

Utjecaj mistranslacije na stabilnost modelnih proteina u staničnom ekstraktu

Brkić, Alojzije

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:995612>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Alojzije Brkić

Utjecaj mistranslacije na stabilnost modelnih proteina u staničnom ekstraktu

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog zvanja
magistra kemije

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za biokemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod zajedničkim mentorstvom prof. dr. sc. Ite Gruić Sovulj i doc. dr. sc. Marka Močiboba.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta *Aminoacil-tRNA-sintetaze kao čuvari standardnog genetičkog koda* (IP-2016-06-6272, voditeljica projekta: prof. dr. sc. Ita Gruić Sovulj).



Mentorima

Hvala Vam na prilici da pod Vašim mentorstvom izradim diplomski rad na Zavodu za biokemiju! Hvala na prilici da učim od Vas, na ukazanom povjerenju, savjetima, uloženom trudu i velikoj podršci u istraživanju, ali i kritičkom čitanju i sugestijama tijekom pisanja ovog rada.

Kolegama iz 301 i 312

Hvala za ugodne, poučne i zabavane trenutke! Znanstvene rasprave s vama su produbile moje znanje o radu u biokemijskom laboratoriju, a neznanstveni razgovori su bili često šaljivi, ali i poučni.

Profesorima – osnovnoškolskim, srednjoškolskim i fakultetskim

Hvala za entuzijazam i požrtvornost u oblikovanju mog kritičkog mišljenja i proširivanje mojih vidokruga i znanja. Hvala što ste poticali moju radoznalost za problematiku koja me ponekad, najiskrenije, nije ni zanimala. Kako je Newton rekao za svoje nastavnike, tako i ja govorim za Vas: Ako ću jednoga dana vidjeti dalje od svih, bit će to zbog Vas.

Ivi

Hvala ti za čitanje rada sa mnom! Zahvaljujući tvom oku osjetljivom na greške, drugi čitatelji će uživati u tekstu bez tiskarskih grešaka.

Mami i tati

Hvala vam što ste mi od najranijih dana bili najveća podrška i najbolji prijatelji, odgajajući me tako da budem pošten, požrtvovan i radišan. Sve moje vrline, koje moji suradnici često ističu na meni, plod su i vašeg odgoja.

Sadržaj

SAŽETAK	IX
ABSTRACT	XI
§ 1. UVOD	1
1.1. Ciljevi i svrha rada	3
§ 2. LITERATURNI PREGLED	5
2.1. Biosinteza proteina	5
2.2. Transfer RNA	8
2.3. Smatanje proteina	10
2.3.1. <i>Spontano smatanje proteina</i>	11
2.3.2. <i>Smatanje proteina potpomognuto šaperonima</i>	13
2.3.3. <i>Stabilnost staničnih proteina</i>	14
2.4. Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS)	16
2.4.1. <i>Podjela aminoacil-tRNA-sintetaza na razrede</i>	17
2.4.2. <i>Izoleucil-tRNA-sintetaza</i>	19
2.5. Mistranslacija u stanici	23
2.5.1. <i>Točnost aminoaciliranja i mehanizmi popravka pogreške aminoacil-tRNA-sintetaza</i>	23
2.5.2. <i>Mistranslacija i stanični mehanizmi osiguravanja translacijske točnosti</i>	25
2.5.3. <i>Pozitivni i negativni aspekti mistranslacije</i>	27
2.5.4. <i>Mistranslacija proteina norvalinom</i>	29
2.6. Modelni proteini za mistranslaciju	32
2.6.1. <i>Stanične fosfataze iz bakterije Escherichia coli</i>	32
2.6.2. <i>β-galaktozidaza iz bakterije Escherichia coli</i>	33
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	35
3.1. Materijali	35
3.1.1. <i>Standardne kemikalije</i>	35
3.1.2. <i>Proteini</i>	35
3.1.4. <i>Instrumenti</i>	35
3.1.5. <i>Sojevi bakterije Escherichia coli</i>	36
3.1.6. <i>Hranjivi mediji za uzgoj bakterija</i>	36
3.2. Metode rada s bakterijama	38
3.2.1. <i>Uzgoj bakterijskih kolonija na LB-pločama</i>	38
3.2.2. <i>Uzgoj prekonodne kulture bakterijskih stanica</i>	38

3.2.3. Praćenje rasta sojeva.....	38
3.3. Metode rada s proteinima	39
3.3.1. Preparativni uzgoj sojeva	39
3.3.2. Sonikacija stanica	39
3.3.3. Liza stanica komercijalnim kompletom BugBuster.....	40
3.3.4. Diskontinuirana poliakrilamidna elektroforeza u prisutstvu natrijevog dodecil sulfata (SDS-PAGE).....	40
3.3.5. Određivanje koncentracije proteina u ekstraktu metodom po Bradfordu.....	42
3.3.6. Test enzimske aktivnosti staničnih fosfataza	42
3.3.7. Test enzimske aktivnosti β -galaktozidaze.....	43
3.3.8. Termička denaturacija proteina u staničnom ekstraktu.....	43
3.3.9. Obrada eksperimentalnih podataka radi dobivanja krivulja mekšanja modelnih proteina u staničnom ekstraktu.....	44
3.3.10. Statistički test za provjeru signifikantnosti rezultata.....	45
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	46
4.1. Strategija istraživanja.....	46
4.2. Optimizacija postupka dobivanja staničnog ekstrakta	48
4.3. Ukupne stanične fosfataze kao modelni proteini za mistranslaciju.....	50
4.4. Pojačano eksprimirane fosfataze u staničnom ekstraktu kao modelni proteini za mistranslaciju	54
4.5. β-galaktozidaza kao modelni protein za mistranslaciju	58
4.5.1. Optimizacija kinetičkog testa za β -galaktozidazu	58
4.5.2. Rast sojeva PS7066 i MG1655 bakterije <i>Escherichia coli</i> u (ne)mistranslatirajućim uvjetima uz pojačanu ekspresiju β -galaktozidaze.....	61
4.5.3. Termička stabilnost β -galaktozidaze osjetljiva je na mistranslaciju.....	64
§ 5. ZAKLJUČAK.....	70
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	72
6.1. Popis korištenih kratica u radu	72
6.2. Popis proteinogenih aminokiselina	74
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	75
§ 8. ŽIVOTOPIS	LXXXI



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

Utjecaj mistranslacije na stabilnost modelnih proteina u staničnom ekstraktu

Alojzije Brkić

Izoleucil-tRNA-sintetaza (IleRS) katalizira sintezu Ile-tRNA^{Ile} u procesu biosinteze proteina. IleRS može ponekad griješiti i misacilirati tRNA^{Ile} s valinom ili neproteinogenim norvalinom. Pogreška u biosintezi proteina (mistranslacija) može biti štetna za stanicu. Iz tog razloga, IleRS posjeduje domenu za popravak vlastite pogreške. U okviru ovog rada praćena je promjena temperature mekšanja β -galaktozidaze kao modelnog proteina uslijed zamjene izoleucina s valinom ili norvalinom. Termička stabilnost β -galaktozidaze praćena je u staničnim ekstraktima soja bakterije *Escherichia coli* koji ima inaktiviranu domenu za popravak pogreške IleRS te ugrađuje valin i norvalin na izoleucinske položaje. Pokazano je da mistranslacija izoleucinskih položaja β -galaktozidaze objema neprikladnim aminokiselinama smanjuje termičku stabilnost enzima te da je utjecaj norvalina izraženiji. Nadalje, opažena je značajnija inhibicija rasta bakterijskih stanica uslijed zamjene izoleucina norvalinom u odnosu na valin. Rezultati sugeriraju da veća toksičnost mistranslacije norvalinom barem djelomično potječe od smanjene stabilnosti proteina s ugrađenim norvalinom.

(80 stranica, 22 slike, 7 tablica, 94 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: izoleucil-tRNA-sintetaza, norvalin, mistranslacija, mistranslatirani proteini, temperatura mekšanja

Mentori: prof. dr. sc. Ita Gruić Sovulj i doc. dr. sc. Marko Močibob

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Marko Močibob
 2. doc. dr. sc. Ivica Đilović
 3. izv. prof. dr. sc. Snežana Miljanić
- Zamjena: izv. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Datum diplomskog ispita: 25. veljače 2019.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

Effect of mistranslation on the stability of model proteins in cell extract

Alojzije Brkić

Isoleucyl-tRNA synthetase (IleRS) catalyses formation of Ile-tRNA^{Ile} for protein biosynthesis. IleRS may mistakenly activate tRNA^{Ile} with valine and nonproteinogenic norvaline. However, IleRS uses an editing domain and corrects its own mistakes to prevent accumulation of erroneous proteins. This work focused on the effects of isoleucine to valine or isoleucine to norvaline substitutions on the thermal stability of a model protein, β -galactosidase. The melting point of β -galactosidase was measured in cell extracts of an IleRS editing-deficient strain of *Escherichia coli*, which incorporated valine or norvaline at isoleucine positions. We showed that mistranslation of β -galactosidase with both norvaline and valine lowered the thermal stability of the enzyme, with norvaline introducing a higher effect. Besides that, isoleucine to norvaline substitution inhibited the growth of the editing-deficient strain to a higher extent than isoleucine replacement with valine. The results suggest that higher toxicity of norvaline misincorporation may be in part caused by production of norvalylated proteins with a lower thermal stability.

(80 pages, 22 figures, 7 tables, 94 references, original in croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: isoleucyl-tRNA synthetase, norvaline, mistranslation, mistranslated proteins, melting point

Mentors: Dr. Ita Gruić Sovulj, Full Professor and Dr. Marko Močibob, Assistant Professor

Reviewers:

1. Dr. Marko Močibob, Assistant Professor
 2. Dr. Ivica Đilović, Assistant Professor
 3. Dr. Snežana Miljanić, Associate Professor
- Substitute: Dr. Iva Juranović Cindrić, Associate Professor

Date of exam: February 25th 2019.

§ 1. UVOD

Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) skupina su enzima koji kataliziraju dvostupanjsku reakciju aminoaciliranja tRNA¹⁻³. U koraku aktivacije, α -karboksilni kisikov atom aminokiseline nukleofilno napada α -fosforov atom Mg-ATP kompleksa, pri čemu se uz oslobađanje pirofosfata stvara miješani anhidrid aminoacil-adenilat. U koraku prijenosa, aktivirana aminokiselina se u reakciji transesterifikacije prenosi na 2'- ili 3'- hidroksilnu skupinu 3'-terminalnog adenzina CCA-kraja odgovarajuće tRNA².

Aminoacilirane-tRNA supstrati su za ribosomsku biosintezu proteina. Uzimajući u obzir paletu funkcija koje proteini mogu vršiti u stanici, proces biosinteze proteina je izuzetno točan – pretpostavlja se da je pogreška (mistranslacija) na razini jednog pogrešno transliranog kodona na njih 10000⁴. Zbog ograničenih sposobnosti ribosoma da diskriminira između misaciliranih tRNA, najveći teret osiguravanja translacijske točnosti snose upravo aminoacil-tRNA-sintetaze⁵. Kako bi translacijska pogreška bila jednaka ili manja od navedene, pretpostavlja se da pogreška aminoacilacije ne smije biti veća od jedne pogrešno prenesene aminokiseline na njih 3300⁴. Zadatak održavanja niskih razina misacilacije nije nimalo trivijalan. Iako aaRS zbog brojnih međumolekulskih interakcija pripadnu tRNA lako diskriminiraju od nepripadne tRNA, pripadna se aminokiselina zbog međusobne sličnosti strukture i svojstava s potencijalnim nepripadnim aminokiselinama teško diskriminira. Kako bi se spriječila misacilacija, a posljedično i mistranslacija, skupina sintetaza razvila je više vrsta korektivnih mehanizama kojima osigurava zadanu točnost: popravak pogreške prije prijenosa u sintetskom aktivnom mjestu koji može biti tRNA-ovisan ili tRNA-neovisan te popravak pogreške nakon prijenosa u zasebnoj deacilacijskoj domeni prisutnoj kod nekih sintetaza (revijalno prikazano u Ref. 3).

Izoleucil-tRNA-sintetaza (IleRS) je aaRS razreda I i podrazreda A kojoj je pripadni supstrat izoleucin, iako je iz literature poznato da IleRS može misacilirati i strukturno slični valin te norvalin. Valin je prirodna proteinogena aminokiselina prisutna u stanici, dok je u normalnim uvjetima norvalin neproteinogen i prisutan u malim količinama. Pokazano je da norvalin nastaje kao nusprodukt u procesu biosinteze leucina u uvjetima uzgoja stanica u mikroaerobnim uvjetima ili kod oskudice jednom od aminokiseline razgranatog lanca⁶⁻⁸.

IleRS loše diskriminira ove dvije nepripadne aminokiseline i u koraku aktivacije i u koraku prijenosa. Da bi spriječila misacilaciju, IleRS se oslanja na kombinaciju svih triju mehanizama popravka pogreške: tRNA-ovisnog i tRNA-neovisnog popravka pogreške prije prijenosa, ali i popravka pogreške nakon prijenosa. Popravak prije prijenosa doprinosi s 30 % ukupnog popravka, dok je glavni mehanizam popravka pogreške popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline u zasebnoj domeni koja se naziva CP1 (*engl. connective peptide*)⁹. Inaktivacijom CP1 domene dolazi do značajne ugradnje valina i norvalina na izoleucinske položaje u proteinima. Recentna istraživanja proteoma bakterije *Escherichia coli* čija je IleRS imala inaktiviranu CP1 domenu tehnikama spektrometrije masa, pokazuju da izoleucinske položaje proteina u takvom soju mogu biti mistranslatirane i do 20 % valinom, odnosno norvalinom, prilikom uzgoja soja u mediju suplementiranom s 2 mmol dm⁻³ nepripadnih aminokiselina¹⁰.

Mistranslacija izoleucinskih položaja u proteinima može dovoditi do problema u njihovom smatanju, potencijalne agregacije ili promjene njihovih svojstava, prvenstveno termičke stabilnosti i enzimske aktivnosti. Naime, terciarnu strukturu proteina definiraju interakcije kratkog ili dugog dosegaja koje ostvaruju aminokiseline u polipeptidnom lancu tog proteina, dominantno: elektrostatske interakcije, vodikove veze, Van der Waalove interakcije te hidrofobni efekt generiran interakcijom bočnih ogranaka nepolarnih aminokiselina. Sinergistički efekt privlačnih i odbojnih interakcija kratkog i dugog dosegaja osigurava graničnu stabilnost proteina u fiziološkim uvjetima, sprječavajući denaturaciju (revijalno prikazano u Ref. 11). U odnosu na izoleucin, valin koji se od izoleucina razlikuje po odsutstvu jedne metilne skupine, ima smanjenu hidrofobnu površinu te njegova ugradnja na izoleucinske položaje manje stabilizira protein. S druge strane, norvalin koji je neproteinogen ima sterički slobodan linearan bočni ogranak te jednu metilnu skupinu manje od izoleucina, zbog čega ugradnja norvalina u proteine potencijalno jače destabilizira proteine od ugradnje valina¹².

Mistranslacija proteina, do određene je granice dobro tolerirana u biološkim sustavima, ali mehanizmi tolerancije još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. I dok su velike razine mistranslacije letalne, manja razina mistranslacije može potencijalno biti i adaptivna kroz povećanje raznolikosti proteoma, povećanje sposobnosti adaptacije organizma na nove uvjete u okolišu te dobivanjem novih funkcija proteina (revijalno prikazano u Ref. 13). Potaknut relativno nedavnim istraživanjima o utjecaju mistranslacije na stanicu, ovaj rad se bavi razvojem modelnih sustava za praćenje utjecaja mistranslacije na stabilnost staničnih proteina.

1.1. Ciljevi i svrha rada

Recentna istraživanja proteoma bakterija tehnikama spektrometrije masa pokazala su da u pravilu ne postoje značajnije razlike termičke stabilnosti proteina (izražene kao temperatura mekšanja proteina) između proteina u staničnom ekstraktu (izuzetno složena matrica) te pojedinačnih pročišćenih proteina¹⁴. Uzimajući to u obzir, ali i mali broj istraživanja koja se temelje na mjerenju svojstava proteina u staničnim ekstraktima, cilj je ovog istraživanja pokušati odrediti fiziološki odgovor soja bakterije *Escherichia coli* s inaktiviranom domenom za popravak pogreške IleRS na povećane razine mistranslacije izoleucinskih položaja u proteinima valinom i norvalinom, prateći termičku stabilnost modelnih proteina u staničnom ekstraktu. Odlučeno je da će se kao modelni proteini koristiti skupina enzima (stanične fosfataze) te pojedinačni enzim (β -galaktozidaza (*Uniprot*: P00722)). Enzimi su odabrani zbog supstratnih specifičnosti prema kromogenim supstratima *o*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozidu (β -galaktozidaza), odnosno *p*-nitrofenil-fosfatu (stanične fosfataze), što omogućava jednostavno spektrofotometrijsko praćenje reakcije. Nekoliko je ciljeva ovog rada:

1. Optimirati kinetičke testove za praćenje enzimske aktivnosti odabranih enzima u staničnim ekstraktima stanica bakterije *Escherichia coli* s ugašenim popravkom pogreške IleRS, uzgojenim u nemistranslatirajućim i mistranslatirajućim uvjetima.
2. Provjeriti može li termička stabilnost cijele skupine enzima (stanične fosfataze) biti indikativna za utjecaj mistranslacije na stabilnost staničnih proteina.
3. Odrediti potencijalne razlike u temperaturi mekšanja enzima β -galaktozidaze te ukupnih staničnih fosfataza u staničnim ekstraktima stanica uzgojenih u mistranslatirajućim i nemistranslatirajućim uvjetima, što će omogućiti usporedbu toksičnosti mistranslacije valinom i norvalinom.
4. Praćenjem termičke stabilnosti modelnih proteina pri više koncentracija valina i norvalina egzogeno dodanih u hranjivi medij ustanoviti potencijalne, o koncentraciji ovisne razlike u toksičnosti mistranslacije izoleucinskih položaja u proteinima valinom i norvalinom.

Na kraju, treba istaknuti da su i fosfataze, ali i β -galaktozidaza često korišteni izvjestiteljski enzimi, ali u literaturi još uvijek nije zabilježena upotreba za ovdje navedenu svrhu, zbog čega će rezultati ovog rada dati novi doprinos razumijevanju toksičnosti mistranslacije. Očekuje se opažanje razlika u temperaturi mekšanja odabranih modelnih enzima u ekstraktima stanica uzgojenih u mistranslatirajućim uvjetima u odnosu na nemistranslatirajuće uvjete, što će pokazati da su odabrani enzimi dobri modelni proteini za praćenje mistranslacije. Također, očekuje se da će mistranslacija norvalinom u većoj mjeri utjecati na termičku stabilnost enzima od mistranslacije valinom, budući da se smatra da bi mistranslacija neproteinogenom aminokiselinom s linearnim bočnim ogrankom mogla biti štetnija od mistranslacije neprikladnom proteinogenom aminokiselinom.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

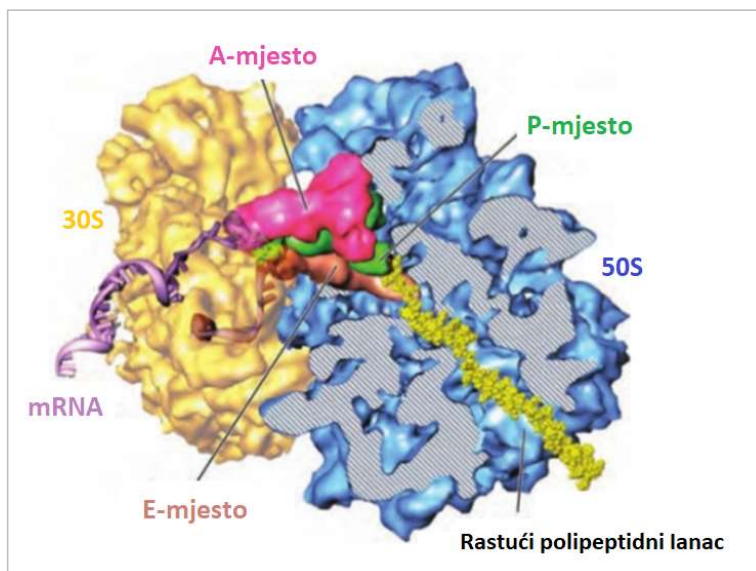
2.1. Biosinteza proteina

Od svih bioloških makromolekula proteini su najraznolikije i najsvestranije komponente stanice, čemu svjedoči paleta staničnih funkcija za koje su direktno ili indirektno odgovorni, ali i njihova brojnost u stanici – tako u proteomskoj bazi *Uniprot* (<https://www.uniprot.org>) već proteom jednostavnog prokariota, *Escherichie coli* K-12 broji 4313 različitih proteina.

Stanični proteini građeni su obično od 20 proteinogenih L-aminokiselina povezanih amidnom vezom u linearne polimere. Osim 20 kanonskih proteinogenih aminokiselina u sastav proteina mogu ući i nekanonske proteinogene aminokiseline kao što su: selenocistein, hidroksiprolin, γ -hidroksiglutamat, ali i neproteinogene aminokiseline, poput norvalina, najčešće kao posljedica pogrešaka u procesu biosinteze proteina^{15,16}.

Proces biosinteze proteina obuhvaća procese transkripcije i translacije. Tijekom transkripcije, genetička informacija pohranjena u nukleotidnim sljedovima molekule DNA privremeno se prenosi u informaciju sadržanu u nukleotidnim sljedovima glasničke RNA (mRNA), koja će poslužiti kao kalup za biosintezu polipeptidnog lanca na ribosomu. Proces transkripcije kataliziraju enzimi DNA-ovisne RNA-polimeraze, procesivno sintetizirajući lance mRNA prema lancu kalupu DNA po principu komplementarnosti baza pri čemu lanac mRNA raste u smjeru 5' prema 3'. Nakon završetka transkripcije, sintetizirana molekula mRNA se dodatno modificira, nakon čega se na ribosomu prevodi u aminokiselinski slijed procesom translacije, tako da je redoslijed aminokiselina u polipeptidnom lancu određen slijedom nukleotida mRNA (revijalno prikazano u Ref. 16-17).

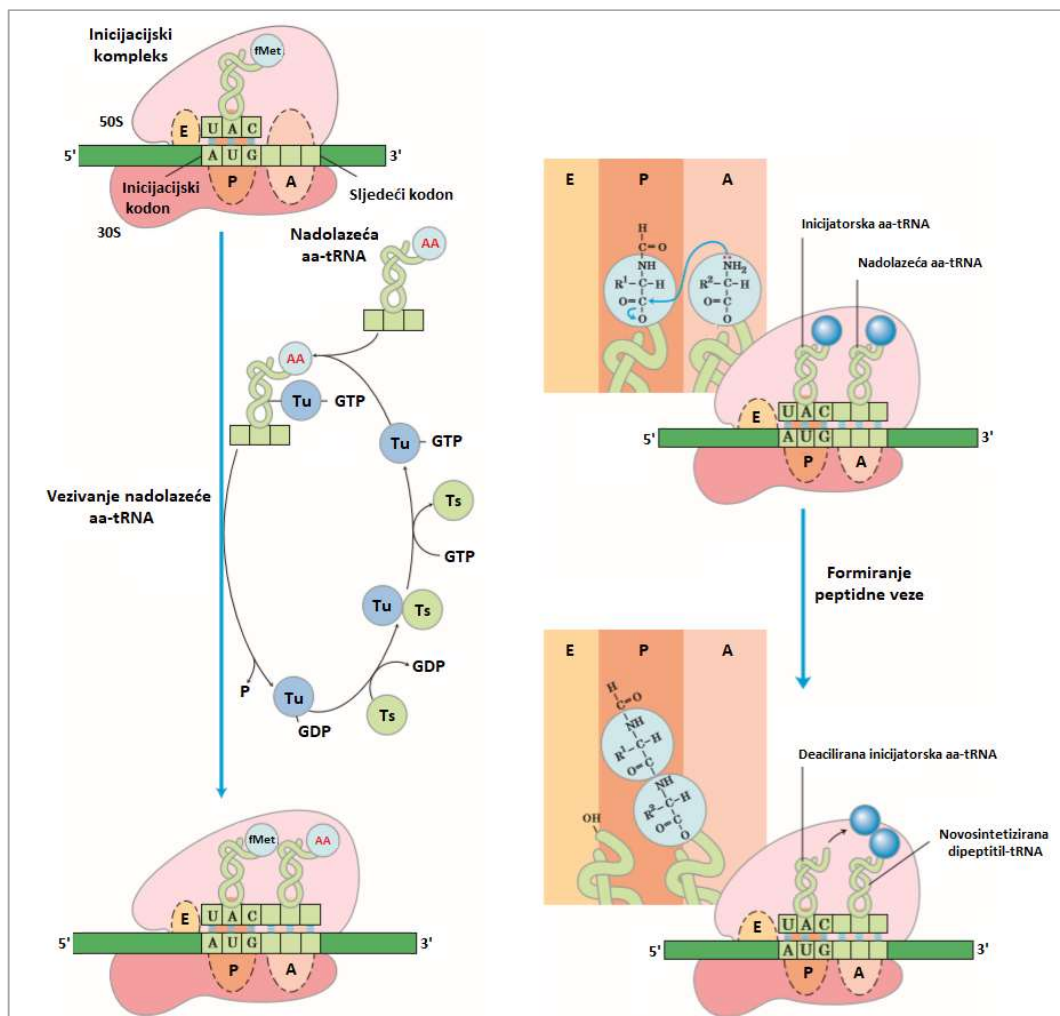
Translacija se kod prokariota odvija na ribosomu u tri koraka, a to su: inicijacija, elongacija i terminacija¹⁸. Bakterijski ribosom je globularni ribonukleoproteinski kompleks molarne mase oko 2,8 MDa građen od velike podjedinice (50S) te male podjedinice (30S) koje zajedno čine 70S ribosom (Slika 2.1). U ribosomu, ribosomska RNA (rRNA) zauzima ugrubo dvije trećine mase. Mala podjedinica ribosoma sadrži jednu rRNA duljine oko 1500 pb, tzv. 16S rRNA i oko 20 proteina. Velika podjedinica sadrži dvije kopije rRNA: 23S rRNA koja ima oko 2900 pb, 5S rRNA koja sadrži 120 pb i 30-40 ribosomskih proteina, ovisno o vrsti¹⁹.



Slika 2.1 Struktura ribosoma iz bakterije *E. coli* temeljena na rezultatima krioelektronske mikroskopije ribosoma. Podjedinice 30S i 50S prikazane su žutom i plavom bojom. tRNA koje zauzimaju P-, A-, i E-mjesto prikazane su zelenom, magenta i smeđom bojom. Ljubičastom bojom prikazan je segment netranslatirane mRNA, a žutozelenom bojom segment sintetiziranog polipeptidnog lanca. Slika je preuzeta je i prilagođena prema D. Voet, J. G. Voet, *Biochemistry*, John Willey & Sons Inc, 4. izdanje, 2011.

U inicijacijskom koraku sastavlja se funkcionalan ribosom. Mala podjedinica ribosoma veže inicijacijsku *N*-formilmetionil-tRNA^{Met} (*N*-fMet-tRNA^{Met}) te inicijacijske faktore (IF-1, IF-2 i IF-3). Takav kompleks potom veže 5'-netranslatiranu regiju mRNA pri čemu se ostvaruju Watson-Crickovi parovi između nukleotida Shine-Dalgarno slijeda (SD) na mRNA i anti-Shine-Dalgarno slijeda prisutnog na 16S rRNA u maloj podjedinici ribosoma. Vezanje SD-slijeda pozicionira antikodon na inicijacijskoj tRNA s početnim kodonom na mRNA nakon čega se veže velika podjedinica ribosoma, čime se sastavlja funkcionalan ribosom. Kao izvor energije u koraku inicijacije koristi se hidroliza GTP-a koji je vezan na IF-2. Završetkom inicijacije na dodirnoj površini podjedinica ribosoma oblikuju se tri vezna mjesta: mjesto u koje se veže aminoacil-tRNA (A-mjesto); mjesto u koje se smješta peptidil-tRNA (P-mjesto) i mjesto iz kojeg deacilirana tRNA napušta ribosom (E-mjesto) (Slika 2.1) (revijalno prikazano u 17-18, 20).

U drugoj fazi translacije, elongaciji (Slika 2.2), odvija se postupno produljenje polipeptidnog lanca, prema genetičkoj uputi sadržanoj u mRNA, uz pomoć elongacijskih faktora: EF-Tu, EF-Ts i EF-G^{18, 21}.



Slika 2.2 Prvi ciklus elongacijske faze translacije koji uključuje dva koraka. U prvom koraku (lijevi dio slike), dolazi do vezanja nadolazeće aa-tRNA u kompleksu s elongacijskim faktorom Tu u A-mjesto na ribosomu (inicijacijskom kompleksu). EF-Tu sadrži vezan GTP koji se prilikom vezanja aa-tRNA u A-mjesto hidrolizira, a s ribosoma disocira EF-Tu:GDP kompleks. Vezani GDP se s EF-Tu oslobađa prilikom interakcije EF-Ts s EF-Tu. Kompleks EF-Ts:EF-Tu rastavlja se nakon što EF-Tu veže molekulu GTP-a, čime se reciklira. U drugom koraku elongacije (desni dio slike) peptidil-transferazni centar ribosoma katalizira reakciju transpeptidacije pri čemu dolazi do deacilacije inicijatorske aa-tRNA u P-mjestu ribosoma i prijenosa rastućeg polipeptidnog lanca na tRNA u A-mjestu (U ovom slučaju nastanka dipeptidil-tRNA u A-mjestu ribosoma.). Ribosom se nakon reakcije transpeptidacije nalazi u hibridnom stanju: Deacilirana inicijatorska tRNA ima svoju akceptorsku peteljku usmjerenu prema E-mjestu, dok se antikodon nalazi i dalje u P-mjestu. Analogno tome, akceptorska peteljka dipeptidil-tRNA usmjerena je prema P-mjestu, iako je antikodon zaostao u A-mjestu. Za sljedeći ciklus elongacije potreban je unidirekcijski pomak ribosoma za jedan kodon mRNA, pri čemu deacilirana inicijatorska tRNA dolazi u E-mjesto, a dipeptidil-tRNA u P-mjesto. Slika je preuzeta i prilagođena prema D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of biochemistry*, W. H. Freeman Mackmillan Learning, New York, 7. izdanje, 2017.

U svakom koraku dekodiranja, EF-Tu u kompleksu s GTP-om dovodi aminoaciliranu tRNA, sintetiziranu na odgovarajućoj aminoacil-tRNA-sintetazi, do A-mjesta ribosoma gdje je pozicioniran kodon mRNA. Nakon vezivanja ispravnog aa-tRNA:EF-Tu:GTP kompleksa u A-mjesto na ribosomu, dolazi do hidrolize GTP-a vezanog na EF-Tu, a kompleks EF-Tu:GDP disocira, pri čemu odgovarajuća aminoacil-tRNA ostaje u A-mjestu ribosoma s njezinim 3'-krajem usmjerenim prema peptidil-transferaznom centru ribosoma^{18,21-22}. Tako pozicionirana aminoacilirana-tRNA sada je supstrat za reakciju transpeptidacije koju katalizira ribosomski peptidil-transferazni centar u velikoj podjedinici ribosoma koji je građen isključivo od RNA²³. U reakciji transpeptidacije dolazi do nukleofilnog napada dušika α -amino skupine aminokiseline vezane u aa-tRNA u A-mjestu ribosoma na α -karbonilni ugljik estera peptidil-tRNA u P-veznom mjestu ribosoma^{18,22,24}. Ciklus elongacije na ribosomu nastavlja se nakon translokacije ribosoma, odnosno unidirekcijskog pomaka mRNA i tRNA vezanih na ribosomu, tako da deacilirana tRNA dođe u E-mjesto iz kojeg može disocirati s ribosoma, peptidil-tRNA u P-mjesto te da A-mjesto postane slobodno. Ribosom se translocira uz pomoć elongacijskog faktora EF-G s vezanim GTP-om, pri čemu intrinzična GTP-azna aktivnost EF-G faktora inducira konformacijske promjene u podjedinicama koje translociraju ribosom^{18-19,21}.

Terminacija translacije kao konačni korak proteinske biosinteze proces je koji rezultira oslobađanjem sintetiziranog polipeptidnog lanca u otopinu u odgovoru na stop-kodone UAG, UAA ili UGA kao i rastavljanjem i recikliranjem translacijske mašinerije. Kao i u prethodnim koracima translacije, terminacija translacije također je koordinirana proteinskim faktorima, ovoga puta faktorima RF-1, RF-2 te RF-3 (revijalno prikazano u Ref. 18).

2.2. Transfer RNA

Molekule transportne RNA (tRNA) su adapteri koji omogućavaju prevođenje slijeda nukleotida mRNA u slijed aminokiselina u polipeptidnom lancu. Njihovo postojanje pretpostavio je Francis Crick, i to nekoliko godina prije nego je 1958. izolirana i strukturno karakterizirana prva tRNA²⁵. tRNA je jednolančana poliribonukleotidna molekula koja se sastoji od slijeda 73-93 ribonukleotida, pri čemu u strukturu tRNA ulazi veliki broj modificiranih ribonukleotida – do danas 112 identificiranih. Modificirane baze najčešće su karakteristične za različite vrste organizama ili unutarstaničnu lokalizaciju konkretne tRNA²⁶. Iako točna uloga modificiranih ribonukleotida još uvijek nije u potpunosti razjašnjena, smatra se da modificirane baze povećavaju stabilnost tercijarne strukture tRNA²⁷⁻²⁸. Tako u slučaju humane tRNA^{Lys} prisustvo

Aceptorska peteljka se sastoji od sedam parova baza i sadrži sparene nukleotide 5'- i 3'- kraja molekule. Na 3'- kraj acceptorske peteljke tRNA posttranskripcijski se dodaje CCA-kraj, na čiji se terminalni adenzin procesom aminoacilacije na odgovarajućoj aminoacil-tRNA-sintetazi povezuje odgovarajuća aminokiselina. D-ruka se sastoji od regije duge 3-4 para baza na koju se nastavlja jednostruka omča koja se sastoji od sedam nukleotida. Ime D-omča potječe od prisustva modificirane baze dihidrouridina (D). Modificirani nukleotidi: ribotimin (T), pseudouridin (Ψ) te ribocitidin (C) nalaze se u TΨC-ruči tRNA koja se sastoji od regije od 5 parova baza koja se završava omčom u kojoj se nalazi slijed nukleotida T-Ψ-C. Antikodonska ruka obično se sastoji od dvolančane regije duge 5 parova baza, na koje se nastavlja omča. Središnji triplet nukleotida koji se komplementarno sparuje s tripletnim kodonom na molekuli mRNA naziva se antikodon. Između antikodonske ruke i TΨC-ruke nalazi se varijabilna ruka, element sekundarne strukture dug 3-21 nukleotida koji je specifičan za različite vrste tRNA (revijalno prikazano u Ref. 16).

U stanici je lanac tRNA smotan u kompaktnu trodimenzionalnu strukturu u obliku grčkog slova Γ pri čemu jedan kraj takve strukture tvore TΨC-regija i acceptorska peteljka, a drugi kraj čine D- i antikodonska ruka. Sekundarna i tercijarna struktura tRNA^{Phe} iz kvaščeve gljivice *Saccharomyces cerevisiae*, jedne od 20 aminoacilacceptorskih tRNA prikazana je na Slici 2.3.

2.3. Smatanje proteina

Smatanje proteina može se definirati kao proces u kojem nestrukturirani polipeptidni lanac poprima ispravnu i funkcionalnu trodimenzionalnu strukturu koja se naziva i nativnom strukturom proteina. Rana istraživanja Anfinsena na ribonukleazi A *in vitro* pokazala su ne samo da je smatanje proteina za ribonukleazu A spontan proces, nego i da je pravilna konformacija proteina nužna kako bi isti bio funkcionalan³⁰. Smatanje proteina započinje kotranslacijski, a završava se neposredno nakon otpuštanja novosintetiziranog peptida s ribosoma u citoplazmu. Iako se dio proteina u stanici, posebno onih manjih i jednostavnije topologije može spontano smotati u nativnu konformaciju nakon otpuštanja s ribosoma, što sugeriraju i Anfinsenova istraživanja, većina većih staničnih proteina, a posebice topološki složeni proteini, zahtijevaju pomoć molekularnih šaperona da bi postigli nativnu strukturu (revijalno prikazano u Ref. 31-32).

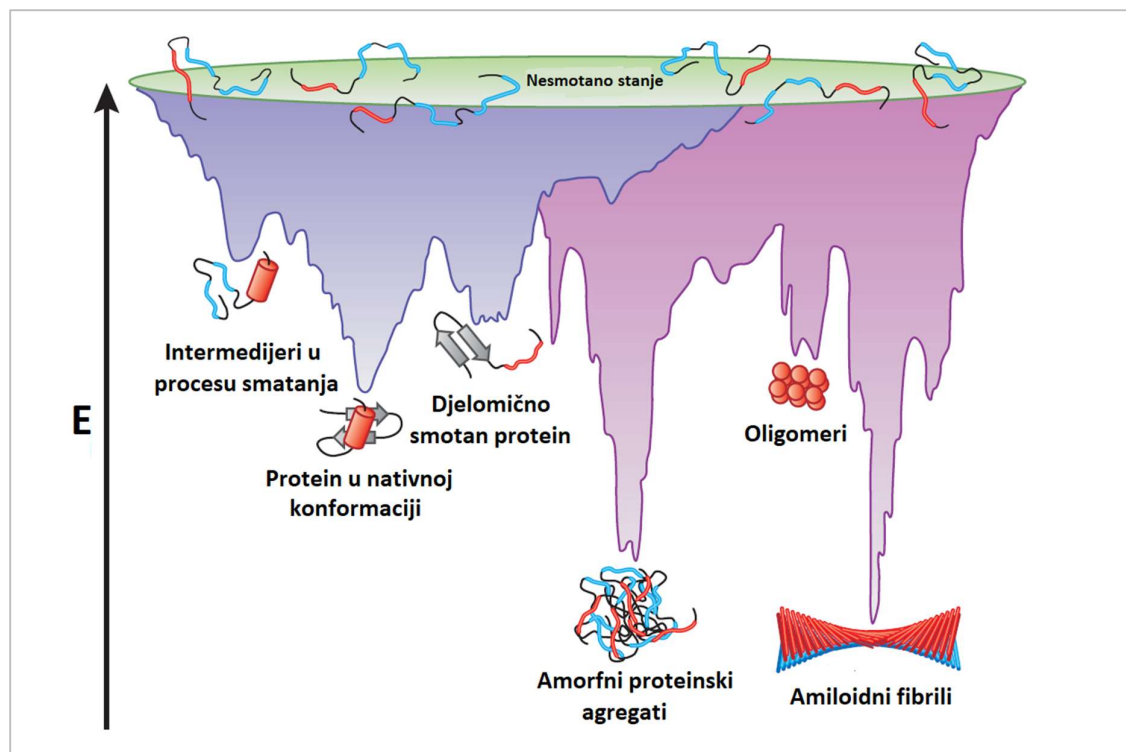
2.3.1. Spontano smatanje proteina

Anfinsenovi eksperimenti renaturacije jednostavnog proteina, goveđe ribonukleaze A *in vitro* pokazali su da se denaturiran protein može spontano smotati natrag u svoju nativnu strukturu³⁰. Eksperimenti slični Anfinsenovom pokazali su da ribonukleaza A nije izuzetak, nego da se zapravo velik broj malih proteina može smatati spontano³³.

Prilikom smatanja, polipeptidni lanac mora pretražiti velik konformacijski prostor u potrazi za nativnom konfiguracijom (Slika 2.4.). Pretraga konformacija u potrazi za nativnom konfiguracijom je najbolje opisiva kao „traženje igle u plastu sijena“ pa ipak prosječan protein „iglu“, odnosno svoju nativnu konfiguraciju nađe u prosjeku za nekoliko desetaka milisekundi³⁴. Ovaj paradoks, nazvan još Levinthalovim paradoksom³⁵, priroda je riješila tako što je ograničila broj načina na koje protein dolazi do svoje nativne konformacije^{11,30}. To sugeriraju i recentna istraživanja koja ukazuju na mogućnost da je smatanje polipeptidnog lanca uvjetovano topologijom nativnog stanja. I dok je broj mogućih interakcija pojedinih atoma u polipeptidnom lancu ogroman, broj topologija koje polipeptidni lanac može poprimiti je ograničen, a topologije proteina slične strukture, ali čak drastično različitog aminokiselinskog slijeda su slične³⁶⁻³⁸. To znači da protein u procesu smatanja, umjesto pretraživanja cijelog konformacijskog prostora, stohastički pretražuje samo topološki vjerojatne konformacije, što drastično ubrzava proces smatanja proteina³⁷. Uvriježeno je mišljenje u struci da je proces navođen termodinamski, pri čemu se sustav organizira tako da u uvjetima u kojima se nalazi minimizira svoju Gibbsovu energiju³¹. Smatanje je najvećim dijelom pogonjeno hidrofobnim efektom, a razmatanje gubitkom konformacijske entropije zbog smanjenja broja stupnjeva slobode prilikom poprimanja nativne konformacije. Tijekom smatanja, interakcije, kakve su ionske interakcije i vodikove veze doprinose smanjenim opsegom, ali su važne jednom kada se formira terciarna struktura. Ovakav energijski profil smatanja podržava prethodno opisano stajalište da je broj topologija koje polipeptidni lanac može poprimiti tijekom smatanja ograničen, budući da može postojati samo ograničen broj topologija u kojima je maksimiziran broj hidrofobnih kontakata¹¹.

Tijekom svog smatanja protein prolazi kroz niz nestabilnih prijelaznih stanja prije nego poprimi nativnu konfiguraciju koja predstavlja lokalni minimum na plohi potencijalne energije³⁷⁻³⁸. Neka od tih prijelaznih vode do nativne konformacije polipeptidnog lanca, a neke do kinetički stabilnih nenativnih stanja pri čemu vjerojatnost poprimanja krive konformacije

raste s povećanjem topološke složenosti nativnog proteina. U slučaju da izostane smatanje u nativnu konformaciju dolazi do agregacije proteina i njihove organizacije u superstrukture koje se nazivaju amiloidni fibrili³². Agregacija je posljedica izlaganja hidrofobnih dijelova srži proteina na površinu, što povećava vjerojatnost hidrofobnih interakcija više djelomično smotanih proteina, vodeći nastanku netopljivih proteinskih agregata^{32,36}.



Slika 2.4 Ploha potencijalne energije za procese spontanog smatanja proteina i agregacije. Na osi ordinata nanescena je arbitrarno konformacijska energija, a profil plohe je proizvoljan i služi samo grafičkoj reprezentaciji principa smatanja. Plavi dio plohe potencijalne energije pokazuje konformacijska stanja koja vode poprimanju nativne konformacije tijekom smatanja, dok ljubičasti dio plohe potencijalne energije predstavlja ona konformacijska stanja koja vode nastanku proteinskih agregata i njihovih superstrukture – amiloidnih fibrila. Važno je uočiti da ne postoji više distinktnih ploha potencijalne energije – i nativne i nenativne konformacije nalaze se na istoj plohi potencijalne energije. Slika je preuzeta i prilagođena prema F. U. Hartl, M. Hayer-Hartl, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16** (2009) 574-581.

Većina saznanja o spontanom smatanju proteina proizilazi iz rezultata istraživanja koji su provedeni *in vitro*. Iako se smatralo da je spontano smatanje proteina *in vivo* istovjetno smatanju *in vitro*, istraživanja su pokazala da je smatanje *in vivo* značajno učinkovitije. Za povećanu učinkovitost smatanja proteina *in vivo*, zaslužno je nekoliko utjecaja. Naime, pokazano je da smatanje proteina započinje kotranslacijski^{18,30-32}, ispravni disulfidni mostovi u većini proteina, koji iste posjeduju u strukturi, nastaju prije nego je sintetiziran cjelokupni polipeptid³⁹, a djelomično smotani proteini *in vivo* izuzetno su često u kompleksu s drugim staničnim proteinima, prvenstveno šaperonima^{32,40-41}.

2.3.2. Smatanje proteina potpomognuto šaperonima

S povećanjem topološke složenosti nativnog stanja proteina, raste vjerojatnost da će protein prilikom spontanog smatanja poprimiti nenativnu konformaciju. Vjerojatnost smatanja u nenativne konformacije dodatno je povećana malim brojem topološki jednostavnih staničnih proteina, ali i činjenicom da stanični okoliš napučen proteinima aktivno potiče smatanje u nenativne strukture i posljedično agregaciju⁴⁰⁻⁴¹. Kako bi se spriječila citotoksična agregacija djelomično ili nepravilno smotanih proteina *in vivo*, stanice raspolažu šaperonima – proteinima koji interagiraju s djelomično smotanim proteinima, aktivno potičući njihovo smatanje u nativni oblik, bez da ostaju prisutni u konačnom obliku proteina. Skupina šaperona je strukturno heterogena, a proteini klasificirani u nekoliko različitih skupina, najčešće prema molekularnoj masi: Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp100 i tzv. mali Hsp-proteini. Unatoč heterogenosti, zajedničko svojstvo svih šaperona je interakcija s elementima strukture nesmotanih proteina koja može biti ovisna ili neovisna o ATP-u ili drugim proteinskim kofaktorima^{32,40-41}.

Šaperoni iz obitelji HSP70 su najvažniji šaperoni uključeni u procese smatanja proteina te homeostaze proteina. Reakcijski ciklus ovih šaperona ovisan je o ATP-u, a reguliran interakcijama sa šaperonima obitelji HSP40 (DnaJ) i faktorima izmjene nukleotida (*engl. nucleotide exchange factor, NEF*). Izloženi hidrofobni bočni ogranci nesmotanih proteina interagiraju s α -helikalnom i β -subdomenom ATP-vezujuće domene šaperona HSP70. Afinitet vezivanja nesmotanog lanca na šaperon ovisi o vezivanju i hidrolizi ATP-a, koje je ovisno o šaperonima HSP40 (revijalno prikazano u Ref. 40-41).

Šaperoni iz obitelji HSP90 metabolička su sabirnica u eukariotskim stanicama i sudjeluju u procesima smatanja proteina važnih u procesu prijenosa signala. HSP90 djeluju nizvodno od šaperona HSP70, a djeluju u kooperaciji s brojnim drugim šaperonima. Iako je reakcijski ciklus HSP90 šaperona ovisan o ATP-u kao i reakcijski ciklus HSP70 šaperona, mehanizam vezivanja i otpuštanja supstrata još uvijek nije u potpunosti razjašnjen. Mehanizmi smatanja koji uključuju interakcije s košaperonima također nisu razjašnjeni, ali koji će košaperon biti uključen u process smatanja proteina na HSP90 izgleda da ovisi o fleksibilnosti samog supstrata (revijalno prikazano u Ref. 40-41).

Šaperonini su veliki proteinski kompleksi (≈ 900 kDa) koji potiču o ATP-u ovisno smatanje proteina veličine do ≈ 60 kDa u šupljini samih šaperonina, sastavljenoj od podjedinica organiziranih u kavezastu strukturu. Smatanjem proteina unutar šaperoninskog kompleksa, protein se iz citosola izolira u okruženje u kojem ne može agregirati ili kompetirati za vezivanje na više šaperona, što može ubrzati proces smatanja proteina. Ovisno o podjediničnoj strukturi i porijeklu, šaperonini se dijele na dvije grupe. Šaperonini grupe I (HSP60 kod eukariota, GroEL kod bakterija) imaju prstenastu strukturu sastavljenu od 7 podjedinica, a kooperiraju s drugim proteinima (HSP10 kod eukariota, GroES kod bakterija). Šaperonini grupe II pronađeni su kod arheja i eukariota, a karakterizira ih kavezasta struktura sastavljena od 8 podjedinica. U *E. coli* najvažniji šaperoninski sustav je GroEL-GroES. GroEL interagira s barem 250 staničnih proteina, obično je veličine do 50 kDa i s kompleksnim α/β ili $\alpha+\beta$ topologijama. GroEL regrutira nesmotane proteine u šupljinu šaperonina GroES, u kojoj se smataju, odvojeno od okoline. Stvaranje kompleksa GroEL-GroES ovisno je o konformacijskim promjenama uzrokovanim hidrolizom ATP-a (revijalno prikazano u Ref. 40-41).

2.3.3. Stabilnost staničnih proteina

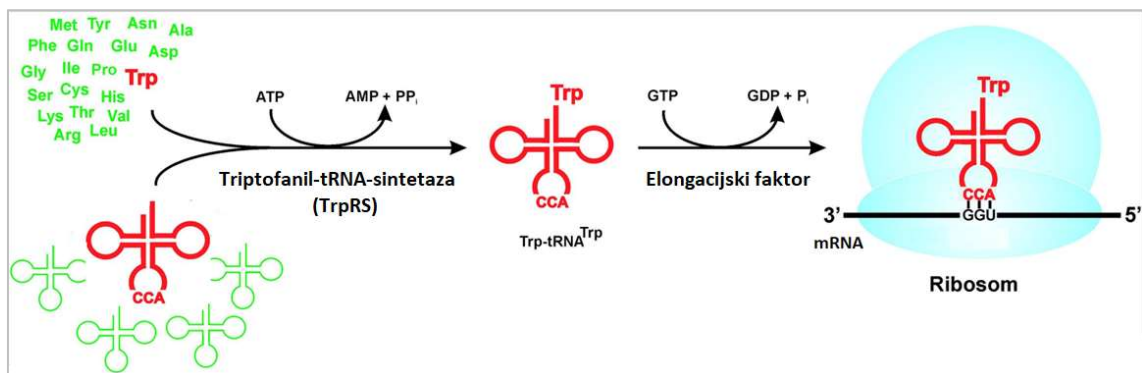
Nativnu strukturu proteina definira trodimenzionalna struktura proteina (tercijarna struktura) koja je u pravilu kompaktna (globularna) i s kompleksnom unutrašnjom arhitekturom definiranom elementima sekundarne strukture. Osim toga, u tercijarnoj strukturi proteina postoji preferentna razdioba aminokiselina prema polarnosti, tako da se nepolarne aminokiseline citosolnih proteina grupiraju u srži proteina, dok se polarne nalaze na površini. Kod transmembranskih proteina, dio površinski izloženih nepolarnih aminokiselina omogućava njihov smještaj u nepolarno okruženje fosfolipidnog dvosloja membrane (revijalno prikazano u Ref. 16-17). Elementi sekundarne strukture, kao i njihovo uklapanje u tercijarnu strukturu,

definirani su sumom interakcija kratkog ili dugog dosega koje ostvaruju aminokiseline u polipeptidnom lancu tog proteina, dominantno: elektrostatskim interakcijama, vodikovim vezama, Van der Waalsovim interakcijama te hidrofobnim efektom nastalim interakcijom nepolarnih aminokiselina. Sinergistički efekt privlačnih i odbojnih interakcija kratkog i dugog dosega osigurava stabilnost proteina. Proteini u stanici nisu u svom najstabilnijem mogućem obliku, nego su granično stabilni. S biološke strane granična stabilnost osigurava povećanu fleksibilnost polipeptidnog lanca granično stabilnog proteina, a posljedica je izostanka evolucijskog pritiska koji bi favorizirao stabilnije proteine. Granična stabilnost također doprinosi brzom smatanju proteina – prilikom smatanja proteina ne traži se globalni minimum na plohi potencijalne energije, koji bi odgovarao najstabilnijem obliku proteina (revijalno prikazano u Ref. 11).

Unatoč tome što su stabilni, dovođenjem energije proteinu procesom zagrijavanja ili narušavanjem interakcija dodatkom površinski aktivnih tvari, moguće je postići značajno narušavanje strukture proteina procesom koji se naziva denaturacija. Proces denaturacije opažen je i razlikovan od procesa agregacije još 1911. godine⁴², ali ga je kao posljedicu razmatanja proteina objasnio H. Wu tek 1929. godine⁴³. Danas se zna da polipeptidni lanac denaturiranih proteina poprima neuređenu konformaciju često nazivanu nasumično klupko (*engl. random coil*)¹⁶, a transformacija je praćena izmjenom energije okoline i proteina ili promjenom svojstava proteina (enzimska aktivnost, apsorpcijska svojstva), što omogućava praćenje procesa denaturacije kalorimetrijskim ili spektroskopskim metodama. Ovisno o proteinu, proces denaturacije može biti reverzibilan pri čemu, neki proteini kao što su ribonukleaza A, spontano poprimaju nativnu strukturu, nakon što se ukloni denaturans ili smanji temperatura³⁰. Ipak, većina se proteina ne može spontano renaturirati te za smatanje zahtijeva asistenciju molekulskih šaperona (potpoglavlje 2.3.2.). Grafički prikaz vrijednosti nekog svojstva proteina (mjenog prilikom denaturacije) o temperaturi naziva se krivuljom termičkog mekšanja proteina. Krivulja je sigmoidalna, pri čemu je apscisa koja odgovara točki infleksije temperatura mekšanja i često se koristi za opisivanje stabilnosti proteina. Treba ipak naglasiti da termička stabilnost proteina izuzetno ovisi o uvjetima u kojima se protein nalazi – za isti protein moguće je odrediti različite temperature mekšanja u puferima različitog sastava.

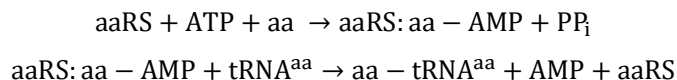
2.4. Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS)

Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) skupina su raznovrsnih enzima koji kataliziraju reakciju aminoaciliranja tRNA u kojoj se kovalentno povezuje aminokiselina s tRNA¹⁻³. Uzimajući u obzir da su aminoacilirane tRNA supstrati za ribosomsku biosintezu proteina, postaje jasno da aaRS imaju ključnu ulogu u procesu biosinteze proteina. Zadatak je aaRS osigurati prepoznavanje pripadnih supstrata u stanici koja obiluje molekulama koje su po strukturnim i kemijskim svojstvima slične supstratima, ujedno spriječavajući pogrešku u aminoaciliranju, a samim time i u biosintezi proteina (Slika 2.5) (revijalno prikazano u Ref. 3).



Slika 2.5 Uloga aminoacil-tRNA-sintetaza u procesu biosinteze proteina. U prvom koraku odgovarajuća aminoacil-tRNA-sintetaza (na slici TrpRS) probire pripadnu aminokiselinu (Trp) i tRNA (tRNA^{Trp}_{CCA}) te vrši sintezu aminoacilirane tRNA (Trp-tRNA^{Trp}_{CCA}) koja služi kao supstrat u procesu elongacije polipeptida na ribosomu. Novosintetizirana Trp-tRNA^{Trp}_{CCA} asocira s elongacijskim faktorom Tu nakon čega kompleks difundira do ribosoma gdje nakon vezivanja istog u A-mjesto ribosoma dolazi do disocijacije elongacijskog faktora i koraka elongacije u kojem Trp-tRNA^{Trp}_{CCA} služi kao supstrat. Preuzeto i prilagođeno prema M. Ibba, D. Söll, *EMBO Rep.* 2 (2001) 382 - 387.

AaRS kataliziraju reakciju aminoaciliranja u dva koraka. Prema pretpostavljenom mehanizmu, u prvom koraku α -karboksilni kisikov atom aminokiseline nukleofilno napada α -fosforov atom Mg-ATP kompleksa, pri čemu dolazi do stvaranja miješanog anhidrida aminoacil-adenilata uz oslobađanje pirofosfata. U drugom koraku, ili 2'- ili 3'- hidroksilna skupina na 3'-terminalnom adozinu CCA-kraja odgovarajuće tRNA nukleofilno napada karbonilni ugljikov atom aminoacil-adenilata pri čemu se u konačnici stvara aminoacil-tRNA uz oslobađanje AMP-a². Pretpostavljeni dvostupanjski mehanizam aminoacilacije je sljedeći:



U navedenoj notaciji aa je oznaka za aminokiselinu, tRNA^{aa} oznaka za jednu od pripadnih izoakceptorskih tRNA, dok je aaRS oznaka za odgovarajuću aminoacil-tRNA-sintetazu.

Zbog njihove izravne uloge u procesu biosinteze proteina, aaRS su izuzetno detaljno proučavane strukturno, kinetički te evolucijski. Ipak, u posljednjih desetak godina, interes znanstvene zajednice pomiče se prema nekanonskim ulogama aaRS. Pionirska istraživanja su pokazala da aaRS mogu aktivno sudjelovati u regulaciji brojnih staničnih procesa kakvi su ekspresija gena, upalni odgovor, apoptoza, intracelularni transport, prijenos signala u stanici i brojni drugi procesi (revijalno prikazano u Ref. 44). Od interesa su i istraživanja koja nefunkcionalne sintetaze povezuju s razvojem degenerativnih bolesti, primjer čega je otkriće da je alanil-tRNA-sintetaza koja je zbog inaktivne domene za popravak pogreške uzrokom nastanka degenerativnih promjena moždanog tkiva kod miša⁴⁵.

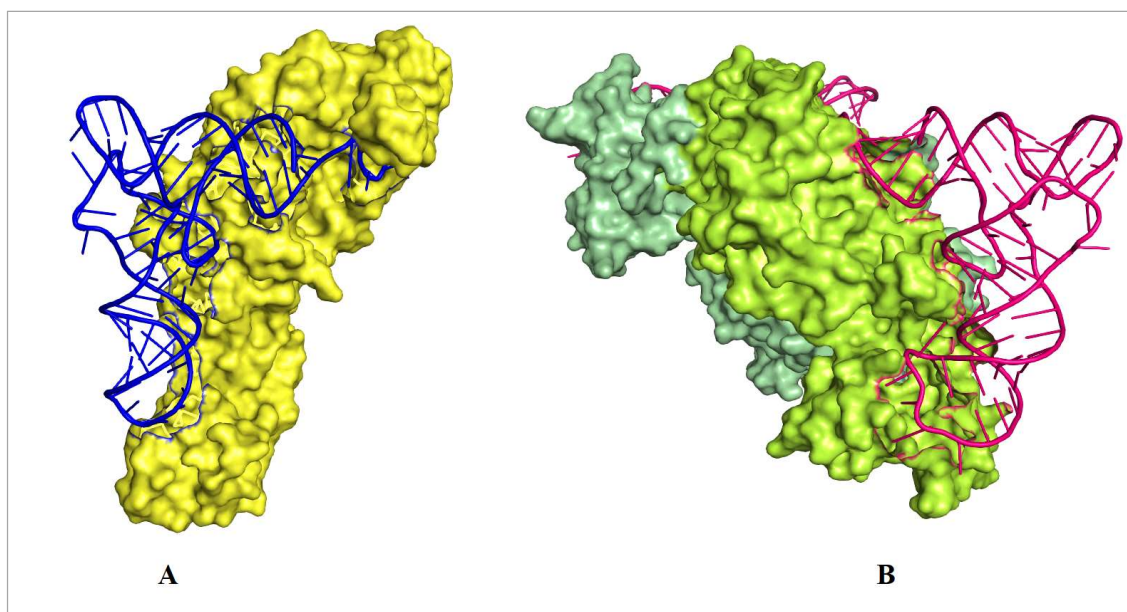
2.4.1. Podjela aminoacil-tRNA-sintetaza na razrede

Sintetaze se dijele u dva razreda (I i II), s 11, odnosno 13 članova u pojedinom razredu, a ovi pak na nekoliko podrazreda. Podjela je temeljena na strukturnim, mehanističkim i kinetičkim razlozima te rezultatima računalnih poravnanja sljedova cijelog niza aaRS koji upućuju da enzimi iz dva razreda ne dijele isto evolucijsko porijeklo^{1,3}. Podjela aaRS prema razredima i podrazredima prikazana je u Tablici 2.1.

Tablica 2.1 Podjela aminoacil-tRNA-sintetaza na razrede I i II prema M. Ibba, D. Soll, *Annu. Rev. Biochem.* **69** (2000) 617-650

Razred I		Struktura	Razred II		Struktura		
Podrazred	A	MetRS	α, α_2	Podrazred	A	SerRS	α_2
	A	LeuRS	α		A	ProRS	α_2
	A	IleRS	α		A	ThrRS	α_2
	A	ValRS	α		A	GlyRS	$\alpha_2, \alpha_2\beta_2$
	B	GluRS	α		A	HisRS	α_2
	B	GlnRS	α		B	AspRS	α_2
	B	CysRS	α		B	AsnRS	α_2
	C	TyrRS	α_2		B	LysRS	α_2
	C	TrpRS	α_2		C	AlaRS	α, α_4
	D	ArgRS	α		C	PheRS	$\alpha, \alpha_2\beta_2$
	E	LysRS	α				

Enzimi razreda I obično su monomeri, uz izuzetak TyrRS i TrpRS koje su homodimeri te MetRS koja je ponekad homodimerna. Katalitička domena enzima razreda I strukturirana je kao Rossmannova struktura sastavljena od pet paralelnih β -ploča koje povezuju α -zavojnice. Unutar aktivnog mjesta smještene su dva visokoočuvana aminokiselinska slijeda koji čine strukturne motive **HIGH** (histidil-izoleucil-glicil-histidin) i **KMSKS** (lizil-metionil-seril-lizil-serin) prisutne kod svih sintetaza razreda I, odgovorne za formiranje veznog džepa za ATP⁴⁶⁻⁴⁸. S druge strane, enzimi razreda II uglavnom su homodimeri, iako je potvrđeno i postojanje homotetramera α_4 ili heterotetramera $(\alpha\beta)_2$ (Tablica 2.1). Za razliku od katalitičke domene aaRS razreda I, kod aaRS razreda II potpuno izostaje Rossmannova struktura te visokoočuvani sljedovi prisutni kod razreda I. Umjesto njih katalitička domena enzima razreda II formirana je od sedmeročlane antiparalelne β -ploče omeđene s tri α -zavojnice. Za razred II, specifični su očuvani sljedovi različiti od očuvanih sljedova kod aaRS razreda I, koji čine strukturne motive 1, 2 i 3. Motiv 1 zaslužan je za formiranje interakcijskog sučelja dimera, dok su motivi 2 i 3 važni za pozicioniranje supstrata. Motiv 2 sudjeluje u vezanju ATP-a, aminokiseline i CCA-kraja molekule tRNA, dok motiv 3 sudjeluje u vezivanju ATP-a. U konačnici velika strukturna razlika dva razreda je i način vezivanja tRNA^{3,48} (Slika 2.6).



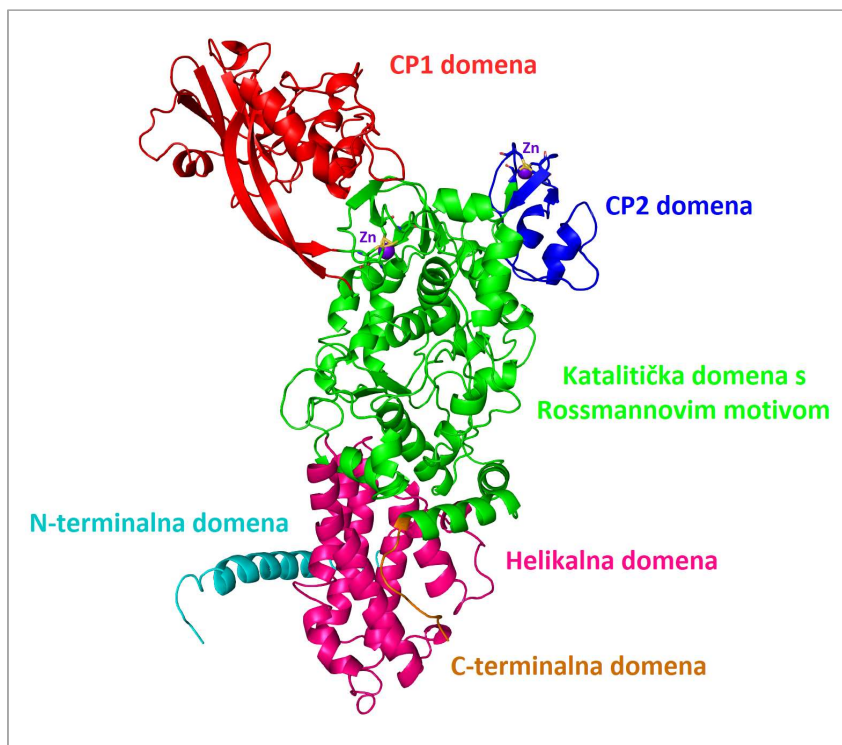
Slika 2.6 Usporedba načina na koje GlnRS (A) i AspRS (B) vežu pripadne tRNA^{Gln} i tRNA^{Asp}. AaRS razreda I, pa tako i GlnRS vežu tRNA sa strane malog utora akceptorske peteljke, dok sintetaze razreda II, među njima i AspRS pripadnu tRNA vežu sa strane velikog utora akceptorske peteljke. Prilikom vezivanja tRNA na aaRS razreda I dolazi do distorzije konformacije 3'-kraja molekule. Slika priređena prema proteinskim strukturama: **1G59** i **1ASY** deponiranim u PDB bazi podataka.

Osim strukturno, dva razreda aaRS razlikuju se mehanistički, a posljedično i kinetički. Prvi korak reakcije aminoacilacije – nastajanje aminoacil-adenilata razlikuje se kod dva razreda. Kod enzima razreda I pretpostavlja se da kinetički efekt dominantno proizilazi iz dovođenja supstrata (aminokiseline i Mg-ATP kompleksa) u prostornu blizinu i orijentaciju (*engl. catalysis by proximity and orientation*), a djelomično i zbog elektrofilne katalize. U odnosu na enzime razreda I, kod enzima razreda II elektrofilna kataliza najznačajnije doprinosi kinetičkom efektu. Mehanizam drugog koraka reakcije aminoacilacije – reakcije transesterifikacije je sličan u dva razreda uz važnu razliku da aaRS razreda I kataliziraju nastanak esterske veze aminokiseline i 2'-hidroksilne skupine riboze terminalnog adenzina CCA-kraja tRNA, nakon čega se aminokiselina u reakciji transesterifikacije prenosi na 3'-hidroksilnu skupinu terminalnog adenzina CCA-kraja tRNA. S druge strane, sintetaze razreda II izravno esterificiraju 3'-hidroksilnu skupinu riboze terminalnog adenzina CCA-kraja tRNA. Kinetički gledano, dva se razreda aaRS razlikuju po koraku koji određuje brzinu reakcije: dok je korak koji određuje brzinu reakcije za aaRS razreda I otpuštanje aminoacilirane tRNA, kod enzima razreda II najsporiji korak je nastajanje aminoacil-adenilata u prisutnosti tRNA (revijalno prikazano u Ref. 3).

2.4.2. Isoleucil-tRNA-sintetaza

Isoleucil-tRNA-sintetaza iz *E. coli* (EcIleRS) (EC 6.1.1.5) katalizira reakciju esterifikacije izoleucina na dvije izoakceptorske molekule tRNA^{Ile}. Prema klasifikaciji aaRS, ubraja se u razred I, podrazred IA^{1,3}. Nažalost, struktura EcIleRS još uvijek nije razriješena. Do sada su uspješno riješene strukture IleRS iz bakterije *Thermus thermophilus* (TtIleRS) u kompleksu s nehidrolizabilnim analogom izoleucil-adenilata, 5'-N-[N-(L-izoleucil)sulfamoil]adenozinom i antibiotikom i inhibitorom mupirocinom⁴⁷, odnosno valinom i izoleucinom⁴⁹ te IleRS iz bakterije *Staphylococcus aureus* (SaIleRS) u kompleksu s tRNA^{Ile} i mupirocinom⁵⁰.

IleRS iz *Thermus thermophilus* (TtIleRS), monomerni je enzim tercijarne strukture oblika grčkog slova Γ (gama), čije su dimenzije 100 Å x 80 Å x 45 Å i molarne mase 120 kDa. U strukturi enzima (Slika 2.7) razlikuje se nekoliko domena: katalitička domena u obliku Rossmannove strukture, domene CP1 i CP2 (*engl. connective peptide*), C-terminalna te N-terminalna domena, kao i helikalna tRNA-vezujuća domena^{47,49}. U strukturi IleRS iz bakterije *Staphylococcus aureus* (SaIleRS), osim domena prisutnih kod TtIleRS, nalazi se i C-terminalna cink-vezujuća domena, odsutna kod TtIleRS⁵⁰.

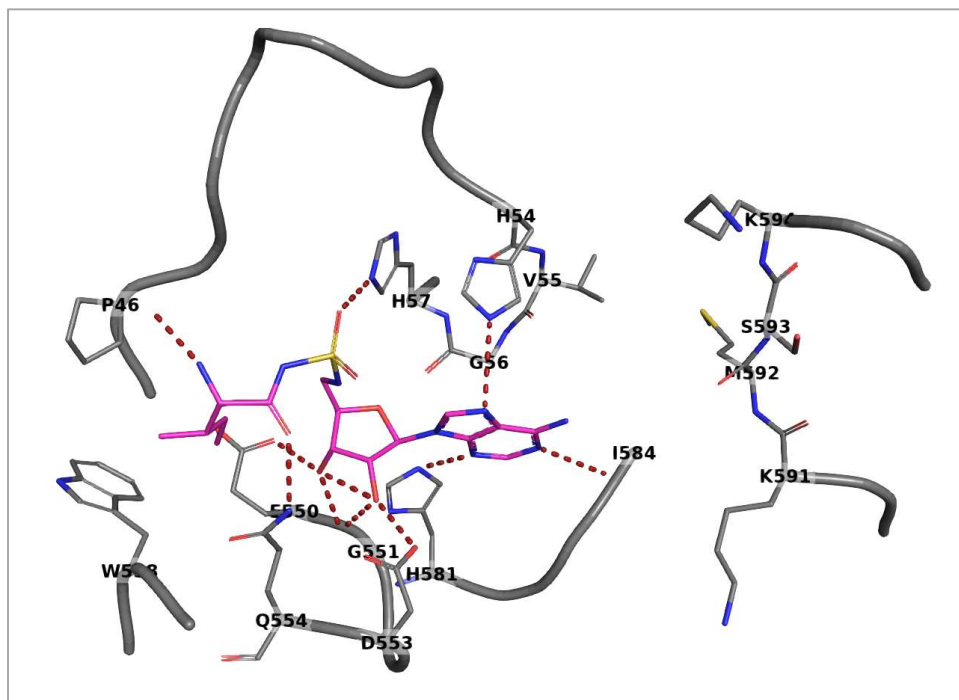


Slika 2.7 Struktura izoleucil-tRNA-sintetaze iz bakterije *Thermus thermophilus*. Različitim bojama prikazane su pojedine domene ili selekcije: CP1 domena (crveno), CP2 domena (plavo), katalitička domena s Rossmannovim motivom (zeleno), helikalna tRNA-vezujuća domena (magenta), N-terminalna domena (plavo) te C-terminus (narančasto). Dva iona cinka su prikazana ljubičastim kuglicama. Asignacija pojedinih domena prema O. Nureki, *et al.*, *Science* **280** (1998) 578-582.

I TtIleRS i SaIleRS su metaloenzimi koji u svojoj strukturi imaju dva iona cinka tetraedatski koordinirana cisteinskim bočnim ograncima, no njihov položaj u strukturi TtIleRS i SaIleRS nije isti. Cinkovi ioni kod TtIleRS su prisutni u CP2 i katalitičkoj domeni⁴⁹, dok je kod SaIleRS jedan cinkov ion koordiniran u CP2 domeni, a drugi je koordiniran u C-terminalnoj cink-vezujućoj domeni, odsutnoj kod TtIleRS. Iako je zbog popunjene koordinacijske sfere metalnih iona njihova uloga primarno strukturna, kod SaIleRS cinkov ion u C-terminalnoj cink-vezujućoj domeni, osim strukturne ima i ulogu u procesu prepoznavanja tRNA⁵⁰.

Sintetsko aktivno mjesto TtIleRS karakteristično je za aaRS razreda I i građeno je kao Rossmannova struktura. Analizom strukture TtIleRS u kompleksu s nehidrolizabilnim analogom izoleucil-adenilata, 5'-N-[N-(L-izoleucil)sulfamoil]adenozinom (Slika 2.8) može se ustanoviti da ATP stupa u interakcije s bočnim ograncima aminokiselina iz dva karakteristična motiva aaRS razreda I: His⁵⁴, Val⁵⁵, Gly⁵⁶, His⁵⁷ (HVGH) i Lys⁵⁹², Met⁵⁹³, Ser⁵⁹⁴ te Lys⁵⁹⁵

(KMSK), očuvanih kod svih aaRS razreda I^[46]. Hidrofobni bočni ogranak izoleucina pozicionira se Van der Waalsovima interakcijama u hidrofobni džep građen od bočnih ogranaka Gly⁴⁵, Pro⁴⁶, Trp⁵¹⁸, Glu⁵⁵⁰ i Trp⁵⁵⁸ [47]. Hidrofobni džep akomodira i aminokiseline s manjim hidrofobnim bočnim ogranakom, kakva je valin, ali je uspješan u diskriminiranju aminokiselina s većim bočnim ogranakom.

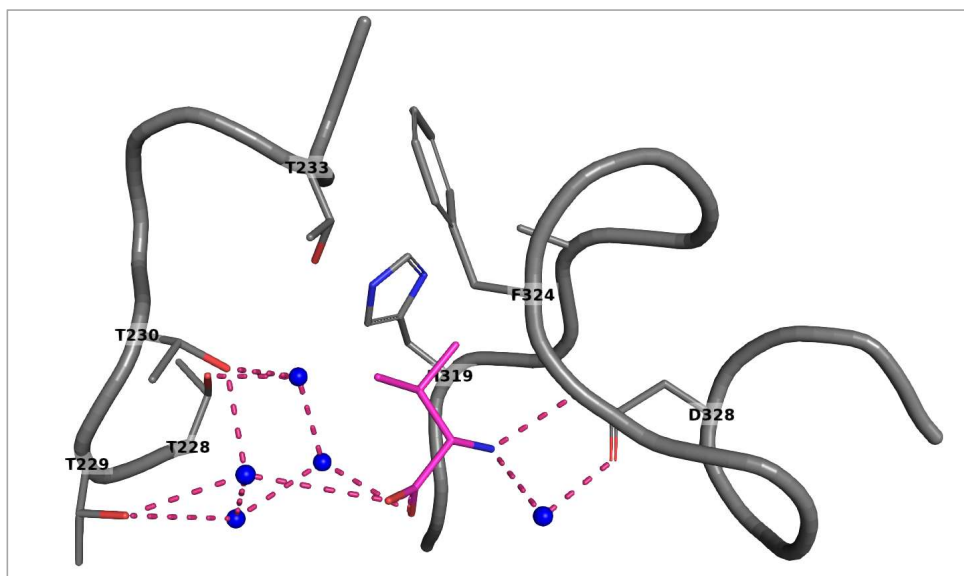


Slika 2.8 Struktura sintetskog aktivnog mjesta IleRS iz bakterije *T. thermophilus* u koje je vezan nehidrolizabilni analog izoleucil-adenilata, 5'-N-[N-(L-izoleucil)sulfamoil]adenozin (Ile-AMS). Ključni bočni ogranaci koji stabiliziraju Ile-AMS u sintetskom mjestu te Ile-AMS prikazani su modelom štapića. Dijelovi polipeptidne okosnice prikazani su sivom vrpcom. Iz prikaza se može ustanoviti da ATP stupa u interakcije s bočnim ogranacima aminokiselina iz dva karakteristična motiva aaRS razreda I: His⁵⁴, Val⁵⁵, Gly⁵⁶, His⁵⁷ (HVGH) i Lys⁵⁹², Met⁵⁹³, Ser⁵⁹⁴ Lys⁵⁹⁵. Hidrofobni bočni ogranak izoleucina pozicionira se u hidrofobni džep građen od bočnih ogranaka Gly⁴⁵, Pro⁴⁶, Trp⁵¹⁸, Glu⁵⁵⁰ i Trp⁵⁵⁸. Slika priređena prema PDB: **1JZQ**

Zbog izuzetno male razlike u strukturi izoleucina i valina, IleRS u sintetskoj reakciji ne može zadovoljavajuće diskriminirati nepripadni valin od izoleucina. U sintetskoj se reakciji, izoleucin od valina diskriminira s faktorom oko 200, što je nedovoljno za postizanje razine točnosti od 1/3300 potrebne za osiguravanje odgovarajuće razine mistranslacije⁵¹. Kako bi spriječila misacilaciju, IleRS se oslanja na kombinaciju svih triju mehanizama popravka pogreške: tRNA-ovisnog i tRNA-neovisnog popravka pogreške prije prijenosa, ali i popravka

pogreške nakon prijenosa. Popravak prije prijenosa doprinosi s 30 % ukupnog popravka, dok je glavni mehanizam popravka pogreške popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline⁹.

Reakcija popravka pogreške nakon prijenosa, odnosno hidroliza Val-tRNA^{Ile} kod *T. thermophilus* odvija se unutar deacilacijskog aktivnog mjesta u domeni CP1 koja je 34 Å udaljena od sintetskog aktivnog mjesta^{49,51-52}. Aktivno mjesto u CP1 domeni građeno je od dva visokoočuvana peptidna segmenta: Gly³¹⁴-Thr-Gly-X-Val-His te Trp²²⁷-(Thr)₃-Pro-Trp-Thr-(X)₃-Asn. Dva visokoočuvana hidrofobna bočna ogranka: Trp²³² i Tyr³⁸⁶ čine vezno mjesto koje je sterički optimirano za vezivanje valina, ali ne i izoleucina⁵². His³¹⁹ iz prvog te Thr²²⁸, Thr²³⁰, Thr²³³ te Asn²³⁷ iz drugog očuvanog segmenta u prostornoj su blizini i podsjećaju na katalitičku trijadu pronađenu kod serinskih proteaza. Molekule vode također su vezane u ovom aktivnom mjestu dodatno sugerirajući njegovu hidrolitičku aktivnost^{49,52} (Slika 2.9). Rješavanje kristalne strukture SallERS u kompleksu s tRNA dalo je uvid u način na koji se misacilirana Val-tRNA^{Ile} doprema do aktivnog mjesta CP1 domene. Steitz *et al.* su pokazali da akceptorska peteljka tRNA^{Ile} mijenja konformaciju tako da se omogući translokacija 3'-kraja tRNA iz sintetskog aktivnog mjesta u deacilacijsko mjesto u CP1 domeni, uz istovremenu rotaciju CP1 domene za 47° obzirom na tijelo enzima⁵⁰.



Slika 2.9. Hidrolitičko aktivno mjesto u CP1 domeni TtIleRS s vezanim valinom. Molekula valina prikazana je štapićastim modelom u purpurnoj boji. Bočni ogranak valina se pozicionira u hidrofobni džep koji tvore Thr²³³, His³¹⁹, Ala³²¹ i Phe³²⁴. Protonirana amino skupina valina ostvaruje vodikove veze s bočnim ogranakom Asp³²⁸ te karbonilnom skupinom His³¹⁹. Karboksilna skupina valina ostvaruje vodikove veze preko molekula vode (prikazane kao plave kuglice) s bočnim ograncima Thr²²⁹, Thr²³⁰ kao i karbonilnim skupinama Trp²²⁷ i Phe³²⁴. Slika priređena prema PDB: 1UE0.

Uzimajući u obzir nezadovoljavajuću diskriminaciju sintetskog mjesta za izoleucin u odnosu na valin i norvalin, domena za popravak pogreške nužna je za osiguravanje aminoacilacijske točnosti. U soju *E. coli* koji ima inaktiviranu domenu za popravak pogreške IleRS zbog zamjene aminokiselina 241-250 unutar domene CP1 alaninima izgubljena je aktivnost popravka pogreške nakon prijenosa IleRS. Posljedica inaktivacije domene za popravak pogreške nakon prijenosa IleRS rezultira prijenosom valina ili norvalina na tRNA^{Ile} [15]. Analiza proteoma soja s inaktiviranom CP1 domenom IleRS tehnikama spektrometrije masa pokazuje da dolazi do globalne ugradnje valina i norvalina na do 20 % ukupnih izoleucinskih položaja u cijelom proteomu prilikom uzgoja soja u mediju s 2 mmol dm⁻³ egzogeno dodanih nepripadnih aminokiselina¹⁰.

2.5. Mistranslacija u stanicama

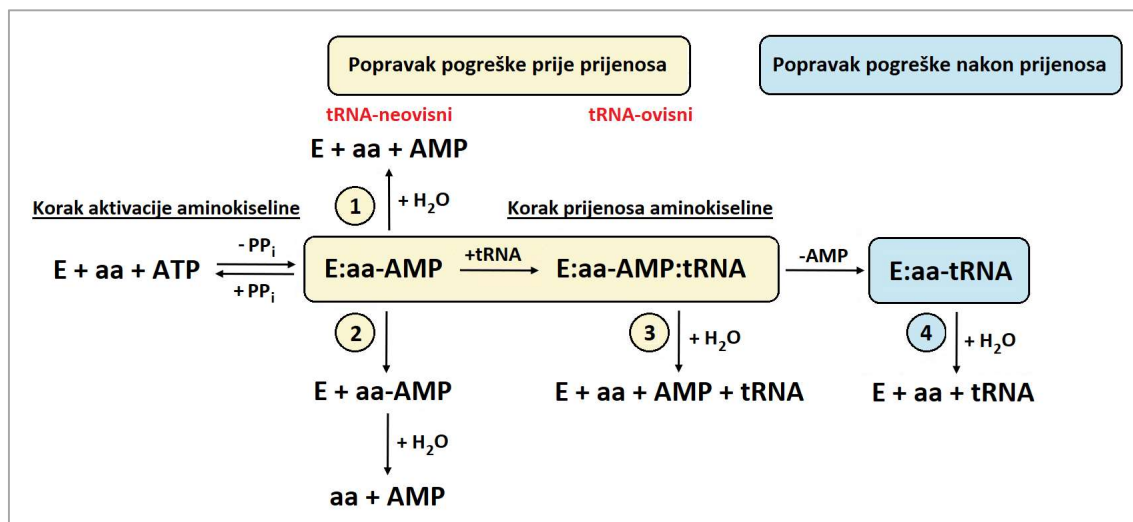
2.5.1. Točnost aminoaciliranja i mehanizmi popravka pogreške aminoacil-tRNA-sintetaza

Aminoacil-tRNA-sintetaze izuzetno su točni enzimi – pretpostavka je da se misacilacije događaju u samo 0,03 % ukupnih reakcija aminoaciliranja^{4,51}. Iako se smatra da se visoka točnost aaRS razvila kao posljedica evolucijskih pritisaka koji su favorizirali vjerno translirane stanične proteine³, naše razumijevanje potreba stanice za aminoacilacijskom točnošću još uvijek nije potpuno. I dok se gubitak sposobnosti popravka pogreške aaRS veže uz razvitak degenerativnih stanja, primjer čega je neurodegeneracija kod miša nastala kao posljedica nefunkcionalnih mehanizama popravka pogreške alanil-tRNA-sintetaze⁴⁵, postupno se otkriva da mistranslacija može povećati adaptivni potencijal stanica. Tako u uvjetima oksidativnog stresa, fosforilacija ključnih bočnih ogranaka metionil-tRNA-sintetaze (MetRS) rezultira povećanom mismetionilacijom nepripadnih tRNA i posljedično pojačanom mistranslacijom proteina metioninom. Povećani broj redoks aktivnih metioninskih bočnih ogranaka u proteinima smanjuje vjerojatnost oksidacije drugih aminokiselina u proteinu⁵³.

Kako bi postigle zadovoljavajuću točnost reakcije aminoaciliranja, aaRS koriste nekoliko različitih mehanizama osiguravanja točnosti. Temeljni mehanizam osiguravanja točnosti, prisutan kod svih aaRS je diskriminacija supstrata, prvenstveno aminokiselina, na osnovu njihovih kemijskih i steričkih svojstava u koraku vezivanja na enzim te aktivacije aminokiseline. Diskriminacija u koraku vezivanja supstrata je dostatna za postizanje potrebne aminoacilacijske točnosti kod nekih aaRS. Tako cisteinil-tRNA-sintetaza, čiji su potencijalni

nepripadni supstrati alanin i serin, iste od cisteina izuzetno dobro diskriminira već u koraku vezivanja na enzim, zbog čega dodatni popravak pogreške nije nužan⁵⁴. Ipak, većina aaRS ima poteškoće kod diskriminacije pripadne aminokiseline od nepripadnih u koraku vezivanja te stoga moraju imati dodatne mehanizme kojima osiguravaju potrebnu točnost.

Popravak pogreške može se odvijati neposredno nakon koraka aktivacije i prije prijenosa aminokiseline na tRNA ili nakon koraka prijenosa. (Slika 2.10) U prvom slučaju radi se o popravku pogreške prije prijenosa, a u drugom o popravku pogreške nakon prijenosa aminokiseline. Popravak prije prijenosa podrazumijeva nekoliko zasebnih mehanizama. Moguća je enzimaska hidroliza reakcijskog međuprodukta, aminoacil-adenilata, u sintetskom mjestu odgovarajuće aaRS koja može biti tRNA-ovisna (Slika 2.10, reakcijski put 3) ili tRNA-neovisna (Slika 2.10, reakcijski put 1). Osim toga, moguća je tRNA-neovisna disocijacija aminoacil-adenilata praćena neenzimskom hidrolizom istog u citosolu (Slika 2.10, reakcijski put 2) (revijalno prikazano u Ref. 3, 48). Popravak pogreške nakon prijenosa podrazumijeva hidrolizu aminoacilirane tRNA u zasebnoj deacilacijskoj domeni, nazvanoj još i domenom za popravak pogreške (Slika 2.10, reakcijski put 4). Ovisno o tipu aaRS može se odvijati *in trans* – misacilirana tRNA se veže u deacilacijsku domenu, nakon prethodne disocijacije iz aktivnog mjesta, odnosno *in cis* – pri čemu se samo 3'-kraj tRNA s vezanom aminokiselinom translocira u domenu za popravak (revijalno prikazano u Ref. 3, 48).



Slika 2.10 Shematski prikaz mehanizama popravka pogreške aaRS. Popravak pogreške prije prijenosa može se odvijati kroz disocijaciju aminoacil-adenilata (2) ili njegovu enzimsku hidrolizu (1 i 3). Popravak pogreške prije prijenosa može biti tRNA-ovisan (3) ili tRNA-neovisan (1). Popravak pogreške nakon prijenosa podrazumijeva deacilaciju misacilirane tRNA u zasebnoj deacilacijskoj domeni (4). Slika je preuzeta i prilagođena prema: N. Cvetešić *et al.*, *EMBO J.* **33** (2014) 1639-1653

2.5.2. Mistranslacija i stanični mehanizmi osiguravanja translacijske točnosti

Svaka pogreška u biosintezi proteina koja rezultira ugradnjom nepripadne aminokiseline u protein na mjesto aminokiseline koja je kodirana genetičkim kodom može se nazvati mistranslacijom⁵⁵. Uzimajući u obzir važnost proteina za stanicu, dugogodišnje rašireno mišljenje da translacija mora biti izuzetno točna, s racionalne strane bilo je opravdano, budući da su pravilna regulacija, visoka brzina i točnost tog procesa esencijalni za opstanak stanice. S druge strane, znanstvena intuicija sugerirala je da translacijska mašinerija, koliko god ona sofisticirana bila, mora imati gornju granicu točnosti. Naime, stanica koja bi biosintezu proteina provodila izuzetno točno, istu bi morala provoditi sporo, možda čak sporije od generacijskog vremena organizma, što bi bilo biološki neracionalno. Biološki racional je, kako se čini, dopustiti određenu razinu mistranslacije, kako bi se proces biosinteze proteina odvijao prihvatljivom brzinom⁵⁵. Da je biosinteza proteina podložna greškama i da mistranslacije nisu izuzetak, znalo se još od 70-ih godina prošlog stoljeća⁵⁶⁻⁵⁷, ali nažalost, pitanje točne kvantifikacije mistranslacija je i dalje otvoreno pitanje u struci. Stajalište je da je razina mistranslacije u prosječnoj bakterijskoj stanici koja raste u normalnim uvjetima na razini jednog pogrešno transliranog kodona na njih 10000 pravilno transliranih^{4,58}, što je više od, ali ipak dovoljno slično razini transkripcijske pogreške u *E. coli* koja iznosi oko 1:100000⁵⁹. Točnost translacije ovisi o točnosti niza sukcesivnih molekulskih događaja koji svaki za sebe imaju inherentnu pogrešku: reakciji aminoaciliranja, diskriminaciji elongacijskog faktora Tu za aminoacilirane tRNA te mehanizmima osiguravanja točnosti na ribosomu^{13,55,60}.

Aminoacil-tRNA-sintetaze osiguravaju staničnu zalihu pravilno aminoaciliranih tRNA koje su supstrati u ribosomskoj biosintezi proteina, pri čemu je točnost koraka aminoaciliranja ključna za održavanje translacijske točnosti⁵⁵. Naime, aminoacil-tRNA-sintetaze selektiraju aminokiseline i tRNA iz staničnih zaliha istih, osiguravajući isključivo vezivanje aminokiseline na njezinu pripadnu tRNA. Rigorozna kontrola dvostupanjske reakcije aminoaciliranja (potpoglavlje 2.5.1.) osigurava prihvatljivu razinu misacilacije, a posljedično mistranslacije.

Aminoacilirane tRNA disociraju s aaRS te ulaze u reverzibilni kompleks s elongacijskim faktorom Tu te se kao takve dopremaju do A-mjesta ribosoma. U slučaju da su antikodon aa-tRNA i kodon mRNA u A veznom mjestu komplementarni, dolazi do hidrolize GTP-a vezanog na EF-Tu te konformacijske promjene koja rezultira smanjenim afinitetom prema aa-tRNA. Nastali EF-Tu:GDP disocira s ribosoma, dok aa-tRNA zaostaje vezana u A-mjesto ribosoma^{18,22} (poglavlje 2.1). Iako doprinosi smanjenim opsegom, EF-Tu sudjeluje u

osiguranju translacijske točnosti. LaRivier *et al.* su pokazali da EF-Tu mehanizmom termodinamičke kompenzacije diskriminira neke misacilirane tRNA (tRNA^{Glu}/tRNA^{Gln} te tRNA^{Asp}/tRNA^{Asn}). Ukupni afinitet vezivanja EF-Tu na aminoaciliranu tRNA definiran je sumom afiniteta EF-Tu za aminokiselinu i tRNA. Što je afinitet EF-Tu prema nekoj tRNA veći to je afinitet prema prema njoj pripadnoj aminokiselini manji i obrnuto⁶¹. Promjena aminokiseline vezane na tRNA kao posljedica misacilacije rezultira nužno promjenom afiniteta Ef-Tu za datu aa-tRNA, pri čemu se diskriminacija misaciliranih tRNA zasniva ili na usporejku ili ubrzanju disocijacije misacilirane tRNA s EF-Tu, što onemogućava nastajanje produktivnih interakcija kompleksa misacilirane tRNA i EF-Tu s ribosomom^{60,61}.

Ribosom, na kojem se odvija translacija, ima ulogu provjere sparivanja ispravnog kodona na mRNA s antikodonom na aminoaciliranoj tRNA pri čemu se aminokiselina pozicionira u položaj pogodan za reakciju transpeptidacije koju katalizira peptidil-transferazni centar ribosoma (poglavlje 2.1). Prepoznavanje pravilnih kodon-antikodon interakcija osigurava se dvostupanjskim mehanizmom početne selekcije aminoacilirane tRNA te osiguranja kvalitete (*engl. proofreading*). U koraku početne selekcije aminoaciliranih tRNA, EF-Tu:GTP:aa-tRNA reverzibilno asocira u A-mjesto ribosoma pri čemu EF-Tu ostvaruje reverzibilnu interakciju s velikom podjedinicom ribosoma, sve dok ribosom vrši provjeru geometrije sparivanja antikodona tRNA i kodona mRNA. Komplementarno sparivanje potiče niz konformacijskih promjena u kompleksu EF-Tu:GTP:aa-tRNA koje stimuliraju brzu hidrolizu GTP-a, zbog koje EF-Tu:GDP disocira iz A-mjesta ribosoma, ostavljajući aminoaciliranu tRNA asociranu u A-mjestu ribosoma. S druge strane, odsutstvo komplementarnog sparivanja kodona na mRNA i antikodona na aa-tRNA ne potiče hidrolizu vezanog GTP-a, zbog čega izostaje konformacijska promjena nužna za disocijaciju EF-Tu s ribosoma. Tako asociran kompleks EF-Tu:GTP:aa-tRNA disocira iz A-mjesta ribosoma^{18,22,55,60}. Mehanizmi osiguravanja kvalitete su važni za osiguravanje održanja pravilnog okvira čitanja. Za vrijeme reakcije transpeptidacije te translokacije, ribosom aktivno provjerava je li došlo do narušavanja ispravnih kodon-antikodon interakcija, odnosno promjene okvira čitanja mRNA. Ukoliko se ustanovi prisustvo nepravilnog kodon-antikodon para u P-mjestu ribosoma dolazi do gubitka specifičnosti A-mjesta ribosoma, što rezultira nastankom aberantnih polipeptidnih lanaca i preuranjenom terminacijom translacije⁵⁵.

2.5.3. Pozitivni i negativni aspekti mistranslacije

Mistranslacijom nastaju proteini koji nisu u skladu s genetičkom uputom, zbog čega potencijalno dolazi do promjena u njihovoj strukturi, termičkoj stabilnosti ili aktivnosti, pri čemu je negativni efekt izravno povezan s razlikom u svojstvima pripadne i nepripadne aminokiseline ugrađene na nekom položaju u proteinu⁶⁰. Najčešća posljedica mistranslacije je gubitak funkcije proteina, agregacija u netopljive agregate ili pojačana ekspresija staničnih proteina odgovora na toplinski stres (HSP) u cilju stabilizacije i pravilnog smatanja krivo smotanih proteina (poglavlje 2.3).

Budući da su mehanizmi kojima aminoacil-tRNA-sintetaze osiguravaju točnost esencijalni za osiguravanje translacijske točnosti, njihovom inaktivacijom potiče se sporadična misacilacija te posljedično mistranslacija. Kako bi se ispitali negativni učinci mistranslacije, provedena su brojna istraživanja na bakterijskim sojevima u kojima određena aaRS ima ugašen popravak pogreške. Praćenjem rasta takvih sojeva te određivanjem svojstava proteoma ili pojedinačnih staničnih proteina u takvim sojevima može se zaključiti o utjecaju mistranslacije.

Pokazano je da u soju *E. coli* s ugašenim popravkom pogreške IleRS dolazi do ugradnje valina i norvalina u stanične proteine što rezultira nastankom „statističkih“ proteina *in vivo*¹⁵. Bacher *et al.* su pokazali da sojevi s ugašenim popravkom pogreške IleRS imaju smanjenu vijabilnost kod uzgoja i u bogatom i u minimalnom hranjivom mediju te prilikom uzgoja pri 37 °C i 42 °C. Inhibicija rasta posebno je bila naglašena prilikom uzgoja pri povišenoj temperaturi u minimalnom hranjivom mediju. Prilikom uzgoja pri temperaturama 25-30 °C brzine rasta soja s ugašenim popravkom pogreške izjednačile su se s vrijednostima izmjerenim za divlji tip soja. Uzimajući to u obzir, autori su pretpostavili da je temeljni utjecaj mistranslacije promjena termičke stabilnosti proteina, zbog čega je pri višim temperaturama povećana koncentracija nepravilno smotanih ili agregiranih proteina. U eksperimentima je uočena i povećana osjetljivost soja s ugašenim popravkom pogreške IleRS (u odnosu na divlji tip soja) prema antibioticima koji utiču na pravilnu aktivnost ribosoma. Efekti su pripisani promjeni svojstava ribosomskih proteina⁶².

Istraživanja negativnih utjecaja mistranslacije provedena su i na eukariotskim stanicama. U pionirskom istraživanju Lee *et al.* su po prvi puta pokazali da gubitak mogućnosti popravka pogreške alanil-tRNA-sintetaze (AlaRS) izaziva akumulaciju citotoksičnih proteinskih agregata u terminalno diferenciranim stanicama neurona miša. Kao posljedica toga javljaju se ataksija i gubitak cerebralnih Purkinjeovih stanica u mozgu miša⁴⁵.

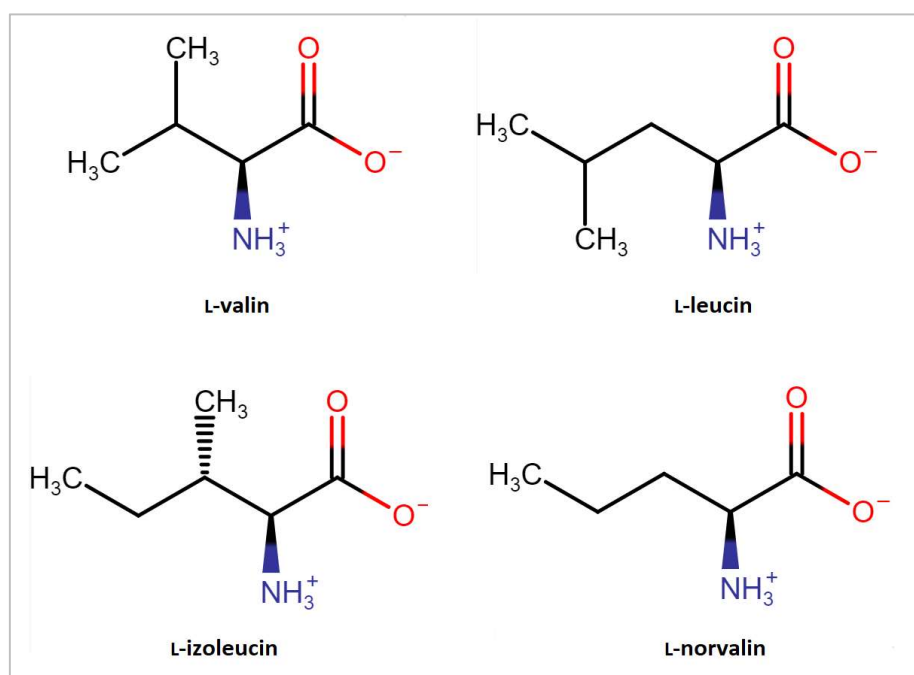
Iako je desetljećima poznato da se translacijske pogreške događaju te su njihovi negativni učinci poznati, dugo se smatralo da je paradigma bioloških sustava minimizirati razinu translacijske pogreške implementiranjem striktnih mehanizama osiguranja kvalitete. Naime, odsustvo mehanizama osiguranja kvalitete translacije dovelo bi do rasipanja nutrijenata i energije na biosintezu proteina koji bi potencijalno bili citotoksični zbog nefunkcionalnosti ili sklonosti agregaciji^{13,55}. U rijetkim slučajevima, mistranslacija može rezultirati poboljšanom ili čak novom funkcijom proteina.

Fluktuacije u temperaturi, osmomolarnosti i dostupnosti pojedinih makro- i mikronutrijenata, stanici predstavljaju stres ukoliko izlaze iz okvira uobičajenih fizioloških vrijednosti⁶³. Posebno značajan izvor staničnog stresa su reaktivne kisikove vrste (*engl. reactive oxygen species, ROS*) koje mogu izazvati redoks oštećenja bioloških makromolekula (lipida, ugljikohidrata, proteina i nukleinskih kiselina). Kako bi spriječile radikalsko oštećenje, stanice sintetiziraju cijeli niz specijaliziranih skupina proteina kakve su: superoksid-dismutaze, peroksidaze te katalaze⁶⁴. Tek je nedavno otkriveno da promjena translacijske točnosti može imati važnu ulogu u adaptaciji stanice na oksidativni i termički stres. Lee *et al.* su pokazali da kod pojačanog oksidativnog stresa dolazi do fosforilacije ključnog ogranka u CP1 domeni metionil-tRNA-sintetaze (MetRS), što povećava vjerojatnost mismetionilacije. Veliki broj metionina u polipeptidnom lancu proteina djeluje kao mamac za reaktivne kisikove vrste – oksidacijom bočnog ogranka metionina spriječava se oksidacija drugih, važnijih bočnih ogranaka u proteinu⁵³. Smanjenje točnosti aminoacilacije na MetRS pokazalo se važnim i kod odgovora stanica na temperaturni stres. Hipertermofilne arheje, kakva je *Aeropyrum pernix* mogu rasti u temperaturnom rasponu 70-100 °C, i iako točni mehanizam adaptacije nije poznat, smatra se da važan doprinos daje misacilacija na MetRS. Naime, pokazano je da pri niskim temperaturama, *A. pernix* aktivno misacilira tRNA^{Met} alaninom. Za odabrane enzime iz *A. pernix* kakva je citrat-sintaza pokazano je da mistranslacija metioninskih položaja u proteinu alaninom daje enzim koji je funkcionalan pri nižim temperaturama od nemistranslatiranog⁶⁵.

Na kraju, smatra se da je mistranslacija izuzetno važna za poticanje fenotipske raznolikosti kod patogena. Mnogi patogeni mikrobi iz roda *Micoplasmaceae* kodiraju nekoliko aaRS s djelomično ili potpuno ugašenim mehanizmima popravka pogreške, zbog čega su iste izuzetno sklone misacilacijama. Vjeruje se da statistički mistranslatirani proteini koji nastaju kao posljedica misacilacija doprinose fenotipskoj raznovrsnosti membranskih proteina koja je nužna za izbjegavanje imunološkog odgovora u inficiranom domaćinu⁶⁶.

2.5.4. Mistranslacija proteina norvalinom

Norvalin je neproteinogena aminokiselina, strukturno slična aminokiselinama razgranatog bočnog ogranka: izoleucinu, leucinu i valinu (Slika 2.11). Koliko je do sada poznato, norvalin je kao prirodna proteinogena komponenta pronađen samo u jednom antifungalnom peptidu porijeklom iz *Bacillus subtilis*⁶⁷.



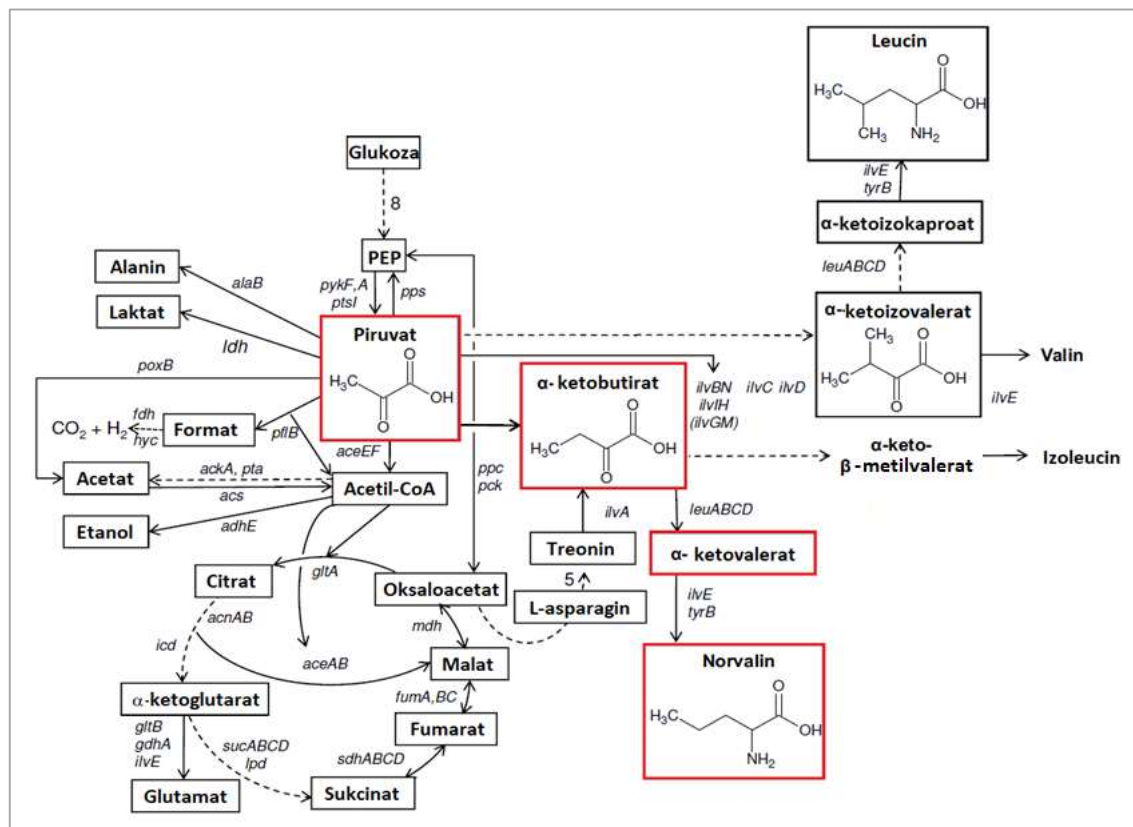
Slika 2.11 Strukturne formule L-valina, L-leucina, L-izoleucina te L-norvalina. Lako se uočava izuzetna strukturna sličnost norvalina s leucinom, izoleucinom i valinom od kojih se norvalin razlikuje po odsutstvu jedne metilne skupine. Slika je izrađena korištenjem programskog paketa *ChemDraw* prema podacima dostupnim u bazi podataka *Drugbank* za zapise: DB00149, DB00167, DB04185 te DB00161.

U normalnim uvjetima rasta stanica, norvalin je neproteinogen i njegova ugradnja u proteine najčešće je posljedica misacilacije na aminoacil-tRNA-sintetazama razreda IA, izoleucil-tRNA-sintetazi te leucil-tRNA-sintetazi. Pokazano je da u koraku aktivacije aminokiseline mjerenom u uvjetima ustaljenog stanja, divlji tip izoleucil-tRNA-sintetaze iz *E. coli* norvalin u odnosu na izoleucin diskriminira s faktorom diskriminacije 238^{10,68}, dok u istom koraku leucil-tRNA-sintetaza norvalin, u odnosu na leucin, diskriminira faktorom diskriminacije od samo 116⁶⁹. Istovremeno, obje sintetaze norvalin ne diskriminiraju ni u koraku prijenosa aminokiseline na tRNA. Tako je korak prijenosa norvalina na tRNA^{lle} kataliziran izoleucil-tRNA-sintetazom s ugašenim popravkom pogreške nakon prijenosa,

jednako brz kao i prijenos izoleucina na tRNA^{Ile} [10,68], dok je prijenos norvalina na tRNA^{Leu} čak i brži od prijenosa leucina na tRNA^{Leu} na leucil-tRNA-sintetazi s ugašenim popravkom pogreške⁷⁰. Uzimajući u obzir odsustvo kinetičke diskriminacije norvalina u oba koraka reakcije aminoacilacije, kao i vrijednost minimalnog faktora diskriminacije od 1/3300 potrebnog za postizanje prihvatljive translacijske točnosti^{4,58}, postaje jasno da je popravak pogreške nužan kako bi se osigurala zadovoljavajuća točnost biosinteze proteina⁷⁰. U prilog tome govore *in vivo* istraživanja na mutiranim sojevima *E. coli* s inaktiviranom domenom za popravak pogreške. U sojevima u kojima je ugašen popravak pogreške LeuRS, opaža se globalna ugradnja norvalina i do na 10 % ukupnih leucinskih položaja u proteinima⁷¹, dok je sličan efekt pokazan i u istovjetnim istraživanjima na IleRS. Uzgojem soja s inaktiviranom domenom za popravak pogreške IleRS u mediju suplementiranom valinom, odnosno norvalinom do koncentracije s 2 mmol dm⁻³, opaža se supstitucija do 20 % ukupnih izoleucinskih položaja valinom, odnosno norvalinom¹⁰.

U normalnim fiziološkim uvjetima norvalin je u stanicama *E. coli* prisutan u niskim količinama (ispod praga detekcije) čak i pri uvjetima kada je stanična kultura dosegla izuzetno visoku vrijednost optičke gustoće, mjerene pri 600 nm (> 40)⁶. Značajan porast koncentracije norvalina u *E. coli* opaža se tijekom uzgoja stanica u mediju bogatom glukozom u mikroaerobnim uvjetima, prilikom čega dolazi do akumulacije piruvata⁶⁻⁸ te u slučaju značajne promjene stanične zalihe aminokiselina razgranatog lanca, posebice leucina⁸. U slučaju rasta bakterijskih stanica u mikroaerobnim uvjetima na mediju bogatom glukozom, snažna aktivacija procesa glikolize spregnuta s inhibicijom ciklusa limunske kiseline u uvjetima oskudice kisikom¹⁶, rezultira akumulacijom piruvata koji je zajednički prekursor u biosintezi izoleucina, leucina i valina, ali i norvalina koji nastaje kao nusprodukt (Slika 2.12). Soini *et al.* pokazali su da se u mikroaerobnim uvjetima norvalin može akumulirati čak do milimolarne koncentracije⁶. S druge strane, da promjene stanične zalihe aminokiselina razgranatog lanca mogu povećati koncentraciju staničnog norvalina, pokazala je Apostolova istraživačka grupa, ustanovivši da deplecija staničnih rezervi leucina tijekom ekspresije rekombinantnog humanog hemoglobina bogatog leucinom u *E. coli* dovodi do povećane ugradnje norvalina na leucinske položaje u proteinu. Predloženo objašnjenje fenomena je bilo da u uvjetima deplecije leucina u stanici, omjer Nva/Leu postaje veći te shodno tome raste vjerojatnost češće pogrešne misacilacije izoakceptorskih tRNA za leucin norvalinom⁸.

Ravnolančani bočni ogranak norvalina ima veću konformacijsku slobodu od bočnih ogranaka izoleucina ili valina, što može uzrokovati probleme u smatanju proteina i ostvarivanju hidrofobnih kontakata u hidrofobnoj srži proteina ili na dodirnim površinama domena. Mistranslatirani proteini su potencijalno skloni gubitku aktivnosti, taloženju i agregaciji što negativno utječe na vijabilnost same stanice⁷².



Slika 2.12 Shematski prikaz biosintetskih puteva za aminokiseline razgranatog alifatskog bočnog ogranaka iz zajedničkog metaboličkog prekursora, piruvata, s pretpostavljenim sintetskim putom za norvalin. Intermedijeri u biosintetskom putu za norvalin zaokruženi su crvenom bojom. Slika je preuzeta i prilagođena prema J. Soini *et al.*, *Microb. Cell Fact.* 7 (2008) 26

2.6. Modelni proteini za mistranslaciju

2.6.1. Stanične fosfataze iz bakterije *Escherichia coli*

Fosfataze ili ortofosforne-monoester fosfohidrolaze (E.C. 3.3.3.) skupina su enzima uključenih u procese hidrolize kinetički stabilnih fosfatnih estera u stanicama. Postoji pet velikih klasa staničnih fosfataza: alkalne fosfataze, ljubičaste kisele fosfataze, kisele fosfataze male molekulske mase, kisele fosfataze velike molekulske mase te proteinske fosfataze specifične za fosfoserinske ili fosfotreoninske bočne ogranke⁷³.

Alkalne fosfataze (*engl. alkaline phosphatases, ALP*) su tipično homodimerne strukture s podjedinicama veličine ≈ 94 kDa. Posjeduju široku supstratnu specifičnost, a maksimalnu aktivnost imaju pri $\text{pH} \approx 8$ ^[73]. Katalitički mehanizam do sada proučavanih alkalnih fosfataza podrazumjeva dvostupanjsku reakciju nukleofilne supstitucije uz neto retenciju konfiguracije fosforovog atoma izlazne skupine i nastanak fosfoseril-enzim intermedijera⁷⁴. Iako je većina ALP kod viših organizama asocirana s membranama, ALP iz *E. coli* je periplazmatski protein⁷³. Aktivno mjesto fosfataza sadrži dva metalna iona cinka i jedan ion magnezija po podjedinici enzima. Analizirajući kristalnu strukturu ALP iz *E. coli*, može se ustanoviti da cinkovi ioni, razmaknuti za 4 Å tvore binuklearni metalni centar, bidentatno premošten ortofosfatom koji je produkt reakcije te inhibitor ALP. Cinkovi ioni sudjeluju u elektrofilnoj katalizi, snižavajući pK_A vrijednost serinskog bočnog ogranka i molekule vode te u stabilizaciji naboja izlazne skupine (revijalno prikazano u Ref. 75). Osim što aktivira molekulu vode potrebnu za reakciju hidrolize, ion cinka može aktivirati i alkohole te amino-alkohole, čineći ih pogodnim nukleofilima. Tako, ALP iz *E. coli* uspješno transfosforilira hidroksilnu grupu akceptora kakvi su Tris ili etanolamin. Dapače, zabilježeno je da enzimska aktivnost ALP poraste za dva puta kada je mjerena u puferu koji sadrži Tris⁷⁶.

Kisele fosfataze (*engl. acid phosphatases, ACP*) kataliziraju reakciju hidrolize fosfoestera u kiselim uvjetima, s pH optimumom $\text{pH} \approx 4$. Smatra se da je reakcijski mehanizam sličan mehanizmu ALP, budući da je pokazano da u prvom koraku reakcije dolazi do nukleofilnog napada skupine enzima na supstrat pri čemu nastaje fosfoseril-enzim intermedijer te da se dvostupanjska reakcija odvija uz očuvanje retencije fosforovog atoma fosfata, jednako kao i za ALP. Ovisno o molekulskoj masi, mogu se podijeliti na kisele fosfataze male molekulske mase (≈ 18 kDa) i kisele fosfataze velike molekulske mase (≈ 50 - 60 kDa), a mogu i ne moraju biti metalo-enzimi. Posebnu klasu čine ljubičaste kisele fosfataze, prisutne kod

biljaka i sisavaca. Ime su dobile po karakterističnoj boji otopine koja potječe od prisutstva binuklearnog željeznog centra (kod sisavaca) ili binuklearnog cinkovog centra (kod biljaka) (revijalno prikazano u Ref. 73).

Proteinske fosfataze kataliziraju defosforilaciju bočnih ogranaka fosfoserina, fosfotirozina ili fosfotreonina u proteinima. Uzimajući u obzir važnost procesa fosforilacije i defosforilacije, ovi su enzimi izuzetno važni u metaboličkoj regulaciji¹⁶. Proteinske fosfataze su u pravilu metaloenzimi, a reakcijski mehanizam im je sličan mehanizmu ostalih fosfataza. Kao i kisele i alkalne fosfataze, proteinske fosfataze su inhibirane fosfatom⁷³.

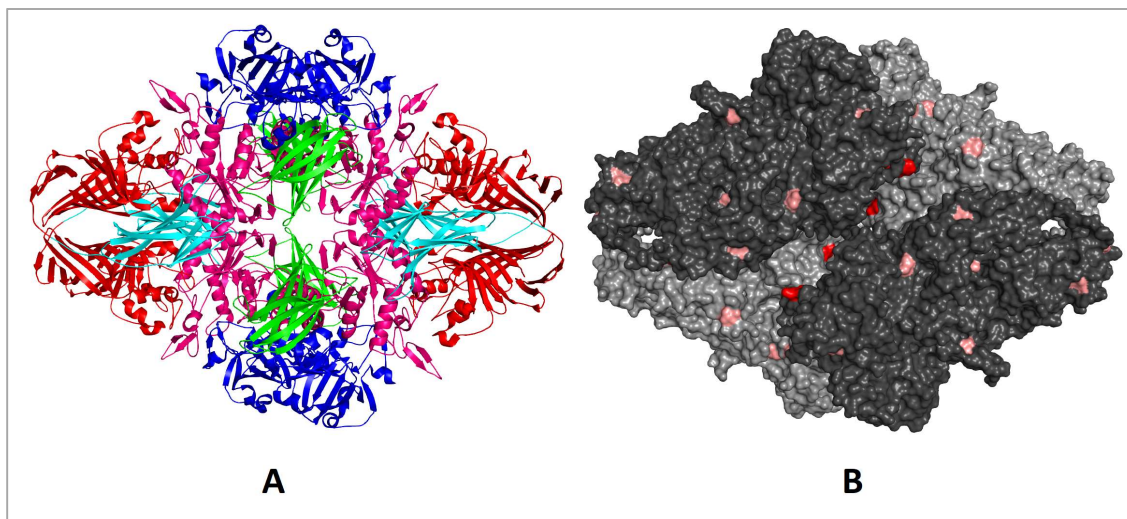
Većina fosfataza ima umjeren do visok afinitet prema kromogenom supstratu, *p*-nitrofenil-fosfatu (pNPP) (prema bazi Brenda: $0,005 < K_M / \text{mmol dm}^{-3} < 5$ za pNPP), zbog čega se njihova aktivnost u otopini lako detektira⁷⁷. Geni za neke fosfataze, među kojima je i gen za alkalnu fosfatazu iz *E. coli*, *PhoA*, dio su *Psi*-skupine gena (*engl. phosphate starvation inducible*) iz *Pho*-regulona – velikog klastera gena neophodnih za metabolizam fosfata. Osim gena za fosfataze, *Psi*-geni su i *pstSCAB* koji kodira transportni sustav za fosfate anorganskog porijekla te gen *Ugp* koji kodira za transportni sustav za glicerol-fosfat. *Psi*-klaster je odgovoran za metabolizam fosfata u uvjetima u kojima je fosfat limitirajući makronutrijent⁷⁸. Ekspresija gena iz *Pho*-regulona značajno je pojačana u uvjetima starvacije fosfatima. Tako je ekspresija alkalne fosfataze pojačana minimalno 200 puta u uvjetima rasta s limitirajućim fosfatima ($0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$) u odnosu na uvjete potpune represije ekspresije (1 mmol dm^{-3})⁷⁹. U uvjetima starvacije fosfatima, postoji također, najmanja inhibicija aktivnosti staničnih fosfataza produktom reakcije, ortofosfatom⁷³.

2.6.2. β -galaktozidaza iz bakterije *Escherichia coli*

β -galaktozidaza iz *E. coli* (Ec β -GAL) (EC: 3.2.1.23.) je hidrolitička transglukozidaza, specifična za β -D-galaktopiranozide s *O*, *N* ili *S*- glikozidnom vezom⁸⁰. Prirodni supstrat joj je laktoza, ali pri fiziološkim uvjetima pokazuje i umjeren do visok afinitet prema umjetnim kromogenim supstratima kakvi su *o*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid (oNPG) ili *p*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid (pNPG) koji se rutinski koriste za detekciju njezine aktivnosti⁸¹. Ec β -GAL je izuzetno katalitički produktivan enzim – pojedinačni tetramer enzima katalizira 38500 ± 900 reakcija u minuti, mjereno za reakciju pretvorbe slabo fluorescentnog resofurin- β -D-galaktopiranozida u visoko fluorescentni resofurin⁸². Gen za β -galaktozidazu, dio je genetskog *lac*-operona, inducibilnog alolaktosom u uvjetima rasta bakterijskih stanica na laktozi kao

jedinom izvoru ugljika, odnosno umjetnim induktorom izopropil- β -D-tiogalaktopiranozidom (IPTG)⁸⁰.

Ec β -GAL je homotetramerni metaloenzim, dimenzija 175 Å x 135 Å x 90 Å, podjedinice veličine 1023 aminokiseline i molarne mase oko 120 kDa. U strukturu pojedinog monomera ulaze jednovalentni kationi Na⁺ i K⁺ te dvovalentni kation Mg²⁺, koji imaju strukturu te kokatalitičku ulogu. Monomer enzima sadrži pet dobro definiranih domena, od kojih treća, bačvasta domena, $\alpha_8\beta_8$, sadrži dio aktivnog mjesta enzima na C-terminalnom kraju bačve (Slika 2.13-A). Ostatak aktivnog mjesta, zajedno s nekoliko ključnih katalitički važnih bočnih ogranaka, čine aminokiseline iz drugih dijelova polipeptidnog lanca monomera te polipeptidnog lanca susjedne podjedinice. Tako se omča iz podjedinice 1 proteže preko sučelja podjedinica i sudjeluje u oblikovanju aktivnog mjesta u podjedinici 4 i obratno. Takve interakcije se ostvaruju između svih podjedinica enzima i ključne su za njegovu aktivnost. Disocijacijom u dimernu ili monomernu formu enzima u potpunosti gubi enzimsku aktivnost te je funkcionalan isključivo u tetramernoj formi⁸¹. Na dodirnoj površini podjedinica nalazi se veći broj hidrofobnih aminokiselina, posebice izoleucina (Slika 2.13-B), zbog čega je Ec β -GAL potencijalno vrlo osjetljiva na mistranlaciju izoleucinskih položaja valinom ili norvalinom, koji bi mogli narušiti hidrofobne interakcije na sučelju domena.



Slika 2.13 Struktura β -galaktozidaze iz bakterije *Escherichia coli* (PDB: 1JZ0). Na slici A u različitim bojama su prikazane pojedine domene podjedinica enzima. Domena u kojoj je smješteno aktivno mjesto prikazana je u crvenoj boji. Na slici B prikazana je raspodjela izoleucina u Ec β -GAL. Izoleucini izloženi na površini enzima prikazani su ružičastom bojom, dok su izoleucini na sučelju podjedinica obojani crvenom bojom. Par nasuprotnih podjedinica označen je istom nijansom sive boje.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Standardne kemikalije

Akrilamid/bisakrilamid, 29,1:0,9 (*Sigma*), agar (*Sigma*), amonijev peroksodisulfat (APS) (*Serva*), baktotripton (*Liofilchem*), cinkov klorid (*Sigma*), *Coomassie Brilliant Blue G-250* (*Merck*), *Coomassie Brilliant Blue R-250* (*Merck*), etanol (*Kefo*), natrijev hidrogenfosfat (*Kemika*), natrijev dihidrogenfosfat (*Sigma*), ditioneitol (DTT) (*Sigma*), etilendiamintetra octena kiselina (EDTA) (*Sigma*), fenilmetilsulfonil-fluorid (PMSF) (*Sigma*), glicerol (*Kemika*), glicin (*Fischer Scientific*), glukoza (*Kemika*), *N*-(2-hidroksietil)piperazin-*N'*-2-etansulfonska kiselina (Hepes) (*AppliChem PanReac*), izoleucin (*Sigma*), izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid (IPTG) (*Sigma*), kalcijev klorid (*Kemika*), kalijev klorid (*Kemika*), kalijev hidroksid (*Kemika*), kvašćev ekstrakt (*Difco*), leucin (*Sigma*), 5X M9-soli (*Sigma*), magnezijev sulfat (*Kemika*), manganov sulfat (*Sigma*), β -merkptoetanol (*Serva*), marker za poliakrilamidnu elektroforezu *Precision Plus Protein Standards Unstained* (*Bio-Rad*), magnezijev klorid heksahidrat (*Kemika*), natrijev dodecil sulfat (*USB Corporation*), *N,N,N',N'*-tetrametiletildiamin (TEMED) (*Serva*), norvalin (*Sigma*), *o*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid (oNPG) (*Sigma*), *p*-nitrofenilf-fosfat (pNPP) (*Sigma*), puferi za kalibraciju pH-metra, pH = 4,01; 7,00; 9,21 (*Mettler Toledo*), tris(hidroksimetil)aminometan (Tris) (*Sigma*), valin (*Sigma*)

3.1.2. Proteini

Albumin iz govedeg seruma (*engl. bovine serum albumin, BSA*) (*NEB*)

3.1.3. Komercijalni kompleti

BugBuster Protein Extraction Reagent Kit Plus Lysonase (*Novagen*)

3.1.4. Instrumenti

Autoklav (EPSA 2000, *Bari*), centrifuga (ThermoScientific SL16R Centrifuge, *Thermo Fischer Scientific*), inkubator (DigitHeat, *J. P. Selecta, S.A.*), izvor napona za SDS-PAGE elektroforezu (PowerPac Basic, *Bio-Rad*), komplet za SDS-PAGE elektroforezu (Mini PROTEAN TetraSystem, *Bio-Rad*), rotacijska platforma (OS-20 Orbital Shaker, *Biosan*), PCR-uredaj (T100 Thermal Cycler, *Bio-Rad*), pH-metar (MP220 Basic pH/mV/°C Meter, *Mettler Toledo*), sonikator (VibraCell 50 Watt Model, *Bioblock Scientific*), spektrofotometar (Evolution 60S

UV-Vis Spectrophotometer, *Thermo Scientific*), termoblok (*ThermoMixer C, Eppendorf*), termostatirane tresilice (*MaxQ 420 HP, Thermo Scientific*; *Orbital Shaker 420, Thermo Scientific*), vaga (*Electronic Balance FA-200, AND Company*)

3.1.5. Sojevi bakterije *Escherichia coli*

MG1655 (Genotip: $F^- \lambda \text{ ilvG}^- \text{ rfb-50 rph-1}$) – laboratorijski soj najbliži divljem tipu bakterije *E. coli*. Soj je korišten kao negativna kontrola.

PS7066 (Genotip: $F^- \lambda \text{ ilvG}^- \text{ rfb-50 rph-1 } 10\text{Ala } ileS$) – Soj je derivat laboratorijskog soja MG1655. U genomu soja, gen *ileS* koji kodira za izoleucil-tRNA-sintetazu (IleRS) je izmjenjen tako da su uvedene mutacije u domenu za popravak pogreške nakon prijenosa. Aminokiseline 241-250 unutar domene zamijenjene su alaninima, čime se u potpunosti gubi aktivnost popravka pogreške nakon prijenosa, zbog čega dolazi do povremenog prijenosa valina ili norvalina na tRNA^{Ile}. Posljedica misacilacije IleRS je ugradnja norvalina i valina na izoleucinske položaje u proteinima¹⁵.

3.1.6. Hranjivi mediji za uzgoj bakterija

Minimalni tekući hranjivi medij M9

Medij je korišten za uzgoj stanica u čijim je ekstraktima praćena aktivnost enzima β -galaktozidaze te ukupnih staničnih fosfataza. Sastav medija bio je sljedeći: 12,8 g dm⁻³ Na₂HPO₄; 3 g dm⁻³ KH₂PO₄; 5 g dm⁻³ NH₄Cl; 2,5 g dm⁻³ NaCl; 2 mmol dm⁻³ MgSO₄; 0,1 mmol dm⁻³ CaCl₂; 100 μ mol dm⁻³ izoleucin, leucin i valin te 50 μ mol dm⁻³ tiamin. Dodatak mediju su valin, odnosno norvalin do koncentracija 1 mmol dm⁻³ ili 2 mmol dm⁻³. Kao izvor ugljika korišteni su: 0,4 % D-(+)-glukoza (medij za uzgoj stanica u čijem je ekstraktu praćena aktivnost staničnih fosfataza), odnosno 0,4 % glicerol uz dodatak 0,5 mmol dm⁻³ izopropil- β -D-tiogalaktopiranozida (medij za uzgoj stanica u čijem je ekstraktu praćena aktivnost β -galaktozidaze). Medij je pripremljen otapanjem potrebne količine komercijalno dostupne smjese 5X M9-soli u ultračistoj vodi kojoj su otopljeni izoleucin, leucin, valin, norvalin i tiamin do potrebnih koncentracija, nakon čega je otopina sterilizirana autoklaviranjem pri 121 °C i 2,6 bar u trajanju 20 minuta. Ohlađenom mediju su u sterilnim uvjetima dodani MgSO₄, CaCl₂, izvor ugljika, odnosno induktor do naznačenih koncentracija.

Minimalni tekući hranjivi medij Tris

Medij je korišten za uzgoj stanica u čijim je ekstraktima praćena aktivnost pojačano eksprimiranih ukupnih staničnih fosfataza. Sastav medija bio je sljedeći: 50 mM Tris-HCl (pH = 7,5 pri $\theta = 25$ °C); 1 g dm⁻³ NH₄Cl; 0,5 g dm⁻³ NaCl; 0,4 % D-(+)-glukoza; 2 mmol dm⁻³ MgSO₄; 0,1 mmol dm⁻³ ZnCl₂; 0,1 mmol dm⁻³ CaCl₂; 100 μmol dm⁻³ izoleucin, leucin i valin te 50 μmol dm⁻³ tiamin. Dodatak mediju su varijabilne količine K₂HPO₄ i KH₂PO₄ te valin, odnosno norvalin do koncentracija 1 mmol dm⁻³ ili 2 mmol dm⁻³. Medij je pripremljen razrijeđivanjem vodene otopine 10X smjese: Tris-HCl (pH = 7,5 pri $\theta = 25$ °C), NH₄Cl, NaCl, ZnCl₂ te CaCl₂ u ultračistoj vodi koju su prethodno dodani izoleucin, leucin, valin i tiamin do naznačenih koncentracija, nakon čega je otopina sterilizirana autoklaviranjem pri 121°C i 2,6 bar u trajanju 20 minuta. Ohlađenom mediju su u sterilnim uvjetima dodani su MgSO₄, K₂HPO₄, KH₂PO₄ te glukoza do naznačenih koncentracija.

Starvacijski tekući medij Tris

Medij je korišten za starvaciju stanica izvorom fosfata nakon uzgoja do srednje logaritamske faze rasta u minimalnom hranjivom mediju Tris s kontroliranim izvorom fosfora, a sve u cilju pojačavanja ekspresije staničnih fosfataza. Sastav medija je isti kao i sastav medija Tris za uzgoj, no u mediju za starvaciju potpuno izostaje izvor fosfata (smjesa K₂HPO₄ i KH₂PO₄).

Tekući Luria-Bertani (LB) hranjivi medij

Medij je korišten za uzgoj prekultura stanica koje su nasađivanje u Tris hranjivi medij s kontroliranim izvorom fosfata. Sastav medija je bio sljedeći: 10 g dm⁻³ baktotripton, 5 g dm⁻³ ekstrakt kvasca i 10 g dm⁻³ NaCl. Medij je pripremljen otapanjem potrebnih količina komponenti u destiliranoj vodi. Prije upotrebe hranjivi medij je steriliziran autoklaviranjem pri 121°C i 2,6 bar u trajanju 20 minuta.

Priprava ploča s krutim Luria-Bertani (LB) hranjivim medijem

Sastav medija je: 37 g dm⁻³ LB-agar otopljen u destiliranoj vodi te steriliziran autoklaviranjem pri 121°C i 2,6 bar u trajanju 20 minuta. Medij je nakon sterilizacije preliven u plastične Petrijeve zdjelice te ostavljen da se hladi radi skrućivanja u gel.

3.2. Metode rada s bakterijama

3.2.1. Uzgoj bakterijskih kolonija na LB-pločama

Za pripremu bakterijskih kolonija na LB-pločama korištene su glicerolske kulture bakterijskih sojeva MG1655 i PS7066 pohranjene na -80°C , u vlasništvu dr. sc. Marka Močiboba. Bakterijski sojevi su u sterilnim uvjetima rada nasadeni na krute Luria-Bertani hranjive podloge, nakon čega su inkubirane preko noći u inkubatoru na 37°C . Nakon uzgoja, ploče su dugoročno (do 30 dana) pohranjene u hladnjači na 4°C .

3.2.2. Uzgoj prekonocne kulture bakterijskih stanica

Za pripremu prekonocnih bakterijskih kultura, pojedinačne bakterijske kolonije s LB-ploča su inokulirane u 5-10 ml potrebnog tekućeg hranjivog medija (potpoglavlje 3.1.6. Materijala i metoda) u sterilnim uvjetima rada. Inokulati su uzgajani preko noći uz aeraciju u tresilici pri 37°C i 250 okretaja u minuti. Nakon uzgoja, alikvotima razrijeđenih prekonocnih bakterijskih kultura određivana je optička gustoća pri $\lambda = 600\text{ nm}$.

3.2.3. Praćenje rasta sojeva

U cilju praćenja dinamike rasta korištenih bakterijskih sojeva u (ne)mistranslatirajućim uvjetima te rasta bakterijskih stanica u hranjivom mediju siromašnom fosfatima, praćena je optička gustoća, OD_{600} tijekom rasta bakterijskih kultura u vremenu. Prekonocna kultura sojeva razrijeđena je do $OD_{600} = 0,02$ u 20 ml minimalnog hranjivog medija M9, odnosno medija Tris s varijabilnom koncentracijom fosfata. Nasađene kulture su uzgajane najmanje 10 sati u sterilnim tikvicama pri 37°C uz protresanje 250 okretaja u minuti. Svakih sat vremena ili češće, u sterilnim uvjetima rada uzimani su alikvoti kulture te im je mjerena optička gustoća pri $\lambda = 600\text{ nm}$. Ovisnost izmjerenih vrijednosti optičke gustoće u ovisnosti o vremenu predstavlja krivulju rasta bakterijskih kultura. U cilju određivanja brzine diobe stanica, eksperimentalni podatci su u programskom paketu *GraphPad Prism* utočnjeni na logističku jednadžbu oblika:

$$OD_{600}(t) = \frac{K \times OD_0}{OD_0 + (K - OD_0)e^{-rt}}$$

gdje su: OD_0 – početna vrijednost optičke gustoće suspenzije bakterijskih stanica, r – brzina diobe stanica, a K – kapacitet okoliša, koji označava maksimalni broj populacije N_{∞} koji je moguć u određenim uvjetima.

Uzimajući u obzir da bakterijski sojevi ne posjeduju otpornost niti na jedan antibiotik, čime bi se omogućilo selektivno uzgajanje bakterijskih stanica odabranih sojeva, kontrola kontaminacije medija je bila prioritetna. Alikvoti bakterijskih suspenzija uzimani su u sterilnim uvjetima rada u laminaru te je uz uzorke uzgajana negativna kontrola koja je bila alikvot medija u kojeg nisu nasadene bakterijske stanice.

3.3. Metode rada s proteinima

3.3.1. Preparativni uzgoj sojeva

Preparativni uzgoj sojeva, za potrebe dobivanja veće biomase bakterijskih stanica, vršen je u 100 ml potrebnog sterilnog hranjivog medija (potpoglavlje 3.1.6. Materijala i metoda) u sterilnim tikvicama volumena 500 ml. U sterilnim uvjetima rada (u laminaru) alikvot medija inokuliran je s 1 ml odgovarajuće prekonoćne bakterijske kulture te je uzgajan uz protresanje na 37 °C pri 250 okretaja u minuti. Uzgoj je zaustavljen nakon što je bakterijska kultura dosegla $OD_{600} = 0,6-0,8$. Nakon uzgoja, stanice iz kultura obarane su centrifugiranjem pri 6000 g u prethodno ohlađenoj centrifugi pri temperaturi 4 °C u trajanju 15 minuta. Supernatant je odvojen od taloga stanica dekantiranjem, stanice resuspendirane u 20 ml hladne ultračiste vode radi njihovog ispiranja, nakon čega su ponovno istaložene centrifugiranjem. Nakon dekantiranja supernatanta, talog stanica pohranjivan je na – 80 °C.

3.3.2. Sonikacija stanica

Odmrznuti talog bakterijskih stanica resuspendira se u puferu za lizu sljedećeg sastava: 1 mmol dm^{-3} EDTA, 150 mol dm^{-3} KCl; $\varphi(\text{glicerol}) = 10 \%$ te 100 mmol dm^{-3} Hepes-KOH titriran do pH = 7,5. Neposredno prije sonikacije, zbog nestabilnosti reagenasa, otopini se dodaju: β -merkaptetanol do konačne koncentracije 5 mmol dm^{-3} i fenilmetilsulfonil-fluorid (PMSF) do konačne koncentracije 0,5 mmol dm^{-3} . PMSF djeluje kao ireverzibilni inhibitor serinskih proteaza kao što su kimotripsin, tripsin i trombin, nekih cisteinskih proteaza kao što je papain, čime sprječava proteolitičku razgradnju proteina u ekstraktu tijekom lize stanica⁸³. β -merkaptetanol osigurava reducirajuće uvjete, sprječavajući potencijalnu oksidativnu degradaciju i agregaciju proteina⁸⁴. Pripremljene suspenzije stanica soniciraju se 4 puta u trajanju od 30 s na 50 % snage sonikatora, sondom promjera 4 mm. Zbog velike količine topline koja se oslobađa tijekom soniciranja, zbog koje bi moglo doći do neželjene denaturacije

proteina, tijekom sonikacije suspenzije bakterijskih stanica se inkubiraju na ledu te se sonikacija provodi diskontinuirano, s pauzama od 60 s između pojedinačnih pulseva. Nakon sonikacije, ostatci membrana i staničnih organela uklone se centrifugiranjem pri 16000 g u trajanju 15 minuta pri 4 °C. Supernatant, koji sadrži topljive citosolne proteine, odvoji se od taloga stanica i pohrani na – 80 °C ili se pristupi analizi.

3.3.3. Liza stanica komercijalnim kompletom *BugBuster*

BugBuster je komercijalni komplet proizvođača *Novagen* namjenjen za blagu lizu stanica smjesom neionskih deterdženata uz dodatak lizozima bakteriofaga T7 i benzonaze, nukleaze široke supstratne specifičnosti⁸⁵. Odmrznuti talog stanica resuspendira se u *BugBuster* reagensu prema uputama proizvođača, nakon čega se suspenziji stanica dodaju β-merkaptoetanol do konačne koncentracije 5 mmol dm⁻³ i fenilmetilsulfonil-florid (PMSF) do konačne koncentracije 0,5 mmol dm⁻³ te enzimi po uputi proizvođača. Suspenzija se potom podvrgne miješanju na rotacijskom mješaču pri 20 okretaja u minuti u trajanju 15 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon provedene inkubacije, ostatci stanica uklone se centrifugiranjem pri 16000 g u trajanju 20 minuta pri 4 °C. Supernatant (stanični ekstrakt) se pažljivo otpipetira i pohrani.

3.3.4. Diskontinuirana poliakrilamidna elektroforeza u prisutstvu natrijevog dodecil sulfata (SDS-PAGE)

Uspješnost lize bakterijskih stanica, odnosno ekstrakcije topljivih citosolnih i periplazmatskih proteina provjerena je diskontinuiranom poliakrilamidnom elektroforezom u prisutstvu natrijevog dodecil-sulfata (SDS-PAGE). SDS-PAGE omogućava razdvajanje molekula po molarnoj masi na poliakrilamidnom gelu. Pokretljivost u gelu molekule zahvaljuju vezivanju nabijenog anionskog deterdženta, natrijevog dodecil sulfata na polipeptidnu okosnicu denaturiranih proteina. Kako je vezivanje SDS-a na sve polipeptidne lance uniformno (≈ 1.4 g SDS-a po gramu proteina), neovisno o njihovoj duljini, tako je i elektroforetska pokretljivost svih proteina jednaka, što znači da se proteini ne odjeljuju prema njihovoj elektroforetskoj pokretljivosti, nego zahvaljujući efektu molekularnog sita poliakrilamidnog gela⁸⁶.

Za potrebe razdvajanja proteina metodom SDS-PAGE pripreman je dvokomponentni poliakrilamidni gel. Gornji dio gela, tzv. gel za sabijanje omogućava sabijanje uzorka u usku prugu na granici s drugim gelom, tzv. gelom za razdvajanje u kojem se odvija razdvajanje proteina prema njihovoj molekularnoj masi. Sastav korištenih gelova prikazan je u Tablici 3.1.

Tablica 3.1 Sastav poliakrilamidnih gelova korištenih za razdvajanje proteina metodom diskontinuirane SDS-poliakrilamidne gel-elektroforeze (SDS-PAGE)

Tip gela	Udio poliakrilamida	Sastav
Gel za sabijanje	4 %	40 g dm ⁻³ akrilamid-bisakrilamid (29,1:0,9) 0,125 mol dm ⁻³ Tris, pH = 6,8 0,1 % (w/v) SDS
Gel za razdvajanje	10 %	90 g dm ⁻³ akrilamid-bisakrilamid (29,1:0,9) 0,375 mol dm ⁻³ Tris, pH = 8,8 0,1 % (w/v) SDS

Gelovi navedenog sastava priređeni su koristeći sustav za izlijevanje gelova iz komercijalnog kompleta za elektroforezu *Mini Protean Tetra (Bio-Rad)* prema uputi proizvođača. Polimerizacija poliakrilamidnih gelova započeta je dodatkom amonijevog persulfata (APS) do konačne koncentracije 0,7 µg ml⁻¹ i *N,N,N',N'*-tetrametiletildiamina (TEMED) do volumnog udjela od 0,05 % u pripremljene smjese gelova (Tablica 3.1).

Na gel su nanoseni uzorci stanica resuspendirani u puferu sastava: 0,0625 mmol dm⁻³ Tris-HCl, pH = 6,8; φ(β-merkaptioetanol) = 1,25 %; φ(glicerol) = 6,25 %; 1,25 % (w/v) SDS i 1 g dm⁻³ bromfenol plavo. Prije nanošenja uzoraka na gel provedeno je normiranje sastava uzorka kako bi uzorci nanoseni na gel u različitim jažicama bili međusobno usporedivi s obzirom na količinu proteina koja je prisutna u nanesenom uzorku. Na gel je nanošena količina stanica koja resuspendirana u 1 ml pufera za nanošenje ima OD₆₀₀ = 0,1. Nakon pripreve, uzorci su denaturirani zagrijavanjem na temperaturi 95 °C u trajanju 5 minuta u termobloku.

Elektroforeza se provodila na sobnoj temperaturi u SDS puferu sastava: 14,4 g dm⁻³ glicin; 3,03 g dm⁻³ Tris, pH = 8,3; 0,1 % (w/v) SDS, u trajanju od 15 minuta pri 120 V, a zatim 45 min pri 180 V. Uzorci su vizualizirani bojanjem gela u otopini boje *Coomassie Brilliant Blue* sastava: 2,5 g dm⁻³ *Coomassie Brilliant Blue* R-250, φ(CH₃CO₂H) = 10 %, φ(CH₃OH) = 45 %. Gel je bojan inkubiranjem u boji na tresilici 15 minuta, nakon čega je višak boje uklonjen u kipućoj destiliranoj vodi do odbojavanja.

3.3.5. Određivanje koncentracije proteina u ekstraktu metodom po Bradfordu

Koncentracija ukupnih staničnih proteina u ekstraktima stanica određena je metodom po Bradfordu. Metoda se temelji se na stvaranju kompleksa boje *Coomassie Brilliant Blue G-250* s proteinima, pri čemu kompleks nastaje vezivanjem anionske i neutralne forme boje na bazične aminokiselinske bočne ogranke lizina, arginina i histidina u proteinima⁸⁷. Nastanak kompleksa izaziva batokromni pomak u apsorpcijskom spektru s $\lambda = 465$ nm na $\lambda = 595$ nm, pri čemu je promjena apsorbancije pri $\lambda = 595$ nm proporcionalna koncentraciji proteina.

Korišten je Bradfordov reagens sastava: $0,1 \text{ g dm}^{-3}$ *Coomassie Brilliant Blue G-250*, $\varphi(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 5 \%$ te $\varphi(\text{H}_3\text{PO}_4) = 10 \%$. Otopina reagensa je bila pohranjena u čistoj staklenoj boci tamnih stijenki u hladnjaku na $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

Koncentracija proteina u lizatima određena je posredno, korištenjem unaprijed pripremljenog kalibracijskog pravca. Iz izvorne otopine serumskog albumina goveda, BSA (*engl. bovine serum albumin*) masene koncentracije $\gamma(\text{BSA}) = 1 \text{ mg ml}^{-1}$ pripremljen je niz kalibracijskih otopina BSA u rasponu koncentracija $0-0,15 \text{ mg ml}^{-1}$. Uzorci staničnih ekstrakata pripremljeni su u triplicatu razrjeđivanjem staničnog ekstrakta puferom za lizu, tako da konačna koncentracija proteina u otopini bude unutar raspona koncentracija kalibracijskih otopina. U pripravljene otopine dodan je 1 ml Bradfordovog reagensa, nakon čega su iste inkubirane 10 minuta pri sobnoj temperaturi te im je po završetku inkubacije izmjerena apsorbancija pri $\lambda = 595$ nm u plastičnim kivetama debljine 10 mm .

Koncentracija proteina u staničnom ekstraktu određena je uvrštavanjem srednje vrijednosti apsorbancije razrijeđenih otopina staničnih ekstrakata u jednadžbu kalibracijskog pravca koji predstavlja ovisnost apsorbancije kalibracijskih otopina pri valnoj duljini detekcije o koncentraciji BSA.

3.3.6. Test enzimske aktivnosti staničnih fosfataza

Praćenje enzimske aktivnosti ukupnih staničnih fosfataza iz *E. coli* (EC. 3.1.3) u staničnim ekstraktima temeljilo se na njihovoj reakciji s umjetnim kromogenim suspratom *p*-nitrofenil-fosfatom (*pNPP*). Reakcijska smjesa je sadržavala: $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ ukupnih proteina staničnog ekstrakta te $2,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ *pNPP*-a u reakcijskom puferu sastava: 100 mmol dm^{-3} Hepes-KOH, $\text{pH} = 7,5$ pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; 5 mmol dm^{-3} MgCl_2 i $0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ MnSO_4 . Reakcija je započinjana dodatkom potrebnog volumena staničnog ekstrakta u prethodno pripravljenu otopinu *pNPP*-a u reakcijskom puferu u plastičnoj kiveti volumena 1 ml i duljine puta zrake

10 mm. Neposredno nakon dodatka ekstrakta otopina je promiješana okretanjem kivete te je spektrofotometrijski praćeno povećanje apsorbancije otopine pri valnoj duljini $\lambda = 410$ nm. Podatci su prikupljeni kontinuirano svakih 10 s tijekom 10 minuta. Prije svakog mjerenja instrument je bio nuliran reakcijskom smjesom koja je sadržavala sve komponente osim stanićnog ekstrakta. Kinetički testovi su provedeni u triplikatu.

3.3.7. Test enzimske aktivnosti β -galaktozidaze

Aktivnost β -galaktozidaze iz *E. coli* (EC. 3.2.1.23) u stanićnim ekstraktima praćena je kroz reakciju enzima s umjetnim kromogenim suspstratom *o*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozidom (oNPG). Reakcijska smjesa je sadržavala: 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ukupnih proteina porijeklom iz stanićnog ekstrakta, 1 mmol dm^{-3} oNPG-a resuspendirano u reakcijskom puferu sastava: 60 mmol dm^{-3} Na_2HPO_4 ; 40 mmol dm^{-3} NaH_2PO_4 ; 1 mmol dm^{-3} MgSO_4 te 10 mmol dm^{-3} KCl. Reakcija je zapoćinjana dodatkom potrebnog volumena stanićnog ekstrakta razrijećenog do koncentracije 1 mg ml^{-1} u prethodno pripravljenu otopinu oNPG-a u reakcijskom puferu u plastićnoj kiveti volumena 1 ml i duljine puta zrake 10 mm. Neposredno nakon dodatka ekstrakta otopina je promiješana okretanjem kivete te je spektrofotometrijski praćeno povećanje apsorbancije otopine pri valnoj duljini $\lambda = 420$ nm. Podatci su prikupljeni kontinuirano svakih 5 s tijekom 90 s. Prije svakog mjerenja instrument je bio nuliran reakcijskom smjesom koja je sadržavala sve komponente osim stanićnog ekstrakta. Kinetički testovi su ponovljeni u triplikatu.

3.3.8. Termićka denaturacija proteina u stanićnom ekstraktu

Stanićni ekstrakt razrijećen je do konaćne koncentracije 1 mg ml^{-1} puferom za lizu sastava: 1 mmol dm^{-3} EDTA; 150 mol dm^{-3} KCl; $\varphi(\text{glicerol}) = 10\%$; 100 mmol dm^{-3} Hepes-KOH titiran do $\text{pH} = 7,5$ te 5 mmol dm^{-3} β -merkaptetanol. Po 50 μl otopine raspipetirano je u devet PCR-tubica od kojih je osam smješteno u urećaj za PCR, dok je jedan alikvot pohranjen na ledu. Otopine su zagrijane istodobno na različite temperature u rasponu 47-60 $^{\circ}\text{C}$, 30 minuta u urećaju za PCR uz primjenu gradijentnog zagrijavanja. Nakon zagrijavanja, smjese su ohlaćene na ledu, a potom i centrifugirane 60 s na sobnoj temperaturi pri brzini 16000 g. U bistrom supernatantu zaostalom nakon centrifugiranja mjerena je rezidualna katalitićka aktivnost u enzimskim testovima za proteine izvjestitelje.

3.3.9. Obrada eksperimentalnih podataka radi dobivanja krivulja mekšanja modelnih proteina u staničnom ekstraktu

Za određivanje krivulja mekšanja proteina, u programskom paketu *GraphPad Prism 6* je na originalnu ili transformiranu ovisnost rezidualne specifične aktivnosti modelnih enzima u termički denaturiranom staničnom ekstraktu o temperaturi prilagođavana asimetrična višeparametarska sigmoidalna krivulja oblika:

$$A(T) = A_{min} + \frac{A_{max} - A_{min}}{1 + 10^{[H \times \log(T_B - T_M)]^S}}$$

$$\log T_B = \log T_M + \frac{1}{H} \log(2^{\frac{1}{S}} - 1)$$

gdje su: $A(T)$ – relativna ili apsolutna specifična aktivnost modelnog proteina mjerena kao promjena apsorbancije po masi enzima u jedinici vremena u ovisnosti o temperaturi (zavisna varijabla); A_{max} i A_{min} – maksimalna, odnosno minimalna vrijednost relativne ili apsolutne specifične aktivnosti modelnog proteina u datom setu podataka; H – Hillov parametar, S – parametar asimetričnosti, T_M – temperatura mekšanja enzima, T_B – parametar jednadžbe dimenzije temperature i T – temperatura (nezavisna varijabla).

Relativna specifična aktivnost modelnih enzima definirana je kao omjer izmjerene (apsolutne) specifične aktivnosti i maksimalne vrijednosti specifične aktivnosti definirane na krivulji prilagođenoj na izvorne (izmjerene) podatke. Kod prilagođavanja asimetrične sigmoidalne krivulje na temperaturnu ovisnost relativnih specifičnih aktivnosti modelnih enzima, parametar A_{min} se ograniči na vrijednost 0, a A_{max} na vrijednost 100. Kao način prilagodbe se odabere prilagođavanje metodom najmanjih kvadrata u 1000 iteracija uz striktno kriterije konvergencije.

3.3.10. Statistički test za provjeru signifikantnosti rezultata

Statistički značaj razlika u temperaturama mekšanja modelnih enzima, određenih kako je opisano u potpoglavlju 3.3.9. Materijala i metoda za različite uvjete, analiziran je Studentovim testom koji je implementiran u programskom paketu *GraphPad Prism 6*. Usporedbom para eksperimentalnih podataka određena je vrijednost parametra P na osnovu kojeg je zaključen statistički značaj razlike. Rezultati su smatrani signifikantno različitim ukoliko je $P < 0,05$. Parametri analize su bili: *paired t-test* uz pretpostavku Gaussove raspodjele podataka i interval pouzdanosti 95 %.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Strategija istraživanja

Cilj ovog diplomskog rada je bio istražiti može li se utjecaj mistranslacijskog stresa pratiti na primjeru ukupnih staničnih fosfataza (skupina enzima) i β -galaktozidaze iz *E. coli* (*Uniprot*: P00722) kao modelnih proteina. U svrhu toga, istraživana je učinak mistranslacije izoleucinskih položaja u proteinima proteinogenim valinom i neproteinogenim norvalinom na termičku stabilnost modelnih proteina u staničnom ekstraktu. Ugradnja norvalina i valina na mjesta kodirana za izoleucin postignuta je uzgojem bakterijskog soja PS7066 *E. coli* u hranjivim medijima M9 i Tris (sastavi opisani u potpoglavlju 3.1.6. Materijala i metoda) u koje su egzogeno dodane nepripadne aminokiseline valin, odnosno norvalin. Budući da IleRS u sintetskom aktivnom mjestu loše diskriminira izoleucin od valina i norvalina, deacilacijska domena za popravak pogreške nakon prijenosa je nužna za sprječavanje akumulacije misaciliranih tRNA^{Ile} [51]. U soju PS7066, mutacijom 10 položaja u deacilacijskoj domeni IleRS u alanine, dobiva se IleRS s potpuno ugašenim popravkom pogreške nakon prijenosa, posljedica čega je akumulacija Nva-tRNA^{Ile} i Val-tRNA^{Ile}, što dovodi do povremene ugradnje valina i norvalina na izoleucinske položaje u proteine¹⁵. Ugradnja nepripadnih aminokiselina u proteom, potvrđena je i analizom mistranslatiranog proteoma PS7066 tehnikama spektrometrije masa¹⁰.

Najjednostavniji način praćenja utjecaja mistranslacijskog stresa na svojstva odabranih modelnih proteina, odabran u ovom radu, je određivanje potencijalne razlike u temperaturi mekšanja modelnih enzima u staničnim ekstraktima stanica uzgojenih u mistranslatirajućim i nemistranslatirajućim uvjetima. Naime, općepoznato je načelo da je funkcija proteina određena njegovom strukturom, zbog čega zamjena izoleucina za valin i norvalin u proteinu, koja može utjecati na strukturu, smatanje i stabilnost proteina, može rezultirati i promjenom u funkciji proteina. Bacher *et al.* te Biluš *et al.*, koji su radili istraživanja na soju *E. coli* s inaktiviranom domenom za popravak pogreške IleRS, sugerirali su da su promjene svojstava soja u odnosu na divlji tip posljedica akumulacije loše smotanih ili agregiranih proteina uslijed statističke mistranslacije izoleucinskih položaja valinom i norvalinom^{10,62}. Naime, bočni ogranci i valina i norvalina imaju manju hidrofobnu površinu u odnosu na za jednu metilnu skupinu veći bočni

ogranak izoleucina, zbog čega bi mistranslacija izoleucinskih položaja u proteinima objema neprikladnim aminokiselinama mogla smanjivati termičku stabilnost proteina¹². Ipak, valin i norvalin se razlikuju po razgranatosti svojih bočnih ogranaka. Bočni ogranak valina posjeduje β -metilnu skupinu jednako kao i bočni ogranak izoleucina, dok je bočni ogranak norvalina ravnolančan i sterički vrlo slobodan. Slična razgranatost bočnih ogranaka izoleucina i valina osigurava njihovu sličnu preferenciju prema β -strukturama u proteinu (*engl. β -propensity*). Za razliku od valina koji ima preferenciju prema β -strukturama u proteinu kao i izoleucin, norvalin ima sklonost ugradnji u α -zavojnice^{88,89}. Posljedično, ugradnja norvalina na izoleucinske položaje u β -strukturama u proteinu više destabilizira protein od mistranslacije istog izoleucinskog položaja valinom. Uzimajući u obzir razlike u navedenim svojstvima koje postoje između valina i norvalina u odnosu na izoleucin, opravdano je smatrati da je općenito mistranslacija staničnih proteina norvalinom štetnija od mistranslacije valinom.

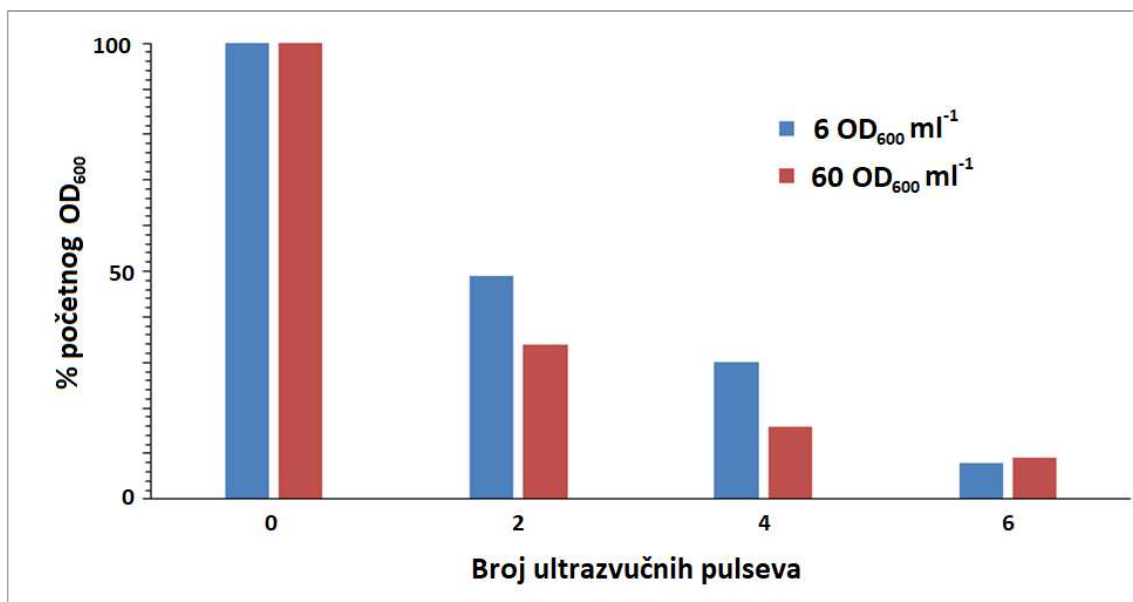
U ovom istraživanju praćena je enzimska aktivnost odabranih modelnih enzima u ovisnosti o temperaturi, budući da je očekivano da će promjena termičke stabilnosti modelnih enzima uslijed mistranslacije uzrokovati promjenu u enzimskoj aktivnosti. Enzimi su odabrani zbog supstratnih specifičnosti prema kromogenim supstratima *o*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozidu (β -galaktozidaza)⁹⁰, odnosno *p*-nitrofenil-fosfatu (stanične fosfataze)⁷⁷, što omogućava jednostavno spektrofotometrijsko praćenje reakcija.

Snaga ovog istraživanja proizilazi iz jednostavnosti i novine pristupa. Tradicionalni pristup određivanja termičke stabilnosti proteina podrazumijeva dugotrajne postupke pročišćavanja proteina, a tek potom određivanje termičke stabilnosti pročišćenih proteina. Ipak, recentna istraživanja bakterijskih proteoma tehnikama spektrometrije masa pokazala su da ne postoji drastična razlika u termičkoj stabilnosti proteina (izražena kao temperatura mekšanja) između pročišćenih proteina te proteina u staničnim ekstraktima, potvrđujući valjanost pristupa opisanog u ovom radu¹⁴. Nadalje, u literaturi je još uvijek nezabilježena upotreba cijele skupine staničnih enzima kao modelnih proteina za praćenje mistranslacijskog stresa. S druge strane, čak ni pojedinačni enzim β -galaktozidaza, izuzetno često korištena kao izvjestiteljski enzim⁹⁰, još uvijek nije korištena za praćenje utjecaja mistranslacijskog stresa na stabilnost staničnih proteina.

4.2. Optimizacija postupka dobivanja staničnog ekstrakta

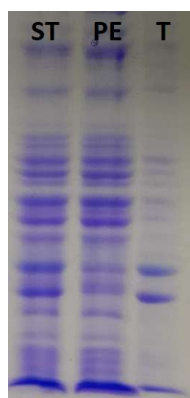
Enzimsku aktivnost modelnih proteina, ukupnih staničnih fosfataza i β -galaktozidaze, praćena je u neobrađenim staničnim ekstraktima. Stanični ekstrakt, razrijeđen puferom za lizu do konačne koncentracije 1 mg ml^{-1} korišten je kao supstrat za enzimske reakcije modelnih enzima s kromogenim supstratima. Stoga je očekivano da nereproducibilnost u postupku dobivanja staničnih ekstrakata bakterijskih stanica iz različitih uzgoja može značajno utjecati na rezultate daljnjih mjerenja u kojima će se koristiti dobiveni stanični ekstrakt. U okviru ovog rada isprobana su dva načina lize bakterijskih stanica: sonikacija te liza stanica komercijalnim kompletom za lizu *BugBuster* proizvođača *Novagen* koji omogućava blagu lizu stanica smjesom neionskih deterdženata uz dodatak smjese lizozima bakteriofaga T7 i benzonaze⁸⁵. Unatoč jednostavnom protokolu primjene, reproducibilnosti i povećanom prinosu proteina u staničnom ekstraktu (do 4 puta više u odnosu na sonikaciju), pokazano je da je specifična aktivnost staničnih fosfataza, smanjena i do 2 puta kada se stanice liziraju *BugBuster* reagensom u odnosu na sonikaciju. S druge strane, liza stanica soniciranjem, kod koje se liza ostvaruje ultrazvučnim valovima velike snage je teško reproducibilna i izaziva zagrijavanje uzorka zbog čega može doći do denaturacije proteina u uzorku⁹¹. Kako bi se spriječilo nepotrebno zagrijavanje uzorka te maksimizirao prinos proteina sonikacijom, provedena je optimizacija postupka koja se temeljila na mjerenju smanjenja optičke gustoće suspenzije bakterijskih stanica prilikom soniciranja⁹¹. Uzorak bakterijskih stanica resuspendiran u 1 ml pufera za lizu uz dodatak 5 mmol dm^{-3} β -merkaptioetanol i $0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ fenilmetilsulfonil fluorida soniciran je 6 puta sondom promjera 4 mm na 50 % snage sonikatora u trajanju 30 s uz vremenski period od 60 s između pojedinih pulseva. Sonikaciji su podvrgnute suspenzije bakterijskih stanica pri dvije vrijednosti optičke gustoće (6 i 60 $\text{OD}_{600} \text{ ml}^{-1}$). Suspenzija bakterijskih stanica se nalazila u Eppendorf tubici volumena 1,5 ml, fiksiranoj vertikalno na ledu, a sonda je u suspenziju bila uronjena do visine pri kojoj počinje konusni dio Eppendorf tubice. Nakon svaka dva pulsa ultrazvukom, iz suspenzije su uzimani alikvoti koji odgovaraju 1/50 početnog volumena suspenzije te su razrijeđeni puferom za lizu do 1 ml, nakon čega je izmjerena optička gustoća suspenzije pri $\lambda = 600 \text{ nm}$. Praćeno je smanjenje optičke gustoće suspenzije u ovisnosti o broju ultrazvučnih pulseva, a rezultati optimizacije prikazani su na Slici 4.1.

Rezultati ukazuju da već nakon 4 ultrazvučna pulsa dolazi do smanjenja optičke gustoće za više od 80 % pri obje vrijednosti početne optičke gustoće suspenzije stanica. Dodatno povećanje broja pulseva ne povećava značajno prinos proteina u ekstraktu, nego vodi potencijalno štetnom zagrijavanju uzorka. Uspješnost sonikacija na obje vrijednosti optičke gustoće je bila podjednaka, pri čemu je istovremeno bila popraćena vidnom promjenom viskoznosti suspenzije. Vremenski odmak od 60 s između pojedinih ultrazvučnih pulseva je optimalan jer ne dolazi do osjetnog zagrijavanja uzorka. Shodno navedenom, odlučeno je da će se sonicerati suspenzije bakterijskih stanica optičke gustoće ne veće od $60 \text{ OD}_{600} \text{ ml}^{-1}$. Suspenzije će biti sonicirane 4 puta sondom promjera 4 mm pri snazi sonikatora 50 % uz inkubaciju na ledu u trajanju 60 s između pulseva. Takav je protokol korišten za lizu svih suspenzija bakterijskih stanica i naveden je u potpoglavlju 3.3.2. Materijala i metoda.



Slika 4.1 Optimizacija sonikacije pri dvije vrijednosti optičke gustoće suspenzije stanica. Rezultati su izraženi kao postotak početne optičke gustoće suspenzije u ovisnosti o broju pulseva. Suspenzije su sonicirane 6 puta sondom promjera 4 mm pri 50 % snage sonikatora u trajanju 30 s uz prekide u trajanju 60 s između pojedinih pulseva. Nakon svaka dva pulsa uzimani su alikvoti 1/50 volumena početne suspenzije, razrijeđeni do 1 ml puferom za lizu te je određena vrijednost optičke gustoće pri $\lambda = 600 \text{ nm}$. Rezultati ukazuju da već nakon 4 ultrazvučna pulsa dolazi do smanjenja optičke gustoće za više od 80 % pri obje vrijednosti početne optičke gustoće suspenzije stanica.

Uspješnost sonikacije suspenzije čija je početna optička gustoća iznosila $60 \text{ OD}_{600} \text{ ml}^{-1}$, dodatno je provjerena SDS-PAGE elektroforezom. Na gel su naneseni uzorak nesoniciranih stanica, uzorak taloga stanica zaostao nakon sonikacije s 4 ultrazvučna pulsa te uzorak staničnog ekstrakta dobivenog nakon sonikacije s 4 ultrazvučna pulsa. Na gel je nanesen ekvivalent $0,1 \text{ OD}_{600}$ svakog pojedinog uzorka. SDS-PAGE gel prikazan je na Slici 4.2. Analizirajući broj i intenzitet pruga koje odgovaraju proteinima u talogu stanica zaostalom nakon soniciranja u odnosu na uzorak ukupnih stanica, može se zaključiti da je sonikacija uspješna te da je većina staničnih proteina uspješno prevedena u proteinski ekstrakt, što potvrđuju i rezultati optimizacije sonikacije.



Slika 4.2 Provjera uspješnosti sonikacije suspenzije bakterijskih stanica optičke gustoće $60 \text{ OD}_{600} \text{ ml}^{-1}$ nakon soniciranja suspenzije s 4 ultrazvučna pulsa u trajanju 30 s, sondom promjera 4 mm i 60 s pauze između pojedinih pulseva. Na gel su naneseni uzorak nesoniciranih stanica (S), talog stanica zaostalo nakon sonikacije (T) te uzorak proteinskog ekstrakta (PE). Na gel je nanesena količina uzorka ekvivalentna količini $0,1 \text{ OD}_{600}$. Mali broj pruga na gelu koje odgovaraju proteinima u talogu upućuje da je sonikacija bila uspješna, pri čemu je većina staničnih proteina uspješno prevedena u stanični ekstrakt.

4.3. Ukupne stanične fosfataze kao modelni proteini za mistranslaciju

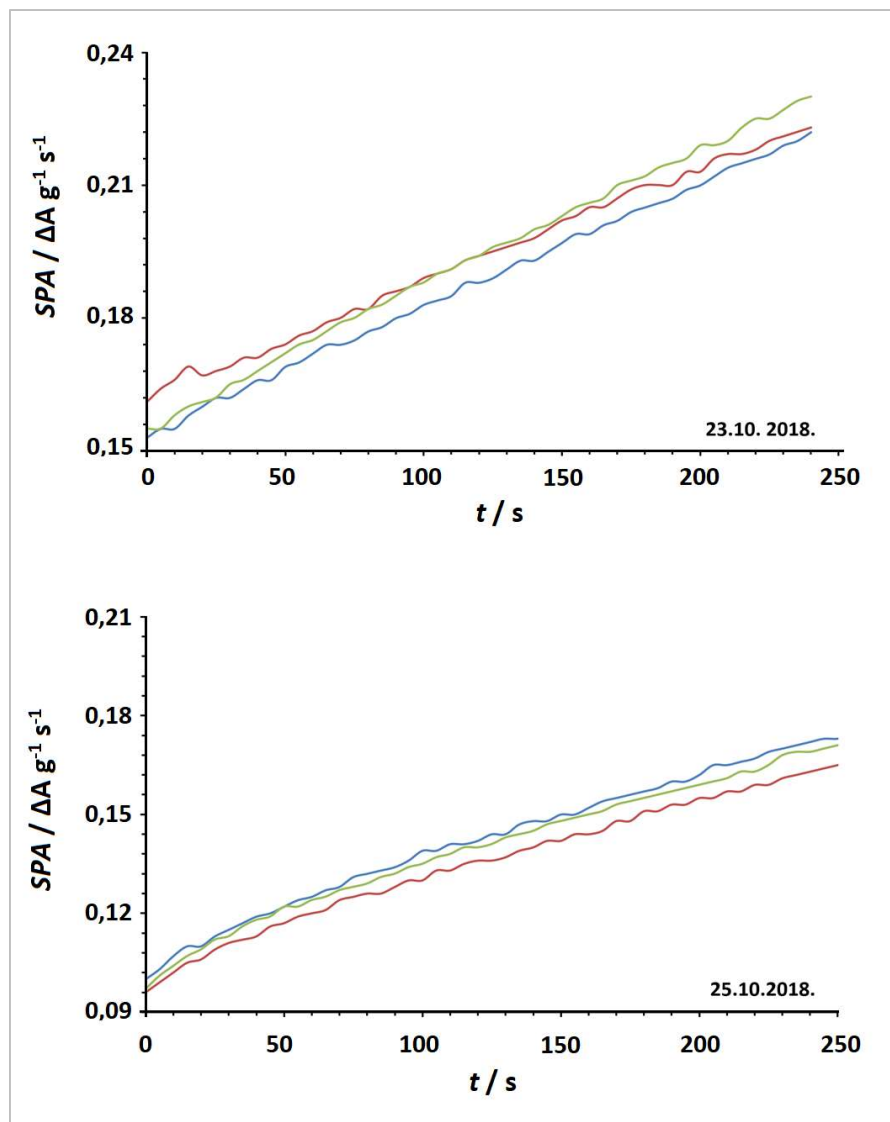
Stanične fosfataze ili fosfomonoesteraze (EC. 3.1.3.) skupina su enzima koji kataliziraju cijepanje ortofosforne skupine s cijelog niza prirodnih supstrata u širokom rasponu uvjeta. Ovisno o pH-vrijednosti medija u kojem imaju maksimum aktivnosti, fosfataze je moguće podijeliti na kisele te bazične⁷³.

Cilj ovog diplomskog rada bio je koristiti ukupne stanične fosfataze kao modelne enzime za praćenje utjecaja mistranslacije na termičku stabilnost staničnih proteina.

Bilo je planirano pratiti gubitak enzimske aktivnosti ukupnih staničnih fosfataza u staničnom ekstraktu stanica uzgojenih u mistranslatirajućim uvjetima nakon njegove termičke denaturacije (potpoglavlje 3.3.8 Materijala i metoda). Kako bi to bilo moguće, prvi korak istraživanja bio je pronalazak reakcijskih uvjeta u kojima većina fosfataza ima maksimalnu aktivnost. Optimizacija kinetičkog testa za fosfataze provedena je na fosfatazama iz staničnog ekstrakta soja MG1655 uzgojenog u nemistranslatirajućim uvjetima. Eksperimentalni uvjeti korišteni u ovom radu su preuzeti iz rada E. Kuznetsove *et al.*⁷⁷. Praćenje enzimske aktivnosti fosfataza temelji se na enzimskoj reakciji fosfataza s umjetnim kromogenim suspratom *p*-nitrofenil-fosfatom (pNPP), prema kojem većina fosfataza ima umjerenu do visoku specifičnost (Prema podacima u bazi Brenda: <http://www.brenda.uni-koeln.de/>, $0,005 < K_M / \text{mmol dm}^{-3} < 5$ za pNPP). Alkalne (pH optimum 8-10) i kisele fosfataze (pH optimum 4-6) pokazuju 20-80 % početne aktivnosti s pNPP-om pri neutralnim pH⁷⁷. Kao pufer korišten je Hepes titriran s KOH do pH = 7,5 koji ima maksimalni puferski kapacitet pri navedenoj pH vrijednosti te prema bazi Brenda: <http://www.brenda.uni-koeln.de/> nije naveden kao potencijalni inhibitor fosfataza. Nadalje, kako većina fosfataza zahtjeva metalne ione cinka i mangana za svoju aktivnost, isti su dodani u reakcijski pufer. Shodno svemu navedenom korišten je protokol opisan u potpoglavlju 3.3.6 Materijala i metoda.

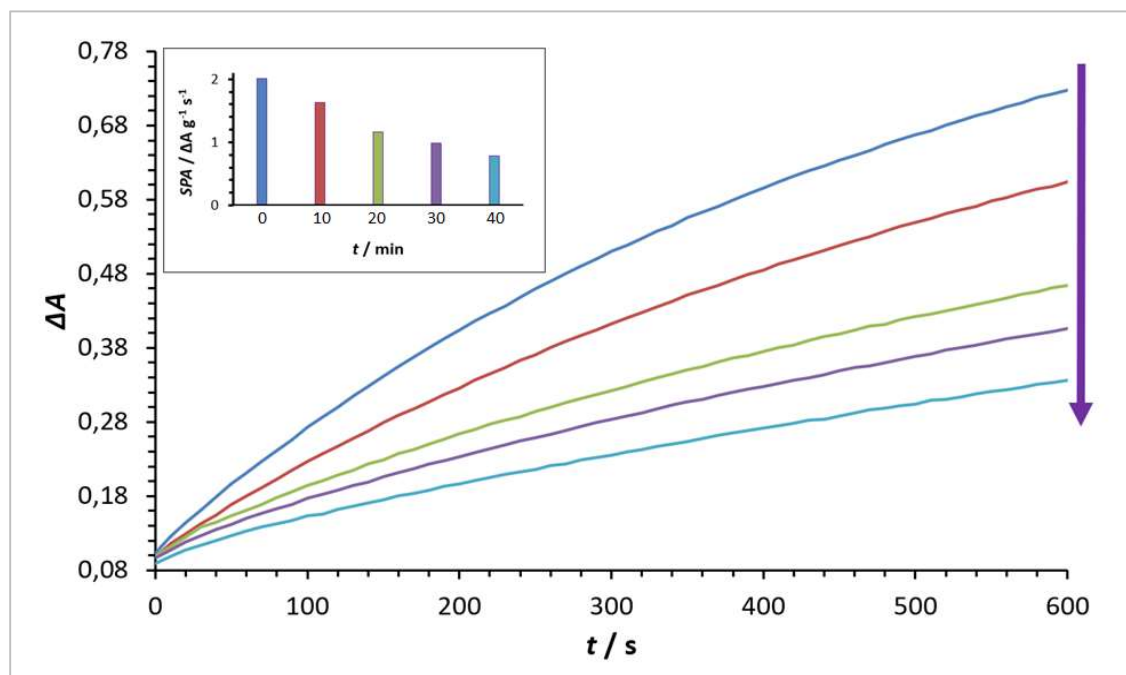
Iako je u staničnim ekstraktima stanica soja MG1655 u nemistranslatirajućim uvjetima uzgoja detektirana enzimska aktivnost fosfataza prema *p*-nitrofenil-fosfatu (pNPP), ista je bila niska i nereproducibilna te izuzetno ovisna o načinu lize stanica. Ovisnost promjene apsorbancije pri valnoj duljini detekcije u vremenu nije linearna, niti je opaženi nelinearni trend bio reproducibilan (Slika 4.3). Specifična aktivnost fosfataza u staničnom ekstraktu izražena kao promjena apsorbancije pri valnoj duljini detekcije u vremenu po masi proteina u reakcijskoj smjesi je bila niska i kretala se u rasponu $0,3-5 \Delta A \text{ g}^{-1} \text{ s}^{-1}$ za ekstrakte stanica iz različitih uzgoja, a bila je sustavno 1,5-4,5 puta veća u ekstraktima dobivenim sonikacijom u odnosu na ekstrakte dobivene lizom komercijalnim reagensom *BugBuster*. Za nisku i nereproducibilnu specifičnu aktivnost može biti odgovoran način uzgoja bakterijskih stanica. Stanice su uzgajane u minimalnom M9-mediju koji je temeljen na fosfatnom puferu (smjesa K_2HPO_4 te KH_2PO_4)⁹² pa je kao takav izdašan izvor fosfora što može rezultirati represijom gena iz *Pho*-regulona, klastera gena u kojem se nalaze i geni za stanične fosfataze⁷⁸, ali i inhibicijom fosfataza produktima reakcije⁷³. Iako se čini malo vjerojatno, osim smanjene ekspresije fosfataza i njihove inhibicije, moguće je da je u uvjetima rasta nekolicina staničnih fosfataza s

niskim brzinama enzimske hidrolize pNPP-a (prema bazi Brenda, <http://www.brenda.uni-koeln.de/> za takve je $230 < V_{\max} / \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} < 698$) dominantno eksprimirana, što onemogućava detekciju u vremenu inkubacije 10 minuta. S druge strane, značajno niža specifična aktivnost u ekstraktima dobivenim lizom komercijalnim kompletom *BugBuster*, potencijalno je uzrokovana inhibicijom ili denaturacijom staničnih fosfataza neionskim deterdžentima prisutnima u reagensu. Sastav reagensa *BugBuster* je zaštićen patentom i nije naveden od strane proizvođača⁸⁴.



Slika 4.3 Vremenski tijek reakcije fosfataza u staničnom ekstraktu stanica soja MG1655 s pNPP-om. Ovisnost promjene apsorbancije pri valnoj duljini detekcije u vremenu nije uvijek linearna, a opaženi trend nije reproducibilan. Prikazani su rezultati za aktivnost fosfataza u staničnim ekstraktima stanica iz dva različita uzgoja u istim uvjetima (datumi uzgoja navedeni na slici). Stanice iz oba uzgoja su tretirane na jednak način.

Uz nisku i nereproducibilnu specifičnu aktivnost ukupnih fosfataza u staničnim ekstraktima, pokazalo se da su stanične fosfataze izuzetno nestabilne. Specifična aktivnost fosfataza u staničnim ekstraktima stanica soja MG1655 se u prosjeku smanjivala do 50 % prilikom ciklusa smrzavanja/odmrzavanja ekstrakata pri čemu se pokazalo da gubitak nije reproducibilan za stanične ekstrakte stanica iz različitih uzgoja ili linearan. Gubitak aktivnosti nije bilo moguće spriječiti dodatkom 10 % (v/v) glicerola kao krioprotektanta u stanični ekstrakt. Specifična aktivnost u odmrznutim ekstraktima se sustavno smanjivala tijekom privremene inkubacije ekstrakta na ledu pri čemu se u prosjeku gubitak do 40 % opažan unutar samo 30 minuta, tj. vremenu potrebnom za određivanje specifične aktivnosti staničnih fosfataza u ekstraktu u triplikatu (Slika 4.4). Opaženi trend smanjenja najvjerojatnije je posljedica nestabilnosti staničnih fosfataza koje u najvećoj mjeri doprinose enzimskoj pretvorbi pNPP-a. Smanjenje aktivnosti kao posljedica proteolitičke razgradnje ili oksidativne agregacije malo je vjerojatno, budući da su tijekom pripreve staničnog ekstrakta dodani fenil-metil-sulfonilfluorid (PMSF) kao ireverzibilni inhibitor serinskih proteaza⁸³, odnosno β-merkaptetanol kao reducens⁹¹.



Slika 4.4 Smanjenje specifične aktivnosti fosfataza u odmrznutim staničnim ekstraktima soja MG1655 uzgojenog u nemistranlatirajućim uvjetima. Prikazani su vremenski tijekovi enzimske reakcije fosfataza u ekstraktu s pNPP-om u vremenskim intervalima od 10 minuta. Specifična aktivnost fosfataza sustavno se smanjivala tijekom privremene inkubacije ekstrakta na ledu pri čemu se u prosjeku gubitak do 40 % opaža unutar samo 30 minuta, tj. u vremenu potrebnom za određivanje specifične aktivnosti staničnih fosfataza u ekstraktu u triplikatu (mala slika).

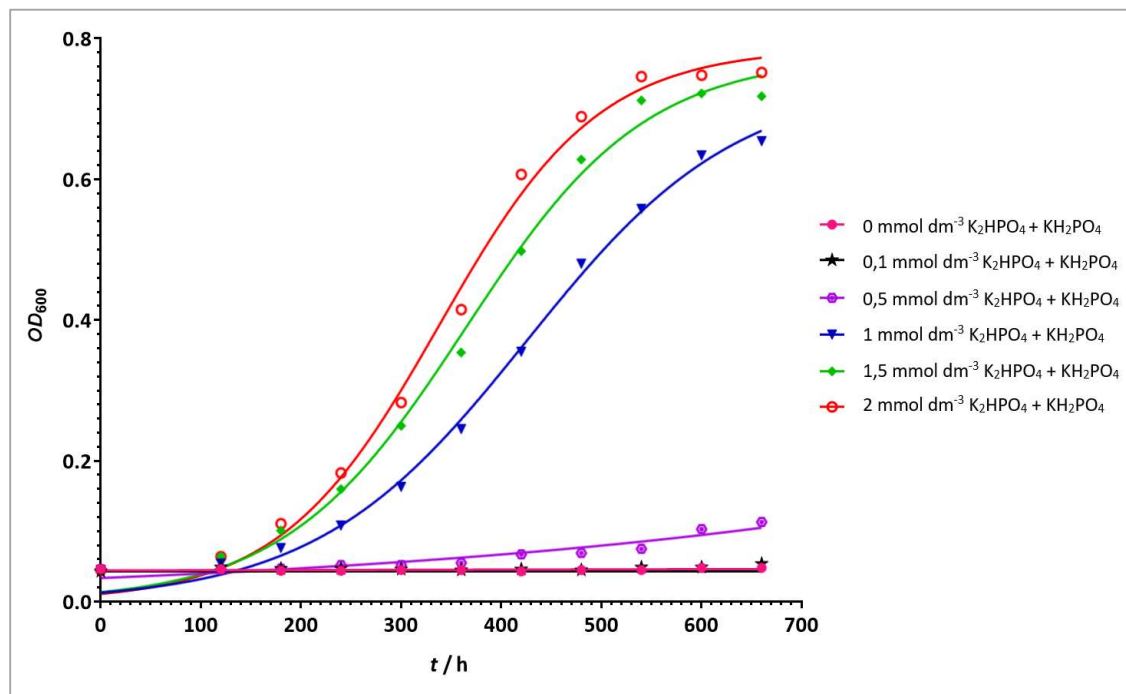
Rezultati provedenog istraživanja ukazuju da ukupne stanične fosfataze u staničnom ekstraktu stanica uzgojenih u minimalnom M9-mediju uz glukozu kao izvor ugljika (potpoglavlje 3.1.6. Materijala i metoda) **ne mogu** biti dobri modelni proteini za praćenje mistranslacije, budući da se kinetički test za iste ne može optimirati tako da bude reproducibilan.

4.4. Pojačano eksprimirane fosfataze u staničnom ekstraktu kao modelni proteini za mistranslaciju

M9-minimalni hranjivi medij temeljen je na fosfatnom puferu (smjesa K_2HPO_4 te KH_2PO_4)⁹² te može izazvati represiju gena iz *Pho*-regulona, klastera gena u kojem se nalaze i geni za nekoliko staničnih fosfataza, uključujući i gen za alkalnu fosfatazu, dominantnu periplazmatsku fosfatazu^{78,79}. U literaturi je pronađeno da u uvjetima starvacije *E. coli* fosfatima, dolazi do pojačanja ekspresije alkalne fosfataze (ALP) minimalno 200 puta⁷⁹. Pojačanje ekspresije ALP, a potencijalno i drugih fosfataza, moglo bi riješiti probleme nereproducibilne i niske specifične aktivnosti fosfataza u staničnim ekstraktima stanica uzgojenih u M9-minimalnom hranjivom mediju (poglavlje 4.3. Rezultata i rasprave). U cilju pojačavanja ekspresije fosfataza u staničnom ekstraktu pokušani su uzgoj stanica u mediju s kontroliranom količinom egzogeno dodanih fosfata te starvacija bakterijskih stanica fosfatima u starvacijskom mediju nakon uzgoja u mediju s kontroliranom količinom egzogeno dodanih fosfata.

Za uzgoj stanica u mediju s kontroliranom koncentracijom fosfata, korišten je Tris-medij čiji je sastav naveden u potpoglavlju 3.1.6. Materijala i metoda. Literaturno je poznato da Tris-medij podržava rast *E. coli*, ukoliko su mediju suplementirani nužni makro- i mikronutrijenti⁹². U ovom radu potvrđen je rast *E. coli* u Tris-mediju suplementiranom s pet koncentracija K_2HPO_4 te KH_2PO_4 egzogeno dodanih u medij. Potpune krivulje rasta soja MG1655 *E. coli* u Tris-mediju na 5 koncentracijskih razina K_2HPO_4 te KH_2PO_4 prikazane su na Slici 4.5. Rezultati upućuju da suplementacija medija s 2 mmol dm^{-3} K_2HPO_4 te KH_2PO_4 rezultira rastom stanica soja MG1655 sličnom rastu u M9-minimalnom mediju, dok pri 20 puta nižoj koncentraciji K_2HPO_4 te KH_2PO_4 stanice rastu oko 5 puta sporije. U mediju bez egzogeno dodanih fosfata te u mediju suplementiranom s $0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ smjese K_2HPO_4 te KH_2PO_4 detektabilan rast se opaža tek nakon 24 sata uzgoja (rezultati nisu prikazani). Kako je fosfor esencijalni makronutrijent, u Tris-mediju bez egzogeno dodanih K_2HPO_4 te KH_2PO_4 koji su

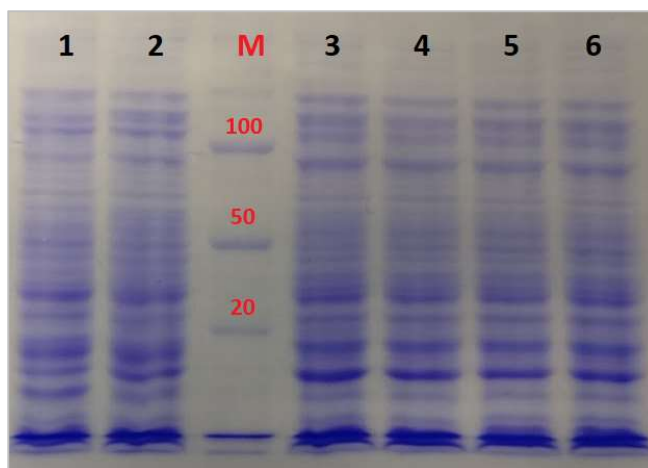
jedini izvor fosfora u ovom mediju, bakterijske stanice ne bi trebale rasti. Opaženi rast vjerojatno je posljedica prijenosa male količine fosfata u Tris-medij iz LB-pretkulture iz koje su stanice nasađene.



Slika 4.5 Krivulje rasta MG1655 u minimalnom hranjivom mediju Tris s varijabilnom koncentracijom fosfata (0; 0,1; 0,5; 1; 1,5 i 2 mmol dm⁻³). Rezultati upućuju da suplementacija medija s 2 mmol dm⁻³ K₂HPO₄ te KH₂PO₄ rezultira rastom MG1655 sličnom rastu u M9-minimalnom mediju (rezultati nisu prikazani), dok pri 20 puta nižoj koncentraciji K₂HPO₄ te KH₂PO₄ stanice rastu oko 5 puta sporije. U mediju bez egzogeno dodanih fosfata te u mediju suplementiranom s 0,1 mmol dm⁻³ smjese K₂HPO₄ te KH₂PO₄ detektibilan rast se opaža tek nakon 24 sata uzgoja (rezultati nisu prikazani).

Stanice uzgojene u Tris-mediju s različitim količinama egzogeno dodanih K₂HPO₄ te KH₂PO₄ istaložene su i lizirane prema protokolu opisanom u potpoglavlju 3.3.2. Materijala i metoda, a talozi stanica analizirani SDS-PAGE elektroforezom na način opisan u potpoglavlju 3.3.4. Materijala i metoda. Slika SDS-PAGE gela prikazana je na Slici 4.6. Rezultati SDS-PAGE analize ne ukazuju na promjene ekspresije staničnih proteina, tako i fosfataza, prilikom uzgoja sa sniženom koncentracijom fosfata, čak ni kod stanica uzgojenih bez egzogeno dodanih K₂HPO₄ te KH₂PO₄ ili su te promjene ispod detekcijskih granica metode. Naime, obrazac pruga je isti za sve uzorke, a relativni intenziteti slični. Ne opažaju se pruge čiji intenzitet linearno raste sa smanjenjem koncentracije egzogeno dodanih fosfata, što bi

ukazivalo na protein (fosfatazu) čija se ekspresija povećava tijekom rasta stanica u mediju s ograničenom koncentracijom fosfata.



Slika 4.6. SDS-PAGE analiza ukupnih proteina iz stanica soja MG1655 *E. coli* uzgojenih u Tris-mediju s različitim količinama egzogeno dodanih K_2HPO_4 te KH_2PO_4 : **1.** bez dodatka K_2HPO_4 i KH_2PO_4 , **2.** + 0,1 mmol dm^{-3} K_2HPO_4 i KH_2PO_4 , **3.** + 0,5 mmol dm^{-3} K_2HPO_4 i KH_2PO_4 , **4.** + 1 mmol dm^{-3} K_2HPO_4 i KH_2PO_4 , **5.** + 1,5 mmol dm^{-3} K_2HPO_4 i KH_2PO_4 , **6.** + 2 mmol dm^{-3} K_2HPO_4 i KH_2PO_4 , **M** – marker masa (crvenom bojom naznačene su mase proteina u kDa) Rezultati SDS-PAGE analize ne ukazuju na promjene ekspresije staničnih proteina prilikom uzgoja sa sniženom koncentracijom fosfata, čak ni kod stanica uzgojenih bez egzogeno dodanih K_2HPO_4 te KH_2PO_4 (Jažica **1**) ili su te promjene ispod detekcijskih granica metode.

Uzimajući u obzir krivlje rasta u Tris-mediju te rezultate SDS-PAGE analize odlučeno je da će se specifična aktivnost staničnih fosfataza s potencijalno pojačano eksprimiranim fosfatazama pratiti u ekstraktu stanica uzgojenih u Tris-mediju suplementiranim s 1 mmol dm^{-3} K_2HPO_4 i KH_2PO_4 . U tom mediju, stanice rastu zadovoljavajućom brzinom te do odgovarajuće optičke gustoće u prihvatljivom vremenu. Stanice iz tri nezavisna uzgoja lizirane su soniciranjem te je određena specifična aktivnost staničnih fosfataza u ekstraktima kako je opisano u potpoglavlju 3.3.6. Materijala i metoda. Specifična aktivnost fosfataza u trima ekstraktima kretala se od 0,53-0,90 $\Delta A g^{-1} s^{-1}$ što je niže od specifične aktivnosti fosfataza u ekstraktima uzgojenim u M9-minimalnom mediju koji je bogat izvor fosfata (poglavlje 4.3. Rezultata i rasprave). Vremenske ovisnosti apsorbancije o vremenu i dalje nisu linearne, a specifična aktivnost u ekstraktu se i dalje gubi prilikom ciklusa smrzavanja/odmrzavanja (promjena do 10 %) te prilikom inkubacije staničnog ekstrakta na ledu. (gubitak 5-10 % aktivnosti prilikom inkubacije u trajanju 30 minuta).

Starvacija bakterijskih stanica uzgojenih u Tris-mediju s kontroliranom koncentracijom fosfata pokušana je u cilju povećanja specifične aktivnosti fosfataza u ekstraktima. Naime, iako je koncentracija fosfata prisutna u korištenom Tris-mediju značajno niža od koncentracije fosfata u M9-mediju, iz dobivenih rezultata može se zaključiti da nije bila dovoljno niska da izazove starvacijski odgovor kod *E. coli*. Navedeno je u skladu s istraživanjima Willskog *et al.* koji su pokazali da se potpuna derepresija ekspresije gena za ALP u *E. coli* opaža prilikom prolongiranog uzgoja u mediju s $0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ egzogeno dodanog izvora fosfata⁷⁹. Ipak, iz krivulja rasta u mediju limitiranom fosfatima (Slika 4.5), pri toj koncentraciji egzogeno dodanih fosfata se ne opaža rast bakterijske kulture čak niti nakon uzgoja u trajanju 12 sati. Budući da je za potrebe eksperimenata bilo potrebno osigurati veću biomasu stanica, pokušao je alternativni način derepresije fosfataza. Stanice *E. coli* su uzgojene do srednje logaritamske faze rasta u Tris-mediju suplementiranom s 1 mmol dm^{-3} smjese K_2HPO_4 i KH_2PO_4 u kojem rastu zadovoljavajućom brzinom, nakon čega su u sterilnim uvjetima istaložene te isprane i prebačene u starvacijski Tris-medij bez dodatka fosfata. Inkubacija u starvacijskom mediju trajala je 15 sati nakon čega su stanice istaložene, lizirane te je određena specifična aktivnost fosfataza u ekstraktima stanica. Smatralo se da će u mediju u kojem je odsutan izvor fosfata, stanice u nekoliko ciklusa diobe iscrpiti fosfate koji su prenešeni iz medija u kojem je proveden uzgoj, ali i stanične zalihe fosfata. Naime, poznato je da u stanicama postoji mehanizam koji omogućava skladištenje fosfata u obliku polifosfata te da je važan u procesu odgovora na stanični stres izazvan starvacijom fosfatima⁹³. Nakon prijenosa u starvacijski medij stanice nisu rasle te nije uočena promjena optičke gustoće bakterijske suspenzije prije i poslije starvacije, što je u skladu s time da stanice u uvjetima starvacije prelaze u stacionarnu fazu rasta⁹³. Nažalost, specifična aktivnost fosfataza u staničnim ekstraktima stanica soja MG1655 starviranih u Tris-mediju u nemistranslatirajućim uvjetima povećala se za maksimalno 30 % u odnosu na specifičnu aktivnost fosfataza u staničnom ekstraktu MG1655 uzgojenom u Tris-mediju suplementiranom s 1 mmol dm^{-3} smjese K_2HPO_4 i KH_2PO_4 . Specifična aktivnost i dalje nije bila reproducibilna za stanične ekstrakte stanica iz različitih uzgoja. Aktivnost staničnih fosfataza u ekstraktu ponovno se smanjivala prilikom inkubacije staničnog ekstrakta na ledu (rezultati nisu prikazani). Uzimajući sve navedeno u obzir, može se zaključiti da stanične fosfataze u ekstraktima stanica, niti nakon pojačanja ekspresije u uvjetima starvacije nisu pogodni modelni proteini za praćenje efekata mistranlacije.

4.5. β -galaktozidaza kao modelni protein za mistranskciju

Rezultati rada na staničnim fosfatazama kao modelnom sustavu za mistranskciju pokazali su da istovremeno praćenje termičke stabilnosti cijele skupine enzima nije dobar eksperimentalni pristup (poglavljja 4.3 i 4.4. Rezultata i rasprave). Nemogućnost optimiziranja reakcijskih uvjeta u kojima cijela skupina enzima ima optimalnu stabilnost i aktivnost, dovela je do promjene modelnog sustava iz skupine staničnih enzima na pojedinačni enzim u staničnom ekstraktu. Kao modelni enzim odabrana je β -galaktozidaza iz *E. coli* (Ec β -GAL) – hidrolitička transglukozidaza, specifična za β -D-galaktopiranozide s *O*, *N* ili *S*- glikozidnom vezom⁸⁰. Nekoliko je razloga za odabir: **(1)** Ec β -GAL je izuzetno katalitički produktivan enzim, pri čemu pojedinačna molekula enzima katalizira pretvorbu 38500 ± 900 molekula u minuti slabo fluorescentnog resofurin- β -D-galaktopiranozida u visoko fluorescentni resofurin⁸². Velika katalitička produktivnost enzima prema drugim umjetnim kromogenim supstratima kakav je i rabljeni *o*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid (oNPG) omogućava jednostavno praćenje reakcije uz veliku osjetljivost spektrofotometrijskog testa⁹⁴. **(2)** Gen za β -galaktozidazu, dio je genomskog *lac*-operona, inducibilnog alolaktozom, odnosno umjetnim induktorom izopropil- β -D-tiogalaktopiranozidom (IPTG)⁸⁰. Pojačanje ekspresije enzima u ekstraktu je poželjno jer povećava osjetljivost spektrofotometrijskog testa. **(3)** Izoleucini u proteinu su zastupljeni na tetramerizacijskom sučelju enzima, a enzim je funkcionalan isključivo u tetramernom obliku. Zamjenom izoleucina u valin ili norvalin, potencijalno je moguće postići smanjenje ili gubitak enzimske aktivnosti uslijed mistranskcije, što bi Ec β -GAL učinilo dobrim modelnim proteinom za praćenje mistranskcije. **(4)** Ec β -GAL je velik protein, pri čemu jedna podjedinica ima 1023 aminokiseline i udio izoleucina od 3,8 % (prema *ExpASy SIB*, <https://www.expasy.org/>), što rezultira povećanom vjerojatnošću da će mistranskcija imati utjecaj na stabilnost ili aktivnost enzima.

4.5.1. Optimizacija kinetičkog testa za β -galaktozidazu

Pokazalo se da je najveći problem kod optimizacije kinetičkog testa za fosfataze bila niska razina ekspresije istih u uvjetima uzgoja (detaljno prikazano u poglavljima 4.3. i 4.4. Rezultata i rasprave). Za razliku od staničnih fosfataza čija se ekspresija ne može potaknuti dodatkom sintetskog induktora, gen za gen za Ec β -GAL dio inducibilnog genomskog *lac*-operona⁸⁰. Zahvaljujući tome, pojačana ekspresija Ec β -GAL može se postići dodatkom sintetskog

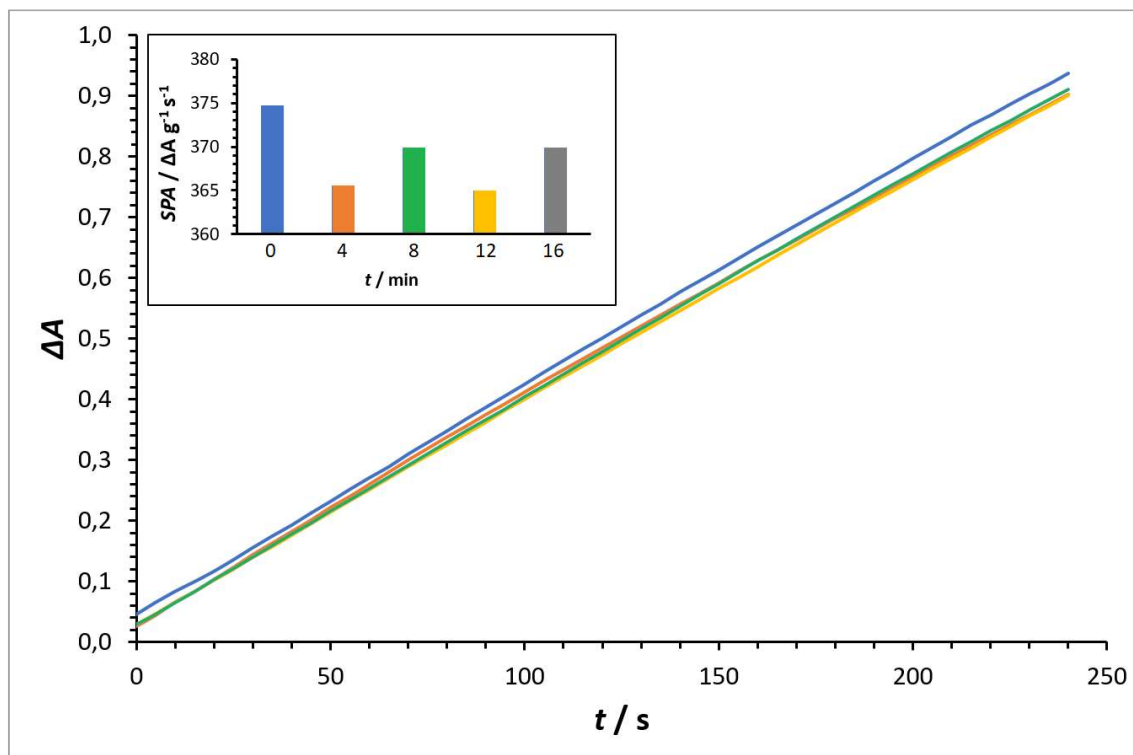
induktora *lac*-operona, izopropil- β -D-tiogalaktopiranozida (IPTG) u hranjivi medij ili korištenjem laktoze kao izvora ugljika u hranjivom mediju. Prednost rada s proteinom čija je ekspresija inducibilna sintetskim induktorom je lakoća eksperimentalnog pristupa. Naime, dok je za pojačanje ekspresije fosfataza nužan uzgoj stanica u mediju s kontroliranom koncentracijom egzogeno dodanih fosfata, što značajno smanjuje njihovu vijabilnost, ekspresija Ec β -GAL se može jednostavno pojačati dodatkom induktora u medij u kojem su stanice vijabilne. Nadalje, ukoliko se pokaže da jako pojačana indukcija gena smanjuje vijabilnost stanica, razina indukcije se može smanjiti smanjenjem koncentracije induktora dodanog u hranjivi medij.

Kako bi se provjerila inducibilnost genomskog *lac*-operona te opravdanost pojačane indukcije Ec β -GAL u stanicama, provedeno je mjerenje specifične aktivnosti Ec β -GAL u ekstraktima stanica soja MG1655 uzgojenih u M9-mediju s glukozom, laktozom i glicerolom kao izvorima ugljika te s i bez dodatka 0,5 mmol dm⁻³ IPTG-a. Enzimska aktivnost Ec β -GAL praćena je u neobrađenim staničnim ekstraktima dobivenim nakon lize stanica soja MG1655 istaloženih u srednjoj eksponencijalnoj fazi rasta. Reakcijski uvjeti za kinetički test su odabrani prema Ref. 94. U odnosu na u tom radu predložene reakcijske uvjete, 100 mmol dm⁻³ Hepes-KOH (pH = 7,2) zamijenjen je puferom sastava 60 mmol dm⁻³ Na₂HPO₄ i 40 mmol dm⁻³ NaH₂PO₄, uobičajenom i optimiranom za mjerenje aktivnosti Ec β -GAL. U reakcijskom puferu sastava opisanog u potpoglavlju 3.3.7. Materijala i metoda, Ec β -GAL ima izuzetno visoku aktivnost prema *o*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozidu (oNPG), a vremenska ovisnost promjene apsorbancije je linearna (Slika 4.7).

Rezultati pokazuju nužnost pojačanja ekspresije Ec β -GAL u staničnim ekstraktima u kojima se mjeri njezina aktivnost. Naime, u staničnim ekstraktima stanica uzgojenih u M9-mediju s glukozom i glicerolom kao izvorima ugljika, a bez dodatka IPTG-a, specifične aktivnosti Ec β -GAL, izražene kao promjena apsorbancije pri valnoj duljini detekcije po masi proteina u reakcijskoj smjesi u vremenu iznose $(0,10 \pm 0,01) \Delta A \text{ g}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (glukoza), odnosno $(0,30 \pm 0,03) \Delta A \text{ g}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (glicerol), što je nedovoljno osjetljivo. Specifična aktivnost Ec β -GAL u ekstraktima stanica uzgojenim u M9-mediju s laktozom kao izvorom ugljika je $(121 \pm 4) \Delta A \text{ g}^{-1} \text{ s}^{-1}$, dok je specifična aktivnost u ekstraktima stanica uzgojenih u M9-mediju s glicerolom kao izvorom ugljika u dodatku 0,5 mmol dm⁻³ IPTG-a $(374 \pm 17) \Delta A \text{ g}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Uzimajući rezultate u obzir, zaključeno je da će se svi daljnji uzgoji stanica za potrebe dobivanja ekstrakta u kojima će se pratiti aktivnost Ec β -GAL vršiti u M9-mediju suplementiranom s

0,5 mmol dm⁻³ IPTG-a uz glicerol kao izvor ugljika. Kao izvor ugljika u hranjivom mediju, nužno je koristiti glicerol, budući da je ekspresija gena *lac*-operona inhibirana u mediju s glukozom kao izvorom ugljika, što je vidljivo iz ovdje prikazanih rezultata.

Na kraju, ispitana je stabilnost Ec β -GAL u staničnim ekstraktima stanica. Enzim nije gubio aktivnost prilikom prolongirane inkubacije na ledu (Slika 4.7), dok je gubitak aktivnosti prilikom ponavljanih ciklusa smrzavanja i odmrzavanja bio manji od 10 % nakon dva ciklusa (rezultati nisu prikazani), što sugerira da je Ec β -GAL potencijalno pogodan modelni protein za mistranslaciju.



Slika 4.7 Smanjenje specifične aktivnosti β -galaktozidaze u odmrznutim staničnim ekstraktima soja MG1655 uzgojenog u M9-mediju s 0,5 mmol dm⁻³ IPTG-a, uz glicerol kao izvor ugljika. Prikazani su vremenski tijekovi enzimске reakcije β -galaktozidaze u ekstraktu stanica s oNPG-om u vremenskim intervalima od 4 minute. Specifična aktivnost β -galaktozidaze nije se mijenjala tijekom privremene inkubacije ekstrakta na ledu (mala slika).

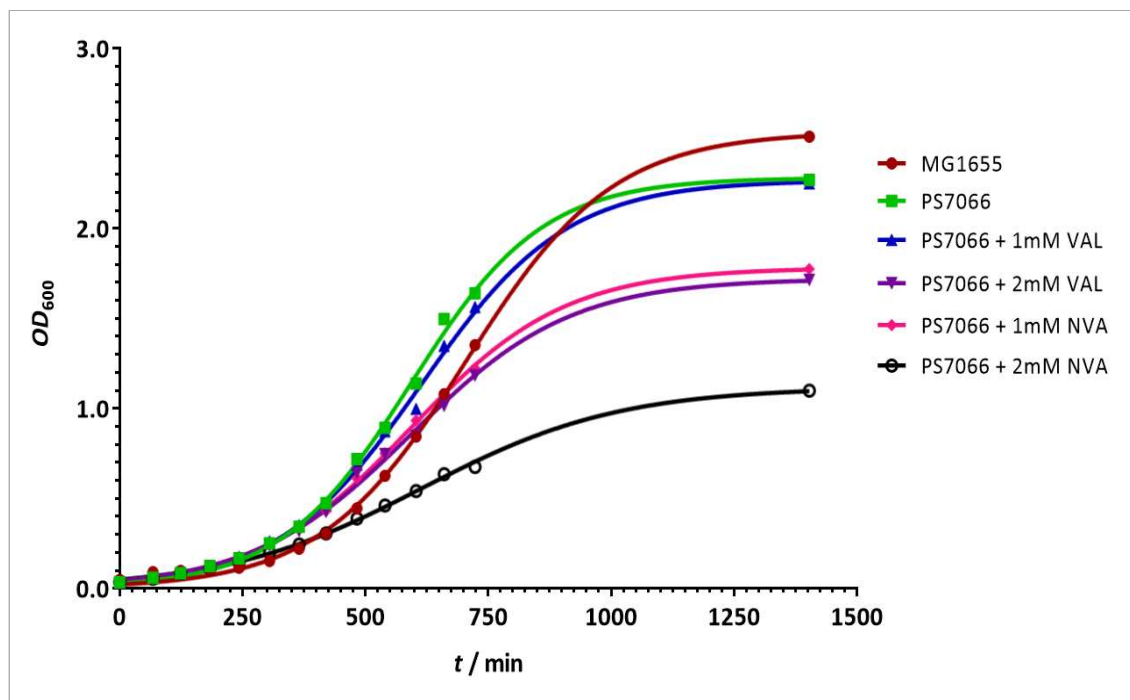
4.5.2. Rast sojeva PS7066 i MG1655 bakterije *Escherichia coli* u (ne)mistranslatirajućim uvjetima uz pojačanu ekspresiju β -galaktozidaze

Kao i kod fosfataza prvi korak istraživanja bilo je ispitati rast sojeva MG1655 i PS7066 u nemistranslatirajućim te mistranslatirajućim uvjetima, ovoga puta uz pojačanu ekspresiju β -galaktozidaze iz *E. coli*.

Rast bakterijskih stanica sojeva PS7066 i MG1655 u nemistranslatirajućim uvjetima provjeren je uzgojem sojeva u M9-minimalnom mediju u prisutnosti $100 \mu\text{mol dm}^{-3}$ egzogeno dodanih aminokiselina izoleucin, leucin i valin te $50 \mu\text{mol dm}^{-3}$ egzogeno dodanog tiamina. Za provjeru rasta isključivo soja PS7066 u mistranslatirajućim uvjetima, proveden je uzgoj u M9-mediju istog sastava, ali dodatno suplementiranom aminokiselinama valin ili norvalin do koncentracija 1 mmol dm^{-3} , odnosno 2 mmol dm^{-3} . M9-medij, sastava opisanog u potpoglavlju 3.1.6. Materijala i metoda, odabran je jer podržava rast bakterijskih stanica, ali ne sadrži izvore aminokiselina⁹² (kao primjerice Luria-Bertani tekući medij), što je nužno za praćenje učinka mistranslacije proteina pojedinom aminokiselinom. Rast je praćen spektrofotometrijski pri $\lambda = 600 \text{ nm}$, na način koji je detaljno opisan u potpoglavlju 3.2.3. Materijala i metoda. Grafičkim prikazivanjem ovisnosti optičke gustoće suspenzija bakterijskih stanica u ovisnosti o vremenu, dobivene su krivulje rasta koje su prikazane na Slici 4.8. Vrijeme diobe je dobiveno nakon prilagođavanja logističke krivulje na eksperimentalne podatke u programskom paketu za statističku obradu podataka *GraphPad Prism 6*, kako je to opisano u potpoglavlju 3.3.9. Materijala i metoda. Vremena diobe bakterijskih stanica analiziranih sojeva navedena su u Tablici 4.1.

Tablica 4.1 Vrijeme diobe bakterijskih stanica sojeva MG1655 i PS7066 u (ne)mistranslatirajućim uvjetima u minimalnom hranjivom mediju M9 s različitim koncentracijama egzogeno dodanog valina i norvalina pri temperaturi 37°C uz protresanje pri 250 okretaja u minuti

Hranjivi medij	Vrijeme diobe / min	
	MG1655	PS7066
M9	103.1	92.9
M9 + 1 mmol dm^{-3} VAL	-	101.9
M9 + 2 mmol dm^{-3} VAL	-	112.2
M9 + 1 mmol dm^{-3} NVA	-	109.1
M9 + 2 mmol dm^{-3} NVA	-	138.6



Slika 4.8 Krivulje rasta sojeva MG1655 i PS7066 u nemistranslatirajućim uvjetima te soja PS7066 u mistranslatirajućim uvjetima pri dvije koncentracije egzogeno dodanog valina, odnosno norvalina.

Krivulje rasta (Slika 4.8) te vremena diobe (Tablica 4.1) potvrđuju inhibitorni učinak valina i norvalina na rast soja PS7066, a vidljivo je i da se rast značajnije inhibira s povišenjem koncentracije egzogeno dodanih nepripadnih aminokiselina. Soj PS7066 je derivat divljeg tipa soja MG1655 u čijem je genomu mutacijom aminokiselina na položajima 241-250 unutar domene za popravak pogreške IleRS u alanine, dokinuta aktivnost popravka pogreške nakon prijenosa. Posljedično, budući da je popravak pogreške IleRS nužan za diskriminaciju izoleucina od norvalina i valina, dolazi do povremenog prijenosa valina ili norvalina na tRNA^{Ile}, što rezultira povremenom ugradnjom valina i norvalina na izoleucinske položaje u proteinima¹⁵. Iz krivulja rasta te vremena diobe se lako se može ustanoviti da je za rast bakterijskih stanica soja PS7066 pri obje koncentracijske razine nepripadnih aminokiselina toksičniji norvalin.

Naime, krivulje rasta sugeriraju da je bakterijski rast PS7066 slično inhibiran u prisutnosti 1 mmol dm⁻³ norvalina te dvostruko veće koncentracije egzogeno dodanog valina. To bi sugeriralo da je za uzgoj soja PS7066 mistranslacija norvalinom barem dva puta toksičnija od mistranslacije valinom. Ipak, uzimajući u obzir da je uzgoj soja proveden samo u jednoj replici jer su podatci bili potrebni isključivo za okvirnu procjenu dinamike uzgoja stanica do srednje logaritamske faze rasta u kojoj bi se stanice taložile radi dobivanja staničnog ekstrakta,

iste treba proučavati s oprezom. Detaljniju analizu toksičnosti valina i norvalina u soju PS7066 u sličnim uvjetima proveli su M. Biluš, M. Šemanjski i M. Močibob *et al.*, koji su praćenjem rasta bakterijskih stanica i sposobnosti stvaranja kolonija (*engl. colony forming unit, CFU*) prilikom uzgoja u M9-mediju suplementiranom s valinom, odnosno norvalinom, pokazali da je pri koncentraciji 2 mmol dm^{-3} egzogeno dodanih neprikladnih aminokiselina, norvalin toksičniji i do četiri puta od valina¹⁰. Rezultati dobiveni u ovom radu su u skladu s tim rezultatima. Prilikom uzgoja u mediju suplementiranom s 2 mmol dm^{-3} norvalina, rast bakterijskih stanica soja PS7066 je gotovo potpuno inhibiran. Rezultati su u skladu s recentnim istraživanjima na Zavodu za biokemiju (prof. dr. sc. Ita Gruić Sovulj, usmena komunikacija) koja upućuju da je mistranslacija neproteinogenom aminokiselinom, kakva je norvalin toksičnija od mistranslacije neprikladnom proteinogenom aminokiselinom, kakva je valin. Prema ovoj hipotezi, biološki su sustavi evoluirali prema strožem isključenju neproteinogenih aminokiselina iz procesa biosinteze proteina, budući da je mistranslacija neproteinogenim aminokiselinama toksičnija za rast i vijabilnost stanice od mistranslacije proteinogenim aminokiselinama. Naime, norvalin, u odnosu na izoleucin posjeduje linearni nerazgranati bočni ogranak manje hidrofobne površine. Manja hidrofobna površina bočnog ogranka norvalina u odnosu na bočni ogranak izoleucina smanjuje stabilizaciju tercijarne strukture proteina hidrofobnim efektom, dok nerazgranatost norvalinskog bočnog ogranka osigurava njegovu povećanu steričku slobodu¹². Sinergistički utjecaj ova dva efekta utječe na pravilno smatanje i stabilnost mistranslatiranog proteina. Uzimajući u obzir da su proteini pri fiziološkim uvjetima samo granično stabilni¹¹, mistranslacija valinom i norvalinom može dovesti do gubitka aktivnosti ili agregacije. Nastankom nefunkcionalnih staničnih proteina ili citotoksičnih proteinskih agregata dolazi do smanjenja vijabilnosti bakterijskih stanica, što je i opaženo. Izraženiji efekt mistranslacije proteina norvalinom na vijabilnost bakterijskih stanica u skladu je s pretpostavkom da je mistranslacija neproteinogenim aminokiselinama toksičnija od mistranslacije proteinogenim. Kako je već ustanovljeno, zamjena izoleucina za norvalin u proteinima značajnije utječe na njihovu strukturu i funkciju od istovrsne zamjene izoleucina valinom.

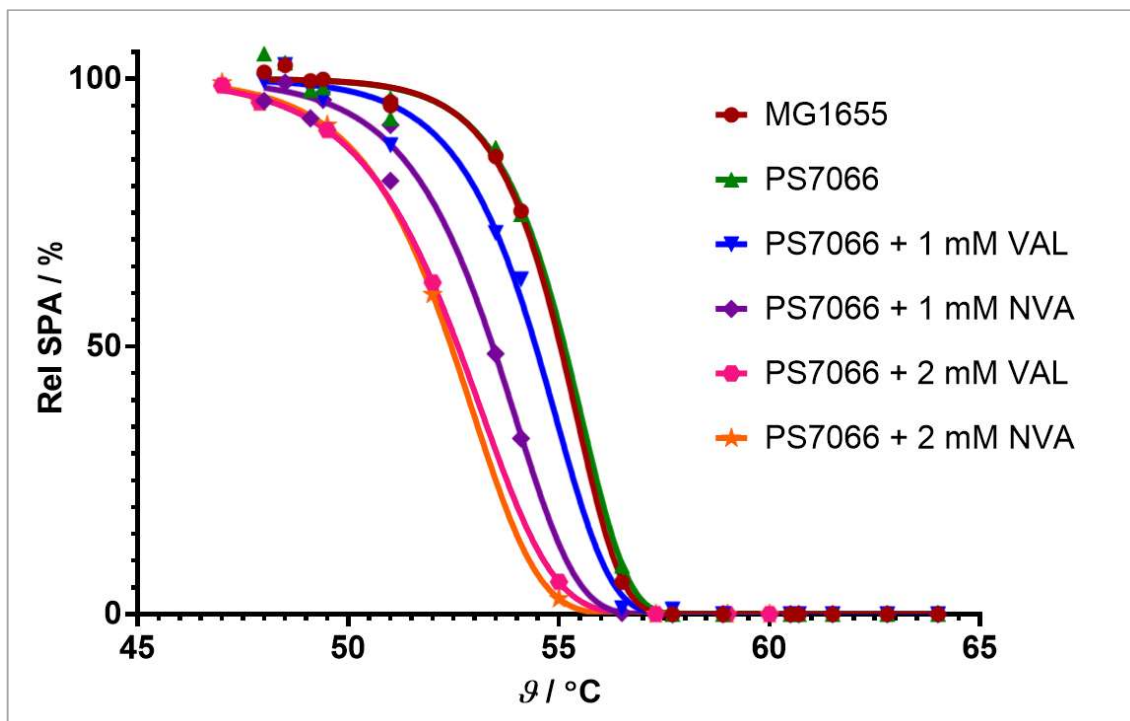
Prilikom uzgoja odabranih sojeva bilo je važno izuzetnu pažnju posvetiti održavanju sterilnih uvjeta uzgoja, budući da ni jedan od uzgajanih sojeva ne sadrži niti jedan gen za otpornost na antibiotik (karakteristike sojeva navedene u potpoglavlju 3.1.5 Materijala i metoda), koji bi osigurao selektivan uzgoj. Kako bi se spriječila kontaminacija, alikvoti suspenzije uzimani su u sterilnim uvjetima rada (laminar) nakon čega su grla tikvica spaljena

u plamenu. Paralelno s uzorcima u tresilicu je inkubiran i alikvot medija u koji nisu bile nasadene bakterijske stanice. Periodično je provjeravano da nije došlo do zamućenja medija bez nasadenih bakterijskih stanica jer bi to indiciralo kontaminaciju.

4.5.3. Termička stabilnost β -galaktozidaze osjetljiva je na mistranslaciju

Optimizirani kinetički test za Ec β -GAL omogućio je pouzdano praćenje njezine enzimске aktivnosti u staničnim ekstraktima podvrgnutim termičkoj denaturaciji pri više temperatura, primjenom protokola gradijentnog PCR-a kako je to detaljno opisano u potpoglavlju 3.3.8. Materijala i metoda. Mjerenja su omogućila dobivanje krivulje mekšanja Ec β -GAL u eksperimentalnim uvjetima u kojima je mjerenje provođeno. Točka infleksije krivulje mekšanja, odgovara temperaturi pri kojoj je denaturirano 50 % proteina u otopini i naziva se temperaturom mekšanja, a često se koristi za procjenu termičke stabilnosti proteina. U ovom istraživanju, određene su krivulje mekšanja i temperature mekšanja Ec β -GAL u staničnim ekstraktima stanica soja PS7066 uzgojenim u hranjivom mediju suplementiranom s egzogeno dodanim aminokiselinama valinom i norvalinom. Prisjetimo se, u soju PS7066 domena za popravak pogreške IleRS je inaktivirana, zbog čega enzim aktivno misacilira tRNA^{Ile} norvalinom, odnosno valinom. Posljedica misacilacije na IleRS je pojačana ugradnja valina i norvalina na izoleucinske položaje u proteinima, pa tako i u Ec β -GAL, što potencijalno mijenja svojstva proteina, kakvo je termička stabilnost. Kako bi se utvrdilo da je potencijalna opažena promjena temperature mekšanja zaista posljedica mistranslacije Ec β -GAL valinom i norvalinom, temperatura mekšanja Ec β -GAL u staničnom ekstraktu stanica uzgojenih u mistranslatirajućim uvjetima uspoređena je s temperaturom mekšanja Ec β -GAL u staničnom ekstraktu soja MG1655. Naime, soj MG1655 za razliku od soja PS7066 ima funkcionalnu domenu za popravak IleRS zbog čega u soju ne dolazi do mistranslacije izoleucinskih položaja u proteinu valinom ili norvalinom.

Krivulje mekšanja Ec β -GAL u staničnim ekstraktima sojeva MG1655 i PS7066 u nemistranslatirajućim i mistranslatirajućim uvjetima prikazane su na Slici 4.9, dok su temperature mekšanja u istim uvjetima navedene u Tablici 4.2. Vrijednosti specifičnih aktivnosti Ec β -GAL dobivene u pojedinim eksperimentima normirane su s obzirom na maksimalnu vrijednost na krivulji kojom je opisan set podataka (potpoglavlje 3.3.9. Materijala i metoda).



Slika 4.9 Krivulje mekšanja Ec β -GAL u staničnim ekstraktima sojeva MG1655 i PS7066 uzgojenih u nemistranslatirajućim i mistranslatirajućim uvjetima. Pojedinačne točke na krivuljama predstavljaju srednje vrijednosti tri nezavisna mjerenja provedena u istim uvjetima.

Tablica 4.2 Temperature mekšanja Ec β -GAL dobivene praćenjem specifične aktivnosti Ec β -GAL u staničnim ekstraktima sojeva MG1655 i PS7066 u nemistranslatirajućim i mistranslatirajućim uvjetima.

Soj i uvjeti → Replika ↓	PS7066					
	MG1655	PS7066	+ 1 mmol dm ⁻³ VAL	+ 1 mmol dm ⁻³ NVA	+ 2 mmol dm ⁻³ VAL	+ 2 mmol dm ⁻³ NVA
1	55,22	55,24	54,02	53,22	52,26	52,06
2	55,01	55,16	54,20	53,60	52,59	52,58
3	55,06	55,20	54,38	53,70	52,87	52,50
($T_M \pm SD$) / °C	55,1 ± 0,1	55,20 ± 0,04	54,2 ± 0,1	53,5 ± 0,3	52,6 ± 0,3	52,4 ± 0,2

Podatci jasno upućuju na nekoliko zaključaka. Temperature mekšanja Ec β -GAL (koje odgovaraju vrijednosti temperature za koju je vrijednost relativne specifične aktivnosti 50 %) u staničnim ekstraktima sojeva MG1655 i PS7066 uzgojenih u nemistranslatirajućim uvjetima su istovjetne. To ukazuje da prilikom uzgoja u nemistranslatirajućim uvjetima ne dolazi do značajne mistranslacije u soju PS7066, što je u skladu s radom M. Biluš, M. Šemanjski, M. Močibob *et al.*, koji su analizom proteoma soja PS7066 u nemistranslatirajućim uvjetima pokazali da ne dolazi do značajnije mistranslacije¹⁰. U ovdje provedenom istraživanju, podudaranje temperatura mekšanja Ec β -GAL u ova dva soja znači da će se eventualne promjene u temperaturi mekšanja Ec β -GAL, opažene kod uzgoja u mistranslatirajućim uvjetima moći pripisati mistranslaciji, a ne inherentnoj razlici u ponašanju sojeva MG1655 i PS7066. Razlike u temperaturama mekšanja Ec β -GAL u ekstraktima sojeva PS7066 uzgojenih s različitim koncentracijama egzogeno dodanih aminokiselina valin, odnosno norvalin, upućuju da mistranslacija izaziva promjenu termičke stabilnosti Ec β -GAL kako je to bilo i očekivano. Promjene temperatura Ec β -GAL u staničnim ekstraktima stanica soja PS7066 uzgojenih u mistranslatirajućim uvjetima u odnosu na temperaturu mekšanja Ec β -GAL u ekstraktu soja PS7066 uzgajanog u nemistranslatirajućim uvjetima su statistički signifikantne, što je utvrđeno provedbom Studentovog testa kako je to opisano u potpoglavlju 3.3.10. Materijala i metoda, a rezultati statističke analize su prikazani u Tablici 4.3.

Tablica 4.3 Rezultati Studentovog testa koji pokazuju signifikantnost razlika temperatura mekšanja Ec β -GAL u ekstraktima sojeva MG1655 i PS7066 uzgajanih u nemistranslatirajućim i mistranslatirajućim uvjetima.

Par za usporedbu		$(\Delta T_M \pm SD) / ^\circ\text{C}$	<i>P</i>
MG1655	PS7066	0,10 \pm 0,08	0,1572
PS7066	PS7066 + 1 mmol dm ⁻³ VAL	- 1,0 \pm 0,2	0,0128
PS7066	PS7066 + 1 mmol dm ⁻³ NVA	- 1,7 \pm 0,3	0,0089
PS7066	PS7066 + 2 mmol dm ⁻³ VAL	- 2,6 \pm 0,3	0,0049
PS7066	PS7066 + 2 mmol dm ⁻³ NVA	- 2,8 \pm 0,3	0,0041
PS7066 + 1 mmol dm ⁻³ VAL	PS7066 + 2 mmol dm ⁻³ VAL	- 1,6 \pm 0,1	0,0019
PS7066 + 1 mmol dm ⁻³ VAL	PS7066 + 1 mmol dm ⁻³ NVA	- 0,7 \pm 0,1	0,0070
PS7066 + 1 mmol dm ⁻³ VAL	PS7066 + 2 mmol dm ⁻³ NVA	- 1,8 \pm 0,2	0,0032
PS7066 + 1 mmol dm ⁻³ NVA	PS7066 + 2 mmol dm ⁻³ NVA	- 1,13 \pm 0,09	0,0023
PS7066 + 2 mmol dm ⁻³ VAL	PS7066 + 2 mmol dm ⁻³ NVA	- 0,2 \pm 0,1	0,1878

U Tablici 4.3 prikazana je srednja vrijednost razlika dvaju setova podataka zajedno s pripadnom standardnom devijacijom te pripadajuća P-vrijednost. Statistički test proveden je kako je opisano u potpoglavlju 3.3.10. Materijala i metoda. Statistički značajni rezultati (označeni zelenom bojom) su oni za koje je $P < 0,05$. Statistički beznačajne razlike rezultata označene su crvenom bojom i za njih vrijedi $P > 0,05$. Na osnovu podataka navedenih u Tablici 4.3 može se zaključiti da pri koncentraciji 1 mmol dm⁻³ dodane nepripadne aminokiseline, mistranslacija izoleucinskih položaja norvalinom značajnije destabilizira Ec β -GAL. Za očekivati je da mistranslacija slično djeluje i na druge proteine. Ovi rezultati zajedno s rezultatima praćenja rasta bakterijskih stanica u mistranslatirajućim uvjetima (prethodno potpoglavlje), sugeriraju da je pri koncentracijskoj razini 1 mmol dm⁻³ nepripadnih aminokiselina, mistranslacija izoleucinskih položaja u proteinima norvalinom toksičnija od mistranslacije valinom. Temeljni mehanizam toksičnosti čini se da je akumulacija staničnih proteina smanjene termičke stabilnosti. Naime i norvalin i valin, strukturno su slični izoleucinu, od kojeg se razlikuju po hidrofobnoj površini (oba bočna ogranka su manja za jednu metilnu skupinu od izoleucinskog) te po razgranatosti (bočni ogranak valina je jednako β -razgranat kao i bočni ogranak izoleucina, dok je bočni ogranak norvalina nerazgranat). Odsutstvo β -metilne skupine u bočnom ogranku norvalina u odnosu na bočne ogranke izoleucina i valina rezultira njegovom povećanom steričkom slobodom i značajno različitom preferencijom za tip

sekundarne strukture u kojoj se dominantno pojavljuje (u odnosu na Ile i Val)^{88,89}. Sinergizam ova dva utjecaja na smanjenje stabilnosti proteina, vjerojatno je rezultat ovdje opažene razlike u temperaturi mekšanja Ec β -GAL mistranslatirane valinom i norvalinom. Ec β -GAL je posebno osjetljiva na mistranslaciju izoleucinskih položaja neproteinogenim aminokiselinama uzimajući u obzir veliki broj izoleucina koji se nalazi na dodirnoj površini podjedinica enzima. Dodirna površina podjedinica je nužna za tetramerizaciju enzima o kojoj ovisi aktivnost Ec β -GAL, budući da je enzim funkcionalan isključivo u tetramernoj formi⁹⁰. Smanjenje jakosti hidrofobnih interakcija na dodirnom sučelju podjedinica ili povećanje njegove steričke slobode, nastali kao posljedica mistranslacije Ec β -GAL valinom, odnosno norvalinom, vjerojatno rezultiraju opaženim gubitkom termičke stabilnosti.

Promjena termičke stabilnosti Ec β -GAL iz staničnih ekstrakata PS7066 uzgajanih u mediju suplementiranom s 2 mmol dm⁻³ nepripadnih aminokiselina u odnosu na temperaturu mekšanja Ec β -GAL iz staničnih ekstrakata PS7066 uzgojenih u nemistranslatirajućim uvjetima pokazuje da postoji koncentracijska ovisnost termičke stabilnosti Ec β -GAL (moguće i drugih staničnih proteina) o mistranslaciji izoleucinskih položaja u proteinima valinom, odnosno norvalinom (Tablica 4.3). To je u skladu s istraživanjem M. Biluš, M. Šemanjski, M. Močibob *et al.* koji su pokazali da se u uvjetima uzgoja soja PS7066 u mediju suplementiranom s 2 mmol dm⁻³ norvalina, odnosno valina opaža globalna mistranlacija oko 14 % izoleucinskih položaja s norvalinom te 19 % izoleucinskih položaja valinom, u odnosu na mistranslaciju manju od 10 % kod uzgoja sojeva u mediju s koncentracijom nepripadnih aminokiselina od 0,5 mmol dm⁻³ [10]. Ono što je potencijalno zanimljivije je odsutvo razlike u temperaturi mekšanja Ec β -GAL iz staničnih ekstrakata soja PS7066 uzgojenih s 2 mmol dm⁻³ valina, odnosno 2 mmol dm⁻³ norvalina. Usporedbe radi, statistički značajna razlika u temperaturi mekšanja Ec β -GAL mistranslatirane norvalinom u odnosu na valin, opažena je pri koncentracijskoj razini 1 mmol dm⁻³ nepripadnih aminokiselina. Ukoliko se pretpostavi povećana toksičnost norvalina u odnosu na valin (što sugeriraju dosadašnji rezultati), odsutstvo razlike u temperaturi mekšanja može se pripisati smanjenoj mistranslatiranosti proteoma norvalinom pri koncentraciji 2 mmol dm⁻³ u odnosu na mistranslaciju valinom. Prema ovoj hipotezi 5 % veća mistranslatiranost izoleucinskih položaja u proteinima valinom u odnosu na norvalin dovoljna je da anulira razliku u termičkoj stabilnosti Ec β -GAL opaženu kod uzgoja PS7066 u prisutstvu 1 mmol dm⁻³ nepripadnih aminokiselina. Iako nije jasno zbog čega postoji razlika u postotku mistranslacije proteoma između valina i norvalina, prilikom uzgoja soja

PS7066 u mediju suplementiranom s 2 mmol dm^{-3} neprirodnih aminokiselina, ista je opažena i drugdje. Smatra se da razlika proizlazi iz narušavanja staničnih omjera Ile/Val/Nva u stanici koji su posljedica utjecaja norvalina na transport aminokiselina razgranatog lanca (izoleucin, leucin i valin) preko membranskog ABC-prenositelja (Marija Pranjić, *mag. chem.*, usmena komunikacija).

Rezultati proučavanja termičke stabilnosti Ec β -GAL iz staničnih ekstrakata PS7066 u nemistranslatirajućim te mistranslatirajućim uvjetima su pokazali da je Ec β -GAL u neobrađenim staničnim ekstraktima soja PS7066 izvrstan modelni protein za praćenje mistranslacije izoleucinskih položaja u proteinima valinom, odnosno norvalinom. Provedba eksperimenta je jednostavna, a termička stabilnost Ec β -GAL u staničnim ekstraktima ovisna o mistranslaciji izoleucinskih položaja valinom, odnosno norvalinom.

§ 5. ZAKLJUČAK

1. Ukupne stanične fosfataze u staničnim ekstraktima bakterijskih stanica uzgojenih u M9-minimalnom hranjivom mediju nisu pogodni modelni proteini za praćenje mistranslacije izoleucinskih položaja u proteinima valinom ili norvalinom. Specifična aktivnost ukupnih staničnih fosfataza u ekstraktu je niska, nelinearna i nereproducibilna za ekstrakte stanica dobivene iz različitih uzgoja.
2. Pokušaj pojačane ekspresije fosfataza u bakterijskim stanicama prilikom uzgoja u mediju s kontroliranom koncentracijom fosfata (Tris-medij s egzogeno dodanim izvorom fosfata) ili starvacijom u mediju bez dodatka fosfata nije rezultirao značajnim povećanjem specifične aktivnosti ukupnih staničnih fosfataza u ekstraktu, niti povećanjem reproducibilnosti specifične aktivnosti za ekstrakte dobivene iz stanica iz različitih uzgoja.
3. Pojačano eksprimirana β -galaktozidaza u staničnim ekstraktima pokazala se kao izvrstan modelni protein za praćenje mistranslacije izoleucinskih položaja u proteinima valinom ili norvalinom. Specifična aktivnost β -galaktozidaze u staničnom ekstraktu je visoka i reproducibilna za ekstrakte dobivene iz stanica iz različitih uzgoja.
4. Mistranslacija izoleucinskih položaja u β -galaktozidazi valinom i norvalinom smanjuje termičku stabilnost enzima. U ekstraktu stanica koje su uzgajane u dodatku 1 mmol dm^{-3} valina i norvalina temperatura mekšanja β -galaktozidaze smanjuje se za $(1,0 \pm 0,2) \text{ }^\circ\text{C}$, odnosno $(1,7 \pm 0,3) \text{ }^\circ\text{C}$. U ekstraktu stanica koje su uzgajane u dodatku 2 mmol dm^{-3} valina i norvalina temperatura mekšanja β -galaktozidaze smanjuje se za $(2,6 \pm 0,3) \text{ }^\circ\text{C}$, odnosno $(2,8 \pm 0,3) \text{ }^\circ\text{C}$.
5. Dobiveni rezultati upućuju da mistranslacija izoleucinskih položaja u β -galaktozidazi norvalinom – neproteinogenom aminokiselinom linearnog bočnog ogranka ima veći utjecaj na stabilnost β -galaktozidaze (potencijalno i drugih staničnih proteina) od mistranslacije izoleucinskih položaja proteinogenom aminokiselinom, valinom.

6. Mistranclacija izoleucinskih položaja proteina norvalinom toksičnija je od mistranclacije valinom, barem za stanice soja PS7066 uzgajane u prisutstvu 1 mmol dm^{-3} neprirodnih aminokiselina suplementiranih u hranjivi medij. Na to upućuju dva nezavisna rezultata: (a) Vijabilnost bakterijskih stanica soja PS7066 manja je prilikom uzgoja soja u mediju suplementiranom s 1 mmol dm^{-3} norvalina, nego kod suplementacije medija istom količinom valina (prema krivuljama rasta stanica soja PS7066 u M9-mediju suplementiranom s valinom i norvalinom) i (b) Mistranclacija norvalinom smanjuje termičku stabilnost β -galaktozidaze 70 % više od mistranclacije valinom (mjereno u staničnim ekstraktima stanica uzgojenih s 1 mmol dm^{-3} valina, odnosno norvalina).
7. Uzimajući u obzir pretpostavljenu povećanu toksičnost mistranclacije izoleucinskih položaja proteina neproteinogenim norvalinom u odnosu na mistranclaciju valinom, može se diskutirati o valjanosti hipoteze prema kojoj je mistranclacija neproteinogenom aminokiselinom toksičnija od mistranclacije proteinogenom aminokiselinom. Shodno tome, biološki sustavi su mogućno evoluirali za učinkovito isključivanje neproteinogenih aminokiselina iz biosinteze proteina. Popravak pogreške aaRS koje ne mogu vjerno aminoacilirati svoje tRNA je stoga nužan.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

6.1. Popis korištenih kratica u radu

Tablica 6.1 Popis kratica koje su korištene u radu navedenih abecednim redoslijedom. Naveden je puni naziv na hrvatskom jeziku koji odgovara kratici te puni naziv na jeziku izvorniku, za kratice stranog porijekla.

Kratica	Puni naziv na hrvatskom jeziku	Puni naziv na izvorniku
AA	Aminokiselina	engl. <i>amino acid</i>
aaRS	Aminoacil-tRNA-sintetaza	engl. <i>aminoacyl-tRNA synthetase</i>
aa-tRNA	Aminoacilirana tRNA	engl. <i>aminoacylated-tRNA</i>
aa-AMP	Aminoacil-adenilat	-
ACP	Kisele fosfataze	engl. <i>acid phosphatases</i>
ALP	Alkalne fosfataze	engl. <i>alkaline phosphatases</i>
AMP	Adenozin-5'-monofosfat	engl. <i>adenosine monophosphate</i>
APS	Amonijev persulfat	engl. <i>ammonium persulphate</i>
ATP	Adenozin-5'-trifosfat	engl. <i>adenosine triphosphate</i>
BSA	Govedi serumski albumin	engl. <i>bovine serum albumin</i>
CBB	Coomassie Brilliant Blue	engl. <i>coomassie brilliant blue</i>
CFU	Sposobnost tvorbe kolonija	engl. <i>colony forming unit</i>
CP1	Deacilacijska domena IleRS	engl. <i>connective peptide 1</i>
DTT	Ditiotreitol	-
EDTA	Etilendiamintetraoctena kiselina	engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EF	Elongacijski faktor	engl. <i>elongation factor</i>
GDP	Gvanozin difosfat	engl. <i>guanosine diphosphate</i>
GTP	Gvanozin trifosfat	engl. <i>guanosine triphosphate</i>
Hepes	4-(2-hidroksietil)-1-piperazin etansulfonska kiselina	-
HSP	Proteini staničnog odgovora na toplinski šok	engl. <i>heat shock proteins</i>
IF	Inicijacijski faktor	engl. <i>initiation factor</i>

Ile-AMS	5'-N-[N-(L-izoleucil)sulfamoil] adenozin	-
IleRS	Izoleucil-tRNA-sintetaza. <i>Imena svih sintetaza izvode se prema troslovnoj oznaci aminokiseline koju sintetaza prenosi na tRNA nakon čega slijedi „RS“</i>	
IPTG	izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid	-
LB	Luria-Bertani	-
mRNA	Glasnička RNA	<i>engl. messenger RNA</i>
NEF	Faktor izmjene nukleotida	<i>engl. nucleotide exchange factor</i>
oNPG	<i>o</i> -nitrofenil-β-D-galaktopiranozid	<i>engl. o-nitrophenyl-β-D-galactopiranoside</i>
PAGE	Poliakrilamidna gel- elektroforeza	<i>eng. polyacrylamide gel-electrophoresis</i>
PMSF	Fenil-metil-sulfonilfluorid	-
pNPP	<i>p</i> -nitrofenil-fosfat	<i>engl. p-nitrophenylphosphate</i>
pNPG	<i>p</i> -nitrofenil-β-D-galaktopiranozid	<i>engl. p-nitrophenyl-β-D-galactopiranoside</i>
Psi	Geni inducirani starvacijom stanica fosfatima	<i>engl. phosphate-starvation inducible</i>
PDB	Proteinska baza podataka	<i>engl. Protein Data Bank</i>
RF	Faktor otpuštanja	<i>engl. release factor</i>
rRNA	Ribosomska RNA	<i>engl. ribosomal RNA</i>
ROS	Reaktivne kisikove vrste	<i>engl. reactive oxygen species</i>
SDS	Natrijev dodecil-sulfat	<i>engl. sodium dodecyl sulphate</i>
TEMED	Tetrametiletildiamin	-
Tris	Tris(hidroksimetil)aminometan	-
tRNA	Transfer tRNA	<i>engl. transfer RNA</i>

6.2. Popis proteinogenih aminokiselina

Tablica 6.2 Popis standardnih proteinogenih aminokiselina te njihovih troslovnih i jednoslovnih kratica.

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

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. M. Ibba, D. Soll, Aminoacyl-tRNA synthesis, *Annu. Rev. Biochem.* **69** (2000) 617-650.
2. M. Ibba, D. Söll. The renaissance of aminoacyl-tRNA synthesis, *EMBO Rep.* **2** (2001) 382 -387.
3. J. J. Perona, I. Gruić-Sovulj, Synthetic and editing mechanisms of aminoacyl-tRNA synthetases, *Top. Curr. Chem.* **334** (2014) 1-41.
4. R. B. Loftfield, D. Vanderjagt, The frequency of errors in protein biosynthesis, *Biochem. J.* **128** (1972) 1353-1356.
5. J. M. Ogle, V. Ramakrishnan, Structural insights into translational fidelity, *Annu. Rev. Biochem.* **74** (2005) 129-177.
6. J. Soini, C. Falschlehner, C. Leidert, J. Bernhardt, J. Vuoristo, P. Neubauer, Norvaline is accumulated after a down-shift of oxygen in *Escherichia coli* W3110, *Microb. Cell Fact.* **7** (2008) 26-37.
7. J. Soini, K. Ukkonen, P. Neubauer, Accumulation of amino acids deriving from pyruvate in *Escherichia coli* W3110 during fed-batch cultivation in a two-compartment scale-down bioreactor, *Adv. Biosci. Biotechnol.* **2** (2011) 336-339.
8. I. Apostol, J. Levine, J. Lippincott, J. Leach, E. Hess, B. C. Glascock, J. M. Weickert, R. Blackmore, Incorporation of norvaline at leucine positions in recombinant human hemoglobin expressed in *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* **272** (1997) 28980-28988.
9. M. Dulic, J. J. Perona, I. Gruic-Sovulj, Determinants for tRNA-dependent pretransfer editing in the synthetic site of isoleucyl-tRNA synthetase, *Biochemistry* **53** (2014) 6189-6198.
10. M. Biluš, M. Šemanjski, M. Močibob, I. Živković, N. Cvetešić, D. S. Tawfik, A. Toth-Petroczy, B. Maček, I. Gruić-Sovulj, On the mechanism and origin of isoleucyl-tRNA synthetase editing against norvaline, *J. Mol. Biol.* DOI: 10.1016/j.jmb.2019.01.029
11. K. A. Dill, Dominant forces in protein folding, *Biochemistry* **29** (1990) 7134-7155.
12. C. Alvarez-Carreño, A. Becerra, A. Lazcano, Norvaline and norleucine may have been more abundant protein components during early stages of cell evolution, *Orig. Life Evol. Biosph.* **43** (2013) 363-375.
13. L. Ribas de Pouplana, M. A. S. Santos, J. Zhu, P. J. Farabaugh, B. Javid, Protein mistranslation: friend or foe?, *Trends Biochem. Sci.* **39** (2014) 355-362.
14. P. Leuenberger, S. Ganscha, A. Kahraman, V. Cappelletti, P. J. Boersema, C. von Mering, M. Claassen, P. Picotti, Cell-wide analysis of protein thermal unfolding reveals determinants of thermal stability, *Science* **355** (2017) 1-12.

15. V. Pezo, D. Metzgar, T. L. Hendrickson, W. F. Waas, S. Hazebrouck, V. Doring, P. Marliere, P. Schimmel, V. De Crecy-Lagard, Artificially ambiguous genetic code confers growth yield advantage, *Proc. Acad. Nat. Acad. Sci. USA* **101** (2004) 8593-8597.
16. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of biochemistry*, W. H. Freeman Mackmillan Learning, New York, 7. izdanje, 1077-1123.
17. D. Voet, J. G. Voet, *Biochemistry*, John Willey&Sons Inc., 4. izdanje, 2011.
18. M. V. Rodnina, Translation in Prokaryotes, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **10** (2018) 1-21.
19. D. N. Wilson, G. Blaha, R. S. Connell, V. P. Ivanov, H. Jenke, U. Stelzl, Y. Teraoka, H. K. Nierhaus, Protein synthesis at atomic resolution: Mechanistics of translation in the light of highly resolved structures for the ribosome, *Curr. Protein Pept.* **3** (2002) 1-53.
20. P. Milón, C. Maracci, L. Filonava, C. O. Gualerzi, M. V. Rodnina, Real-time assembly landscape of bacterial 30S translation initiation complex, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19** (2012) 609-618.
21. W. Wintermeyer, F. Pesk, M. Beringer, K. B. Gromadski, A. Savelsbergh, M. V. Rodnina, Mechanisms of elongation on the ribosome: dynamics of a macromolecular machine, *Biochem. Soc. Trans.* **32** (2004) 733-737.
22. T. E. Dever, R. Green, The elongation, termination, and recycling phases of translation in eukaryotes, *Cold Spring. Harb. Perspect. Biol.* **4** (2012) a013706.
23. N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore, T. A. Steitz, The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution, *Science* **289** (2000) 905-920.
24. A. Sievers, M. Beringer, M. V. Rodnina, R. Wolfenden, The ribosome as an entropy trap, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101** (2004) 7897-7901.
25. B. M. Hoagland, L. M. Stephenson, F. J. Scott, I. L. Hecht, C. P. Zamecnik, A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis, *J. Biol. Chem.* **231** (1958) 241-257.
26. A. W. Cantara, F. P. Crain, J. Rozenski, A. J. McCloskey, A. K. Harris, X. Zhang, A. F. Vendeix, D. Fabris, F. P. Agris, The RNA Modification Database, RNAMDB: 2011 update, *Nucleic Acids Res.* **39** (2011) D19501.
27. M. Helm, R. Giegé, C. Florentz, A Watson-Crick base-pair disrupting methyl group (_{m1}A9) is sufficient for cloverleaf folding of human mitochondrial tRNA^{Lys}, *Biochemistry* **38** (1999) 13338-13346.
28. C. Lorenz, C. E. Lünse, M. Mörl, tRNA modifications: Impact on structure and thermal adaptation, *Biomolecules* **35** (2017) 1-29.
29. R. Giegé, M. Frugier, Transfer RNA structure and identity, u: *Madame Curie Bioscience Database*, Austin (TX), Landes Bioscience, 2000-2013. dostupno na internetskoj adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6236/>
30. C. B. Anfinsen, Principles that govern the folding of protein chains, *Science* **181** (1973) 223-230.

31. M. J. Gething, J. Sambrook, Protein folding in the cell, *Nature* **355** (1992) 33-44.
32. F. U. Hartl, M. Hayer-Hartl, Converging concepts of protein folding *in vitro* and *in vivo*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16** (2009) 574-581.
33. S. E. Jacson, How do small single-domain proteins fold?, *Fold. Des.* **3** (2004) R81-R90.
34. J. Kubelka, J. Hofrichter, W. A. Eaton, The protein folding "speed limit", *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14** (2004) 76-88.
35. C. Levinthal, How to fold graciously?, Mossbauer spectroscopy in biological systems, *Proceedings of a meeting held at Allerton House, Monticello, Illinois, 1969*, 22-24.
36. J. D. Bryngelson, J. N. Onuchic, N. D. Socci, P. G. Wolynes, Funnels, pathways and the energy landscape of protein folding: A synthesis, *Proteins* **21** (1995) 167-195.
37. D. Baker, A surprising simplicity to protein folding, *Nature* **405** (2000) 39-42.
38. C. M. Dobson, A. Sali, M. Karplus, Protein folding: a perspective from theory and experiment, *Angew. Chem. Int. Ed.* **37** (1998) 868-893.
39. R. B. Freedman, Native disulphide bond formation in protein biosynthesis: Evidence for the role of protein disulphide isomerase, *Trends Biochem. Sci.* **9** (1984) 438-441.
40. F. U. Hartl, R. Hlodan, T. Langer, Molecular chaperons in protein folding: the art of avoiding sticky situations, *Trends Biochem. Sci.* **19** (1994) 20-26.
41. F. U. Hartl, A. Bracher, M. Hayer-Hartl, Molecular chaperones in protein folding and proteostasis, *Nature* **475** (2011) 324-332.
42. H. Chick, J. C. Martin, On the 'heat-coagulation' of proteins, *J. Physiol.* **43** (1911) 1-27.
43. H. Wu, Studies on denaturation of proteins – A theory of denaturation, *Am. J. Physiol.* **90** (1929) 562-563.
44. E. V. Smirnova, V. A. Lakunina, I. Tarassov, I. A. Krashennnikov, P. A. Kamenski, Noncanonical functions of aminoacyl-tRNA synthetases, *Biochemistry* **77** (2012) 15-25.
45. 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, S. L. Ackermann, Editing-defective tRNA synthetase causes protein misfolding and neurodegeneration, *Nature* **443** (2006) 50-55.
46. K. Shiba, P. Schimmel, Tripartite functional assembly of a large class I aminoacyl tRNA synthetase, *J. Biol. Chem.* **267** (1992) 22703-22706.
47. T. Nakama, O. Nureki, S. Yokoyama, Structural basis for the recognition of isoleucyl-adenylate and an antibiotic, mupirocin, by isoleucyl-tRNA synthetase, *J. Biol. Chem.* **276** (2001) 47387-47393.
48. S. S. Yadavalli, M. Ibba, Quality control in aminoacyl-tRNA synthesis its role in translational fidelity, *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* **86** (2012) 1-43.

49. O. Nureki, D. G. Vassylyev, M. Tateno, A. Shimada, T. Nakama, S. Fukai, M. Konno, T. L. Hendrickson, P. Schimmel, S. Yokoyama, Enzyme structure with two catalytic sites for double-sieve selection of substrate, *Science* **280** (1998) 578-582.
50. L. F. Silvan, J. Wang, T. A. Steitz, Insights into editing from an Ile-tRNA synthetase structure with tRNA^{Ile} and mupirocin, *Science* **285** (1999) 1074-1077.
51. R. A. Fersht, Editing mechanisms in protein synthesis, Rejection of valine by the isoleucyl-tRNA synthetase, *Biochemistry* **16** (1997) 1025-1030.
52. R. Fukunaga, S. Fukai, R. Ishitani, O. Nureki, S. Yokoyama, Crystal structures of the CP1 domain from *Thermus thermophilus* isoleucyl-tRNA synthetase and its complex with L-valine, *J. Biol. Chem.* **279** (2004) 8396-8402.
53. Y. J. Lee, Promiscuous methionyl-tRNA synthetase mediates adaptive mistranslation to protect cells against oxidative stress, *J. Cell. Sci.* **127** (2014) 4234-4245.
54. R. A. Fersht, C. Dingwall, CysteinyI-tRNA synthetase from *Escherichia coli* does not need an editing mechanism to reject serine and alanine. High binding energy of small groups in specific molecular interactions, *Biochemistry* **18** (1979) 1245-1249.
55. N. M. Reynolds, B. Lazazzera, M. Ibba, Cellular mechanisms that control mistranslation, *Nat. Rev. Microbiol.* **8** (2010) 849-857.
56. P. Edelman, J. Gallant, Mistranslation in *E. coli*, *Cell* **10** (1977) 131-137.
57. J. Parker, J. D. Friesen, "Two out of three" codon reading leading to mistranslation *in vivo*, *Mol. Gen. Genet.* **177** (1980) 439-445.
58. N. Ellis, J. Gallant, An estimate of the global error frequency in translation, *Mol. Gen. Genet.* **188** (1982) 169-172.
59. A. Blank, J. A. Gallant, R. R. Burges, L. A. Loeb, An RNA-polymerase mutant with reduced accuracy of chain elongation, *Biochemistry* **25** (1986) 5920-5928.
60. K. Mohler, M. Ibba, Translational fidelity and mistranslation in the cellular response to stress, *Nat. Microbiol.* **2** (2017) 17117.
61. F. J. LaRiviere, A. D. Wolfson, O. C. Uhlenbeck, Uniform binding of aminoacyl-tRNAs to elongation factor Tu by thermodynamic compensation, *Science* **294** (2001) 162-165.
62. J. M. Bacher, V. de Crecy-Lagard, P. R. Schimmel, Inhibited cell growth and protein functional changes from an editing-defective tRNA synthetase, *Proc. Nac. Acad. Sci. USA* **102** (2005) 1697-1701.
63. L. P. Foster, Stress-induced mutagenesis in bacteria, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **42** (2007) 373-397.
64. D. J. Betteridge, What is Oxidative stress?, *Metabolism* **49** (2000) 3-8.

65. M. H. Schwartz, T. Pan, Temperature dependent mistranslation in a hyperthermophile adopts proteins to lower temperatures, *Nucl. Acid Res.* **44** (2016) 294-303.
66. L. Li, T. M. Boniecki, D. J. Jaffe, S. B. Imai, M. P. Yau, A. Z. Luthey-Schulten, Naturally occurring aminoacyl-tRNA synthetases editing-domain mutations that cause mistranslation in *Mycoplasma* parasites, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **108** (2011) 9378-9383.
67. P. Nandi, P. G. Sen, An antifungal substance from a strain of *Bacillus subtilis*, *Nature* **172** (1953) 871-872.
68. Mirna Biluš, *Mehanizam diskriminacije prirodnih proteinogenih i neproteinogenih neprirodnih aminokiselina kod aminoacil-tRNA-sintetaza razreda IA*, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2016, 101-103.
69. N. Cvetešić, A. Palencia, I. Halasz, S. Cusack, I. Gruić-Sovulj, The physiological target for LeuRS translational quality control is norvaline, *EMBO J.* **33** (2014) 1639-1653.
70. N. Cvetešić, J. J. Perona, I. Gruić-Sovulj, 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** (2012) 25381-25394.
71. N. Cvetešić, M. Šemanjski, B. Soufi, K. Krug, I. Gruić-Sovulj, B. Maček, Proteome-wide measurement of non-canonical bacterial mistranslation by quantitative mass spectrometry of protein modifications, *Sci. Rep.* **6** (2016) 1-13.
72. B. Ruan, S. Palioura, J. Sabina, L. Marvin-Guy, S. Kochhar, A. R. Larossa, D. Soll, Quality control despite mistranslation caused by an ambiguous genetic code, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105** (2008) 16502-16507.
73. B. J. Vincent, W. M. Crowder, A. B. Averill, Hydrolysis of phosphate monoesters: a biological problem with multiple chemical solutions, *Trends Biochem. Sci.* **17** (1992) 105-110.
74. J. E. Coleman, Structure and mechanism of alkaline phosphatase, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21** (1992) 441-483.
75. E. E. Kim, W. H. Wyckoff, Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures. Two-metal ion catalysis, *J. Mol. Biol.* **218** (1991) 449-464.
76. J. Dayan, I. B. Wilson, The phosphorylation of Tris by alkaline phosphatase, *Biochim. Biophys. Acta* **81** (1964) 618-620.
77. E. Kuznetsova, M. Proudfoot, S. A. Sanders, J. Reiking, A. Savchenko, C. H. Arrowsmith, A. M. Edwards, A. F. Yakunin, Enzyme genomics: Application of general enzymatic screens to discover new enzymes, *FEMS Microbiol. Rev.* **29** (2005) 263-279.
78. A. K. White, W. W. Metcalf, Microbial metabolism of reduced phosphorus compounds, *Annu. Rev. Microbiol.* **61** (2007) 379-400.

79. G. R. Willsky, M. H. Malamy, Control of alkaline phosphatase and the phosphate-binding protein in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* **127** (1976) 595-609.
80. A. Ullmann, *Escherichia coli Lactose operon* u knjizi *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*, John Willey & Sons Ltd, Chichester, 2009
81. R. E. Huber, G. Kurz, A quantitation of the factors which affect the hydrolase and transgalactosylase activities of β -galactosidase (*E. coli*) on lactose, *Biochemistry* **15** (1976) 1994-2001.
82. K. G. Shoemaker, H. D. Juers, L. M. J. Coombs, W. B. Mathews, D. B. Craig, Crystallization of β -galactosidase does not reduce the range of activity of individual molecules, *Biochemistry* **42** (2003) 1707-1710.
83. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/pmsfro?lang=en®ion=BA#>.
[Citirano: 25. 7 2018.]
84. Novagen, Protein Purification and Detection Tools, Merck KGaA, Darmstadt, 2007, 8-11.
85. *BugBuster* protein extraction reagent description, Novagen, 2000.
86. V. K. Roy, N. S. Kumar, G. Gurusubramanian, Proteins – structure, properties and their separation by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, *Sci. Vis.* **12** (2012) 170-181.
87. M. M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **72** (1976) 248-254.
88. K. Fujiwara, H. Toda, M. Ikeguchi, Dependence of α -helical and β -sheet amino acid propensities on the overall protein fold type, *BMC Struct. Biol.* **12** (2012) 18
89. P. C. Lyu, J. C. Sherman, A. Chen, N. R. Kallenbach, Alpha-helix stabilization by natural and unnatural amino acids with alkyl side chains, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88** (1991) 5317-5320.
90. D. H. Juers, B. W. Matthews, R. E. Huber, LacZ β -galactosidase: Structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance, *Prot. Sci.* **21** (2012) 1792-1807.
91. A. C. Grabsky, *Advances in preparation of biological extracts for protein purification*, dostupno u: *Guide to Protein Purification*, 2 izdanje, svezak 463 (2009) 1-851.
92. F. D. Neidhardt, P. L. Bloch, D. F. Smith, Culture medium for enterobacteria, *J. Bacteriol.* **119** (1974) 736-747.
93. C. N. Peterson, M. J. Mandel, T. J. Silhavy, *Escherichia coli* starvation diets: Essential nutrients weigh in distinctly, *J. Bacteriol.* **187** (2005) 7549-7553.
94. Marker/Reporter Enzymes u knjizi: E. Hyoung-Myong, *Enzymology Primer for Recombinant DNA Technology*, Academic Press, London, 1996.

§ 8. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Alojzije Brkić

Datum rođenja: 3. studenog 1995.

Mjesto rođenja: Zenica, Bosna i Hercegovina

Obrazovanje

2002–2010 Osnovna škola, Osnovna škola „Vareš“, Vareš, Bosna i Hercegovina

2010–2014 Srednja škola, Franjevačka klasična gimnazija Visoko, Visoko, Bosna i Hercegovina

2014–2017 Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Republika Hrvatska

2017-2018 Diplomski studij kemije, grane: Analitička kemija i biokemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Republika Hrvatska

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2014, 2016 Otvoreni dan Kemijskog odsjeka, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu