicirani na LeuRS isticali su izoleucin kao dobar supstrat sintetske reakcije. Rezultati ove disertacije pokazali su da su istraživanja pogrešno protumačena jer komercijalno dostupan izoleucin sadrži tragove leucina. Izmjereni udio leucina u izoleucinu ovisi o proizvođaču i proizvodnoj šarži i nalazi se u rasponu 0,02-0,50 %. Dobiveni rezultati ističu važnost testiranja nepripadnih aminokiselina na prisutnost pripadne aminokiseline.
- LeuRS učinkovito isključuje izoleucin u sintetskoj reakciji uslijed slabog vezanja u osnovnom stanju i sporije katalize u odnosu na pripadni leucin. Sveukupni faktor diskriminacije izoleucina u aminoaciliranju iznosi 11000.
- Glavnu prijetnju točnosti dekodiranja leucinskih kodona predstavlja norvalin – neproteinogena, prirodna aminokiselina koja se u bakterijskoj citoplazmi nakuplja u uvjetima smanjene količine kisika.
- LeuRS, kao i ValRS i IleRS, posjeduje tRNA-neovisni popravak pogreške koji se odvija u sintetskom mjestu.
- LeuRS ne koristi tRNA-ovisan popravak pogreške prije prijenosa za održavanje točnosti leuciliranja, i po tome više sliči ValRS, dok se IleRS izdvaja kao jedina aaRS razreda Ia kod koje je pokazan tRNA-ovisan popravak pogreške.
- Glavni mehanizam popravka pogreške LeuRS je popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline, tj. deacilacija misacilirane tRNA u domeni CP1.
- Primarna biološka uloga hidrolitičke domene CP1 kod *E. coli* LeuRS je isključivanje norvalina iz genetičkog koda.
- Mehanizam popravka pogreške je svojstvo enzima koje može biti ovisno o supstratu. U slučaju LeuRS, mutacija T252R u potpunosti gasi deacilaciju Ile-tRNA^{Leu}, ali samo atenuira deacilaciju Nva-tRNA^{Leu}.
- Elongacijski faktor Tu ne razlikuje Nva- i Leu-tRNA^{Leu}.

- Gašenje hidrolitičke aktivnosti LeuRS ne utječe na rast *E. coli* u normalnim, aerobnim uvjetima. Popravak pogreške je važan za održavanje vijabilnosti *E. coli* u mikroaerobnim uvjetima kada dolazi do akumulacije norvalina.
- Kvantitativnom spektrometrijom masa pokazano je da soj *E. coli* kojem LeuRS ima ugašen hidrolitički popravak ne ugrađuje izoleucin umjesto leucina. Dodatno je analiziran sastav proteoma soja s ugašenim popravkom pogreške uzgojenog u mikroaerobnim uvjetima i utvrđena je prosječna ukupna razina mistranslacije norvalinom u iznosu od oko 5 %.
- Rezultati pokazuju da popravak pogreške aaRS nije neophodan u normalnim uvjetima bakterijskog rasta i upućuju na povezanost mehanizama popravka pogreške aaRS s mehanizmima bakterijske prilagodbe na promjenjive uvjete rasta.
- Rezultati ove disertacije usmjeravaju na daljnje istraživanje uloge mehanizama popravka pogreške aminoacil-tRNA-sintetaza u isključivanju prirodnih neproteinogenih aminokiselina iz genetičkog koda.

7 Popis oznaka, kratica i simbola

Popis aminokiselina:

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

Popis kratica:

aa-AMP: aminoacil-adenilat

aaRS: aminoacil-tRNA-sintetaze

aa-tRNA: aminoacil-tRNA

AMP: adenozin-5'-monofosfat

APS: amonij persulfat

ATP: adenozin-5'-trifosfat

BSA: albumin goveđeg seruma, engl. *bovine serume albumine*

CP1: engl. *connective peptide* I

DTT: ditiotreitol

EDTA: etilendiamintetraoctena kiselina

GTP: gvanozin-5´-trifosfat

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

IPTG: izopropil-β-tiogalaktozid

LB: Luria-Bertani medij, kompletni medij za uzgoj bakterije *Escherichia coli*

LeuD3: L-leucin-5,5,5-d3

Leu0: L-leucin

M9: minimalni medij

NAD+: nikotinamid adenin dinukleotid

Ni-NTA: nikal-nitrilotrioctena kiselina

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

PMSF: fenilmetilsulfonil-fluorid

SDS: natrijev dodecilsulfat

SDS-PAGE: elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecilsulfata

SSS: SuperSILAC standard

SILAC: engl. *Stabile Isotope Labelling with Amino acids in Cell culture*

TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin

Tris: Tris(hidroksimetil)-aminometan

8 Literaturni izvori

1. M. Ibba and D. Soll, *Annu Rev Biochem* **69** (2000) 617-650.
2. J.J. Perona and A. Hadd, *Biochemistry* **51** (2012) 8705-8729.
3. A.R. Fersht, *Biochemistry* **16** (1977) 1025-1030.
4. S.S. Yadavalli and M. Ibba, *Adv Protein Chem Struct Biol* **86** (2012) 1-43.
5. J.J. Perona and I. Gruic-Sovulj, *Top Curr Chem* (2013)
6. J. Ling, N. Reynolds and M. Ibba, *Annu Rev Microbiol* **63** (2009) 61-78.
7. S. Fukai, O. Nureki, S. Sekine, A. Shimada, J. Tao, D.G. Vassylyev and S. Yokoyama, *Cell* **103** (2000) 793-803.
8. L. Lin, S.P. Hale and P. Schimmel, *Nature* **384** (1996) 33-34.
9. O. Nureki, D.G. Vassylyev, M. Tateno, A. Shimada, T. Nakama, S. Fukai, M. Konno, T.L. Hendrickson, P. Schimmel and S. Yokoyama, *Science* **280** (1998) 578-582.
10. L.F. Silvian, J. Wang and T.A. Steitz, *Science* **285** (1999) 1074-1077.
11. M. Dulic, N. Cvetesic, J.J. Perona and I. Gruic-Sovulj, *J Biol Chem* **285** (2010) 23799-23809.
12. I. Gruic-Sovulj, J. Rokov-Plavec and I. Weygand-Durasevic, *FEBS Lett* **581** (2007) 5110-5114.
13. A. Minajigi and C.S. Francklyn, *J Biol Chem* **285** (2010) 23810-23817.
14. K.E. Splan, M.E. Ignatov and K. Musier-Forsyth, *J Biol Chem* **283** (2008) 7128-7134.
15. J.F. Chen, N.N. Guo, T. Li, E.D. Wang and Y.L. Wang, *Biochemistry* **39** (2000) 6726-6731.
16. S.A. Martinis and G.E. Fox, *Nucleic Acids Symp Ser* **36** (1997) 125-128.
17. Y. Tang and D.A. Tirrell, *Biochemistry* **41** (2002) 10635-10645.
18. J. Soini, C. Falschlehner, C. Liedert, J. Bernhardt, J. Vuoristo and P. Neubauer, *Microb Cell Fact* **7** (2008) 30.
19. I. Apostol, J. Levine, J. Lippincott, J. Leach, E. Hess, C.B. Glascock, M.J. Weickert and R. Blackmore, *J Biol Chem* **272** (1997) 28980-28988.
20. T.L. Lincecum, Jr., M. Tukalo, A. Yaremchuk, R.S. Mursinna, A.M. Williams, B.S. Sproat, W. Van Den Eynde, A. Link, S. Van Calenbergh, M. Grotli, S.A. Martinis and S. Cusack, *Mol Cell* **11** (2003) 951-963.
21. M. Tan, B. Zhu, X.L. Zhou, R. He, X. Chen, G. Eriani and E.D. Wang, *J Biol Chem* **285** (2010) 3235-3244.
22. T.M. Schmeing and V. Ramakrishnan, *Nature* **461** (2009) 1234-1242.
23. V. Ramakrishnan and P.B. Moore, *Curr Opin Struct Biol* **11** (2001) 144-154.
24. S. Klinge, F. Voigts-Hoffmann, M. Leibundgut and N. Ban, *Trends Biochem Sci* **37** (2012) 189-198.
25. D.L. Nelson and M.M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*2008: W. H. Freeman.
26. N. Malys, *Mol Biol Rep* **39** (2012) 33-39.
27. T.M. Karve and A.K. Cheema, *J Amino Acids* **2011** (2011) 207691.
28. D. Voet and J.G. Voet, 2004: Wiley.
29. J. Cavarelli and D. Moras, *Faseb Journal* **7** (1993) 79-86.
30. P.F. Agris, *EMBO Rep* **9** (2008) 629-635.

31. S. Dunin-Horkawicz, A. Czerwoniec, M.J. Gajda, M. Feder, H. Grosjean and J.M. Bujnicki, *Nucleic Acids Res* **34** (2006) D145-149.
32. L. Pallanck, M. Pak and L.H. Schulman, *tRNA Discrimination in Aminoacylation*, in *tRNA*1995, American Society of Microbiology.
33. M.E. Saks, J.R. Sampson and J.N. Abelson, *Science* **263** (1994) 191-197.
34. T. Muramatsu, K. Nishikawa, F. Nemoto, Y. Kuchino, S. Nishimura, T. Miyazawa and S. Yokoyama, *Nature* **336** (1988) 179-181.
35. G. Eriani, M. Delarue, O. Poch, J. Gangloff and D. Moras, *Nature* **347** (1990) 203-206.
36. L. Ribas De Pouplana and P. Schimmel, *Trends Biochem Sci* **26** (2001) 591-596.
37. M. Ibba, S. Morgan, A.W. Curnow, D.R. Pridmore, U.C. Vothknecht, W. Gardner, W. Lin, C.R. Woese and D. Soll, *Science* **278** (1997) 1119-1122.
38. A. Ambrogelly, D. Korencic and M. Ibba, *J Bacteriol* **184** (2002) 4594-4600.
39. J.G. Arnez and D. Moras, *Trends Biochem Sci* **22** (1997) 211-216.
40. J. Cavarelli, G. Eriani, B. Rees, M. Ruff, M. Boeglin, A. Mitschler, F. Martin, J. Gangloff, J.C. Thierry and D. Moras, *EMBO J* **13** (1994) 327-337.
41. D. Moras, *Trends Biochem Sci* **17** (1992) 159-164.
42. B.E. Griffin, M. Jarman, C.B. Reese, J.E. Sulston and D.R. Trentham, *Biochemistry* **5** (1966) 3638-3649.
43. J.S. Weinger and S.A. Strobel, *Biochemistry* **45** (2006) 5939-5948.
44. C.M. Zhang, J.J. Perona, K. Ryu, C. Francklyn and Y.M. Hou, *J Mol Biol* **361** (2006) 300-311.
45. E. Guth, S.H. Connolly, M. Bovee and C.S. Francklyn, *Biochemistry* **44** (2005) 3785-3794.
46. A. Minajigi and C.S. Francklyn, *Proc Natl Acad Sci U S A* **105** (2008) 17748-17753.
47. N. Cvetesic, J.J. Perona and I. Gruic-Sovulj, *J Biol Chem* **287** (2012) 25381-25394.
48. H. Jakubowski and A.R. Fersht, *Nucleic Acids Res* **9** (1981) 3105-3117.
49. A.C. Bishop, T.K. Nomanbhoy and P. Schimmel, *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** (2002) 585-590.
50. N.T. Uter, I. Gruic-Sovulj and J.J. Perona, *J Biol Chem* **280** (2005) 23966-23977.
51. A.C. Dock-Bregeon, B. Rees, A. Torres-Larios, G. Bey, J. Caillet and D. Moras, *Mol Cell* **16** (2004) 375-386.
52. M. Dulic, J.J. Perona and I. Gruic-Sovulj, *Biochemistry* **53** (2014) 6189-6198.
53. R.B. Loftfield and E.A. Eigner, *J Biol Chem* **240** (1965) PC1482-1484.
54. A.N. Baldwin and P. Berg, *J Biol Chem* **241** (1966) 831-838.
55. E.W. Eldred and P.R. Schimmel, *J Biol Chem* **247** (1972) 2961-2964.
56. S. Cusack, A. Yaremchuk and M. Tukalo, *EMBO J* **19** (2000) 2351-2361.
57. A. Palencia, T. Crepin, M.T. Vu, T.L. Lincecum, Jr., S.A. Martinis and S. Cusack, *Nat Struct Mol Biol* **19** (2012) 677-684.
58. A. Yaremchuk, S. Cusack, O. Gudzera, M. Grotli and M. Tukalo, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **56** (2000) 667-669.
59. L.R. De Pouplana* and P. Schimmel, *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **57** (2000) 865-870.
60. M.T. Vu and S.A. Martinis, *Biochemistry* **46** (2007) 5170-5176.
61. M.G. Xu, J.F. Chen, F. Martin, M.W. Zhao, G. Eriani and E.D. Wang, *J Biol Chem* **277** (2002) 41590-41596.
62. J.J. Ma, M.W. Zhao and E.D. Wang, *Biochemistry* **45** (2006) 14809-14816.
63. M. Tukalo, A. Yaremchuk, R. Fukunaga, S. Yokoyama and S. Cusack, *Nat Struct Mol Biol* **12** (2005) 923-930.

64. Y.G. Zheng, H. Wei, C. Ling, F. Martin, G. Eriani and E.D. Wang, *Nucleic Acids Res* **32** (2004) 3294-3303.
65. J.L. Hsu, S.B. Rho, K.M. Vannella and S.A. Martinis, *J Biol Chem* **281** (2006) 23075-23082.
66. F. Houman, S.B. Rho, J. Zhang, X. Shen, C.C. Wang, P. Schimmel and S.A. Martinis, *Proc Natl Acad Sci U S A* **97** (2000) 13743-13748.
67. G.Y. Li, A.M. Becam, P.P. Slonimski and C.J. Herbert, *Mol Gen Genet* **252** (1996) 667-675.
68. M.T. Boniecki, M.T. Vu, A.K. Betha and S.A. Martinis, *Proc Natl Acad Sci U S A* **105** (2008) 19223-19228.
69. S.W. Lue and S.O. Kelley, *Biochemistry* **46** (2007) 4466-4472.
70. S.W. Lue and S.O. Kelley, *Biochemistry* **44** (2005) 3010-3016.
71. R.S. Mursinna, K.W. Lee, J.M. Briggs and S.A. Martinis, *Biochemistry* **43** (2004) 155-165.
72. S. Englisch, U. Englisch, F. Von Der Haar and F. Cramer, *Nucleic Acids Res* **14** (1986) 7529-7539.
73. X.L. Zhou, D.H. Du, M. Tan, H.Y. Lei, L.L. Ruan, G. Eriani and E.D. Wang, *Nucleic Acids Res* **39** (2011) 8857-8868.
74. M. Tan, M. Wang, X.L. Zhou, W. Yan, G. Eriani and E.D. Wang, *Nucleic Acids Res* **41** (2013) 5513-5523.
75. A.M. Williams and S.A. Martinis, *Proc Natl Acad Sci U S A* **103** (2006) 3586-3591.
76. R.S. Mursinna, T.L. Lincecum, Jr. and S.A. Martinis, *Biochemistry* **40** (2001) 5376-5381.
77. K.W. Lee and J.M. Briggs, *Proteins* **54** (2004) 693-704.
78. Y. Liu, J. Liao, B. Zhu, E.D. Wang and J. Ding, *Biochem J* **394** (2006) 399-407.
79. A.P. Mascarenhas and S.A. Martinis, *Biochemistry* **47** (2008) 4808-4816.
80. M.W. Zhao, B. Zhu, R. Hao, M.G. Xu, G. Eriani and E.D. Wang, *EMBO J* **24** (2005) 1430-1439.
81. A.K. Betha, A.M. Williams and S.A. Martinis, *Biochemistry* **46** (2007) 6258-6267.
82. F.L. Rock, W. Mao, A. Yaremchuk, M. Tukalo, T. Crepin, H. Zhou, Y.K. Zhang, V. Hernandez, T. Akama, S.J. Baker, J.J. Plattner, L. Shapiro, S.A. Martinis, S.J. Benkovic, S. Cusack and M.R. Alley, *Science* **316** (2007) 1759-1761.
83. R.A. Hellmann and S.A. Martinis, *J Biol Chem* **284** (2009) 11478-11484.
84. F. Von Der Haar and F. Cramer, *FEBS Lett* **56** (1975) 215-217.
85. B.E. Nordin and P. Schimmel, *Biochemistry* **42** (2003) 12989-12997.
86. F. Von Der Haar and F. Cramer, *Biochemistry* **15** (1976) 4131-4138.
87. H. Asahara and O.C. Uhlenbeck, *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** (2002) 3499-3504.
88. T. Dale, L.E. Sanderson and O.C. Uhlenbeck, *Biochemistry* **43** (2004) 6159-6166.
89. T. Dale and O.C. Uhlenbeck, *Trends Biochem Sci* **30** (2005) 659-665.
90. J. Eargle, A.A. Black, A. Sethi, L.G. Trabuco and Z. Luthey-Schulten, *J Mol Biol* **377** (2008) 1382-1405.
91. F.J. Lariviere, A.D. Wolfson and O.C. Uhlenbeck, *Science* **294** (2001) 165-168.
92. M. Stanzel, A. Schon and M. Sprinzl, *Eur J Biochem* **219** (1994) 435-439.
93. H.D. Becker and D. Kern, *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** (1998) 12832-12837.
94. H. Bhaskaran and J.J. Perona, *J Mol Biol* **411** (2011) 854-869.
95. S. Ribeiro, S. Nock and M. Sprinzl, *Anal Biochem* **228** (1995) 330-335.
96. P. Nandi and G.P. Sen, *Nature* **172** (1953) 871-872.

97. G. Bogosian, B.N. Violand, E.J. Dorward-King, W.E. Workman, P.E. Jung and J.F. Kane, *J Biol Chem* **264** (1989) 531-539.
98. E.V. Sycheva, T.A. Iampol'skaia, E.S. Preobrazhenskaia, A.E. Novikova, N.G. Matrosov and N.V. Stoinova, *Mikrobiologiia* **76** (2007) 805-812.
99. G. Kohlhaw, T.R. Leary and H.E. Umbarger, *J Biol Chem* **244** (1969) 2218-2225.
100. M. Kisumi, M. Sugiura and I. Chibata, *J Biochem* **80** (1976) 333-339.
101. M. Biermann, J. Linnemann, U. Knupfer, S. Vollstadt, B. Bardl, G. Seidel and U. Horn, *Microb Cell Fact* **12** (2013) 116.
102. A.L. Weber and S.L. Miller, *J Mol Evol* **17** (1981) 273-284.
103. D. Mendel, J.A. Ellman, Z. Chang, D.L. Veenstra, P.A. Kollman and P.G. Schultz, *Science* **256** (1992) 1798-1802.
104. B. Picur, M. Lisowski, H. Taniuchi and E. Poerio, *Arch Biochem Biophys* **315** (1994) 533-547.
105. R.B. Loftfield and D. Vanderjagt, *Biochem J* **128** (1972) 1353-1356.
106. P. Edelmann and J. Gallant, *Cell* **10** (1977) 131-137.
107. E.B. Kramer and P.J. Farabaugh, *RNA* **13** (2007) 87-96.
108. I. Stansfield, K.M. Jones, P. Herbert, A. Lewendon, W.V. Shaw and M.F. Tuite, *J Mol Biol* **282** (1998) 13-24.
109. D.A. Drummond and C.O. Wilke, *Nat Rev Genet* **10** (2009) 715-724.
110. T. Pan, *Annu Rev Genet* **47** (2013) 121-137.
111. N.M. Reynolds, B.A. Lazazzera and M. Ibba, *Nat Rev Microbiol* **8** (2010) 849-856.
112. A. Moghal, K. Mohler and M. Ibba, *FEBS Lett* **588** (2014) 4305-4310.
113. J.M. Bacher, V. De Crecy-Lagard and P.R. Schimmel, *Proc Natl Acad Sci U S A* **102** (2005) 1697-1701.
114. J.M. Bacher and P. Schimmel, *Proc Natl Acad Sci U S A* **104** (2007) 1907-1912.
115. V.A. Karkhanis, A.P. Mascarenhas and S.A. Martinis, *J Bacteriol* **189** (2007) 8765-8768.
116. J.W. Lee, K. Beebe, L.A. Nangle, J. Jang, C.M. Longo-Guess, S.A. Cook, M.T. Davisson, J.P. Sundberg, P. Schimmel and S.L. Ackerman, *Nature* **443** (2006) 50-55.
117. B. Ruan, S. Palioura, J. Sabina, L. Marvin-Guy, S. Kochhar, R.A. Larossa and D. Soll, *Proc Natl Acad Sci U S A* **105** (2008) 16502-16507.
118. I. Miranda, R. Rocha, M.C. Santos, D.D. Mateus, G.R. Moura, L. Carreto and M.A. Santos, *PLoS One* **2** (2007) e996.
119. M.A. Santos, C. Cheesman, V. Costa, P. Moradas-Ferreira and M.F. Tuite, *Mol Microbiol* **31** (1999) 937-947.
120. J.M. Bacher, W.F. Waas, D. Metzgar, V. De Crecy-Lagard and P. Schimmel, *J Bacteriol* **189** (2007) 6494-6496.
121. J.A. Paredes, L. Carreto, J. Simoes, A.R. Bezerra, A.C. Gomes, R. Santamaria, M. Kapushesky, G.R. Moura and M.A. Santos, *BMC Biol* **10** (2012) 55.
122. N. Netzer, J.M. Goodenbour, A. David, K.A. Dittmar, R.B. Jones, J.R. Schneider, D. Boone, E.M. Eves, M.R. Rosner, J.S. Gibbs, A. Embry, B. Dolan, S. Das, H.D. Hickman, P. Berglund, J.R. Bennink, J.W. Yewdell and T. Pan, *Nature* **462** (2009) 522-526.
123. E. Wiltrout, J.M. Goodenbour, M. Frechin and T. Pan, *Nucleic Acids Res* **40** (2012) 10494-10506.
124. T.E. Jones, R.W. Alexander and T. Pan, *Proc Natl Acad Sci U S A* **108** (2011) 6933-6938.

125. J.Y. Lee, D.G. Kim, B.G. Kim, W.S. Yang, J. Hong, T. Kang, Y.S. Oh, K.R. Kim, B.W. Han, B.J. Hwang, B.S. Kang, M.S. Kang, M.H. Kim, N.H. Kwon and S. Kim, *J Cell Sci* **127** (2014) 4234-4245.
126. A.J. Link, D. Phillips and G.M. Church, *J Bacteriol* **179** (1997) 6228-6237.
127. A.D. Wolfson and O.C. Uhlenbeck, *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** (2002) 5965-5970.
128. S. Ledoux and O.C. Uhlenbeck, *Methods* **44** (2008) 74-80.
129. M.M. Bradford, *Anal Biochem* **72** (1976) 248-254.
130. I. Gruic-Sovulj, N. Uter, T. Bullock and J.J. Perona, *J Biol Chem* **280** (2005) 23978-23986.
131. J. Ling, B.R. So, S.S. Yadavalli, H. Roy, S. Shoji, K. Fredrick, K. Musier-Forsyth and M. Ibba, *Mol Cell* **33** (2009) 654-660.
132. R. Bertholet and P. Hirsbrunner, *Precipitation from an anhydrous ketone and sulfuric acid*, 1981, Google Patents.
133. J. Rappsilber, M. Mann and Y. Ishihama, *Nat Protoc* **2** (2007) 1896-1906.
134. N. Cvetesic, A. Palencia, I. Halasz, S. Cusack and I. Gruic-Sovulj, *EMBO J* **33** (2014) 1639-1653.
135. M.L. Bovee, M.A. Pierce and C.S. Francklyn, *Biochemistry* **42** (2003) 15102-15113.
136. L. Dibbelt, U. Pachmann and H.G. Zachau, *Nucleic Acids Res* **8** (1980) 4021-4039.
137. I. Gruic-Sovulj, I. Landeka, D. Soll and I. Weygand-Durasevic, *Eur J Biochem* **269** (2002) 5271-5279.
138. F. Schuber and M. Pinck, *Biochimie* **56** (1974) 391-395.
139. N. Cvetesic, I. Akmacic and I. Gruic-Sovulj, *Croat Chem Acta* **86** (2013) 73-82.
140. E.B. Newman and R. Lin, *Annu Rev Microbiol* **49** (1995) 747-775.
141. M. Mann, *Nat Rev Mol Cell Biol* **7** (2006) 952-958.
142. T. Geiger, J. Cox, P. Ostasiewicz, J.R. Wisniewski and M. Mann, *Nat Methods* **7** (2010) 383-385.
143. G.H. Vondenhoff and A. Van Aerschot, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **30** (2011) 465-474.
144. P.C. Lv and H.L. Zhu, *Curr Med Chem* **19** (2012) 3550-3563.
145. B. Gadakh and A. Van Aerschot, *Expert Opin Ther Pat* **22** (2012) 1453-1465.
146. D.F. Hansen, P. Neudecker, P. Vallurupalli, F.A. Mulder and L.E. Kay, *J Am Chem Soc* **132** (2010) 42-43.
147. S.C. Lovell, J.M. Word, J.S. Richardson and D.C. Richardson, *Proteins* **40** (2000) 389-408.
148. A. Fersht, *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding* 1st ed1998, New York: W. H. Freeman. 650.
149. J.G. Arnez, A.C. Dock-Bregeon and D. Moras, *J Mol Biol* **286** (1999) 1449-1459.
150. T.L. Bullock, N. Uter, T.A. Nissan and J.J. Perona, *J Mol Biol* **328** (2003) 395-408.
151. A.R. Fersht and C. Dingwall, *Biochemistry* **18** (1979) 1245-1249.
152. P. Schimmel and E. Schmidt, *Trends Biochem Sci* **20** (1995) 1-2.
153. M.A. Farrow and P. Schimmel, *Biochemistry* **40** (2001) 4478-4483.
154. P.J. Beuning and K. Musier-Forsyth, *J Biol Chem* **276** (2001) 30779-30785.
155. H. Jakubowski, *Biochemistry* **38** (1999) 8088-8093.
156. H.Y. Kim, G. Ghosh, L.H. Schulman, S. Brunie and H. Jakubowski, *Proc Natl Acad Sci U S A* **90** (1993) 11553-11557.
157. H. Jakubowski, *Biochemistry* **35** (1996) 8252-8259.
158. A.P. Minton, *J Cell Sci* **119** (2006) 2863-2869.

159. B.D. Bennett, E.H. Kimball, M. Gao, R. Osterhout, S.J. Van Dien and J.D. Rabinowitz, *Nat Chem Biol* **5** (2009) 593-599.
160. R. Kramer, *Arch Microbiol* **162** (1994) 1-13.
161. R. Krämer, *FEMS Microbiology Reviews* **13** (1994) 75-93.
162. T. Hermann and R. Kramer, *Appl Environ Microbiol* **62** (1996) 3238-3244.
163. V. Hernandez, T. Crepin, A. Palencia, S. Cusack, T. Akama, S.J. Baker, W. Bu, L. Feng, Y.R. Freund, L. Liu, M. Meewan, M. Mohan, W. Mao, F.L. Rock, H. Sexton, A. Sheoran, Y. Zhang, Y.K. Zhang, Y. Zhou, J.A. Nieman, M.R. Anugula, M. Keramane El, K. Savariraj, D.S. Reddy, R. Sharma, R. Subedi, R. Singh, A. O'leary, N.L. Simon, P.L. De Marsh, S. Mushtaq, M. Warner, D.M. Livermore, M.R. Alley and J.J. Plattner, *Antimicrob Agents Chemother* **57** (2013) 1394-1403.
164. N.M. Reynolds, J. Ling, H. Roy, R. Banerjee, S.E. Repasky, P. Hamel and M. Ibba, *Proc Natl Acad Sci U S A* **107** (2010) 4063-4068.
165. J. Sternjohn, S. Hati, P.G. Siliciano and K. Musier-Forsyth, *Proc Natl Acad Sci U S A* **104** (2007) 2127-2132.

9 Životopis

Rođena sam 23. srpnja 1987. godine u Zagrebu, gdje sam završila Osnovnu školu "Pavlek Miškina" i XV. gimnaziju. 2005. godine upisala sam Preddiplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Preddiplomski studij završila sam 2008. godine sa seminarskom radnjom "Mehanizam konformacijske promjene proteina G prilikom prijenosa signala" pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ite Gruić-Sovulj. Iste godine upisala sam Diplomski studij molekularne biologije. Iste godine upisala sam Diplomski studij molekularne biologije. 2010. godine diplomirala sam s radom "Kloniranje, prekomjerna ekspresija te pročišćavanje molekula $tRNA^{Ile}$ i $tRNA^{Val}$ iz bakterije *Escherichia coli*" pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ite Gruić Sovulj. Od 2011. godine zaposlena sam kao znanstveni novak na Zavodu za biokemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta. Neposredni sam voditelj dvaju diplomskih radova.

ZNANSTVENO USAVRŠAVANJE

2014 usavršavanje u području spektrometrije mase, Proteome Center Tübingen, Interdepartmental Institute for Cell Biology, University of Tübingen, Tübingen, Germany

2010 *Junior research specialist* (usavršavanje iz područja enzimske kinetike), Department of Chemistry and Biochemistry, University of California, Santa Barbara (2 mjeseca)

ZNANSTVENE PUBLIKACIJE

1. **Cvetesic N**., Palencia A., Halasz I., Cusack S, Gruic-Sovulj I. (2014) The physiological target for LeuRS translational quality control is norvaline, *EMBO J* **33**, 1639-1653.

2. **Cvetesic N**., Akmacic I., Gruic-Sovulj I. (2012) Lack of discrimination against non-proteinogenic amino acid norvaline by elongation factor Tu from *Escherichia coli*, *Croatica Chemica Acta* **86**, 73-82.

3. **Cvetesic N.**, Perona J.J., Gruic-Sovulj I. (2012) Kinetic partitioning between synthetic and editing pathways in class I aminoacyl-tRNA synthetases occurs at both pre-transfer and post-transfer hydrolytic steps, *J Biol Chem* 287, 25381-25394

4. Dulic M., **Cvetesic N.**, Perona J.J., Gruic-Sovulj I (2010)
Partitioning of tRNA-dependent editing between pre- and post-transfer pathways in class I aminoacyl-tRNA synthetases, *J Biol Chem* **285**, 23799-23809.

5. Steffen W., Gemperli AC, **Cvetesic N**, Steuber J (2010)
Organelle-specific expression of subunit ND5 of human complex I (NADH dehydrogenase) alters cation homeostasis in Saccharomyces cerevisiae,
FEMS Yeast Res **10**, 648-659

6. Gruic-Sovulj I, Dulic M, Jaric J, **Cvetesic N**, Majsec K, Weygand-Durasevic I (2010)
Efficiently Activated Serine Analogue is Not Transferred to Yeast tRNASer,
Croat Chem Acta, **83,** 163-169.

SUDJELOVANJA NA KONGRESIMA I RADIONICAMA

2014 Konferencija **"25th tRNA conference 2014"**, Kyllini, Grčka
Cvetešić, Nevena; Biluš, Mirna; Palencia, Andres; Dulić, Morana, Cusack, Stephen; Gruić-Sovulj, Ita
"Class I aaRS quality control mechanisms preserve canonical translation in *Escherichia coli*" (pozvano predavanje)

2014 Ljetna škola biofizike **"Biomolecular complexes and assemblies"**, Primošten, Hrvatska
Cvetešić, Nevena; Palencia Andres; Cusack, Stephen; Gruić-Sovulj, Ita
"Reassesment of LeuRS discriminatory power unveils norvaline as a prime quality control target" (poster i usmeno priopćenje)

2014 Konferencija **"25th tRNA conference 2014"**, Kyllini, Grčka
Cvetešić, Nevena; Soufi, Boumediene; Šemanjski Maja; Maček Boris; Gruić-Sovulj, Ita
"Quantitative analysis of the *Escherichia coli* proteome in the absence of LeuRS proofreading" (poster)

2013 Konferencija **„Gene Translation: Fidelity and quality control"**, Barcelona, Španjolska
Cvetešić, Nevena; Palencia, Andres; Cusack, Stephen; Gruić-Sovulj, Ita
„The prime function of Escherichia coli LeuRS CP1 domain is editing of norvaline not isoleucine" (poster)

2013 Radionica „**PRIME-XS Workshop on Phosphopeptide enrichment, labeling strategies and proteomics data analysis**", Split
Cvetešić, Nevena; Gruić-Sovulj, Ita
„Escherichia coli LeuRS CP1 domain operates to exclude norvaline from the cellular proteome" (poster)

2012 Konferencija „**XXIV tRNA Conference",** Olmue, Čile
Nevena Cvetešić, Morana Dulić, John J. Perona, Ita Gruić-Sovulj

„Interplay between synthetic and editing pathways in class I aminoacyl-tRNA synthetases“ (predavanje)

2012 EMBO praktični tečaj: **„Transient Kinetics Methods Applied to Biological Macromolecules**“ (University of Kent, Canterbury, United Kingdom, 2012, **EMBO stipendija**)

2011 Konferencija **„XXII. hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera“**, Zagreb
Dulić, Morana; Cvetešić, Nevena; Franičević, Nina; Perona, John J.; Gruić-Sovulj, Ita
„Opposing activities share the same active site: synthesis and breakdown of aminoacyl-adenylates by isoleucyl-tRNA synthetase“ (predavanje)

2010 Konferencija **„23rd tRNA Workshop“**, Aveiro, Portugal
Dulic, Morana; Cvetešić, Nevena; Perona, John J.; Gruić-Sovulj, Ita
„tRNA-independent proofreading by class I aminoacyl- tRNA synthetases“ (poster)

2010 EMBO praktični tečaj: **"Protein Expression, Purification and Crystallization**", Hamburg, Njemačka (**EMBO stipendija**)

2010 Teorijski tečaj **“RNA Structure and Function”**, ICGEB, Trst, Italija

2009 Konferencija: **“The 3rd Adriatic Meeting on Computational Solutions in the Life Science”**, (Primošten, Croatia, 2009)
Nevena Cvetešić, Morana Dulić, John J. Perona, Ita Gruić-Sovulj
“Mechanism of hydrolytic proofreading in amino acid selection for protein biosynthesis” (poster)

2009 **“EMBO Young Scientists Forum”**, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

2008 50 godina molekularne biologije u Hrvatskoj, Zagreb

2008 Ljetna škola: **“International Biology Undergraduate Summer School”,** University of Zürich**,** Zürich, Švicarska

NAGRADE I STIPENDIJE

2015 Stipendija „Loreal za žene u znanosti 2015“

2014 Nagrada „Greta Pifat“ za izvrsne mlade znanstvenike, dodjeljena od Hrvatskog biofizičkog društva u sklopu Ljetne škole biofizike

2014 Stipendija Zaklade Adris za polaznike Poslijediplomskog studija

2010	Nacionalova Top stipendija za top studente
2007–2010	Stipendija Grada Zagreba za studente diplomskog studija
2008	Rektorova nagrada za rad: "Dobivanje čiste tRNA iz transkripcijske smjese kromatografijom na ionskom-izmjenjivaču u jednom danu"
2006	Državna stipendija – za studente u prvih 10 % na ljestvici poretka po ostvarenom uspjehu na prijemnom ispitu