Mehanizam diskriminacije prirodnih proteinogenih i neproteinogenih nepripadnih aminokiselina kod aminoacil-tRNA-sintetaza razreda 1A

Biluš, Mirna

Doctoral thesis / Disertacija

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:534637

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Mirna Biluš

MEHANIZAM DISKRIMINACIJE PRIRODNIH PROTEINOGENIH I NEPROTEINOGENIH NEPRIPADNIH AMINOKISELINA KOD AMINOACIL-tRNA-SINTETAZA RAZREDA IA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2016.

University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE

Mirna Biluš

MECHANISM OF DISCRIMINATION OF NATURAL PROTEINOGENIC AND NON-PROTEINOGENIC AMINO ACIDS IN CLASS IA AMINOACYL-tRNA SYNTHETASES

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2016.

Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Mirna Biluš

MEHANIZAM DISKRIMINACIJE PRIRODNIH PROTEINOGENIH I NEPROTEINOGENIH NEPRIPADNIH AMINOKISELINA KOD AMINOACIL-tRNA-SINTETAZA RAZREDA IA

DOKTORSKI RAD

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

Zagreb, 2016.

University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE

Mirna Biluš

MECHANISM OF DISCRIMINATION OF NATURAL PROTEINOGENIC AND NON-PROTEINOGENIC AMINO ACIDS IN CLASS IA AMINOACYL-tRNA SYNTHETASES

DOCTORAL THESIS

Supervisor:

Dr. Ita Gruić Sovulj, Associate Professor

Zagreb, 2016.

Najiskrenije zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Iti Gruić Sovulj na ukazanom povjerenju, brojnim savjetima, uloženom trudu i velikoj podršci u istraživanju, te kritičkom čitanju i sugestijama u izradi ovog rada.

Hvala svim članovima Zavoda za biokemiju na vrlo ugodnoj radnoj atmosferi.
Posebno hvala Neveni i Morani na brojnim savjetima, pomoći u eksperimentalnom radu i odličnoj atmosferi u labosu.

Hvala mojoj obitelji na razumijevanju i pruženoj podršci tijekom školovanja.

Sadržaj

SAŽETAK ..... **X**

ABSTRACT ..... **XI**

1. Uvod **1**

1.1. Svrha i cilj rada 3

2. Literaturni pregled **6**

2.1. Biosinteza proteina 6

2.2. tRNA 12

2.2.1. $tRNA^{Ile}$ iz bakterije *E. coli* 14

2.2.2. $tRNA^{Val}$ iz bakterije *E. coli* 15

2.2.3. $tRNA^{Leu}$ 15

2.3. Aminoacil-tRNA-sintetaze 16

2.3.1. Reakcija aminoaciliranja 16

2.3.2. Razred I i II 17

2.3.3. Popravak pogreške kod aminoacil-tRNA-sintetaza 20

2.3.4. Izoleucil-tRNA-sintetaza 22

2.3.5. Valil-tRNA-sintetaza 26

2.3.6. Leucil-tRNA-sintetaza 28

2.3.6.1. Leucil-tRNA-sintetaza iz bakterije *E. coli* 29

2.3.6.2. Leucil-tRNA-sintetaza iz *H. sapiens* 30

2.4. Norvalin 31

3. Materijal i metode **33**

3.1. Materijali 33

3.1.1. Standardne kemikalije 33

3.1.2. Aminokiseline, nukleotidi i radioaktivno obilježeni spojevi 33

3.1.3. Boje 34

3.1.4. Markeri veličine 34

3.1.5. Enzimi, proteini i nukleinske kiseline 34

3.1.6. Početnice 34

3.1.7. Komercijalni kompleti za pročišćavanje DNA 34

3.1.8. Hranjive podloge i medij za uzgoj bakterije *E. coli* 34

3.1.9. Sojevi i plazmidi bakterije *E. coli* 35
3.1.9.1. Sojevi bakterije *E. coli* 35
3.1.9.2. Plazmidi za ekspresiju proteina u bakteriji *E. coli* 36
3.1.10. Ostali materijal 38
3.2. Metode 39
3.2.1. Metode rada s nukleinskim kiselinama 39
3.2.1.1. Izolacija genomske DNA 39
3.2.1.2. Izolacija plazmidne DNA 40
3.2.1.3. Dizajn i konstrukcija rekombinantnih plazmida za ekspresiju proteina *in vivo* 40
3.2.1.4. Dizajn i konstrukcija rekombinantnih plazmida za ekspresiju tRNA *in vivo* 40
3.2.1.5. Izolacija i pročišćavanje ukupne stanične tRNA 41
3.2.1.6. Izolacija nativne $tRNA^{Ile}$ iz bakterije *E. coli* 42
3.2.1.7. Elektroforeza u denaturirajućem poliakrilamidnom gelu s urejom 44
3.2.1.8. Lančana reakcija polimeraze 44
3.2.1.9. Elektroforeza u gelu agaroze 45
3.2.1.10. Razgradnja restrikcijskim endonukleazama i ligacija 46
3.2.1.11. Transformacija bakterijskih stanica 47
3.2.1.12. Određivanje koncentracije nukleinskih kiselina 47
3.2.1.13. Uspješnost ugradnje inserta u vektor 47
3.2.2. Metode rada s proteinima 49
3.2.2.1. Prekomjerna ekspresija proteina 49
3.2.2.2. Pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozi .. 50
3.2.2.3. Gel-filtracijska kromatografija 51
3.2.2.4. Pročišćavanje enzima od aminoacil-adenilata 51
3.2.2.5. Elektroforeza u gelu poliakrilamida u prisustvu natrijevog dodecilsulfata . 52
3.2.2.6. Ultrafiltracija 53
3.2.2.7. Metode izmjene otopine proteina 53
3.2.2.7.1 Dijaliza 53
3.2.2.7.2 Kromatografija na PD-10 kromatografskim kolonama 54
3.2.2.8. Određivanje koncentracije proteina 54

3.2.2.8.1 Određivanje koncentracije pomoću spektrofotometra NanoDrop 1000 . 54
3.2.2.8.2 Određivanje koncentracije po Bradfordu 54
3.2.3. Kinetičke metode..... 55
3.2.3.1. Aktivacija aminokiselina mjerena ATP/PP_i izmjenom..... 55
3.2.3.2. Aminoaciliranje uz [^{14}C]aminokiselinu 57
3.2.3.3. Aminoaciliranje uz [^{32}P]tRNA..... 59
3.2.3.4. Određivanje akceptorske aktivnosti tRNA 60
3.2.3.5. Prijenos aktivirane aminokiseline na tRNA..... 60
3.2.3.6. Test utroška ATP-a 62
3.2.3.7. Paralelno praćenje nastanka AMP-a i aminoacilirane tRNA..... 63
3.2.3.8. Priprema pogrešno aminoacilirane tRNA 63
3.2.3.9. Deacilacija u uvjetima jednog obrtaja enzima 64
3.2.3.10. Provjera čistoće aminokiselina kinetičkim testom..... 65
3.2.4. Metode rada s bakterijama *in vivo*..... 66
3.2.4.1. Određivanje toksičnosti nepripadnih aminokiselina mjerenjem IC50..... 66
3.2.4.2. Test rasta bakterija na krutim hranjivim podlogama 67
4. Rezultati 68
4.1. Proizvodnja i pročišćavanje IleRS, ValRS i LeuRS 68
4.1.1. Proizvodnja i pročišćavanje izoleucil- i valil-tRNA-sintetaze iz bakterije *Escherichia coli*..... 68
4.1.1.1. Proizvodnja i pročišćavanje 10SAla izoleucil-tRNA-sintetaze 69
4.1.1.1.1 Testiranje aktivnosti IleRS 10SAla 70
4.1.2. Proizvodnja i pročišćavanje leucil-tRNA-sintetaze iz *Homo sapiens*..... 70
4.1.2.1. Provjera aktivnosti hsLeuRS nakon pročišćavanja..... 72
4.2. Proizvodnja i pročišćavanje tRNA..... 74
4.2.1. Proizvodnja i pročišćavanje $tRNA^{Ile}$ i $tRNA^{Val}$..... 74
4.2.2. Proizvodnja i pročišćavanje nativne $tRNA^{Ile}$ iz bakterije *E. coli*..... 75
4.2.3. Proizvodnja i pročišćavanje $tRNA^{Leu}$ iz *H. sapiens* prekomjerno eksprimirane u bakteriji *E. coli* 76
4.3. Provjera aminokiselina kao nepripadnih supstrata aminoacil-tRNA-sintetaza 77
4.4. Diskriminacija nepripadnih aminokiselina u reakcijama aktivacije aminokiselina... 79
4.4.1. Diskriminacija norvalina enzimima IleRS i ValRS iz bakterije *E. coli* 79

4.4.2. Diskriminacija izoleucina i norvalina enzimom hsLeuRS 80
4.5. Diskriminacija norvalina u koraku prijenosa na $tRNA^{Ile}$ i $tRNA^{Val}$ u reakcijama kataliziranim enzimima IleRS i ValRS 83
4.6. Ukupni popravak pogreške enzima IleRS i ValRS iz bakterije *E. coli* 86
4.7. Popravak pogreške prije prijenosa 86
4.7.1. tRNA-neovisni popravak pogreške prije prijenosa norvalina za enzime IleRS i ValRS 86
4.7.2. tRNA-ovisni popravak pogreške prije prijenosa norvalina kod enzima IleRS .. 87
4.7.3. tRNA-ovisni popravak pogreške prije prijenosa norvalina kod enzima ValRS. 89
4.8. Popravak pogreške nakon prijenosa 90
4.9. Utjecaj tRNA na koeficijente brzine reakcija kod IleRS 93
4.10. *In vivo* rezultati 94
4.10.1. Određivanje toksičnosti nepripadnih aminokiselina mjerenjem IC50 95
4.10.2. Test rasta bakterija na krutim podlogama 98
5. Rasprava 100
5.1. IleRS 100
5.2. ValRS 111
5.3. LeuRS 114
6. Zaključak 117
7. Popis oznaka, kratica i simbola 119
7.1. Popis aminokiselina 119
7.2. Popis kratica 120
8. Literaturni izvori 123
9. Životopis XII

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

MEHANIZAM DISKRIMINACIJE PRIRODNIH PROTEINOGENIH I NEPROTEINOGENIH NEPRIPADNIH AMINOKISELINA KOD AMINOACIL-tRNA-SINTETAZA RAZREDA IA

Mirna Biluš

Zavod za biokemiju, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Horvatovac 102A, Zagreb

Aminoacil-tRNA-sintetaze kataliziraju vezanje aminokiselina na 3'-kraj tRNA u reakciji koja se sastoji od dva koraka: prvo dolazi do aktivacije aminokiseline uz pomoć ATP-a pa nastaje aminoacil-adenilat, a zatim do prijenosa aktivirane aminokiseline na 3'- kraj tRNA. Strukturna sličnost aminokiselinskih supstrata i potreba za točnošću reakcije aminoaciliranja uvjetovale su postojanje mehanizama popravka pogrešaka aminoacil-tRNA-sintetaza: popravak se može odvijati prije i poslije prijenosa na tRNA. U ovoj disertaciji istraženi su mehanizmi diskriminacije enzima izoleucil- i valil-tRNA-sintetaze iz bakterije *Escherichia coli* prema prirodnoj neproteinogenoj aminokiselini norvalinu. IleRS uspješno aktivira norvalin i prenosi ga na $tRNA^{Ile}$, a popravak se vrši prije prijenosa i većim dijelom nakon prijenosa na tRNA. Kao što je to prethodno pokazano za valin, IleRS koristi, uz tRNA-neovisni, i tRNA-ovisni popravak pogreške prije prijenosa za uklanjanje norvalina. Potonji mehanizam je svojstven IleRS i nije dokumentiran kod drugih enzima klase Ia. Norvalin je 3 do 4 puta toksičniji od valina bakteriji *E. coli* koja eksprimira IleRS s ugašenim popravkom pogreške nakon prijenosa. ValRS slabo aktivira norvalin, pa se već u prvom koraku reakcije aminoaciliranja postiže diskriminacija dovoljna za očuvanje točne biosinteze proteina. Ipak, aktivirani norvalin se efikasno prenosi na $tRNA^{Val}$, a ako dođe do prijenosa uklanja se popravkom pogreške nakon prijenosa.

(129 + XIII stranica, 50 slika, 25 tablica, 115 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: izoleucil-tRNA-sintetaza/ valil-tRNA-sintetaza/ leucil-tRNA-sintetaza/ mistranslacija/ norvalin/ popravak pogreške

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

Ocjenitelji: dr. sc. Marko Močibob, doc.
dr. sc. Branimir Bertoša, izv. prof.
dr. sc. Dušica Vujaklija, viš. znan. sur.

Rad prihvaćen: 30. studenog 2016.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

MECHANISM OF DISCRIMINATION OF NATURAL PROTEINOGENIC AND NON-PROTEINOGENIC AMINO ACIDS IN CLASS IA AMINOACYL-tRNA SYNTHETASES

Mirna Biluš

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

Aminoacyl-tRNA synthetases catalyze binding of amino acids to the 3'-end of tRNA in a 2-step reaction: the first step is activation of amino acid with ATP to form aminoacyl-adenylate, and in the second step the activated amino acid is transferred to tRNA's 3'-end. Structural similarity of the amino acid substrates and the required accuracy of the aminoacylation reaction directed the development of proofreading mechanisms by aminoacyl-tRNA synthetases: proofreading may occur before or after amino acid transfer to tRNA. In this dissertation, discrimination mechanisms of a natural non-proteinogenic amino acid norvaline by *Escherichia coli* isoleucyl- and valyl-tRNA synthetase were explored. IleRS activates norvaline well and transfers it to $tRNA^{Ile}$, and the repair mechanisms may operate prior to or after transfer of norvaline to $tRNA^{Ile}$. As previously shown with valine, besides tRNA-independent, IleRS also exhibits tRNA-dependent pre-transfer editing to eliminate norvaline. The latter mechanism is distinctive for IleRS and its existence has not been proven in other aminoacyl-tRNA synthetases. Norvalin is 3-4 × more toxic than valine to an *E. coli* strain that contains IleRS with inactivated post-transfer editing. ValRS weakly activates norvaline, and the discrimination achieved in the first step of aminoacylation is high enough to sustain the accuracy of overall protein biosynthesis. Nevertheless, as activated norvaline is efficiently transferred to $tRNA^{Val}$, ValRS can eliminate norvalyl-$tRNA^{Val}$ through post-transfer editing.

(129 + XIII pages, 50 figures, 25 tables, 115 references, original in Croatian)

Keywords: isoleucyl-tRNA synthetase/ valyl-tRNA synthetase/ leucyl-tRNA synthetase/ mistranslation/ norvaline/ proofreading

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

Reviewers: dr. sc. Marko Močibob, Assistant Professor
dr. sc. Branimir Bertoša, Associate Professor
dr. sc. Dušica Vujaklija, Senior Research Associate

Thesis accepted: November 30th, 2016

1. Uvod

Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) su enzimi koji kataliziraju kovalentno povezivanje 3'-kraja molekule tRNA i aminokiseline[1]. Reakcija aminoaciliranja se sastoji od dva koraka: aktivacije aminokiseline i prijenosa aktivirane aminokiseline na tRNA. U koraku aktivacije dolazi do nukleofilnog napada kisika iz karboksilne skupine aminokiseline na fosfor α-fosfatne skupine ATP-a, čime nastaje miješani anhidrid - aminoacil-adenilat (aa-AMP) i oslobađa se pirofosfat. Slijedi reakcija prijenosa aktivirane aminokiseline na tRNA: nukleofilni napada kisika iz 2'- ili 3'- OH skupine riboze terminalnog adenozina molekule tRNA na α-karbonilni ugljikov atom aminoacil-adenilata[1]. Oba koraka reakcije aminoaciliranja se odvijaju u aktivnom sintetskom mjestu enzima.

Točnost prevođenja slijeda nukleotida u slijed aminokiselina koje izgrađuju polipeptide esencijalna je za vijabilnost stanica. Eksperimentalno izmjerena pogreška prijenosa genetičke informacije iznosi 1 pogrešku na 1000-10000 aminokiselina[2-4]. Takvu minimalnu pogrešku biološki sustav tolerira i ona ne predstavlja prijetnju za život stanice. AaRS se dijele na dva razreda prema strukturnim i funkcionalnim odrednicama, a u stanici standardno postoji oko dvadeset aaRS, za svaku proteinogenu aminokiselinu po jedna[5]. Da bi se točnost translacije održala na visokoj razini, aaRS moraju povezivati isključivo pripadne parove aminokiseline i tRNA, odnosno svaka aminokiselina mora biti povezana s tRNA koja svojim antikodonom odgovara kodonu koji određuje ugradnju aminokiseline u rastući polipeptidni lanac. Od supstrata s kojima stupaju u interakcije, tRNA je značajno veća molekula od aminokiseline pa je i dodirna površina između tRNA i enzima veća. U strukturi tRNA postoje pozitivni i negativni elementi identiteta kao odrednice koje pospješuju (pozitivni elementi) odnosno onemogućuju (negativni elementi) interakcije između tRNA i pripadne odnosno nepripadne aaRS[6]. Međudjelovanjem elemenata identiteta tRNA, aaRS relativno jednostavno izabiru pripadnu tRNA te je vjerojatnost aminoaciliranja nepripadne tRNA vrlo mala. Obzirom na relativno veliku strukturnu heterogenost molekula tRNA, aaRS imaju veće mogućnosti u izboru elemenata identiteta za prepoznavanje pripadnih tRNA. Aminokiseline, kao drugi supstrat aaRS, nemaju toliko raznoliku strukturu i razlikuju se u strukturi bočnog ogranka za, na primjer, samo jednu metilensku skupinu (izoleucin i valin). Iz tog razloga, neke aaRS griješe u izboru pripadne aminokiseline iz staničnog okruženja te aktiviraju i prenose nepripadne aminokiseline na tRNA. Da bi se ukupna pogreška u translaciji održala na razini koja je prihvatljiva stanici, aaRS su razvile mehanizme popravka vlastitih pogrešaka. Kod aaRS se može naći nekoliko

različitih mehanizama popravka pogrešaka: popravak pogreške prije prijenosa, koji može biti tRNA-neovisan ili tRNA-ovisan (potpomognut prisustvom tRNA), i popravak pogreške nakon prijenosa nepripadne aminokiseline na tRNA[5].

Enzimi izoleucil-, valil- i leucil-tRNAsintetaza (IleRS, ValRS, LeuRS), koji su istraživani u okviru ove disertacije, pripadaju aminoacil-tRNA-sintetazama razreda Ia, koje odlikuje nekoliko zajedničkih strukturnih elemenata među kojima je važno spomenuti posebnu domenu za popravak pogrešaka nakon prijenosa koja je udaljena 30-ak Å od aktivnog sintetskog mjesta.

IleRS je enzim čiji je pripadni supstrat aminokiselina izoleucin, a poznato je i da IleRS prepoznaje, odnosno veže, aktivira i prenosi na tRNA također i nepripadni valin. Valin je aminokiselina koja je za samo jednu metilensku skupinu manja od izoleucina, pa se uspješno smješta u aktivno mjesto IleRS, i aktivira se svega 200 puta lošije nego pripadni izoleucin[7, 8]. Valin se uspješno prenosi i na $tRNA^{Ile}$ u drugom koraku sintetske reakcije, pa je za održavanje točnosti dekodiranja izoleucinskih kodona nužan popravak pogreške, kako IleRS ne bi u stanično okruženje oslobađao pogrešno aminoaciliranu valil-$tRNA^{Ile}$ [7]. Za IleRS je pokazano da koristi popravak pogreške prije prijenosa, i to uz standardni tRNA-neovisni, koristi i tRNA-ovisni popravak[7-9]. Dok je tRNA-neovisni popravak relativno univerzalan kod svih aaRS (čak i aaRS koje nemaju posebnu domenu za popravak pogreške), tRNA-ovisni popravak pogreške prije prijenosa je do sada najbolje dokumentiran kod IleRS iz bakterije *E. coli* i kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, i to uz valin kao nepripadni supstrat[7, 10]. tRNA-neovisni popravak pogreške prije prijenosa podrazumijeva hidrolizu aminoacil-adenilata unutar sintetskog mjesta, gdje uostalom i nastaje, te je relativno spor proces koji samo malim dijelom doprinosi ukupnom popravku pogreške. Za tRNA-ovisni popravak pogreške je pokazano da svojom aktivnošću može činiti i do 30 % ukupnog popravka[11], dok je glavni mehanizam popravka pogreške uglavnom popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline u zasebnoj domeni CP1 (engl. *connective peptide*).

ValRS je enzim koji katalizira kovalentno povezivanje pripadnog valina i $tRNA^{Val}$. Kao i IleRS, i ValRS može pogriješiti u prepoznavanju pripadne aminokiseline te aktivirati i neke nepripadne slične aminokiseline, poput treonina[7, 12]. Kod ValRS iz bakterije *E. coli* je pokazano da koristi tRNA-neovisni popravak pogreške prije prijenosa i popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline za uklanjanje pogrešno aktiviranog treonina i pogrešno aminoacilirane Thr-$tRNA^{Val}$ [7]. Popravak pogreške prije prijenosa aminokiseline nije bio potpomognut prisustvom tRNA, odnosno, kinetička istraživanja sugeriraju da ValRS iz bakterije *E. coli* u prisustvu treonina ne koristi tRNA-ovisni popravak pogreške prije prijenosa[7].

LeuRS je treći i zadnji član podrazreda Ia aaRS, i katalizira esterifikaciju, odnosno kovalentno povezivanje $tRNA^{Leu}$ i pripadnog leucina. Kao i IleRS i ValRS, LeuRS također griješi zbog strukturne sličnosti leucina s drugim aminokiselinama, pa se tako u literaturi mogu pronaći podaci da LeuRS aktivira izoleucin, metionin, valin, norvalin, α-aminobutirat itd.[13-15]. Nedavno je u našem laboratoriju pokazano da je glavni problem istraživanja izoleucina kao nepripadnog supstrata LeuRS prisutnost tragova leucina u komercijalnim pripravcima izoleucina[14]. Kako je leucin pripadna aminokiselina za koju LeuRS ima značajno viši afinitet nego za nepripadne aminokiseline (red veličine 100×)[14], prisutnost tragova leucina može uzrokovati kinetičke artefakte u kojima se zapravo prati reakcija s pripadnim leucinom, a produkti i aktivnost pripisuju nepripadnom izoleucinu. Nakon što je proizveden i testiran izoleucin bez tragova leucina, pokazano je da bakterija *E. coli* LeuRS vrlo učinkovito diskriminira izoleucin u sintetskim reakcijama (aktivaciji i prijenosu aminokiseline), te da izoleucin ne predstavlja prijetnju točnosti dekodiranja leucinskih kodona. Kako je faktor diskriminacije veći od 30000, u prisustvu izoleucina nisu niti potrebni korektivni mehanizmi[14]. Istovremeno, pokazano je da prijetnju točnosti LeuRS predstavlja norvalin – prirodna, neproteinogena aminokiselina koja se u citoplazmi bakterije *E. coli* može nakupiti do milimolarne koncentracije u mikroaerobnim uvjetima[16]. Kako se norvalin ne diskriminira učinkovito u sintetskim reakcijama, LeuRS koristi popravak pogreške nakon prijenosa za uklanjanje norvalilirane-tRNA. Kod LeuRS iz bakterije *E. coli*, kao i kod ValRS iz bakterije *E. coli* pokazano je da ne koriste tRNA-ovisni popravak pogreške prije prijenosa, odnosno dodatak tRNA ne stimulira hidrolizu aminoacil-adenilata, a glavni popravak pogreške je popravak pogreške nakon prijenosa na tRNA[14].

Kao što je već spomenuto, norvalin je prirodna neproteinogena aminokiselina koja se u uvjetima smanjene koncentracije kisika može akumulirati do koncentracije usporedive s koncentracijom ostalih aminokiselina u stanici[16, 17]. Norvalin nastaje zbog niske specifičnosti enzima koji sudjeluju u biosintezi leucina (operon leuABCD) direktnom elongacijom iz piruvata[16, 18]. Do sada nije razjašnjeno ima li norvalin neku biološku ulogu u stanici, ili nastaje kao slučajni produkt.

1.1. Svrha i cilj rada

Do sada je napravljeno relativno malo kinetičkih istraživanja s norvalinom kao nepripadnim supstratom aminoacil-tRNA-sintetaza koje kataliziraju povezivanje aminokiselina sličnih norvalinu (izoleucin, valin, leucin) i pripadnih tRNA. Istraživanje u okviru ove doktorske

disertacije rasvijetlit će sposobnost diskriminacije nepripadnog norvalina od pripadnih supstrata enzima IleRS i ValRS iz bakterije *E. coli* i LeuRS iz *H. sapiens*. Uspoređujući kinetičke parametre koji su do sad poznati za reakcije navedenih enzima uz pripadne supstrate i pojedine nepripadne supstrate s podacima dobivenim za norvalin u sklopu ovog istraživanja, cilj je ispitati koliku prijetnju predstavlja norvalin, kao do sad zanemarena, a realno moguća biološka prijetnja točnosti dekodiranja, u odnosu na proteinogene nepripadne aminokiseline. Konkretni ciljevi su:

- Odrediti sposobnost diskriminacije norvalina u sintetskim reakcijama kao i u reakcijama popravka pogreške enzima IleRS iz bakterije *E. coli* korištenjem kinetičkih testova *in vitro.*

- Utvrditi koristi li IleRS tRNA-ovisan popravak pogreške prije prijenosa u prisustvu norvalina, kao i u prisustvu valina. Je li taj tip popravka svojstvo enzima, ili ovisi o supstratu?

- Odrediti sposobnost diskriminacije norvalina u sintetskim reakcijama kao i u reakcijama popravka pogreške enzima ValRS iz bakterije *E. coli* primjenom kinetičkih testova *in vitro.*

- Usporedbom rezultata dobivenih s IleRS i ValRS u prisustvu norvalina utvrditi kojem enzimu norvalin predstavlja prijetnju točnosti reakcije aminoaciliranja, odnosno kojem enzimu je norvalin bolji supstrat, kako bi se utvrdio prikladan modelni enzim za istraživanja *in vivo* toksičnosti proteinogene, odnosno neproteinogene aminokiseline

- *In vivo* istraživanjima soja bakterije *E. coli* koji umjesto divljeg tipa modelnog enzima ima enzim koji je izgubio sposobnost popravkom pogreške odrediti predstavlja li zamjena proteinogene aminokiseline u proteomu nepripadnom proteinogenom ili neproteinogenom prirodnom aminokiselinom veću prijetnju vijabilnosti, te kvantificirati razliku u vijabilnosti bakterija.

- Ponovno istražiti diskriminaciju izoleucina enzimom LeuRS iz *H. sapiens,* koristeći uzorak izoleucina koji ne sadrži tragove leucina. Cilj je ispitati očuvanost diskriminacije izoleucina kod humane varijante enzima, tj. jesu li prethodno publicirani rezultati s *H. sapiens* LeuRS artefakt kontaminacije izoleucina, kao što je to pokazano za enzim iz bakterije *E. coli*.

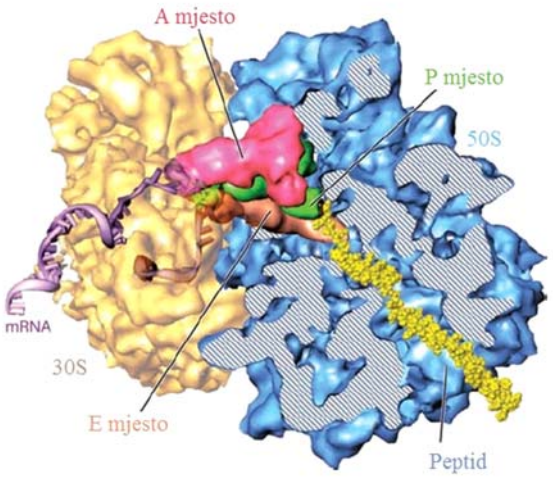
Rezultati predstavljeni u ovoj disertaciji omogućit će bolje razumijevanje mehanizama popravka pogreške, te utvrditi koliko norvalin, kao prirodna neproteinogena aminokiselina, predstavlja prijetnju točnosti translacije kao nepripadni supstrat aaRS razreda Ia. Ukoliko su mehanizmi popravka pogreške za eliminaciju norvalina iz proteoma očuvani, takvi rezultati idu u prilog hipotezi da norvalin nužno nastaje u određenim stresnim uvjetima te da možda ima i biološku ulogu. Norvalin predstavlja zanimljivo područje za buduća istraživanja i implementaciju ovakvih studija i kod eukariota, obzirom da nije poznata toksičnost niti učinak na eukariotske stanice. Iako ga viši eukarioti ne mogu sintetizirati zbog nedostatka enzima za biosintezu razgranatih aminokiselina, norvalin se u organizam lako unosi prehranom, ili ga stanice mogu unijeti zbog suživota s bakterijama koje ga sintetiziraju.

2. Literaturni pregled

2.1. Biosinteza proteina

Proteini su među najvažnijim sastavnim molekulama svih stanica. Pravilna građa, funkcija, i metabolizam proteina esencijalni su za žive stanice. Svaka pogreška u biosintezi proteina može imati štetne posljedice, pa je proces nastanka proteina potrebno precizno regulirati i minimizirati odstupanje od zadanog genetičkog koda.

Proces biosinteze proteina u stanicama se dijeli na transkripciju, proces prepisivanja genetičke informacije s DNA na glasničku RNA (engl. *messenger RNA*, mRNA), i translaciju odnosno prevođenja genetičkog koda u aminokiselinski slijed – proteine. Na staničnim kompleksima ribosomima dolazi do sparivanja kodona mRNA i antikodona odgovarajućih molekula transfer RNA (tRNA) na koje su vezane aminokiseline, te dolazi do stvaranja peptidnih veza s nadolazećim aminokiselinama, odnosno nastaju polipeptidi – proteini. Ribosomi su makromolekulski kompleksi sastavljeni od dvije podjedinice, a svaka podjedinica sastavljena je od ribosomske RNA (rRNA) i proteinskog dijela (Slika 2.1). Prokariotski ribosomi su veličinom manji od eukariotskih: sastoje se od manje podjedinice sedimentacijskog koeficijenta 30S, koja se sastoji od 16S rRNA i 21 polipeptidnog lanca, i veće podjedinice 50S koja se sastoji od 23S rRNA, 5S rRNA i 31 polipeptidnog lanca[19]. Eukariotski ribosomi imaju manju podjedinicu sedimentacijskog koeficijenta 40S koju čine molekula 18S rRNA te 33 polipeptida i veću podjedinicu 60S koju čine 28S, 5,8S i 5S rRNA i 49 polipeptida[20, 21].

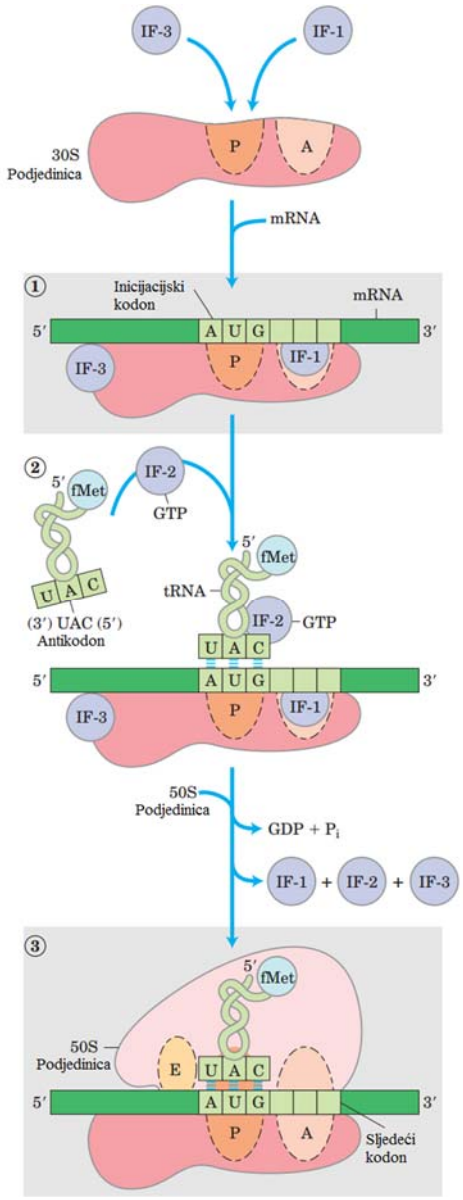


Slika 2.1: Strukturni prikaz ribosoma iz bakterije *Escherichia coli*. Dvije podjedinice su označene su 30S (žuto) i 50S (plavo). Molekule tRNA se nalaze u mjestima A, P i E i označene su ružičastom, zelenom i smeđom bojom. mRNA i peptid su označeni ljubičastom i žutom bojom. Preuzeto i prilagođeno iz [21].

Kod eukariota su procesi transkripcije i translacije prostorno i vremenski odijeljeni, pa se transkripcija odvija u staničnoj jezgri, nastala mRNA se transportira iz jezgre u citoplazmu gdje slijedi translacija na slobodnim ribosomima i na ribosomima vezanim na endoplazmatski retikulum. Kod prokariota se procesi transkripcije i translacije događaju u staničnoj citoplazmi, a proces translacije može započeti i prije nego je transkripcija završila, na još nedovršenim molekulama mRNA. Jedan od preduvjeta za početak translacije je i postojanje aminoaciliranih molekula tRNA s odgovarajućim aminokiselinama vezanim na 3'-kraju. Upravo su enzimi aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) zaduženi za povezivanje odgovarajućih aminokiselina i pripadnih molekula tRNA, pa imaju ključnu ulogu u procesu nastanka staničnih proteina, a time i u pravilnom funkcioniranju stanice.

Proces translacije kod arheja i eukariota je sličan translaciji kod prokariota, a najveća je razlika u koraku inicijacije.

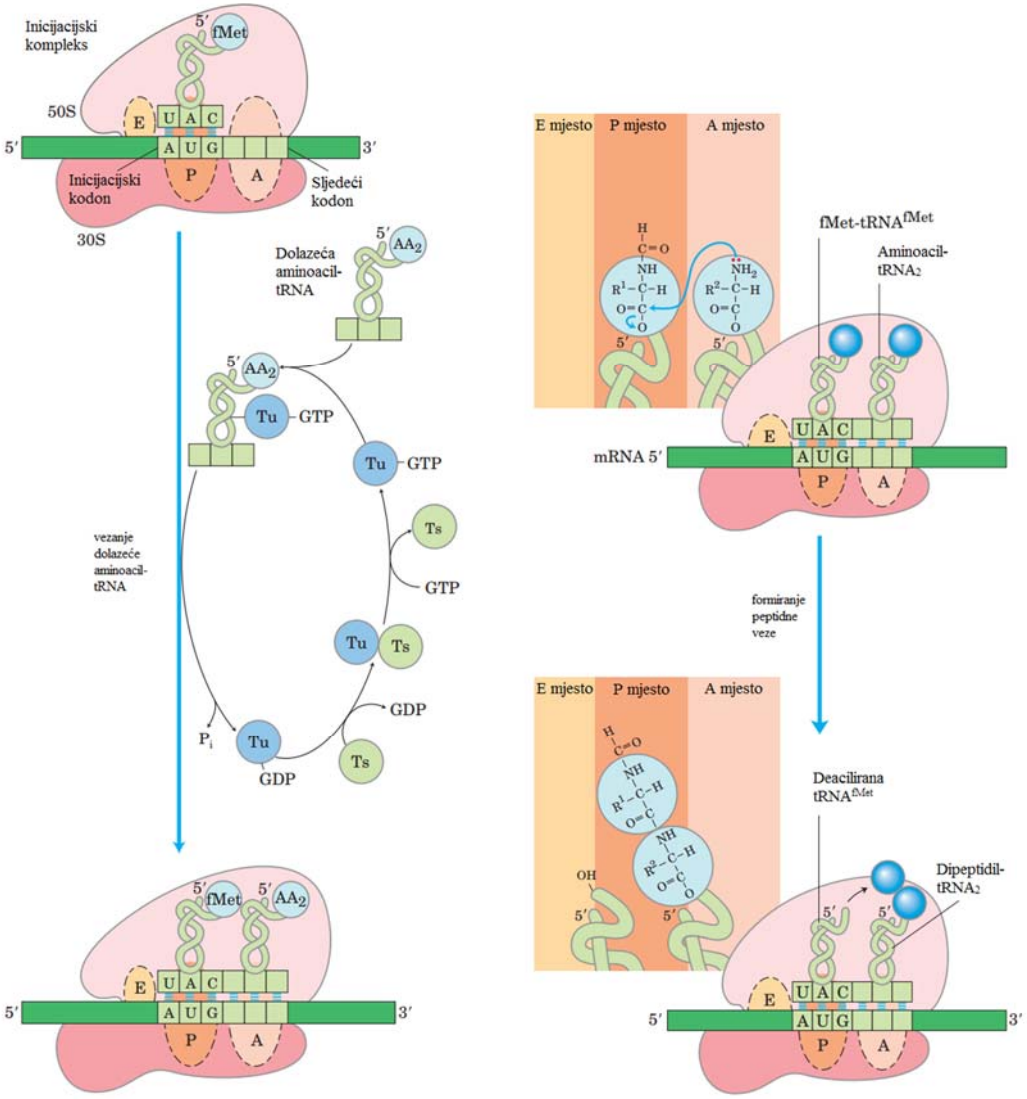
Kod prokariota proces translacije se može podijeliti na 3 stupnja: inicijacija, elongacija i terminacija. Inicijacija započinje vezanjem inicijacijskih faktora 1 (IF-1) i 3 (IF-3) na manju podjedinicu ribosoma, tako da se IF-1 smješta u mjesto P ribosoma, dok se IF-3 pozicionira tako da sprječava spajanje ribosomskih podjedinica 50S i 30S (Slika 2.2). Slijedi vezanje molekule mRNA na ribosomsku podjedinicu u orijentaciji koja omogućava ispravno pozicioniranje inicijacijskog kodona uslijed interakcije Shine-Dalgarno očuvanog slijeda (nalazi se 8-13 nukleotida uzvodno od inicijacijskog kodona) s 30S podjedinicom ribosoma. Zatim inicijacijski faktor 2 (IF-2) do ribosomskog mjesta P dovodi inicijacijsku, odnosno početnu aminoaciliranu tRNA – formilmetionil-$tRNA^{Met}$, čiji se antikodon sparuje s inicijacijskim kodonom. Formilmetionin je aminokiselina koja se kod prokariota veže kao prva aminokiselina novonastajućih proteina. Vezana je na $tRNA^{Met}$, koja se svojim antikodonom sparuje sa start kodonom AUG. Inicijacija završava vezanjem veće ribosomske podjedinice na kompleks manje podjedinice, mRNA i tRNA, dolazi do otpuštanja incijacijskih faktora, te slijedi elongacija započetog peptidnog lanca.



Slika 2.2: Inicijacija translacije. Inicijacija započinje vezanjem IF-3 i IF-1 na manju podjedinicu ribosoma, nakon čega se na manju podjedincu veža i mRNA. Slijedi dolazak inicijacijske aminoacilirane tRNA, koju donosi IF-2. Faktori IF-1, IF-2 i IF-3 se otpuštaju, te dolazi do vezanja velike podjedinice na kompleks manje podjedinice, mRNA i aminoacilirane tRNA. Preuzeto i prilagođeno iz [22].

Elongacija, odnosno produljenje peptidnog lanca se događa uz pomoć faktora elongacije: EF-Tu, EF-Ts i EF-G, a započinje dolaskom druge aminoacilirane tRNA do formiranog kompleksa ribosoma, mRNA i prve tRNA (Slika 2.3). Uloga EF-Tu je dopremanje aminoaciliranih tRNA do ribosoma, gdje se vežu na mjesto A ribosoma gdje dolazi do sparivanja antikodona s kodonom. Ukoliko se dogodi ispravno sparivanje, dolazi do otpuštanja aminoacilirane tRNA te se GTP koji je vezan na EF-Tu hidrolizira na GDP uz otpuštanje P_i. Regeneraciju aktivnog oblika EF-Tu (s vezanim GTP) omogućava elongacijski faktor Ts koji vezanjem za EF-Tu pospješuje disocijaciju GDP. Nakon disocijacije EF-Ts, EF-Tu veže GTP i time prelazi u

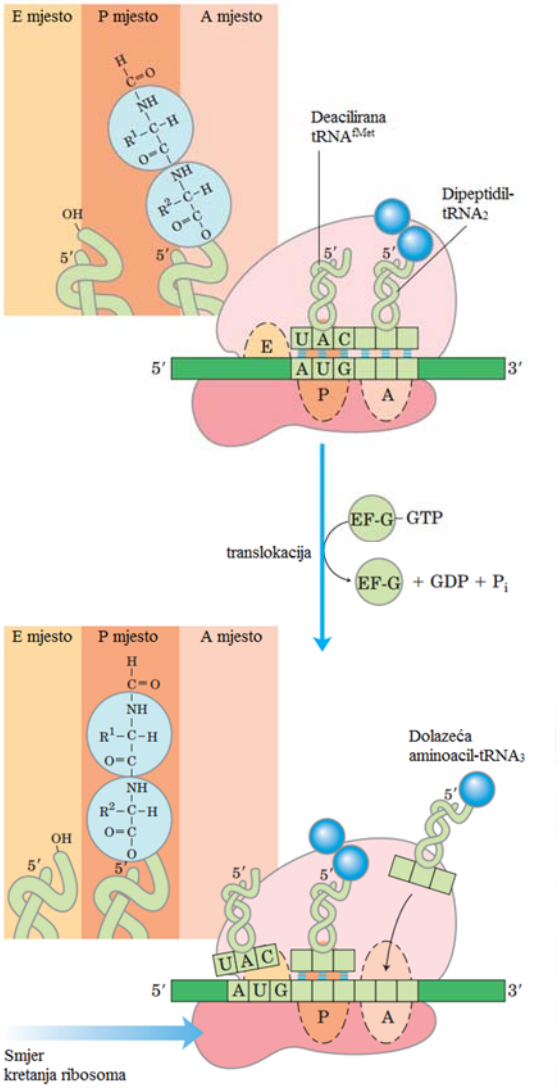
aktivni EF-Tu:GTP binarni kompleks koji može ponovno vezati novu aminoaciliranu tRNA. Kada se dvije aminoacilirane tRNA nađu vezane na P odnosno A mjestu ribosoma, dolazi do nastanka prve peptidne veze uslijed nukleofilnog napada dušika iz α-amino skupine druge aminokiseline na ugljik α-karboksilne skupine prve aminokiseline, u reakciji koju katalizira ribozim peptidil-transferaza 23S RNA. Novonastali rastući peptid se sad nalazi vezan na 3'-kraj tRNA na mjestu A, a početna $tRNA^{Met}$, sada bez vezane aminokiseline, ostaje vezana na mjestu P.



Slika 2.3: Elongacija translacije. Na kompleks ribosoma, mRNA i aminoacilirane inicijalne tRNA veže se sljedeća po redu aminoacilirana tRNA, na A mjesto ribosoma. Aminoaciliranu tRNA donosi elongacijski faktor Tu (s vezanim GTP-om). GTP se hidrolizira na GDP i P_i. Nakon vezanja druge tRNA na ribosom dolazi do formiranja prve peptidne veze nukleofilnim napadom dušika iz amino skupine druge aminokiseline na ugljik iz karboksilne skupine prve aminokiseline, pa je novonastali dipeptid vezan na tRNA na A mjestu ribosoma. Elongacijski faktor Ts zamjenjuje GDP za GTP na elongacijskom faktoru Tu. Preuzeto i prilagođeno iz [22].

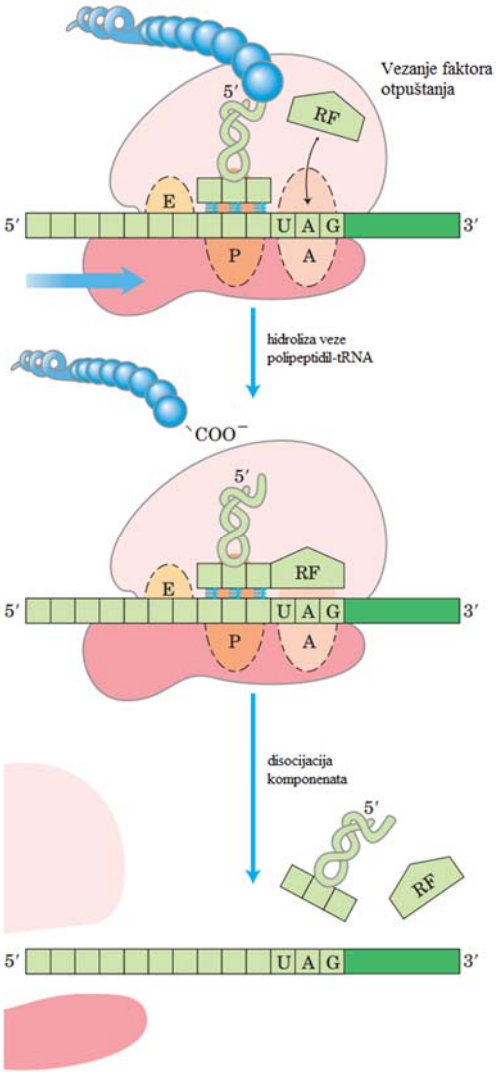
Uloga zadnjeg spomenutog elongacijskog faktora EF-G je da uz utrošak GTP-a pomiče mRNA u odnosu na ribosom, odnosno omogućava pomicanja slobodne tRNA na mjesto E (engl. *exit*),

te dolazi do otpuštanja iskorištene tRNA s ribosoma, a istovremeno se tRNA s peptidom vezanim na 3'-kraju pomiče na mjesto P (Slika 2.4 i Slika 2.3). U idućem krugu translacije na slobodno mjesto A može doći nova aminoacilirana tRNA s antikodonom komplementarnim kodonu mRNA. EF-Tu nema jednak afinitet prema svim kombinacijama parova aa-tRNA: optimalni afinitet pokazuje prema pripadnim parovima aa-tRNA, a prema tRNA koje imaju vezane pogrešne nepripadne aminokiseline može pokazivati ili prejak ili preslab afinitet[23-25]. Međutim, značaj takvog ponašanja EF-Tu je u jednolikom vezanju svih pripadnih parova aa-tRNA kako bi se omogućila jednolika translacija sa svim aminokiselinama. Uloga EF-Tu u održavanju točnosti biosinteze smatra se ograničenom, a fiziološki značaj nije ispitan[26].



Slika 2.4: Translokacija ribosoma. Proces elongacije završava translokacijom ribosoma u odnosu na mRNA. Uz pomoć elongacijskog faktora G (s vezanim GTP) dolazi do pomicanja mRNA u odnosu na ribosom. Pri tome se inicijacijska tRNA više ne nalazi na P mjestu, već je premještena na E mjesto, gdje dolazi do njene disocijacije s ribosoma. tRNA s vezanim dipeptidom na 3'-kraju se sada nalazi na P mjestu ribosoma. Na taj način se oslobađa mjesto A na ribosomu, na koje se veže sljedeća aminoacilirana tRNA. Preuzeto i prilagođeno iz [22].

Korak elongacije se odvija cijelom dužinom mRNA, sve dok se na mjestu A ribosoma ne nađe jedan od tri stop kodona kojima nije komplementaran antikodon niti jedne tRNA, te time započinje zadnji korak translacije, terminacija. Na slobodno mjesto A ribosoma veže se terminacijski faktor, odnosno faktor otpuštanja (engl. *release factor*), RF1 ili RF2 (ovisno o identitetu stop kodona) (Slika 2.5). Slijedi prijenos gotovog polipeptidnog lanca s tRNA vezane na mjestu P na molekulu vode, čime se polipeptid oslobađa s ribosoma. Kompleks mRNA, tRNA, terminacijskih faktora i dviju podjedinica ribosoma disocira uz pomoć terminacijskog faktora RF3, faktora EF-G i faktora recikliranja ribosoma RRF (engl. *ribosome recycling factor*).



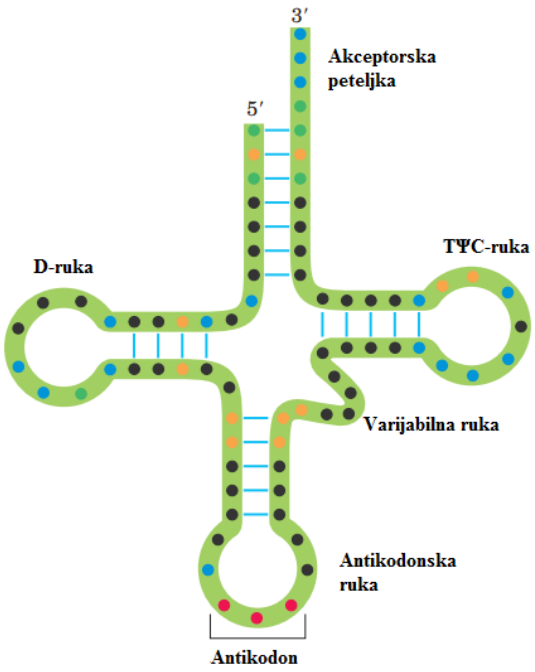
Slika 2.5: Terminacija translacije. Kada se na A mjestu ribosoma nađe jedan od tri stop kodona, na A mjesto se veže terminacijski faktor (faktor otpuštanja). Novosintetizirani peptid se prenosi na molekulu vode i oslobađa s ribosoma. Slijedi disocijacija ribosomskih podjedinica, mRNA i tRNA. Preuzeto i prilagođeno iz [22].

Polipeptidni lanci koji se oslobode s ribosoma nisu odmah spremni obavljati stanične funkcije. Kako bi postigli svoju biološki aktivnu formu, polipeptidni lanci se moraju smotati u svoje

nativne konformacije, a često slijede i posttranslacijske modifikacije, poput dodavanja fosforilne, acetilne ili metilne skupine na bočne ogranke aminokiselina, vezanja oligosaharida i slično[22, 27].

2.2. tRNA

Nakon otkrića strukture dvostruke zavojnice DNA u prošlom stoljeću, pretpostavljeno je da u procesu biosinteze proteina mora postojati molekula „adaptor“ koja bi se komplementarno sparivala s kodonom mRNA, a na sebi bi imala vezanu aminokiselinu[28]. Ubrzo je pokazano da je molekula koja obavlja tu funkciju upravo molekula transfer RNA. Molekule tRNA su jednolančane molekule RNA, koje se obično sastoje od 50 do 100 parova baza. Komplementarnim sparivanjem baza u strukturi tRNA nastaje prepoznatljiva sekundarna struktura djeteline, a elementi strukture koji se mogu razlikovati su akceptorska peteljka, gdje se nalaze 5'- i 3'-kraj molekule tRNA, zatim antikodonska peteljka, u kojoj se ističe triplet antikodona, a preostala tri elementa su D-ruka, TΨC-ruka, i varijabilna ruka koja predstavlja najveću razliku u sekundarnoj strukturi raznih tRNA (Slika 2.6).

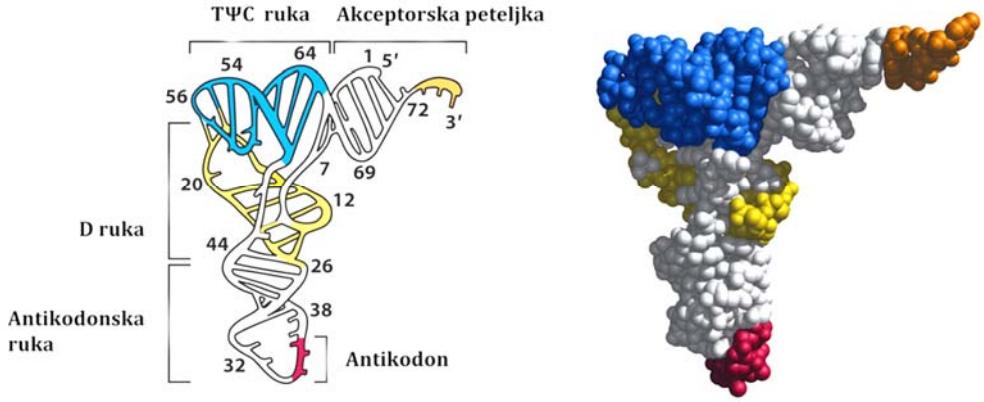


Slika 2.6: Sekundarna struktura tRNA. Plavim točkama su označeni nukleotidi očuvani kod svih tRNA. Narančastom i plavom bojom su označeni nukleotidi koji se razlikuju kod različitih tRNA. Preuzeto i prilagođeno iz [22].

Akceptorska peteljka je mjesto gdje se komplementarnim sparivanjem približavaju početak (5'-kraj) i kraj (3'-kraj) molekule tRNA. Sve tRNA na svojem 3'-kraju imaju triplet nukleotida

slijeda CCA, a na terminalni adenozin, u reakciji esterifikacije kataliziranoj aminoacil-tRNA-sintetazama, veže se odgovarajuća aminokiselina. Akceptorska peteljka se obično sastoji od sedam parova baza. U strukturi tRNA česti su posttranskripcijski modificirani nukleotidi, koji se u sekundarnoj strukturi tRNA ne-Watson-Crickovim parovima mogu sparivati s drugim nukleotidima. Uloga modifikacija nukleotida može biti termička stabilizacija i smanjenje dinamičnosti strukture[29]. U prosjeku je pokazano da modificirani nukleotidi čine 11,6 % svih nukleotida 561 sekvencirane molekule tRNA u istraživanju iz 2010. godine[30]. U strukturi tRNA D-ruka je dobila ime prema modificiranoj bazi dihidrouridinu koja se tamo nalazi. D-ruka se obično sastoji od 3-4 para baza, a završava s omčom duljine 5 do 7 nukleotida. Modificirani nukleotid nalazi se i u TΨC-ruci – između nukleotida ribotimidina i ribocitidina nalazi se nukleotid pseudouridin. TΨC-ruka se najčešće sastoji od pet parova baza na koje se nastavlja omča. Antikodonska peteljka sastoji se od obično od 5 parova baza na koje se nastavlja omča s tripletom antikodona smještenim na središnjem dijelu omče. Varijabilna ruka molekule tRNA je element sekundarne strukture koji se najviše razlikuje među raznm tRNA, a može sadržavati od 3 do 21 nukleotidne baze.

U stanici molekule tRNA poprimaju nativnu konformaciju specifične strukture koja nalikuje obliku slova „L“, gdje se na jednom „kraku“ nalaze D-ruka i antikodonska peteljka, s antikodonskim tripletom na dnu, a na drugom „kraku“ su TΨC-ruka i akceptorska peteljka gdje se veže aminokiselina (Slika 2.7).



Slika 2.7: Tercijarna struktura tRNA, nativna konformacija tRNA. Preuzeto i prilagođeno iz [22].

Molekula tRNA nastaje u procesu prepisivanja s DNA pomoću enzima RNA-polimeraze. Molekule tRNA ne nastaju kao „zrele“ gotove molekule već je transkribirana molekula prekursor kojem je potrebna posttranskripcijska dorada na 5'- i 3'-kraju, kao i formiranje modificiranih nukleotida. Molekulama tRNA potrebno je endonukleolitičko cijepanje suvišnih

slijedova na 5'-kraju molekule, u reakciji koju katalizira ribonukleaza P. Kako je ranije spomenuto, na 3'-kraju molekula tRNA mora se nalaziti triplet nukleotida CCA, pa modifikacija 3'-kraja podrazumijeva uklanjanje suvišnog slijeda s 3'-kraja i dodavanje tripleta CCA, ako nije kodiran genom za tRNA. Reakciju cijepanja nakon 73. nukleotida katalizira enzim RNaza Z, dok dodatak tripleta CCA katalizira enzim tRNA-nukleotidil-transferaza. U slučaju kad je triplet CCA kodiran u genomskoj DNA, cijepanje dodatnih slijedova kataliziraju RNaza E i stanične egzonukleaze[31]. Nakon prekrajanja krajeva tRNA dolazi do modifikacija nukleotidnih baza.

Za svaku od 20 proteinogenih aminokiselina u stanicama postoji skupina izoakceptorskih tRNA. Antikodon izoakceptorske tRNA komplementaran je bar jednom kodonu mRNA za odgovarajuću aminokiselinu. Za točnu biosintezu staničnih proteina od velike je važnosti vezanje odgovarajuće aminokiseline na 3'-kraj pripadne tRNA u reakciji koju kataliziraju aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS). Zbog relativno slične strukture gotovo svih tRNA, potrebno je postojanje elemenata koji omogućuju razlikovanje pojedinih tRNA, tzv. elemenata identiteta. Svaka stanična tRNA u strukturi ima pozitivne elemente identiteta koji omogućuju interakciju s pripadnom aaRS, i negativne elemente identiteta koji onemogućuju interakcije s nepripadnim aaRS[6]. Također, kako u stanici najčešće postoji samo jedna aaRS za svaku aminokiselinu, ta jedna aaRS mora prepoznavati sve izoakceptore tRNA za tu pojedinu aminokiselinu. Elemente identiteta najčešće čine nukleotidi iz akceptorske peteljke, zatim baza na položaju 73 („diskriminatorska baza"), a elementi identiteta mogu biti i modificirane nukleotidne baze[32]. Nukleotidi iz antikodonske peteljke također često tvore elemente identiteta, osim kod tRNA specifičnih za aminokiseline koje su u genetičkom kodu predstavljene s više kodona, pa nije moguće ostvariti univerzalni element identiteta[6].

2.2.1. $tRNA^{Ile}$ iz bakterije E. coli

U genetičkom kodu postoje tri kodona koja odgovaraju aminokiselini izoleucinu: AUU, AUA te AUC. U stanicama bakterije *E. coli* postoje dva izoakceptora tRNA koja se sparuju s tim kodonima prilikom translacije. Izoakceptori dijele 68 % sličnosti, a najviše se razlikuju u antikodonskoj omči.

S kodonima AUU i AUC sparuje se glavni izoakceptor koji ima antikodon GAU, dok se drugi, sporedni izoakceptor sparuje s kodonom AUA. Da bi to sparivanje bilo moguće, mora doći do posttranskripcijske modifikacije tRNA, jer se u genomu zapisan slijed antikodona CAU veže metioninski kodon AUG. Posttranslacijskom modifikacijom dodaje se lizin vezanjem ε-

amino skupine lizina na C-2 položaj pirimidinskog prstena i nastaje modificirani nukleozid lizidin, te antikodon tog sporednog izoakceptora ima slijed LAU[33].

In vitro transkribirana $tRNA^{Ile}$ (glavni izoakceptor) koja nema postranslacijski dorađene baze, pokazuje značajno manju aktivnost od nativne $tRNA^{Ile}$ u kinetičkim testovima aminoacilacijske aktivnosti[34]. Kao najvažniji elementi identiteta za interakciju $tRNA^{Ile}$ i IleRS određeni su u antikodonskoj omči položaji baza 34, A35 i U36[34]. Također važni elementi identiteta u sustavu IleRS i $tRNA^{Ile}$ iz bakterije *E. coli* su: modificirani nukleotid t6A37 (N6-treonilkarbamoil-adenozin) i A38 iz antikodonske ruke, te parovi baza C29-G41 iz antikodonske petlje, U12-A23 iz D-ruke, C4-G69 kao i diskriminatorska baza A73[33, 34].

2.2.2. $tRNA^{Val}$ iz bakterije E. coli

Istraživanje na $tRNA^{Val}$ je pokazalo da $tRNA^{Val}$ dobivena *in vitro* transkripcijom pokazuje gotovo jednako aminoaciliranje kao nativna modificirana $tRNA^{Val}$ [35].

Detaljno istraživanje transkripata $tRNA^{Val}$ iz bakterije *E. coli* otkrilo je čitav niz važnih elemenata identiteta te tRNA. Napravljen je niz transkripata s mutacijama na položajima za koje se pretpostavljalo da su bitni za prepoznavanje od ValRS, a koji su onda istraženi određivanjem kinetičkih parametara u aminoaciliranju. Važni elementi identiteta su A35 i C36, dvije antikodonske baze. Nukleotidne baze A, C i U na položaju 73 (diskriminatorska baza) ValRS može prepoznati, do je naprotiv G73 negativni element identiteta. Kao manje važni elementi identiteta služe G20 i G45. Na akceptorskoj peteljci nema drugih nukleotida koje prepoznaje sintetaza[36].

2.2.3. $tRNA^{Leu}$

$tRNA^{Leu}$, zajedno s $tRNA^{Ser}$ i $tRNA^{Tyr}$ (iz bakterije *E. coli*) pripada u skupinu II tRNA, koje za razliku od ostalih tRNA imaju dugu varijabilnu petlju i omču koje mogu sadržavati od 13 do 21 nukleotid[37]. Čak šest kodona u genetskom kodu kodira za leucin, pa $tRNA^{Leu}$ identitetne elemente uglavnom nema u antikodonskom tripletu. Poznati elementi identiteta za $tRNA^{Leu}$ iz bakterije *E. coli* su diskriminatorska baza A73 te D- i TΨC-ruka, odnosno važna je tercijarna struktura tRNA[38]. Za $tRNA^{Leu}$ iz *Homo sapiens* elementi identiteta su parovi baza iz akceptorske peteljke, nukleotid iz D-ruke, diskriminatorska baza A73 i varijabilna petlja[39]. U ovom radu koristit će se $tRNA^{Leu}$ iz citoplazme *H. sapiens*.

2.3. Aminoacil-tRNA-sintetaze

Kao što je ranije spomenuto, uloga aminoacil-tRNA-sintetaza u stanicama je kataliziranje kovalentnog povezivanja aminokiselina i pripadnih molekula tRNA[1]. Aminoacil-tRNA-sintetaze su enzimi koji su u genomu stanica obično prisutni u jednoj kopiji i evolucijski su vrlo očuvani zbog ključne uloge u biosintezi proteina. AaRS reakciju aminoaciliranja kataliziraju u dva koraka, od kojih prvi obuhvaća aktivaciju aminokiseline uz utrošak jedne molekule ATP-a pri čemu nastaje aminoacil-adenilat, a drugi korak podrazumijeva prijenos aktivirane aminokiseline na 3'-kraj molekule tRNA (revijalno prikazano u [5]). Za točnu biosintezu proteina je ključno povezivanje odgovarajućih pripadnih parova aminokiselina i tRNA. Zbog strukturne i funkcionalne sličnosti pojedinih aminokiselina, ovi enzimi povremeno griješe u izboru supstrata, no radi održavanja pogreške u biosintezi proteina na razini koja je stanici prihvatljiva (eksperimentalno izmjerena 1 pogreška na 1000-10000 sintetiziranih peptidnih veza[2-4]), razvili su mehanizme popravka vlastitih pogrešaka (revijalno prikazano u [5]). U izboru tRNA aaRS rijetko griješe zbog već prethodno spomenutih elemenata identiteta koji omogućavaju specifično prepoznavanje pripadne tRNA.

2.3.1. Reakcija aminoaciliranja

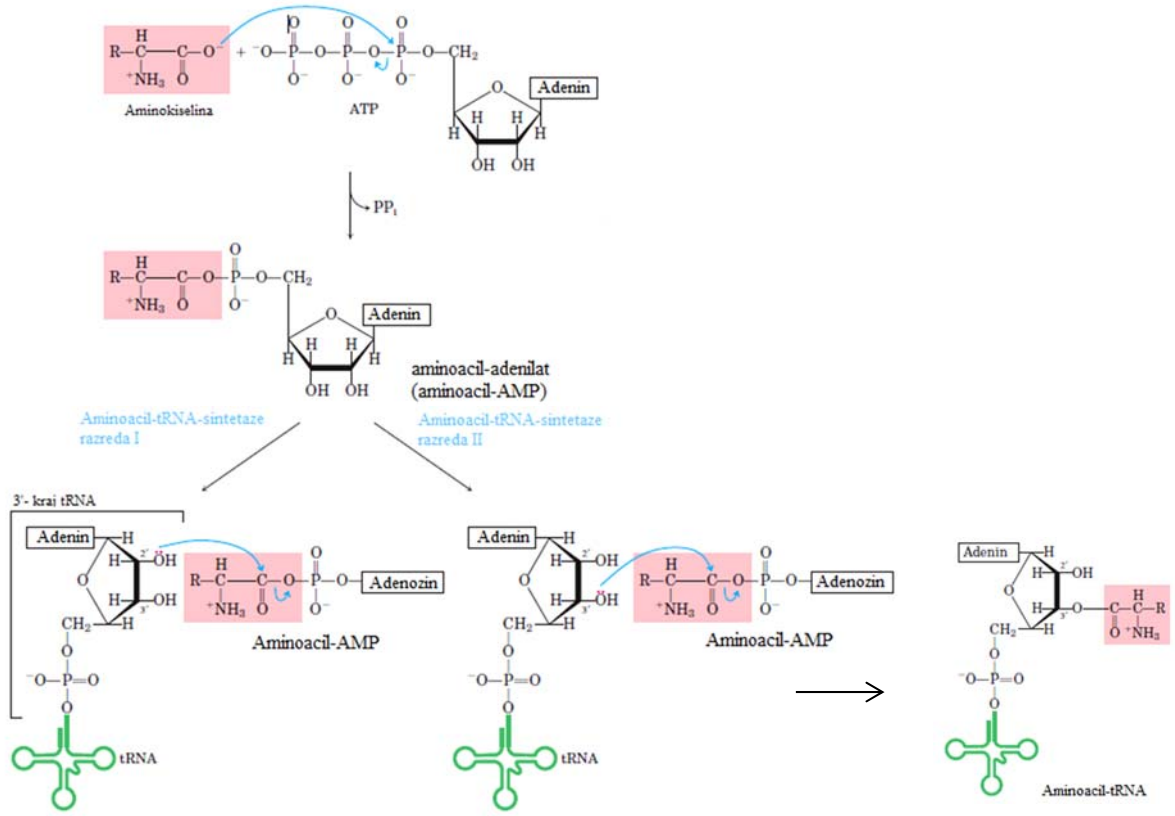
AaRS kataliziraju formiranje esterske veze između karboksilnog ugljikovog atoma aminokiseline i 3'-OH skupine riboze terminalnog adenozina 76 na molekuli tRNA. Reakcija aminoaciliranja odvija se u aktivnom sintetskom mjestu enzima, a odvija se u dva koraka:

$$1.\ \mathrm{ATP} + \mathrm{aa} \rightleftarrows \mathrm{aa\text{-}AMP} + \mathrm{PP_i}$$

$$2.\ \mathrm{aa\text{-}AMP} + \mathrm{tRNA} \rightarrow \mathrm{aa\text{-}tRNA} + \mathrm{AMP}$$

Reakcija započinje aktivacijom aminokiseline: dolazi do nukleofilnog napada atoma kisika iz α-karboksilne skupine aminokiseline na α-fosfatnu skupinu ATP-a, pri čemu nastaje miješani anhidrid aminoacil-adenilat (aa-AMP) i oslobađa se pirofosfat[1]. Za reakciju aktivacije kod većine aaRS nije potrebno prisustvo tRNA, dovoljna je prisutnost supstrata ATP-a i aminokiseline. Za aktivaciju arginil-, glutaminil-, glutamil- i lizil-tRNA-sintetaze (iz razreda I) tRNA je potrebna da bi došlo do aktivacije (revijalno prikazano u [40]). U drugom koraku aminoaciliranja dolazi do prijenosa aktivirane aminokiseline na tRNA, pri čemu dolazi do nukleofilnog napada kisika iz 2'- ili 3'- OH skupine terminalne riboze adenozina 76 molekule tRNA na α-karbonilni ugljikov atom aminoacil-adenilata. U toj reakciji nastaje tRNA aminoacilirana (aa-tRNA), odnosno esterificirana aminokiselinom na 2'- ili 3'- OH skupini terminalnog adenozina (ovisno o razredu aaRS, opisano u sljedećem poglavlju) i AMP.

Konačni produkti ukupne reakcije aminoaciliranja su aminoacil-tRNA, te AMP i PP_i. (Slika 2.8).



Slika 2.8: Shematski prikaz reakcije aminoaciliranja. Preuzeto i prilagođeno iz [22].

2.3.2. Razred I i II

U stanicama obično postoji 20 aaRS, za svaku proteinogenu aminokiselinu postoji jedna aaRS koju obično kodira jedan gen. Neki organizmi posjeduju i netipične aaRS, pirolizil-tRNA-sintetazu (PylRS) i fosfoseril-tRNA-sintetazu (SepRS). Prema strukturnim i funkcionalnim karakteristikama aaRS se dijele na dva razreda[40-42]: razred I s 11 članova i razred II s 13 članova, s tim da lizil-tRNA-sintetaza ima predstavnike u oba razreda, ovisno o podrijetlu organizma (Tablica 2.1).

Tablica 2.1: Podjela aminoacil-tRNA-sintetaza na razrede I i II. Podjela prema [5].

Razred I	Kvaterna struktura	Razred II	Kvaterna struktura
MetRS	α, α_2	SerRS	α_2
LeuRS	α	ProRS	α_2
IleRS	α	ThrRS	α_2
ValRS	α	GlyRS	α_2
CysRS	α, α_2	HisRS	α_2
GlnRS	α	AspRS	α_2
GluRS	α	AsnRS	α_2
TyrRS	α	LysRS	α_2
TrpRS	α2	PheRS	$(\alpha\beta)_2$, α
ArgRS	α_2	GlyRS	$(\alpha\beta)_2$
LysRS	α	AlaRS	α_2, α
		SepRS	α_4
		PylRS	α_2

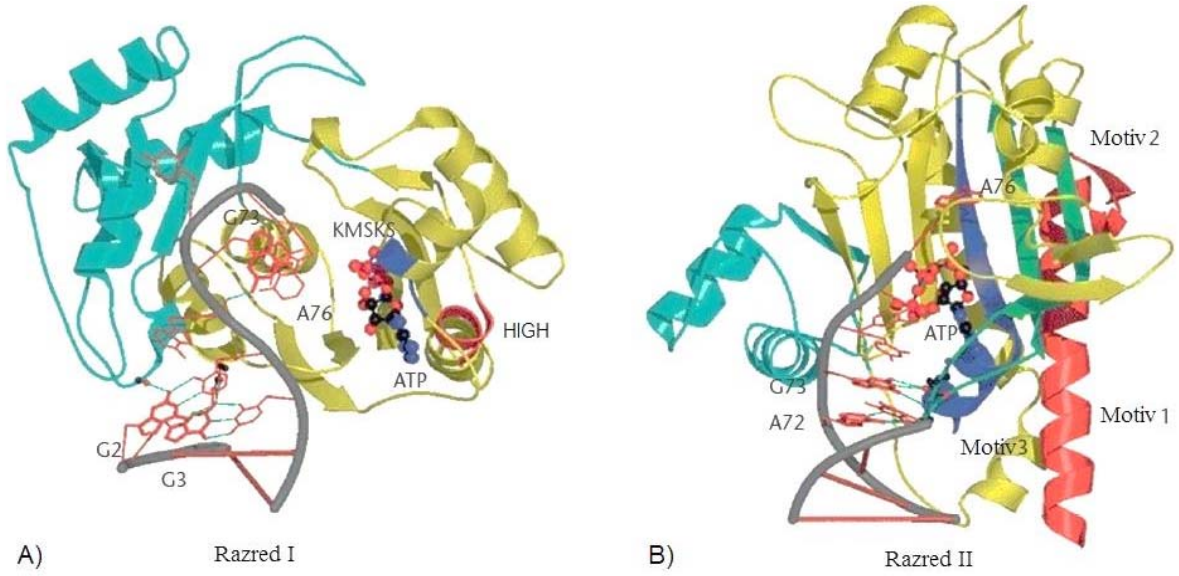
Enzimi razreda I, metil-, leucil-, izoleucil-, valil-, cisteinil-, glutaminil-, glutamil-, tirozil-, triptofanil-, arginil- i lizil-tRNA-sintetaza (MetRS, LeuRS, IleRS, ValRS, CysRS, GluRS, GlnRS, TyrRS, TrpRS, ArgRS, LysRS) uglavnom su monomerni proteini. 11 članova ovog razreda dodatno je podijeljeno u 3 podrazreda, Ia, Ib i Ic. Sve enzime razreda I karakteriziraju zajedničke strukturne odrednice: motiv HIGH (slijed histidil-izoleucil-glicil-histidin) i KMSKS (slijed lizil-metionil-seril-lizil-serin).

Karakteristična Rossmannova struktura koja se sastoji od dva motiva β-α-β čini aktivno mjesto enzima ovog razreda. U reakciji aminoaciliranja ovi enzimi vežu molekulu tRNA smotanu u L oblik sa strane malog utora i esterificiraju 2'-OH skupinu posljednjeg adenozina 3'-kraja, nakon čega se aminokiselina reakcijom transesterifikacije prenosi na susjednu 3'-OH[22].

Kao i drugi proteini koji posjeduju Rossmannovu strukturu, enzimi ovog razreda ATP vežu u izduženoj konformaciji[43].

U skupinu razreda II pripadaju seril-, prolil-, treonil-, glicil-, histidil-, asparagil-, asparaginil-, lizil-, fenilalanil-, alanil-, fosfoseril- i pirolizil-tRNA-sintetaza (SerRS, ProRS, ThrRS, GlyRS, HisRS, AspRS, AsnRS, LysRS, PheRS, AlaRS, SepRS, PylRS). Za razliku od razreda I, enzimi ovog razreda su uglavnom homo- ili heterodimeri, a prema sličnosti nukleotidnih sljedova njihovih gena i kvaternoj strukturi dijele se na tri podrazreda: IIa, IIb i

IIc. Funkcionalne razlike u odnosu na enzime razreda I su prilaženje molekuli tRNA sa strane velikog utora, vezanje ATP-a u savijenoj konformaciji, i direktno vezanje aminokiseline na 3'-OH skupinu posljednjeg adenozina 76 3'-kraja molekule tRNA (jedina iznimka je fenilalanil-tRNA-sintetaza, kod koje se aminokiselina prvotno veže na 2'-OH skupinu, kao kod razreda I). Strukturno obilježje enzima ovog razreda čini niz od tri motiva, od kojih motiv 1 sudjeluje u interakciji monomera, a motivi 2 i 3 su dio aktivnog mjesta. Čitavo aktivno mjesto građeno je od anti-paralelne β ploče omeđene trima α zavojnicama[44] (Slika 2.9).



Slika 2.9: Prikaz strukture aktivnih mjesta aminoacil-tRNA-sintetaza u kompleksu s akceptorskim peteljkama pripadnih molekula tRNA i ATP-om. A) Glutaminil-tRNA-sintetaza, predstavnik razreda I. Žuto je označena Rossmannova struktura. Karakteristični motivi HIGH I KMSKS su označeni crvenom i tamno-plavom bojom. B) Aspartil-tRNA-sintetaza, predstavnik razreda II. Crvenom, zelenom i tamno-plavom bojom su označena 3 karakteristična motiva. Preuzeto iz [45].

Enzimi razreda I i II razlikuju se još i u jednoj funkcionalnoj, odnosno kinetičkoj karakteristici. Kinetička istraživanja ustaljenog i predustaljenog stanja reakcije aminoaciliranja pokazala su da se kod enzima razreda I ograničavajući korak događa nakon same reakcije aminoaciliranja, odnosno kod većine enzima je ograničavajuća brzina otpuštanja produkata s enzima u otopinu[5, 46]. Navedeno svojstvo se u kinetičkim istraživanjima predustaljenog stanja, u reakcijskim uvjetima koji omogućavaju barem 5-10 obrtaja enzima, očituje vidljivim „burst"-om, odnosno tzv. prsnućem produkta. Krivulja nastajanja produkta opisuje se brzim inicijalnim eksponencijalnim nastajanjem produkta nakon čega slijedi njegovo linearno nakupljanje. Linearna faza takve bifazne krivulje objašnjava se kroz nužnu disocijaciju produkta da bi enzim dalje mogao sudjelovati i u pretvorbi supstrata u produkt. U prvom reakcijskom krugu kroz eksponencijalno nastajanje produkta očituje se prava neometana brzina kemijske reakcije pretvorbe, dok sporija disocijacija nastalog produkta ograničava brzinu daljnje katalize. Ovakav

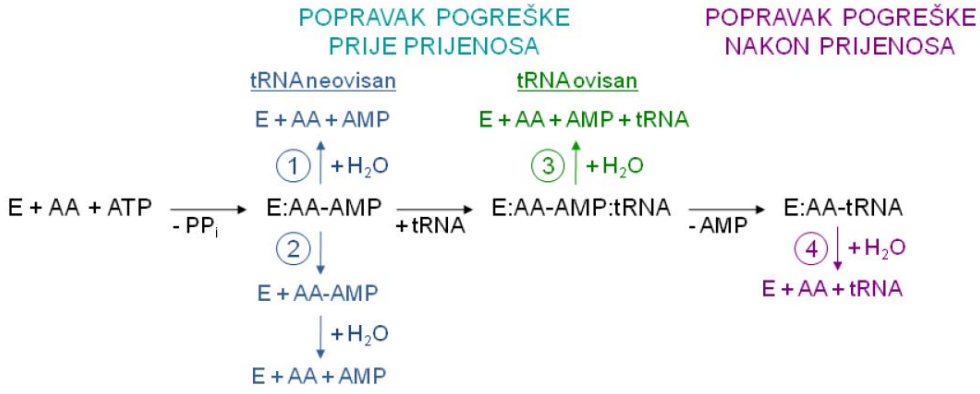
mehanizam nije primijećen kod enzima razreda II. Za enzime razreda II specifična je sporija aktivacija u prisustvu tRNA u odnosu na disocijaciju produkta, zbog čega upravo korak aktivacije ograničava ukupnu brzinu aminoaciliranja, te nije vidljiva kinetika "burst"-a[5, 46].

2.3.3. Popravak pogreške kod aminoacil-tRNA-sintetaza

AaRS povremeno rade pogreške zbog nedovoljne specifičnosti sintetskih mjesta. Da bi se razina pogreške u ukupnoj biosintezi proteina održala na stanici prihvatljivoj razini, razne aaRS koriste različite strategije popravka vlastitih pogrešaka. U ovom poglavlju opisat će se popravak pogreške kod aminoacil-tRNA-sintetaza, osim IleRS, ValRS i LeuRS koje će se detaljnije opisati u sljedećem poglavlju.

Sve stanične tRNA su donekle strukturno slične, međutim kako se radi o relativno velikim molekulama, između molekula tRNA koje su zadužene za određene aminokiseline ipak postoje dovoljne razlike (pozitivni i negativni elementi identiteta, ranije opisano) te u pravilu ne dolazi do prepoznavanja između aaRS i nepripadnih tRNA.

Kad se aaRS nađe okružena relativno visokom koncentracijom 20 sličnih aminokiselina, većinu aminokiselina odbacuje, odnosno ne može ih vezati u aktivno sintetsko mjesto zbog steričkih razloga. Dio aminokiselina koje se ipak vežu, ne pozicioniraju se u sintetsko mjesto na način koji omogućava produktivnu katalizu. Za ostale aminokiseline, koje se mogu vezati u aktivno mjesto i aktivirati postoje mehanizmi popravka pogrešaka. Popravak pogrešaka kod aaRS se generalno može podijeliti na popravak pogreške nakon aktivacije pogrešne aminokiseline, ali prije prijenosa tRNA, i na popravak pogreške nakon prijenosa pogrešne aminokiseline na tRNA. Popravak pogreške može biti enzimski – hidrolizom na enzimu, ili neenzimski otpuštanjem aminoacil-adenilata u otopinu gdje se hidrolizira[47]. Popravak pogreške prije prijenosa se može događati u odsutnosti tRNA i to je takozvani tRNA-neovisni popravak pogreške prije prijenosa. No, ukoliko prisutnost tRNA stimulira popravak pogreške prije prijenosa, takav tip popravka naziva se tRNA-ovisni popravak pogreške prije prijenosa aminokiseline (Slika 2.10).



Slika 2.10: Shema popravka pogreške kod aminoacil-tRNA-sintetaza. Prilagođeno iz[7].

Od 20 staničnih aaRS, 10 ih ima neki oblik popravka pogreške: leucil-, izoleucil-, valil-, metionil-, seril-, prolil-, treonil-, lizil- (razreda II), fenilalanil- i alanil-tRNA-sintetaza. Od njih metionil-, seril- i lizil-tRNA-sintetaza (razreda II, enzim koji pripada razredu I ostvaruje dovoljnu razinu specifičnosti u sintetskoj reakciji aktivacije, pa nije potreban popravak pogreške) koriste samo tRNA-neovisni popravak pogreške prije prijenosa, popravak koji se odvija u sintetskom aktivnom mjestu, te ne ovisi o prisutnosti posebne domene za popravak pogreške[5]. Ovaj tip popravka podrazumijeva hidrolizu nepripadnog aminoacil-adenilata koja nije stimulirana prisustvom tRNA, a svojstven je i svim drugim aaRS koje koriste i ostale tipove popravka pogreške (bilo aaRS razreda I ili II). Međutim, kako je to relativno slaba aktivnost u usporedbi s drugim robustnijim popravcima, čini vrlo mali udio u ukupnom popravku pogreške (oko 5 %)[7, 48]. Osim hidrolize nepripadnog aminoacil-adenilata u sintetskom mjestu enzima, moguće je i da enzim selektivno otpušta nepripadni aminoacil-adenilat u otopinu gdje se neenzimski hidrolizira. Poznato je da ovakav tip popravka pogreške djelomično koriste SerRS[49] i mitohondrijska ThrRS[50]. Ne zna se da li popravak pogreške prije prijenosa, s obzirom da čini tako mali udio ukupnog popravka, uopće ima fiziološku važnost[5]. IleRS je jedina aaRS za koju je detaljno okarakteriziran tRNA-ovisni popravak pogreške prije prijenosa koji se odvija u sintetskom mjestu, a detaljnije će bit opisan u sljedećem poglavlju.

Popravak pogreške nakon prijenosa se događa u zasebnim domenama zaduženim upravo za taj popravak. Kod enzima razreda I koji imaju ovaj tip popravka (IleRS, ValRS i LeuRS) to je domena CP1. Općenito, smatra se da kod sintetaza razreda I gdje je disocijacija produkta najsporiji korak, dolazi do translokacije, odnosno pomicanja 3'-kraja tRNA s vezanom aminokiselinom do domene za popravak pogreške, dok je kod enzima razreda II moguće da

dolazi do disocijacije u otopinu i ponovnog vezanja pogrešno aminoacilirane tRNA nakon otpuštanja s enzima.

Enzimi razreda II, za razliku od razreda I, nemaju srodne domene za popravak pogrešaka. Na primjer ThrRS hidrolizira pogrešno aminoaciliranu Ser-tRNA^{Thr} u posebnoj domeni udaljenoj 39 Å od sintetskog aktivnog mjesta[51]. ProRS posjeduje posebnu INS domenu za popravak pogreške (opisana niže). AlaRS također povremeno griješi[52] i vrši popravak pogreške nakon prijenosa. Glavni supstrati za popravak su glicil-tRNA^{Ala} i seril-tRNA^{Ala}. Za smještanje serina u domenu za popravak pogrešaka, AlaRS ima hidrofobni džep i vjerojatno koristi ion cinka u interakcijama[5, 53]. PheRS koristi mehanizam popravka pogrešaka nakon prijenosa za hidroliziru tirozil-tRNA^{Phe}. Tirozin se pritom veže vodikovim vezama u domenu za popravak pogreške.

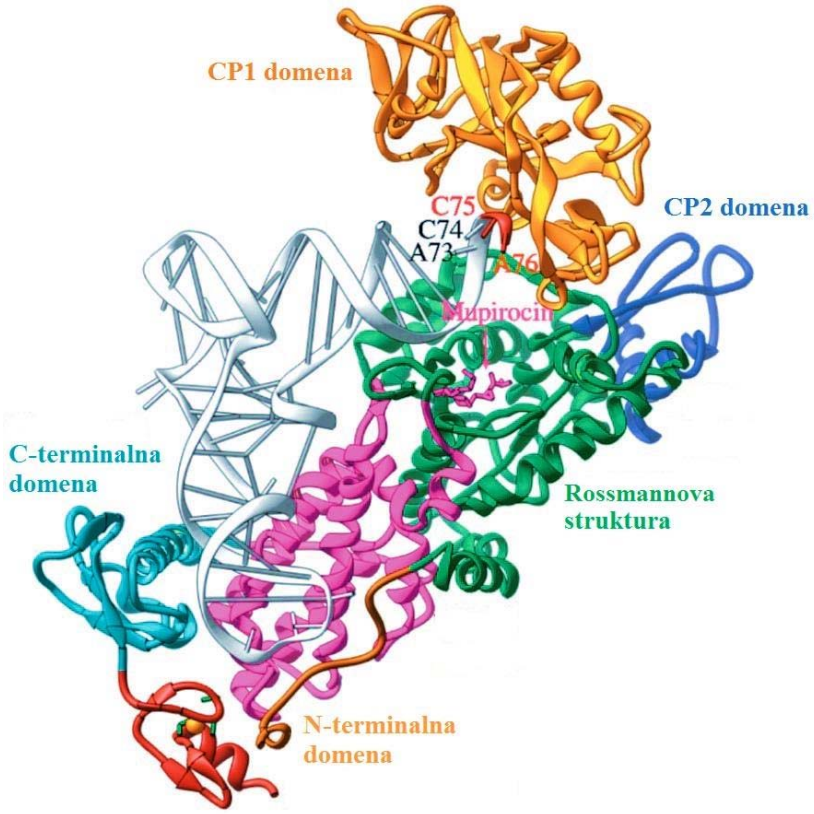
Osim spomenutih mehanizama popravka pogreške, kod nekih aaRS postoji i popravak pogreške *in trans*, kada enzim veže pogrešno aminoaciliranu tRNA te dolazi do hidrolize u domeni za popravak pogreške. Popravak pogreške *in trans* se može događati i pomoću posebnih enzima koji obavljaju zadaću hidrolize pogrešno aminoacilirane tRNA, a koji su homolozi domena za popravak pogrešaka nakon prijenosa aaRS[54]. Popravak *in trans* zastupljniji kod enzimima razreda II, vjerojatno jer je kod njih najsporiji korak ukupne reakcije aminoaciliranja nije otpuštanje produkta, već neki raniji korak. Kako je enzimima razreda I upravo disocijacija produkta najsporiji korak, veća je mogućnost da će se prije disocijacije pogrešno aminoacilirana tRNA translocirati u domenu za popravak pogreške gdje će se dogoditi hidroliza esterske veze i osloboditi deacilirana tRNA i nastala aminokiselina.

Primjer samostalnog proteina koji obavlja popravak *in trans* je Ybak. Domena za popravak pogreške ProRS INS[55], čija glavna zadaća je hidroliza Ala-tRNA^{Pro} u bakteriji *E. coli*[56], ne može hidrolizirati Cys-tRNA^{Pro}. To bi mogao biti razlog postojanja posebnog enzima Ybak kod bakterija koji u kompleksu s ProRS može hidrolizirati Cys-tRNA^{Pro} [57]. Sličnu funkciju ima i ProXp-Ala koji deacilira Ala-tRNA^{Pro} [56]. AlaX je protein sa strukturnom homologijom domeni za popravak pogreške kod AlaRS. Ovaj protein može vršiti hidrolizu Ser-tRNA^{Ala} i Gly-tRNA^{Ala} hidrolitičkim popravkom *in trans*[58].

2.3.4. Izoleucil-tRNA-sintetaza

Izoleucil-tRNA-sintetaza (IleRS) je aminoacil-tRNA-sintetaza razreda Ia, čiji je pripadni supstrat aminokiselina izoleucin. Uz navedene strukturne elemente koji karakteriziraju sve aaRS razreda I, u strukturi IleRS postoje strukturni elementi specifični za podrazred Ia kojem IleRS pripada. Strukturno se IleRS može podijeliti na N-terminalnu katalitičku domenu,

insercijske domene CP1 i CP2 (engl. *connective peptide*) i C-terminalnu RNA-vezujuću domenu (Slika 2.11).



Slika 2.11: Struktura IleRS iz bakterije *Staphylococcus aureus* u kompleksu s mupirocinom u aktivnom sintetskom mjestu (ljubičasto) i $tRNA^{Ile}$ (bijelo). Rossmannova struktura označena je zeleno, CP1 domena narančasto, CP2 domena tamno-plavo, tRNA-vezna domena ljubičasto, C-terminalna domena svijetlo-plavo, vezno mjesto za Zn^{2+} crvenom bojom. Preuzeto i prilagođeno iz [59].

Posebno je zanimljiva domena CP1 koja je umetnuta u Rossmannovu strukturu i udaljena 30 Å od aktivnog sintetskog mjesta[60-62]. Kod nekolicine aaRS razreda Ia koje u svojoj strukturi imaju domenu CP1 pokazano je da je njena funkcija hidrolitički popravak pogreške nakon prijenosa nepripadne aminokiseline na tRNA[63-65]. Domena CP2 koja se nalazi ili prije ili poslije domene CP1 nema posebnu funkciju, međutim potrebna je za aktivnost enzima[60, 66]. IleRS iz bakterije *E. coli* je metaloenzim koji u svojoj strukturi sadrži vezana dva metalna iona Zn^{2+}, koordinirana cisteinskim bočnim ograncima[67-69]. Uloga metalnog iona je strukturna, i pokazano je da je važan za funkciju, unatoč tome što se ne nalazi u aktivnom mjestu enzima.

Izoleucin, pripadni supstrat ovog enzima je alifatska aminokiselina koja se na enzim veže u hidrofobni džep sastavljen od bočnih ogranaka Gly^{45}, Pro^{46}, Trp^{518}, Glu^{550} i Trp^{558}, i formira interakcije s Asp^{85} i Gln^{554} (kod IleRS iz bakterije *Thermus thermophilus*). Zbog očito važne funkcije ovih bočnih ogranaka, ove aminokiseline su evolucijski očuvane u svim do sada sekvenciranim IleRS[62]. ATP, za koji je ranije spomenuto da se kod enzima razreda I veže u

ispruženoj konformaciji, veže se na IleRS tako da stvara interakcije s bočnim ograncima aminokiselina koje se nalaze u vrlo očuvanim motivima aaRS razreda I, a to su His^{54}, Val^{55}, Gly^{56}, His^{57} (HVGH) i Lys^{592}, Met^{593}, Ser^{594} Lys^{595} (KMSK) (opet kod IleRS iz bakterije *Thermus thermophilus*). Kao i drugi enzimi razreda I, IleRS veže $tRNA^{Ile}$ sa strane malog utora. C-kraj enzima ostvaruje interakcije s antikodonskom petljom molekula tRNA, a poznato je da se u tom dijelu proteina nalaze determinante za interakciju s antikodonskom petljom $tRNA^{Ile}$ [33, 59].

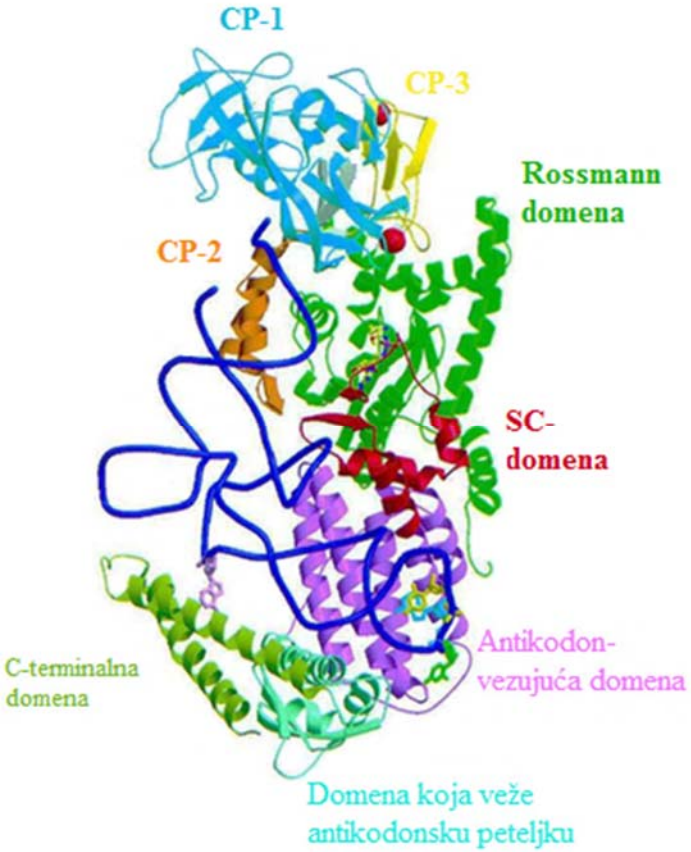
Osim pripadnog supstrata izoleucina, IleRS može greškom katalizirati reakciju aminoacilacije i s drugim aminokiselinama. Valin, aminokiselina s alifatskim bočnim ogrankom koja se od izoleucina razlikuje za samo jednu $–CH_2$ skupinu, također je supstrat ovog enzima. Pokazano je da zbog relativne strukturne sličnosti ovih dviju aminokiselina aktivno sintetsko mjesto teško razlikuje ove dvije aminokiseline, odnosno valin se veže u isto sintetsko aktivno mjesto kao i izoleucin, no ne ostvaruje maksimum hidrofobnih interakcija zbog manjeg bočnog ogranka. Eksperimentalno je pokazano da IleRS uspješno aktivira valin, i to samo 200 puta lošije nego pripadni izoleucin, a također je pokazano i da se valin uspješno prenosi na $tRNA^{Ile}$, i to jednako učinkovito kao i izoleucin[7, 8]. Još 60-ih godina prošlog stoljeća otkriveno je da IleRS ima mehanizam popravka pogreške, odnosno u prisutnosti tRNA primijećena je hidroliza Val-AMP-a[9]. Kasnije je pokazano da valin vezan na 3'-kraj $tRNA^{Ile}$ može translokacijom biti prenesen u drugo aktivno mjesto enzima, domenu CP1 gdje se odvija popravak pogreške nakon prijenosa, odnosno dolazi do hidrolize $Val\text{-}tRNA^{Ile}$ [70]. U domeni CP1 dolazi do hidrolize esterske veze valina i $tRNA^{Ile}$, te se slobodna aminokiselina i slobodna tRNA otpuštaju s enzima. Ranija istraživanja su sugerirala da se enzimov pripadni supstrat izoleucin ne može smjestiti u CP1 domenu za popravak pogreške, stoga se ne hidrolizira. Model koji je ovdje opisan se naziva model dvostrukog sita[71, 72], gdje kao prvo grubo sito djeluje sintetsko mjesto enzima, pa se aminokiseline veće od pripadnog izoleucina ne mogu vezati u sintetsko mjesto, a drugo finije sito je domena za popravak pogreške nakon prijenosa, gdje se mogu smjestiti samo aminokiseline manje od izoleucina, dok je izoleucin isključen iz tog hidrolitičkog mjesta. Novija istraživanja govore da se izoleucin ipak može vezati u CP1 domenu, no hidroliza je vrlo spora, pa je glavni način isključivanja izoleucina kinetički, a ne sterički, čime se klasični model dvostrukog sita ovdje proširuje i na kinetičko isključivanje pripadnog supstrata[73].

Sličan mehanizam popravka pogreške prisutan je i u drugim enzimima razreda Ia. Posebnost IleRS u odnosu na druge enzime ovog podrazreda je postojanje još jednog mehanizma popravka pogreške. Pokazano je da IleRS iz bakterije *E. coli* uz valin kao nepripadni supstrat koristi

mehanizam popravka pogreške prije prijenosa koji je tRNA-ovisan. Naime, kod većine enzima, pa i kod IleRS, zamijećen je slab tRNA-neovisni popravak pogreške prije prijenosa (hidroliza nepripadnog aminoacil-adenilata), međutim jedino je kod IleRS iz bakterije *E. coli* jednoznačno neosporivo pokazano da prisutnost tRNA stimulira hidrolizu Val-AMP u sintetskom aktivnom mjestu[7, 11]. Analogni mehanizam ne postoji kod strukturno sličnih i srodnih ValRS i LeuRS iz bakterije *E. coli*, te je prema do sad postojećim podacima IleRS jedinstven. Kod IleRS iz bakterije *E. coli* popravak pogreške prije prijenosa čini čak do 30 % ukupnog popravka pogreške[11]. Raniji eksperimentalni radovi su ovaj tip popravka pogreške smještali u domenu CP1 gdje se također odvija i popravak pogreške nakon prijenosa. Međutim, mehanizam prenošenja aminoacil-adenilata do 30 Å udaljene domene nikad nije razjašnjen, a kritike modela obuhvaćaju nepostojanje tunela kojim se prenosi aminoacil-adenilat, i specifičnost translokacije samo nepripadnog aminoacil-adenilata. Kao nelogičnost modela isticano je i provjerava li se pripadni aminoacil-adenilat u domeni CP1, te kako se zatim nakon provjere vraća u sintetsko mjesto da bi predao aktiviranu aminokiselinu za prijenos na $tRNA^{Ile}$. Osim što navedeni mehanizam prijenosa aktivirane aminokiseline nije nikad eksperimentalno dokazan, pokazano je i da se aminoacil-adenilat veže u hidrolitičku domenu CP1 sa značajno manjim afinitetom od supstrata za popravak pogreške nakon prijenosa[59, 62, 65, 74]. Tek 2010. godine je model konačno opovrgnut kada je pokazano da IleRS s inaktiviranim hidrolitičkim mjestom u domeni CP1 i dalje ima aktivan tRNA-ovisan popravak pogreške prije prijenosa aminokiseline[7]. Daljnja potvrda modela po kojem se reakcija odvija u sintetskom mjestu pružilo je istraživanje u kojem je pokazano da mutacija jednog bočnog ogranka u sintetskom mjestu (Y59) može selektivno i u potpunosti ukinuti tRNA-ovisan popravak prije prijenosa[11]. Pokazano je da IleRS iz bakterije *E. coli* posjeduje tRNA-ovisan popravak pogreške prije prijenosa zbog kinetičkog particioniranja prijenosa pogrešno aktivirane aminokiseline na tRNA i hidrolitičkog popravka nepripadnog aminoacil-adenilata u sintetskom mjestu. Naime, IleRS nakon aktivacije prenosi valin na tRNA brzinom koja je usporediva s brzinom hidrolize valil-adenilata, pa se dio valil-adenilata uspije hidrolizirati prije prijenosa i nastanka valil-$tRNA^{Ile}$. Shodno tome, nakon aktivacije izoleucina, prijenos se odvija jednakom brzinom kao i prijenos valina, međutim koeficijent brzine hidrolize izoleucil-adenilata je značajno niži u odnosu na hidrolizu valil-adenilata, pa se glavnina izoleucina prenese na $tRNA^{Ile}$ i nastaje izoleucil-$tRNA^{Ile}$. Ovo nije slučaj kod ValRS gdje je prijenos aminokiseline na tRNA relativno brz u odnosu na hidrolizu aminoacil-adenilata, pa se tRNA prije pogrešno aminoacilira nego se pogrešni aminoacil-adenilat stigne hidrolizirati u aktivnom sintetskom mjestu.

2.3.5. Valil-tRNA-sintetaza

Valil-tRNA-sintetaza zajedno s IleRS i LeuRS čini podrazred aminoacil-tRNA sintetaza Ia, jer s njima dijeli veliku strukturnu sličnost. Razlikuje se šest strukturnih elemenata: Rossmannova domena, CP domene (CP1, CP2 i CP3), antikodon-vezujuća domena (α-helikalna domena), središnja domena koja interagira s peteljkama tRNA (engl. *stem-contact*, SC-domena), domena koja veže antikodonsku peteljku i C-terminalna domena koja veže D i T peteljke (Slika 2.12).



Slika 2.12: Struktura ValRS iz bakterije *Thermus thermophilus* u kompleksu s $tRNA^{Val}$ (tamno-plava). CP domene (CP1, CP2 i CP3) su označne svijetlo-plavom, narančastom i žutom bojom. Domena s Rossmanovom strukturom je označena zeleno, C-terminalna domena označena je žuto-zelenom bojom, Antikodon vezujuća domena je ljubičasta, središnja SC domena je crvena, domena koja veže akceptorsku peteljku je morski-plave boje. Preuzeto i prilagođeno iz [75].

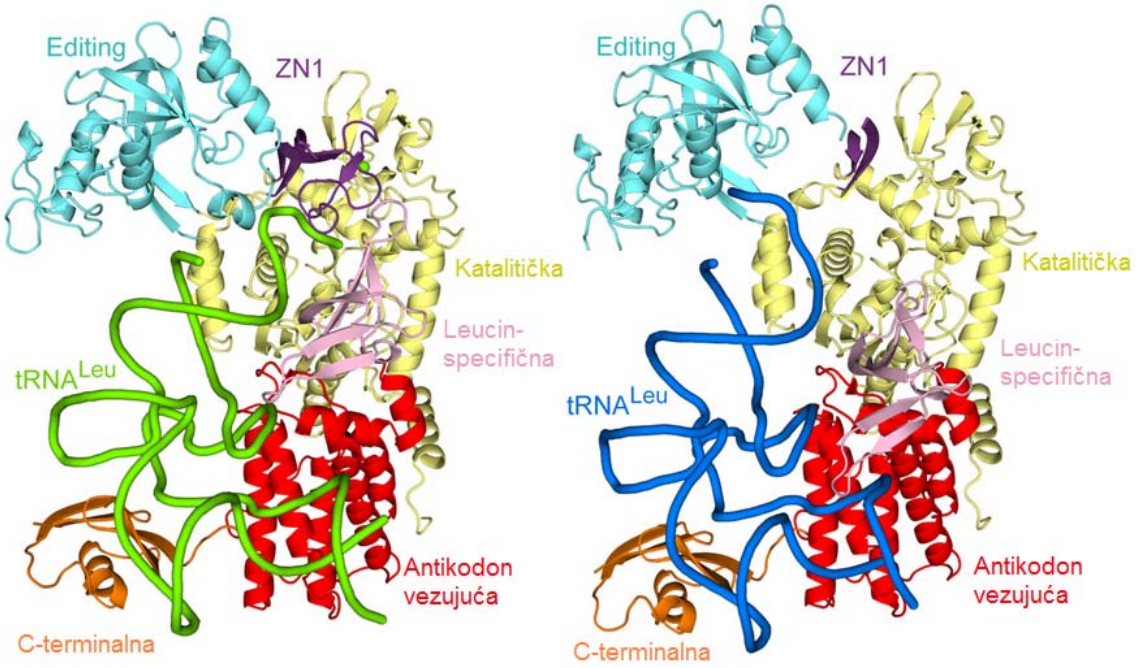
U strukturi ValRS iz bakterije *T. thermophilus* su dva iona Zn^{2+}. U strukturi također postoje i karakteristični slijedovi KMSKS i HIGH. Kao i IleRS i LeuRS, ValRS ima karakterističnu domenu CP1 koja vrši popravak pogreške nakon prijenosa, a umetnuta je u Rossmannovu domenu. Iako ValRS temeljno katalizira esterifikaciju $tRNA^{Val}$ pripadnom aminokiselinom valinom, kao i ranije spomenuti IleRS, ValRS povremeno griješi u reakciji zbog nedovoljne specifičnosti aktivnog sintetskog mjesta, te može aktivirati nepripadnu aminokiselinu i prenijeti je na 3'-kraj $tRNA^{Val}$. Aminokiseline koje se najčešće predstavljaju kao prijetnja točnoj reakciji

aminoaciliranja su proteinogeni (genetičkim kodom je zapisana u genomu) treonin te neproteinogeni (nema ga u genetičkom kodu) α-aminobutirat[72, 76]. Izoleucin, aminokiselina koja je za samo jednu metilensku skupinu veća od pripadnog valina se dobro diskriminira u sintetskom mjestu enzima, te ne dolazi do značajne aktivacije ove aminokiseline, a ni aminokiselina s većim bočnim ograncima.

Početkom ovog stoljeća određena je kristalna struktura ValRS iz bakterije *T. thermophilus*, u kompleksu s $tRNA^{Val}$ i Val-AMS (*N*-[L-valil]-*N*'-adenozildiaminosulfon, analog Val-AMP). Iz strukture je vidljivo da se valin veže na enzim u katalitičko sintetsko mjesto Rossmannove domene. Pri tome svojim α-amino- i karboksilnim skupinama stupa u interakciju s Pro^{42}, Asp^{81} i Asn^{44}, a alifatski bočni ogranak se smješta u hidrofobni džep sastavljen od aminokiselina Pro^{41}, Pro^{42}, Trp^{456}, Ile^{491} i Trp^{495}. Kao što je već prethodno spomenuto, izoleucin se zbog većeg bočnog ogranka ne može smjestiti u ovo aktivno mjesto, te ne dolazi do aktivacije. Kod svih analiziranih ValRS, aminokiseline koje stupaju u intrakciju s valinom su očuvane, osim Asn^{44}, koji nije očuvan kod arhealnih enzima[62]. Inače su čak i hidrofobni džepovi IleRS i ValRS iz bakterije *T. thermophilus* strukturno slični, međutim džep za vezanje Ile je veći i dublji, kako bi se izoleucinski veći bočni ogranak mogao neometano vezati[62]. Treonin, aminokiselina koja ima bočni ogranak sličan valinu, s razlikom u zamjeni jedne $–CH_3$ skupine hidroksilnom skupinom, može se vezati u aktivno mjesto, pa može doći do nastanka nepripadnog treonil-adenilata. Kod ValRS je pokazano da postoji popravak pogreške prije prijenosa u odsustvu $tRNA^7$, te da je glavni popravak pogreške hidroliza pogrešno aminoacilirane tRNA unutar domene CP1. Kod IleRS je domena CP1 strukturno građena tako da može primiti aminokiseline koje su manje od izoleucina (ili jednake), a kod ValRS ova domena ima drugu vrstu specifičnosti. Aminokiseline Arg^{216}, Thr^{219}, Lys^{270}, Thr^{272}, Asp^{276} i Asp^{279} stvaraju hidrofilni džep, u koji se primjerice treonin može dobro pozicionirati. Posebno je važno ostvarivanje vodikove veze između hidroksilne skupine bočnog ogranka s Lys^{270}, Thr^{272} i Asp^{279} [77]. Nemogućnost stvaranja te vodikove veze isključuje vezanje valina u ovo mjesto za popravak pogreške. Asp^{279} osim ostvarivanja vodikove veze s bočnim ogrankom ostvaruje i vodikovu vezu s α-amino skupinom treonina. Ova aminokiselina očuvana je i kod IleRS i LeuRS gdje također ostvaruje interakciju s α-amino skupinom. Opisani model je vrlo sličan mehanizmu dvostrukog sita IleRS, gdje je prvo grubo sito i kod jednog i drugog enzima aktivno mjesto koje ne može vezati veće aminokiseline zbog steričkih smetnji, dok je drugo, finije sito kod IleRS temeljeno na kinetičkom isključivanju, a kod ValRS na hidrofilnoj interakciji[62].

2.3.6. Leucil-tRNA-sintetaza

Leucil-tRNA-sintetaza (LeuRS) je zadnji enzim iz podrazreda Ia aminoacil-tRNA-sintetaza. LeuRS strukturom odgovara dvama ranije opisanim enzimima. Uz elemente prisutne u svim enzimima razreda Ia (sljedovi HIGH i KMSKS te Rossmannova katalitička domena), novitet za LeuRS su zasebna cink-vezujuća domena (ZN1), zatim su prisutni i domena za popravak pogreške nakon prijenosa u nešto drugačijoj orijentaciji, antikodon-vezujuća domena, leucin-specifična domena te C-terminalna domena (Slika 2.13).



Slika 2.13: Struktura LeuRS iz bakterije *E. coli* u kompleksu s tRNA. Lijeva slika prikazuju strukturu prilikom aminoaciliranja, kad je 3-kraj tRNA u aktivnom sintetskom mjestu. Desna slika prikazuje strukturu prilikom popravka pogreške nakon prijenosa, kad je 3'-kraj tRNA u domeni za popravak pogreške nakon prijenosa. Katalitička domena je prikazana žutom bojom, antikodon-vezujuća domena je crvena, leucin specifična domena je ružičasta, ZN1 domena je ljubičasta, domena za popravak pogreške nakon prijenosa (editing) je svjetolo plava, C-terminalna domena je narančasta. Preuzeto i prilagođeno iz [78].

LeuRS je aaRS čiji je pripadni supstrat aminokiselina leucin. Kao i ranije opisane aaRS, poznato je da i LeuRS aktivira nepripadne aminokiseline zbog nedovoljne specifičnosti aktivnog mjesta i prenosi ih na $tRNA^{Leu}$. Najčešće spominjane aminokiseline koje predstavljaju prijetnju točnom aminoaciliranju su proteinogeni izoleucin i neproteinogeni norvalin (Nva), a iz starijih istraživanja poznato je da LeuRS može aktivirati i metionin, kao i neproteinogene aminokiseline norleucin i homocistein[13-15]. Kao i ranije opisane aaRS i LeuRS koristi mehanizme popravka pogreške poput tRNA-neovisnog popravka pogreške prije prijenosa, i popravka pogreške nakon prijenosa koji je odgovoran za popravak većine pogrešaka i odvija se u domeni CP1 (editing domena).

2.3.6.1. *Leucil-tRNA-sintetaza iz bakterije* E. coli

Enzim iz bakterije *E. coli* je do danas vrlo dobro istražen enzim s kojim se bave brojne istraživačke grupe[15, 48, 79, 80]. Od nabrojenih aminokiselina koje mogu predstavljati prijetnju, najčešće se spominju izoleucin i norvalin[14, 48, 63, 81-83]. Brojna istraživanja su se bavila popravkom pogreške LeuRS iz bakterije *E. coli* u prisutnosti izoleucina, dajući raznolike rezultate, s faktorima diskriminacije u aktivaciji koji su varirali od 630 do 5400, čime se gubi potreba za mehanizmima popravka pogreške za ovaj enzim, jer 5400 nadilazi granicu dozvoljene pogreške u biosintezi proteina (uzima se da je granica 1:3000)[63, 83]. Istraživanjem iz 2014. potvrđeno je da je faktor diskriminacije izoleucina od strane LeuRS iz bakterije *E. coli* izuzetno visok (oko 30000), te da popravak pogreške za ovu aminokiselinu nije potreban jer se dovoljno dobro diskriminira u sintetskoj reakciji[14]. Ipak, popravak pogreške nakon prijenosa za uklanjanje izoleucina postoji kod LeuRS, a postojanje mehanizama popravka pogreške nakon prijenosa unatoč dobroj diskriminaciji ranije je primijećeno i kod ProRS i PheRS[84, 85]. Raznolikost literaturnih podataka te neslaganje novih podataka s postojećim objašnjeno je time što komercijalne preparacije izoleucina imaju malu količinu pripadnog leucina, što uvelike utječe na rezultate osjetljivih kinetičkih eksperimenata, pogotovo kada se baziraju na upotrebi radioaktivnog pirofosfata. U istom radu pokazano je da je najveća prijetnja LeuRS iz bakterije *E. coli* neproteinogena aminokiselina norvalin, te da je obzirom na faktor diskriminacije norvalina potreban popravak pogreške kako bi se spriječila ugradnja norvalina umjesto leucina u proteine.

Norvalin je neproteinogena aminokiselina koja se prirodno pojavljuje u živim organizmima, a u nekim uvjetima se u bakteriji *E. coli* može nakupiti i do milimolarnih koncentracija (detaljnije opisano u poglavlju 2.4). Glavni mehanizam kojim LeuRS korigira pogreške s norvalinom je popravak pogreške nakon prijenosa aminokiselina na $tRNA^{Leu}$, koji se odvija u domeni CP1. U ranijim strukturnim i kinetičkim istraživanjima je pokazano da je aminokiselina T^{252} koja se nalazi u domeni CP1 ključna za specifičnost domene, a njenom mutacijom u alanin gubi se specifičnost prema pripadnom leucinu vezanom na $tRNA^{Leu}$, odnosno T^{252} predstavlja faktor specifičnosti za diskriminaciju pripadne aminokiseline[86]. Međutim, također je istaknuto da je isti aminokiselinski bočni ogranak ključan za mehanizam deacilacije izoleucil-, odnosno norvalil-$tRNA^{Leu}$. Na temelju eksperimenata deacilacije Ile-$tRNA^{Leu}$ pretpostavljeno je kako se mutacijom T^{252} u R (veći bočni ogranak), blokira deacilacija svih nepripadnih aminoaciliranih tRNA. S navedenim mutantom prodložen je model tRNA-ovisnog popravka pogreške prije prijenosa u prisustvu norvalina, jer je mutant imao aktivan popravak iako se smatralo da ima

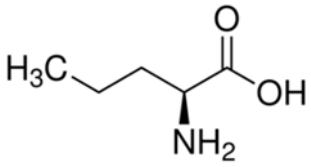
ugašen popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline. Međutim, novije istraživanje pokazalo je da je deacilacija norvalil-tRNA^{Leu} oslabljena, ali ne i u potpunosti ugašena mutacijom T252R[48]. Upotrebom mutanta koji je sasvim inaktivan u deacilaciji norvalil-tRNA^{Leu} (D345A LeuRS), pokazano je da LeuRS zapravo ne koristi tRNA-ovisan popravak pogreške prije prijenosa, te da je u prethodnim radovima preostala aktivnost nepotpuno ugašenog popravka pogreške nakon prijenosa aminokiseline pogrešno pripisana tRNA-ovisnom popravku pogreške prije prijenosa aminokiseline.

2.3.6.2. *Leucil-tRNA-sintetaza iz* H. sapiens

Aminoacil-tRNA-sintetaze iz eukariotskih stanica često tvore multienzimske komplekse s drugim aaRS i proteinima. LeuRS iz citoplazme stanica *H. sapiens* (hsLeuRS) dio je jednog multienzimskog kompleksa, prisutnog u stanicama različitih organizama koji se protežu kroz evolucijsko stablo od kukaca do ljudi[87]. Uz hsLeuRS u kompleksu su još i glutamilprolil-tRNA-sintetaza (bifunkcionalna sintetaza), izoleucil-, glutaminil-, metionil-, lizil-, arginil-, i aspartil-tRNA-sintetaza, kao i tri dodatna proteina molekulskih masa 18, 38, i 43 kDa. Enzim iz *H. sapiens* je nešto veći od enzima iz bakterije *E. coli*, s 1176 parova baza i molekulskom masom od 134,47 kDa, a s enzimom iz bakterije *E. coli* dijeli 10,8 % sličnosti na razini primarne strukture[88]. Kao i enzimi iz drugih vrsta citosolna humana LeuRS posjeduje posebnu domenu za popravak pogreške nakon prijenosa[89]. Rezultati ranijih kinetičkih istraživanja na hsLeuRS sugeriraju da enzim nepripadne aminokiseline norvalin i α-aminobutirat popravlja različitim mehanizmima popravka pogrešaka: α-aminobutirat se popravlja tRNA-ovisnim popravkom pogreške prije prijenosa, a norvalin popravkom pogreške nakon prijenosa. Unatoč tome, autori navode da je moguća pogrešna aminoacilacija i nakupljanje pogrešno aminoacilirane tRNA pri visokim koncentracijama navedenih aminokiselina[90]. Obzirom na probleme u metodološkom pristupu grupe koja je provodila navedena istraživanja (pogrešno pripisan tRNA-ovisan popravak prije prijenosa kod LeuRS iz bakterije *E. coli*[80]), potrebna je detaljnija kinetička karakterizacija uz rigorozne kontrole kako bi se ustvrdilo koristi li zaista hsLeuRS različite mehanizme popravka pogreške u ovisnosti o nepripadnom supstratu.

2.4. Norvalin

Norvalin je netipična aminokiselina s ravnolančanim alifatskim bočnim ogrankom (Slika 2.14).



Slika 2.14 Struktura norvalina.

Norvalin je također i neproteinogena aminokiselina, odnosno njena ugradnja u proteine nije određena genetskim kodom. Ipak, pokazano je da se u određenim uvjetima norvalin može ugraditi u stanične proteine te je pronađen kao sastavni dio peptida kod nekih bakterija poput *Bacillus subtilis*[91]. Predloženo je da se norvalin u stanicama najvjerojatnije sintetizira zbog slabe supstratne specifičnosti enzima koji sudjeluju u biosintezi aminokiselina s razgranatim bočnim ograncima, poput izoleucina, leucina i valina. Najvjerojatniji put nastanka norvalina u staničnim uvjetima je direktno preko piruvata iz kojeg nastaje α-ketobutirat te α-ketovalerat[16, 18, 92, 93]. Iz α-ketovalerata transaminacijom nastaje norvalin. Enzimi koji sudjeluju u biosintezi su α-izopropilmalat-sintaza, α-izopropilmalat-izomeraza i α-izopropilmalat-dehidrogenaza (odgovarajući geni koji kodiraju za navedene enzime su redom *leuA, leuB, leuC i leuD*) te transaminaciju rade enzimi koje kodira *ileE* ili *TyrB*[16, 18].

U radu iz 1997. Apostol[18] i drugi pokazali su da se u uvjetima nedostatka leucina u bakteriji *E. coli* norvalin ugrađuje u prekomjerno eksprimirani humani hemoglobin. Primijećeno ugrađivanje su objasnili time što u uvjetima duljeg rasta bakterija potroši leucin (također i uslijed prekomjerne ekspresije hemoglobina), te udio Nva/Leu postaje veći i dolazi do češće pogrešne aminoacilacije $tRNA^{Leu}$. Također, navode da su dva potencijalna rješenja za sprječavanje ugradnje norvaline prilikom prekomjerne ekspresije proteina u bakteriji *E. coli* ili dodavanje leucina ili sprječavanje nakupljanja piruvata, iz kojeg se norvalin sintetizira.

Nedavno su Soini i dr.[16] pokazali da se norvalin nakuplja u stanicama bakterije *E. coli* u prirodnim uvjetima, i to prilikom rasta sa smanjenom količinom kisika (mikroaerobni uvjeti) uz dodatak glukoze staničnom mediju. Objašnjenje za takvo opažanje je nakupljanje piruvata uslijed pojačane glikolize (zbog suviška glukoze), uz smanjenu potrošnju piruvata jer u mikroaerobnim uvjetima nije aktivan ciklus limunske kiseline. Autori su uzgajali soj bakterije *E. coli* na definiranom mediju, uz stalni dodatak glukoze, uz postupno smanjenje dotoka kisika kad su stanice dosegle visoku gustoću (OD_{600} oko 40). Očekivano, u ovim uvjetima primijećeno je nakupljanje piruvata, ali i nakupljanje nekih proteinogenih aminokiselina, povezanih s

povećanom koncentracijom piruvata, te je primijećeno i značajno povećanje koncentracije norvalina. Nakon nekoliko sati, koncentracija norvalina nakupila se do koncentracije oko $c = 1$ mmol dm^{-3}. Ovaj efekt nije primjećen u stanicama koje su uzgajane u aerobnim uvjetima. Pretpostavlja se da se norvalin može sintetizirati kod svih mikroorganizama koji imaju navedene enzime, te mogu preživjeti u mikroaerobnim uvjetima. Međutim, leucin, izoleucin i valin su u humanim stanicama esencijalne aminokiseline, tj. ne mogu se sintetizirati. Kako enzimi za biosintezu ovih aminokiselina nisu aktivni, može se zaključiti da se u humanim stanicama norvalin ne može sintetizirati, odnosno može se pretpostaviti da se u stanicama može naći jedino unosom u stanice, ako se eventualno nađe u okolini (bilo unos prehranom ili od mikroorganizama/bakterija koje ga mogu sintetizirati).

3. Materijal i metode

3.1. Materijali

3.1.1. Standardne kemikalije

Agar (*Sigma*), agaroza (*Sigma*), akrilamid (*Sigma*), amonijev acetat (CH_3COONH_4) (*Kemika*), amonijev klorid (NH_4Cl) (*Kemika*), amonijev peroksodisulfat (APS) (*Serva*), amonijev sulfat ($(NH_4)_2SO_4$) (*Kemika*), ampicilin (*Sigma*), 1,4-bis(2-(4-metil-5-fenil)oksazolil)benzen (POPOP) (*Calbiochem*), cinkov klorid ($ZnCl_2$) (*Sigma*), 2,5-difenil oksazol (PPO) (*Merck*), dimetilsulfoksid (DMSO) (*Sigma*), natrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4) (*Kemika*), ditiotreitol, (DTT) (*Sigma*), etanol (*Kemika*), etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) (*Sigma*), fenilmetilsulfonil-fluorid (PMSF) (*Sigma*), fenol (*Kemika*), glicerol (*Kemika*), glicin (*USB Corporation*), glukoza (*Kemika*), *N*-(2-hidroksietil)piperazin-*N*'-2-etansulfonska kiselina (Hepes) (*USB Corporation*), imidazol (*Sigma*), izopropil-β-tiogalaktozid (IPTG) (*Sigma*), izopropanol (*Kemika*), kalcijev klorid (*Kemika*), kalijev dihidrogenfosfat (*Kemika*), kalijev klorid (*Kemika*), kanamicin (*Sigma*), kloramfenikol (*Sigma*), kloridna kiselina (*Kemika*), kloroform (*Kemika*), kvaščev ekstrakt (*Difco*), magnezijev sulfat (*Kemika*), β-merkaptoetanol (*Serva*), *N*,*N*'-metilenbisakrilamid (*Merck*), natrijev acetat (*Kemika*), natrijev dodecilsulfat (SDS) (*Merck*), natrijev hidroksid (*Kemika*), natrijev klorid (*Kemika*), natrijev pirofosfat ($Na_4P_2O_7$) (*Sigma*), octena kiselina (*Kemika*), pepton (*Sigma*), polietilenglikol 8000 (PEG_{8000}) (*Sigma*), *N*,*N*,*N*',*N*'-tetrametiletilendiamin (TEMED) (*Serva*), trifluoroctena kiselina (TFA) (*Sigma*), trikloroctena kiselina (TCA) (*Kemika*), toluen (*Kemika*), tripton (*Sigma*), tris(hidroksimetil)-aminometan (Tris) (*Sigma*), ureja (*Kemika*).

3.1.2. Aminokiseline, nukleotidi i radioaktivno obilježeni spojevi

[α-^{32}P]ATP (*Perkin Elmer*), ATP (*Sigma*), dNTP (ekvimolarna smjesa dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (*Sigma*), izoleucin (*Sigma*), [^{14}C]-izoleucin (*Amersham Biosciences*), [^{14}C]-leucin (*Perkin Elmer*), [^{14}C]-valin (*Amersham Biosciences*), izoleucin (*Sigma*), leucin (*Sigma*), norvalin (*Sigma*), [^{32}P]PP_i (*Perkin Elme*r), treonin (*Sigma*), valin (*Sigma*).

3.1.3. Boje

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

3.1.4. Markeri veličine

1 kb DNA Ladder (*NEB*), Precision Plus Protein Standards, Unstained (*Bio-Rad*).

3.1.5. Enzimi, proteini i nukleinske kiseline

Albumin iz goveđeg seruma (eng. *bovine serum albumin*; BSA) (*NEB*), DNaza I (oslobođena od RNaza) (*NEB*), RNaza A (*Sigma*), lizozim (*USB*), Phusion DNA-polimeraza (*Fermentas*), komercijalni 5× GC pufer (*NEB*), piruvat-kinaza (*Sigma*), ribonukleaza A iz goveđe gušterače (*USB Corporation*), restrikcijske endonukleaze s pripadnim puferima (*NEB*), T4-DNA-ligaza i pripadni pufer (*Fermentas*), termostabilna anorganska pirofosfataza (TIPP) (*NEB*), ukupna tRNA iz bakterije *E. coli* (*Roche*).

3.1.6. Početnice

Početnice korištene u lančanoj reakciji polimeraze naručene su od komercijalnog proizvođača (*Sigma*). Slijedovi početnica navedeni su u poglavljima 3.2.1.4 i 3.2.1.8.

3.1.7. Komercijalni kompleti za pročišćavanje DNA

QIAprep Spin Miniprep Kit (*Qiagen*) za izolaciju plazmidne DNA, QIAquick Gel Extraction Kit (*Qiagen*) za izolaciju DNA iz agaroznih gelova.

3.1.8. Hranjive podloge i medij za uzgoj bakterije E. coli

Tekuća hranjiva podloga Luria-Bertani (LB): kvaščev ekstrakt (γ = 5 g L^{-1}), tripton (γ = 10 g L^{-1}), NaCl (γ = 10 g L^{-1}).
Tekuća hranjiva podloga 2×YT: kvaščev ekstrakt (γ = 10 g L^{-1}), tripton (γ = 16 g L^{-1}), NaCl (γ = 5 g L^{-1}).
LB ploče: kvaščev ekstrakt (γ = 5 g L^{-1}), tripton (γ = 10 g L^{-1}), NaCl (γ = 10 g L^{-1}), agar (γ = 15 g L^{-1}).

Hranjive podloge se steriliziraju autoklaviranjem i u njih se po potrebi dodaje antibiotik. Antibiotik kanamicin se dodaje do konačne koncentracije 0,030 mg mL^{-1}, a antibiotik ampicilin do 0,100 mg mL^{-1}.

M9 tekući hranjivi medij: Na_2HPO_4 (c = 50 mmol dm^{-3}), KH_2PO_4 (c = 25 mmol dm^{-3}), NaCl (c = 10 mmol dm^{-3}), NH_4Cl (c = 20 mmol dm^{-3}), $CaCl_2$ (c = 0,1 mmol dm^{-3}), $MgSO_4$ (c = 2 mmol dm^{-3}), glukoza (γ = 20 g dm^{-3}), tiamin (c = 1 mmol dm^{-3}), izoleucin (c = 100 μmol dm^{-3}), leucin (c = 100 μmol dm^{-3}), valin (c = 100 μmol dm^{-3}).

3.1.9. Sojevi i plazmidi bakterije E. coli

3.1.9.1. *Sojevi bakterije* E. coli

BL21 (DE3) (F^- *ompT hsd*S_B (r_B^- m_B^-) *gal dcm* (DE3); *Novagen*): soj za prekomjernu ekspresiju gena ukloniranih u ekspresijski vektor koji sadrži T7 promotor (pET serija vektora) Soj sadrži gen za T7 RNA-polimerazu integriran u bakterijski kromosom koji je pod kontrolom inducibilnog promotora *lac*UV5, koji se inducira dodatkom IPTG-a. Soj je deficijentan za proteaze *Lon* i *OmpT*.

Rosetta (DE3) (F^- *ompT hsd*S_B (r_B^- m_B^-) *gal dcm* (DE3) pRARE (Cam^R); *Novagen*): Soj koji je varijanta BL21 soja, optimiran za ekspresiju eukariotskih proteina, s kodonima koji se rijetko koriste u bakteriji *E. coli*.

DH5α ((*sup*E44 Δ*lac*U169 (Φ80 lacZ) ΔM15) *hsdR*17 *recA*1 *endA*1 *gyrA*96 *thi*1 *relA*1): soj koji se koristi za umnožavanje plazmidne DNA i za kloniranje. Zbog mutacije *recA*1 gena onemogućena je homologna rekombinacija i popravak molekule DNA što je pogodno za stabilnost transformirane DNA. Mutacijom *endA*1 gena koji kodira za endonukleazu I izbjegava se nespecifična razgradnja DNA. α-komplementacija s amino-krajem β-galaktozidaze iz pUC vektora moguća je zbog mutacije Φ80lacZ ΔM15.

MG1655 (F^- *lambda*$^-$ *ilvG*$^-$ *rfb-50 rph-1*): laboratorijski soj, najsličniji divljem tipu bakterije *E. coli*.

PS7068[1]: derivat MG1655 (*ΔilvGE*), laboratorijski soj, varijanta MG1655 soja koji je auksotrof za izoleucin, leucin i valin.

PS7066: (kasnije u tekstu soj 10SAla): derivat MG1655 (F^- *lambda*$^-$ *ilvG*$^-$ *rfb-50 rph-1*) laboratorijskog soja. U gen *ileS* unesene su mutacije u domenu za popravak pogreške nakon

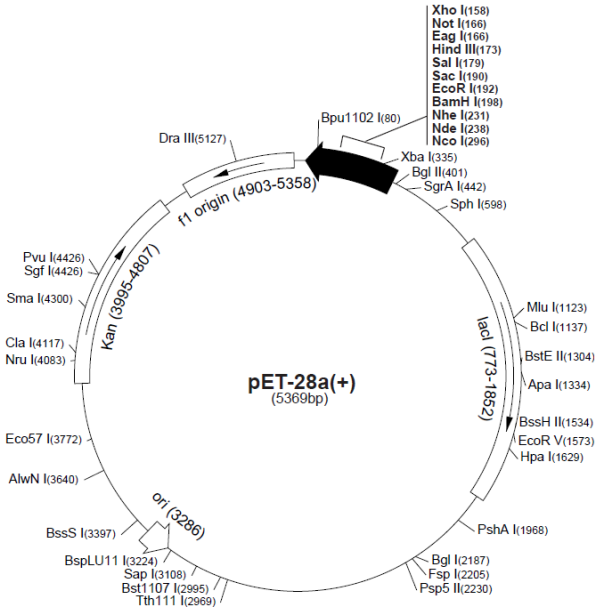
[1] Sojeve PS7068 i PS7066 ustupio je dr. Paul Schimmel

prijenosa. Aminokiseline 241 do 250 zamijenjene su alaninima, čime se gubi aktivnost popravka pogreške nakon prijenosa[94].

3.1.9.2. *Plazmidi za ekspresiju proteina u bakteriji* E. coli

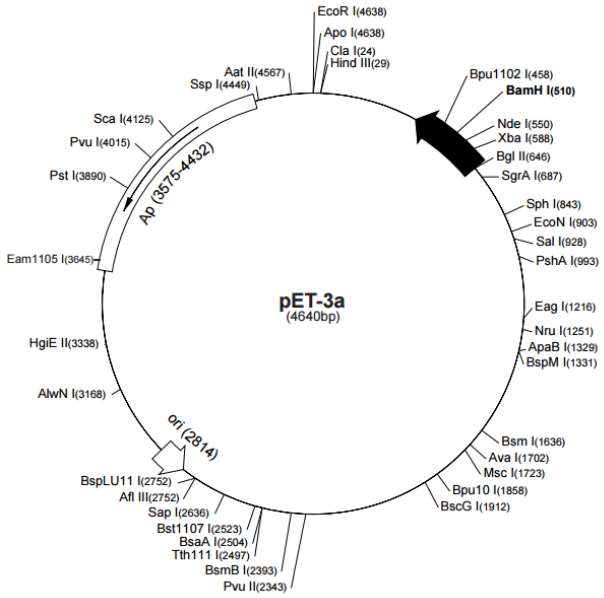
Korišteni su plazmidi pET sustava. Korišteni plazmidi su niskokopijski plazmidi koji su se koristili za ekspresiju proteina ili tRNA *in vivo*.

Korišten je plazmid za prekomjernu ekspresiju proteina pET28b (Slika 3.1). Plazmid za prekomjernu ekspresiju proteina je pod kontrolom inducibilnog T7 promotora. Eksprimirani proteini mogu imati heksahistidinski privjesak na N- ili C- kraju, što omogućuje pročišćavanje afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozi. Plazmid nosi gen za rezistenciju na antibiotik kanamicin.



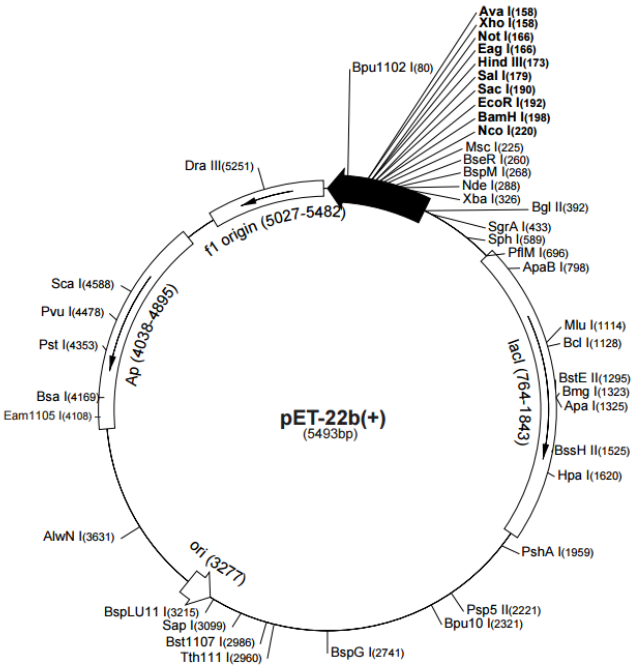
Slika 3.1. Plazmid pET28.

Za prekomjernu ekspresiju molekula tRNA korišten je plazmid ΔpET3a, derivat plazmida pET3a (Slika 3.2). Plazmid za prekomjernu ekspresiju je pod kontrolom inducibilnog T7 promotora. Korišten je za ekspresiju molekula $tRNA^{Ile}$ i $tRNA^{Val}$ iz bakterije *E. coli* i $tRNA^{Leu}$ iz *H. sapiens*. Plazmid nosi gen za rezistenciju na antibiotik ampicilin.



Slika 3.2: Plazmid pET3a.

Korišten je i plazmid pET22, za prekomjernu ekspresiju s ugrađenim genom za izoleucil-tRNA-sintetazu iz bakterije *E. coli*, kojeg je ustupila dr. sc. Morana Dulić (Slika 3.3). Plazmid nosi rezistenciju na antibiotik ampicilin.



Slika 3.3: Plazmid pET22.

3.1.10. Ostali materijal

DEAE-celuloza DE-52 (*Whatman*), Ni-NTA agaroza (*Qiagen*), streptavidin sefaroza High Performance (*GE Healthcare*), mikrotitarske pločice (*Kisker*), pločice za tankoslojnu kromatografiju (eng. *TLC plates*) od polietilenimin-celuloze (*Fluka*), kromatografska kolona Superdex Increase 200 10/300 GL (*GE Healthcare*), kromatografska kolona Jupiter C4 5 µm 300 Å 4,6 x 250 mm (*Phenomenex*), PD-10 kolona (*GE Healthcare*), zaslon s uskladištenim fosforom (*Amersham Biosciences*), filter papir (Whatman 3MM), filteri s promjerom pora 0,2 µm (*Whatman*), celulozna membrana za dijalizu (D9277, *Sigma*), centrikoni *Amicon® Ultra centrifugal filters* (*Milipore*).

3.2. Metode

3.2.1. Metode rada s nukleinskim kiselinama

Metode izolacije plazmidne DNA ili genomske DNA iz bakterije *E. coli*, lančana reakcija polimeraze, elektroforeza u gelu agaroze, razgradnja plazmidne DNA restrikcijskim endonukleazama, transformacija stanica bakterije *E. coli* elektroporacijom plazmidne DNA te izolacija tRNA iz bakterije *E. coli* temeljno su napravljene i prilagođene prema metodama iz priručnika J. Sambrook i D. Russell-a: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3. izdanje, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)[95] ili prema uputama proizvođača komercijalnih setova.

3.2.1.1. *Izolacija genomske DNA*

Genomska DNA je izolirana iz soja 10SAla bakterije *E. coli*. Izolacija je provedena ekstrakcijom sa smjesom fenola i kloroforma, prema sljedećem protokolu: 5 mL zasićene kulture bakterije *E. coli* uzgojene u tekućem mediju LB, istaloženo je centrifugiranjem pri 5000 g u trajanju od 15 min. Izolacija je provedena pri sobnoj temperaturi. Talog stanica resuspendiran je u 200 μL pufera sastava Tris-HCl (c = 100 mmol dm^{-3}, pH = 8,0) i EDTA (c = 10 mmol dm^{-3}). U suspenziju stanica dodano je 500 μL smjese fenola i kloroforma, i suspenzija je vorteksirana 4 min radi razbijanja stanica. Centrifugiranjem 6 min pri 10000 g odvojeni su slojevi. Vodeni sloj je zatim izdvojen i ekstrahiran jednakim volumenom smjese fenola i kloroforma, suspenzija je vorteksirana i centrifugirana 6 min pri 10000 g. Ponovno je izdvojena vodena faza i dodan je jednak volumen izopropanola, kako bi se istaložila genomska DNA. Smjesa je centrifugirana 20 minuta pri 10000 g. Dobiveni talog je ispran s 200 μL etanola (φ = 70 %) sobne temperature, i podvrgnut centrifugiranju u trajanju od 15 min pri 10000 g. Talog je posušen i otopljen u 200 μL pufera sastava Tris-HCl (c = 10 mmol dm^{-3}, pH = 8,0) i EDTA (c = 1 mmol dm^{-3}). S ciljem uklanjanja RNA, dodana je RNaza finalne koncentracije γ = 100 μg mL^{-1} te je otopina inkubirana 20 minuta pri sobnoj temperaturi. RNaza je zatim uklonjena ekstrakcijom sa smjesom fenola i kloroforma, a preostala genomska DNA je istaložena iz vodene faze izdvojene nakon centrifugiranja dodatkom otopine konačnog sastava PEG_{8000} 10 % (w/v), NaCl (c = 300 mmol dm^{-3}) i $MgCl_2$ (c = 10 mmol dm^{-3}). Talog genomske DNA dobiven centrifugiranjem 15 min pri 10000 g resuspendiran je u 200 μL etanola (φ = 70 %). Smjesa je centrifugirana 10 min pri 10000 g, nakon čega je dobiveni talog osušen u SpeedVac uređaju i otopljen u 50 μL pufera sastava Tris-HCl (c = 10 mmol dm^{-3}, pH = 8,0) i

EDTA (c = 1 mmol dm^{-3}). Uspješnost izolacije provjerena je u gelu agaroze (1 % agaroza, w/v). Kasnije je ova DNA korištena kao kalup za lančanu reakciju polimeraze.

3.2.1.2. *Izolacija plazmidne DNA*

Plazmidna DNA izolirana je iz bakterije *E. coli*, iz 5 mL kulture koja je rasla 16 h pri 37 °C u LB mediju s dodatkom odgovorajućeg antibiotika (plazmid nosi gen za rezistenciju na antibiotik). Kultura je istaložena centrifugiranjem 15 min pri 5000 g na 4 °C. Plazmidna DNA je izolirana komercijalno dostupnim kompletom QIAprep Spin Miniprep Kit (*Qiagen*) prema priloženim uputama. Komercijalni komplet se temelji na klasičnoj metodi alkalne lize. Iz staničnog lizata se uklanjaju genomska DNA i proteini, a plazmidna DNA se eluira s membrane priložene kolonice.

3.2.1.3. *Dizajn i konstrukcija rekombinantnih plazmida za ekspresiju proteina* in vivo

Gen za IleRS iz soja 10SAla bakterije *E. coli* (10SAla IleRS) umnožen je PCR-om s kalupa prehodno izolirane ukupne genomske DNA, s početnicama za restrikcijska mjesta NdeI i BamHI. Gen je ukloniran u ekspresijski vektor pET28b. Gen za hsLeuRS naručen je iz baze cDNA gena *Kazusa* (klon KIAA1352). Gen je umnožen PCR-om s početnicama koje imaju mjesta za restrikcijske enzime NdeI i HindIII, s kalupa – plazmidnog vektora u kojem je gen dostavljen pBluescript II SK (+). Gen za hsLeuRS je također ukloniran u ekspresijski plazmid pET28b.

3.2.1.4. *Dizajn i konstrukcija rekombinantnih plazmida za ekspresiju tRNA* in vivo

tRNA je izolirana iz bakterijske kulture bakterije *E. coli* transformirane plazmidom za ekspresiju ciljnog izoakceptora tRNA. Na ovaj način su izolirane ukupne tRNA obogaćene s $tRNA^{Ile}$ i $tRNA^{Val}$ iz bakterije *E. coli* i $tRNA^{Leu}$ iz *Homo sapiens*. Plazmide za ekspresiju $tRNA^{Ile}$ i $tRNA^{Val}$ ustupila je dr. sc. Nevena Cvetešić. Rekombinantni plazmid za ekspresiju humane $tRNA^{Leu}$ pripremljen je u okviru ovog rada. Gen za $tRNA^{Leu}$ pripremljen je komplementarnim sparivanjem naručenih sintetskih oligonukleotida. Napravljena su dva konstrukta, odnosno dva rekombinantna plazmida koja sadrže dva različita gena za $tRNA^{Leu}$ izoakceptore. Korišteni su sljedeći izoakceptori, odnosno oligonukleotidi:

$tRNA^{Leu}$ izoakceptor CAG:
5' GTCAGGATGGCCGAGCGGTCTAAGGCGCTGCGTTCAGGTCGCAGTCTCCCCTG GAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTCCTGACACCA 3'.

tRNA^{Leu} izoakceptor CAA:
5' GUCAGGAUGGCCGAGUGGUCUAAGGCGCCAGACUCAAGUUCUGGUCUCCGG
AUGGAGGCGUGGGUUCGAAUCCCACUUCUGACACCA 3'.

Odabrana dva konstrukta predstavljaju glavni (CAG) i sporedni (CAA) izoakceptor. Izabrani su kao pretpostavljeni najkvalitetniji sljedovi prema genomskim bazama podataka i dostupnim publikacijama. Izoakceptor CAA je napravljen prema sekvenci iz rada Breitschopf i Gross 1994.[96], koja je gotovo identična sekvenciranoj tRNA^{Leu} iz rada Sprinzl i sur. 1987[97]. (jedan nukleotid razlike u varijabilnoj regiji). Slijed koji kodira za izoakceptor CAG napravljen je prema genomskoj sekvenci iz baze podataka. Sintetski geni, s uzvodno nadodanim slijedom koji odgovara promotoru T7, uklonirani su u plazmid ΔpET3a. Navedeni sustav omogućava kontrolu ekspresije dodatkom IPTG-a.

3.2.1.5. *Izolacija i pročišćavanje ukupne stanične tRNA*

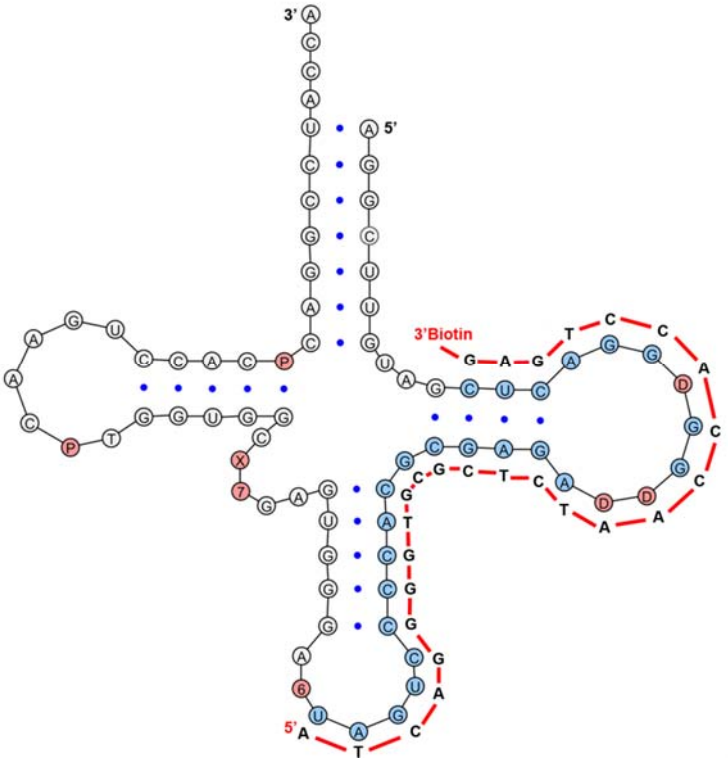
S ciljem ekspresije tRNA^{Leu} iz *H. sapiens* s rekombinantnih plazmida opisanih u prethodnom potpoglavlju, 5 mL prekonoćne zasićene kulture bakterije *E. coli* transformirane je s odgovarajućim plazmidom razrijeđeno u 500 mL LB tekućeg hranjivog medija s dodatkom ampicilina konačne koncentracije γ = 100 μg mL^{-1}. Kultura je uzgajana pri 37 °C uz potresanje od 200 rpm dok nije dosegla optičku gustoću OD_{600} iznosa 0,6. Nakon toga inducirana je transkripcija s rekombinantnog plazmida dodatkom IPTG-a konačne koncentracije c = 1 mmol dm^{-3}. Ekspresija gena koji kodira za tRNA se odvijala 16 sati pri temperaturi od 30 °C uz potresanje pri 200 rpm. Kultura je istaložena centrifugiranjem 15 min pri 5000 g, a talog stanica resuspendiran u 15 mL pufera za izolaciju tRNA sastava Tris-HCl (c = 10 mmol dm^{-3}, pH = 8,0) i magnezijev acetat (c = 10 mmol dm^{-3}). U suspenziju je dodan jednak volumen fenola zasićenog vodom, te je suspenzija žustro potresana vorteksiranjem. Vodeni i fenolni sloj su odijeljeni centrifugiranjem 15 min pri 5000 g , vodeni sloj je izdvojen, i ponovno ekstrahiran jednakim volumenom smjese fenola i kloroforma. Nakon centrifugiranja i izdvajanja vodenog sloja, stanična DNA je istaložena dodatkom PEG_{8000} konačnog udjela 8 % (w/v) i NaCl konačne koncentracije c = 0,5 mol dm^{-3}. Nakon 15 min pri sobnoj temperaturi, suspenzija je centrifugirana 15 min pri 5000 g. Nakon centrifugiranja u supernatantu ostaje tRNA, dok DNA završava u talogu. Ukupna stanična tRNA istaložena je dodatkom natrijevog acetata pH = 4,5 do finalne koncentracije c = 0,25 mol dm^{-3} i 2,5 volumena etanola, nakon inkubacije pri -20 °C u trajanju od 16 h. Suspenzija je zatim centrifugirana 2 h pri 5000 g, a dobiveni talog tRNA posušen je u SpeedVac uređaju i zatim otopljen u 500 μL sterilne redestilirane vode. Obzirom

da je ukupna stanična tRNA vjerojatno izolirana kao aminoacilirana, otopljena tRNA podvrgnuta je deacilaciji u lužnatim uvjetima, dodavanjem Tris-HCl pH = 8,5 (konačne koncentracije barem c = 0,125 mol dm^{-3}, dok otopina ne poprimi pH vrijednost 8,5) i inkubacijom 1,5 h pri 37 °C. Deacilacija je zaustavljena dodatkom octene kiseline u malim obrocima, dok pH nije spušten na 5. Deacilirana tRNA prevedena je prije skladištenja pri -20 °C u pufer kojeg čini Hepes pH = 7,5 (konačna koncentracija c = 5 mmol dm^{-3}) dijalizom, pri čemu su izmijenjena tri obroka pufera. Uspješnost izolacije tRNA je provjerena elektroforezom u poliakrilamidnom gelu s urejom. Koncentracija dobivene tRNA je određena spoktrofotometrijski na spektrofotometru NanoDrop 1000 mjerenjem apsorbancije pri 260 nm.

$tRNA^{Val}$ i $tRNA^{Ile}$ iz bakterije *E. coli* su eksprimirane *in vivo* s ekspresijskih vektora ΔpET3. Rekombinantne vektore je ustupila dr. sc. Nevena Cvetešić. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje napravljeni su jednako kao što je opisano pročišćavanje $tRNA^{Leu}$ iz *H. sapiens*. $tRNA^{Val}$ je nakon takvog standardnog pročišćavanja bila spremna za korištenje, dok je $tRNA^{Ile}$ dodatno pročišćena kromatografijom obrnutih faza radi izdvajanja hipomodificiranih varijanti $tRNA^{Ile}$ od potpuno modificirane i aktivne $tRNA^{Ile}$ [7, 98]. Za pročišćavanje je korištena kolona Jupiter C4 5 µm 300 Å 4,6 x 250 mm (*Phenomenex*). Kolona je najprije uravnotežena puferom A sastava amonijev acetat (c = 20 mmol dm^{-3}), magnezijev acetat (c = 10 mmol dm^{-3}), natrijev klorid (c = 400 mmol dm^{-3}). Naneseno je po 50-60 µl otopine tRNA koncentracije γ = 50 mg mL^{-1} (2-3 mg ukupne $tRNA^{Ile}$) po kromatografiji. Protok pufera podešen je na 1 mL min^{-1}. Elucija uzorka provodila se postupnim povećanjem udjela etanola u puferu, odnosno postupnim dodavanjem pufera B sastava amonijev acetat (c = 20 mmol dm^{-3}), magnezijev acetat (c = 10 mmol dm^{-3}), natrijev klorid (c = 400 mmol dm^{-3}), etanol (φ = 30 %).

3.2.1.6. *Izolacija nativne $tRNA^{Ile}$ iz bakterije* E. coli

$tRNA^{Ile}$ iz bakterije *E. coli* koja je korištena u dosadašnjim istraživanjima[7, 11], a i u ovom radu, imala je uvedenu mutaciju G^1:C^{72} jer je pokazano da se tRNA s G na prvom mjestu puno bolje transkribira zbog svojstva korištene T7 polimeraze da uspješnije započinje transkripciju sa supstrata koji započinju s G. Kako prvi nukleotid nije element identita, ova zamjena ne bi trebala utjecati na interakcije s aaRS[34]. Za usporedbu kinetičkih svojstava nativne $tRNA^{Ile}$ A^1:U^{72} s mutiranom prekomjerno eksprimiranom tRNA, nativna tRNA je izolirana iz komercijalne ukupne stanične tRNA (*Roche*) iz bakterije *E. coli* biotiniliranim oligonukleotidima komplementarnim dijelu $tRNA^{Ile}$. Naručena je oligonukleotidna DNA proba koja je kompelementarna antikodonskoj omči i D-ruci izoakceptora $tRNA^{Ile}_{GAU}$ iz bakterije *E. coli*, te je biotinilirana na 3' kraju (Slika 3.4).



Slika 3.4: Sekundarna struktura tRNA^{Ile} iz bakterije *E. coli*, izoakceptor GAU, s komplementarno spojenim slijedom biotiniliranog oligonukleotida. Sliku je ustupila dr. sc. Nevena Cvetešić.

tRNA je izolirana prema protokolu iz Yokogawa i sur.[99] Oligonukleotidna proba se veže za streptavidinsku smolu u kolonicama „Streptavidin Sepharose High Performance“ (GE Healthcare). Kolonice sa smolom su pripremljene tako da se u prazne kolonice Ultrafree-MC (*Milipore*) veličine pora 0,45 μm napune sa 600 μL sefaroze s vezanim streptavidinom. Kolonice se isperu tri puta s 300 μL pufera Tris pH = 7,5 (c = 10 mmol dm^{-3}). Na kolonice se zatim nanese 400 μL biotiniliranih oligonukleotida koncentracije c = 7,5 μmol dm^{-3}. Oligonukleotidi se inkubiraju 10 min u streptavidinskoj smoli na kolonici, a zatim se nevezani oligonukleotidi uklone centrifugiranjem. Ukupna tRNA je pomiješana sa streptavidinskom smolom u hibridizacijskom puferu (Tris pH = 7,5 (c = 10 mmol dm^{-3}), NaCl (c = 1,8 mol dm^{-3}) i EDTA (c = 0,2 mmol dm^{-3})) i smjesa je zagrijana 10 min pri 65 °C, te polako hlađena do sobne temperature. Time se omogućava specifično vezanje tRNA koja je komplementarna oligonukleotidnim probama vezanim na streptavidinsku smolu. Nakon toga, smola s vezanom tRNA se ispire puferom (Tris pH = 7,5, c = 10 mmol dm^{-3}) sve dok se ne ispere sva nevezana te nespecifično i slabo vezana tRNA. Prisutnost tRNA u puferu za ispiranje provjerava se spektrofotometrijski, a ispiranje je gotovo kada se više ne detektira prisutnost tRNA (što je obično bilo nakon 6 ciklusa ispiranja). Zatim se sa smole eluira željeni čvrsto vezani izoakceptor dodatkom pufera (Tris pH = 7,5, c = 10 mmol dm^{-3}), zagrijavanjem smole pri 65

°C kako bi se dokinule interakcije između tRNA i biotiniliranih oligonukleotida vezanih na streptavidinsku smolu te se centrifugiranjem izdvoje eluirane tRNA. Koncentracija eluirane tRNA provjerena je spektrofotometrijski, a čistoća je određena utvrđivanjem akceptorske aktivnosti za izoleucin (vidi poglavlje 3.2.3.4)

3.2.1.7. *Elektroforeza u denaturirajućem poliakrilamidnom gelu s urejom*

Za provjeru uspješnosti ekspresije tRNA i provjeru čistoće proizvedene tRNA napravljena je elektroforeza u poliakrilamidnom gelu s urejom. Gel je sljedećeg sastava: akrilamid:bisakrilamid 19:1, 8 % (w/v), ureja (c = 8 mol dm^{-3}), Tris (c = 90 mmol dm^{-3}), borna kiselina (c = 90 mmol dm^{-3}), EDTA (c = 2 mmol dm^{-3}, pH = 8,0), APS (γ = 0,7 μg mL^{-1}), TEMED 0,05 % (w/v). Uzorci su prije nanošenja denaturirani inkubacijom 5 min pri 80 °C uz prethodno dodavanje boje u omjeru 1:1 sastava ureja (c = 8 mol dm^{-3}), bromfenol plavo (γ = 2 mg mL^{-1}), ksilencijanolfluorofosfat (γ = 2 mg mL^{-1}), EDTA (c = 10 mmol dm^{-3}, pH = 8,0). Elektroforeza se provodila 1 h pri 120 V. tRNA je nakon elektroforeze vizualizirana potresanjem gela 10 min u otopini toluidinskog modrila (γ = 40 μg mL^{-1}), etanol (φ = 50 %), octena kiselina (φ = 0,1 %). Nespecifično vezana boja uklonjena je kuhanjem gela u kipućoj vodi.

3.2.1.8. *Lančana reakcija polimeraze*

Lančana reakcija polimeraze (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) je metoda pomoću koje se može specifično umnožiti točno određeni segment DNA *in vitro*. Metoda se rutinski koristi u laboratorijima za amplifikaciju gena od interesa iz genomske ili plazmidne DNA. Reakcija se temelji na izmjeni triju ciklusa: denaturacija kalupa kad se dvolančana DNA razdvoji pri visokoj temperaturi (oko 95-98 °C), sparivanje početnica na komplementarne sljedove na DNA kalupu (temperatura obično oko 45-70 °C), te produljenje lanca DNA katalizirano termostabilnom DNA-polimerazom (temperatura obično oko 70 °C). U svakom ciklusu se broj kopija gena povećava, te na kraju n ciklusa u smjesi postoji 2^n kopija gena od interesa. U ovom radu PCR je korišten da bi se gen koji kodira za mutirani protein IleRS klonirao iz soja 10SAla bakterije *E. coli* u ekspresijski vektor pET28b, te kako bi se hsLeuRS preklonirao u pET28b. Kao kalup za IleRS je korištena genomska DNA izolirana iz soja 10SAla bakterije *E. coli* kako je ranije opisano, a kalup za hsLeuRS je bio komercijalni plazmid u s genom za hsLeuRS. Korištene su početnice kojima su uvedena mjesta za cijepanje restrikcijskim enzimima NdeI i BamHI, odnosno NdeI i HindIII (Tablica 3.1). Isti enzimi kasnije su korišteni za cijepanje

produkta PCR reakcije i plazmidnog vektora, te su time omogućili nastajanje stršećih krajeva preko koji je PCR produkt ligiran u vektor. Korištena je Phusion-polimeraza visoke točnosti, kako bi se spriječilo eventualno unošenje mutacije u kodirajući gen. Korišteni su uvjeti preporučeni od proizvođača Phusion-polimeraze (inicijalna denaturacija 3 min na 98 °C; 30 puta: denaturacija na 98 °C 10 sekundi, vezanje početnica na kalup 30 sekundi na 56 °C, 90 sekundi ekstenzija na 72 °C; te na kraju finalna ekstenzija 10 minuta na 72 °C). Uspješnost PCR amplifikacije provjerena je elektroforezom u gelu agaroze (opisano u poglavlju 3.2.1.9). Dobiveni PCR produkti su pročišćeni korištenjem komercijalnog seta QIAquick Gel Extraction Kit (*Qiagen*) za izolaciju DNA iz agaroznih gelova, prema priloženim uputama proizvođača.

Tablica 3.1: Sljedovi početnica korištenih za kloniranje hsLeuRS (LRS HS F i LRS HS R) i 10SAla IleRS (EcIRS pET28 F i EcIRS pET28 R) u vektor pET28b. Podcrtani su dijelovi koji su mjesta prepoznavanja restrikcijskih enzima (navedeni u zagradama).

Naziv početnice	Nukleotidni slijed (5' → 3')
LRS HS F	GAGAGAGCATATGGCGGAAAGAAA (NdeI)
LRS HS R	GAGAGAGGGATCCCTACTATTAATGAACCAGATAGAT (BamHI)
EcIRS pET28 F	GAGAGAGCATATGAGTGACTATAAATCAACC (NdeI)
EcIRS pET28 R	GAGAGAGAAGCTTTCAGGCAAACTTACGTTTTT (HindIII)

3.2.1.9. *Elektroforeza u gelu agaroze*

Elektroforeza u gelu agaroze je metoda odjeljivanja nukleinskih kiselina s obzirom na njihovu pokretljivost u električnom polju. Negativno nabijene nukleinske kiseline se u električnom polju gibaju u smjeru pozitivne elektrode anode. Molekule se kroz gel agaroze gibaju različitim brzinama obzirom na svoju veličinu i stupanj superzavijenosti, pa se tako brže gibaju manje molekule i molekule superzavijene strukture. Korišteni su 1 % (w/v) agarozni gelovi, pripremljeni otapanjem 3 g agaroze u 300 mL pufera TAE sastava Tris (c = 40 mmol dm^{-3}), octena kiselina (c = 20 mmol dm^{-3}), EDTA (c = 1 mmol dm^{-3}, pH = 8,0) s dodanim etidijevim bromidom do koncentracije 50 μg L^{-1}. Uzorak je nanesen na gel u smjesi s bojom za nanošenje uzorka (finalno 2,5 % (w/v) bromfenolno plavilo, 0,01 mol dm^{-3} EDTA (pH = 8,0), (φ = 3 %) glicerol) koja omogućuje vizualizaciju tijeka elektroforeze, i olakšava nanošenje samog uzorka u horizontalno položeni gel. Elektroforeza je provedena u aparaturi za horizontalnu elektroforezu (*EPS 600, Pharmacia Biotech*) u TAE puferu pri naponu od 120 V, pri sobnoj temperaturi. Uzorci su vizualizirani etidijevim bromidom koji je prisutan u gelu i puferu za elektroforezu, a koji se interkalira između baza u molekuli DNA pri čemu mu se povećava intenzitet fluorescencije pod UV svjetlom (sam etidijev bromid apsorbira UV zračenje pri λ =

302 i 366 nm, a UV zračenje pri λ = 254 nm apsorbira DNA i može prenijeti etidijevom bromidu)[95]. Etidijev bromid absorbirano zračenje emitira kao svjetlost valne duljine 590 nm. Gelovi su analizirani i snimljeni pod UV svjetlom (λ = 302 nm, odgovara valnoj duljini za direktnu pobudu editijevog bromida) transiluminatora (*DNR, Bio-Imaging Systems Ltd*.) povezanog s računalom. Uz uzorke na gel je uvijek nanesen i komercijalno dostupni marker veličine „1 kb DNA Ladder" (*NEB*) radi procjene veličine razdvojenih fragmenata.

3.2.1.10. *Razgradnja restrikcijskim endonukleazama i ligacija*

Restrikcijske endonukleaze su dio restrikcijsko-modifikacijskog sustava prokariota, čija je zadaća razgradnja stranih DNA u stanicama domaćina. U laboratorijskim istraživanjima koriste se restrikcijske endonukleaze tipa II, a služe za razgradnju specifičnih sljedova DNA. Restrikcijske endonukleaze prepoznaju specifične sljedove nukleotida, od 4 do 8 nukleotida, a standardno nakon cijepanja ostavljaju ili tupe krajeve, ili 3'- ili 5'- stršeće ljepljive krajeve[100]. U ovom radu restrikcijska razgradnja korištena je da bi se specifično pocijepali krajevi PCR produkata i vektor te omogućilo njihovo sparivanje i konačna ligacija s ciljem stvaranja rekombinantnog vektora. Korišteni su restrikcijski enzimi SalI i BamHI u reakciji s vektorom ΔpET3 (za cijepanje komplementarno sparenih tRNA oligonukleotida i cijepanje samog vektora) za ugradnju gena koji kodiraju tRNA te BamHi i NdeI (hsLeuRS), ili NdeI i HindIII (10SAla IleRS) za ugradnje u vektor pET28 (za cijepanje PCR produkata i vektora). Reakcijska smjesa za razgradnju PCR produkta odnosno vektora ΔpET3a (ili pET28b) je sadržavala oko 1,5 μg DNA, komercijalni pufer NEB 3.1 i po 20 U oba restrikcijska enzima. Reakcija razgradnje odvijala se 3 sata na 37 °C. Smjesa razgrađenog vektora je nanesena na agarozni gel, iz kojeg je linearni produkt odgovarajuće veličine izrezan i pročišćen komercijalnim kompletom QIAquick Gel Extraction Kit (*Qiagen*) za izolaciju DNA iz agaroznih gelova. Istim kompletom je pročišćena razgrađena smjesa PCR produkta (bez potrebe za agaroznom elektroforezom).

Pocijepani PCR produkti i vektor su ligirani u molarnom omjeru 3:1 (PCR produkt:vektor). Reakcijska smjesa koja je sadržavala pufer za T4 ligazu, 20 U T4 ligaze (*Fermentas*), vektor i PCR produkt inkubirana je 1,5 sat pri 22 °C. Ligaza je zatim inaktivirana inkubacijom 20 min na 65 °C. Napravljena je i kontrolna reakcija u kojoj je ligiran sam vektor bez dodatka inserta. Bakterije *E. coli* soja DH5α su elektroporacijom transformirane s po 4 μL ligacijskih smjesa.

3.2.1.11. *Transformacija bakterijskih stanica*

Bakterijske stanice su u ovom radu transformirane elektroporacijom. U ovom procesu se djelovanjem jakog električnog polja kratkotrajno povećava propusnost stanične stijenke za DNA. Korišten je uređaj Gene Pulser (*Bio-Rad*), a parametri su postavljeni na napon 2500 V i kapacitet 25 μF, te uređaj za nadzor pulsa (*Pulse Controller, Unit Bio-Rad*) s otporom 200 Ω. Kivete za elektroporaciju, nosač kiveta i reakcijske smjese su prethodno ohlađene, jer je u tim uvjetima elektroporacija, odnosno preživljenje stanica učinkovitije. Stanicama koje su priređene za elektroporaciju (tzv. „elektrokompetentne" stanice) dodano je 1 do 50 ng DNA te je primijenjen električni impuls uslijed kojeg je došlo do ulaska DNA u stanice. Impuls je bio 2,5 kV cm^{-1}, a vrijeme pražnjenja kondenzatora bilo je 4-4,5 ms. Brzim dodatkom tekućeg LB medija smjesi stanica neposredno nakon elektroporacije i inkubacijom pri 37 ° C u trajanju od 1 h, stanice su oporavljene prije nasađivanja na hranidbeni medij. Zatim je 20 i 200 μL suspenzije transformiranih stanica nasađeno na krute LB podloge s dodatkom antibiotika ampicilina, gen za čiju rezistenciju nosi plazmid ΔpET3a, odnosno kanamicina u slučaju transformacije rekombinatnom varijantom vektora pET28b. Ploče su rasle 16 sati pri 37 °C. Na pločama bi trebale narasti samo bakterije s ugrađenim insertom, a ako je vektor dobro pripremljen ne bi trebalo biti vidljivih kolonija na kontrolnim pločama na koje je nasađena suspenzija bakterija transformiranih vektorom bez inserta.

3.2.1.12. *Određivanje koncentracije nukleinskih kiselina*

Koncentracija nukleinskih kiselina određivana je korištenjem spektrofotometra NanoDrop 1000, mjerenjem absorbancije pri valnoj duljini od 260 nm. Definirano je kada je na putu svjetlosti duljine 1 cm absorbancija 1, koncentracija dvolančane DNA je γ = 50 ng μL^{-1}, a koncentracija RNA γ = 40 ng μL^{-1} [95].

3.2.1.13. *Uspješnost ugradnje inserta u vektor*

Uspješnost ugradnje inserta u vektor potvrđena je izolacijom plazmida iz kolonija koje su narasle na podlogama s odgovarajućim antibiotikom, te restrikcijskom analizom i analizom nukleotidnih sljedova sekvenciranjem. Restrikcijska analiza je provedena u smjesama sljedećeg sastava: 10 U restrikcijskog enzima, odgovarajući NEB pufer i 500 ng plazmidne DNA. Korišteni su enzimi s kojima su inserti ugrađeni u rekombinantne plazmide, te se očekivala izgradnja inserata nakon provedene restrikcijske analize. Smjese su inkubirane 3 sata na 37 °C,

te su analizirane elektroforezom u gelu agaroze. Konačna potvrda ugradnje sljedova u vektor je dobivena sekvenciranjem. Za sekvenciranje su korištene početnice koje komplementarno odgovaraju dijelu vektora malo prije mjesta ugradnje inserta (50-100 nukleotida uzvodno ugrađenom genu). Za provjeru ugradnje gena za tRNA u ΔpET3a korištena je komercijalna početnica koja odgovara T7 promotoru, a za provjeru gena za 10SAla IleRS korištena je reverzna početnica za mutagenezu D342A, kojom je provjerena mutacija na mjestu od 241 do 250. Sekvenciranje je provedeno u kompaniji *Macrogen*.

3.2.2. Metode rada s proteinima

3.2.2.1. *Prekomjerna ekspresija proteina*

Proteini korišteni u ovom radu prekomjerno su eksprimirani u bakteriji *E. coli*. Pripremljeni su proteini IleRS iz bakterije *E. coli*, i to divlji tip, mutant D342A, dvostruki mutant D342A/T243R i mutant s 10 alanina uvedenih u aminokiselinski slijed na pozicijama od 241 do 250, zatim ValRS iz bakterije *E. coli*, i to divlji tip i mutant D286A, te divlji tip hsLeuRS (enzim iz *H. sapiens*). Rekombinantne plazmide s genima za IleRS (osim ileRS 10SAla koji je pripremljen u sklopu ovog rada) ustupila je dr. sc. Morana Dulić, dok je rekombinantne plazmide za ValRS ustupila dr. sc. Nevena Cvetešić. Rekombinantni plazmid za ekspresiju hsLeuRS je također pripremljen u sklopu ove disertacije.

Za ekspresiju svih proteina korišten je T7 ekspresijski sustav. Proteini su uklonirani u ekspresijske vektore sustava pET iza T7 promotora. T7 polimeraza je RNA-polimeraza bakteriofaga koja se ne pojavljuje u bakteriji *E. coli*, već je u genom laboratorijskog soja ugrađen gen koji kodira za T7 polimerazu (npr. sojevi korišteni u sklopu ovog rada oznake BL21(DE) i Rosetta). Gen koji kodira za T7 polimerazu u genomu sojeva BL21 soja i Rosetta je pod kontrolom *lacUV5* promotora. Dodatak IPTG-a aktivira ekspresiju T7 polimeraze, koja se veže na T7 promotor i dolazi do transkripcije, a zatim i translacije gena koji se nalaze pod kontrolom T7 promotora. U ovom radu korišteni su plazmidi pET28b (za ValRS, hsLeuRS i 10SAla IleRS) i varijanta plazmida pET22 (za IleRS divlji tip, jednostruki i dvostruki mutant). Plazmidi pET sustava imaju T7 promotor ispred gena koji se ugrađuje na plazmid i s kojeg se odvija ekspresija[101]. T7 promotor ispred gena ugrađenog u plazmid također je reguliran dodatkom IPTG-a, pa dodatkom tog induktora dolazi do disocijacije represora i omogućava se prekomjerna ekspresija proteina kodiranog genom koji je nizvodno od T7 promotora.

Plazmidi s ugrađenim genom za protein od interesa elektroporacijom su transformirani u bakterije *E. coli* (sojeve BL21 i Rosetta). Pojedinačna bakterijska kolonija transformirana ciljnim rekombinantnim plazmidom nasađena je u LB medij (u slučaju proteina hsLeuRS u 2×YT medij) s odgovarajućim antibiotikom (kanamicin za pET28 i ampicilin za pET22), i inkubirane su preko noći pri 37 °C uz potresanje. Ujutro je 5 mL kulture razrijeđeno u 500 mL LB medija s odgovarajućim antibiotikom (u slučaju hsLeuRS u 2×YT mediju). Rast bakterijske kulture je praćen spektrofotometrijski, i kada je OD_{600} dosegao 0,6 ekspresija proteina inducirana je dodatkom IPTG finalne koncentracije c = 250 μmol dm^{-3}. Za prekomjernu ekspresiju IleRS i ValRS, kultura je ostavljena 3 sata pri 37 °C uz potresanje. Ekspresija hsLeuRS-a odvijala se 6 h pri 20 °C. Nakon ekspresije, kulture su istaložene centrifugiranjem

15 min pri 5000 g. Talozi stanica su pospremljeni na -20 °C do korištenja za pročišćavanja proteina.

3.2.2.2. *Pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozi*

U ovoj disertaciji se kao primarna metoda pročišćavanja proteina koristila afinitetna kromatografija na Ni-NTA agarozi. Afinitetna kromatografija na Ni-NTA agarozi se temelji na specifičnim interakcijama između iona nikla i histidinskih bočnih ogranaka heksahistidinskog privjeska koji se nalazi na ciljnim proteinima na N- ili C-kraju. Svi proteini korišteni u ovoj disertaciji imali su heksahistidinski privjesak na N-kraju. Ioni nikla su u kromatografskoj matrici vezani na nitrilotrioctenu kiselinu (NTA) koja je tetradentatni kelirajući adsorbens koji okupira četiri od šest koordinacijskih mjesta niklovog iona (Ni^{2+}). Sama NTA je vezana na Sepharose® CL-6B (agarozu) (*Qiagen*). Druga dva koordinacijska mjesta popunjavaju se atomima dušika iz imidazolnog prstena bočnog ogranka histidina ciljnih proteina. Postupak pročišćavanja proteina afinitetnom kromatografijom izvodio se na 4 °C. Stanični talog resuspendiran je u 5 mL pufera A (Hepes pH = 7,0, c = 20 mmol dm^{-3}, NaCl c = 500 mmol dm^{-3}, $MgCl_2$ c = 5 mmol dm^{-3}, β-merkaptoetanol c = 10 mmol dm^{-3}, imidazol c = 10 mmol dm^{-3}). Suspenziji je dodan PMSF (c = 1 mmol dm^{-3}), inhibitor serinskih proteaza, DNaza (γ = 3 ng μL^{-1}) i lizozim (γ = 50 ng μL^{-1}), radi boljeg razaranja stanica. Suspenzija stanica razbijena je soniciranjem u sonikatoru *High Intensity Ultrasonic Processor*, *Bioblock Scientific*, 6 puta po 1 minutu, uz pauze od 1 minute između svakog soniciranja. Suspenzija nakon soniciranja centrifugirana je 1 h pri 10000 g na 4 °C. Supernatant u kojem su se nalazili otopljeni proteini odvojen je od taloga i profiltriran kroz filter veličine pora 0,22 μm (*Whatman*). Dobiveni filtrat se nanosio na kolonu. Kolona za afinitetnu kromatografiju koja koristi gravitacijski protok pripremljena je prije svakog korištenja punjenjem s 1 mL Ni-NTA agaroze. Agaroza koja je nanesena na kolonu zatim je isprana s 10 mL sterilne redestilirane vode i uravnotežena s 10 mL pufera A. Uzorak je kroz stupac agaroze propušten 3 puta, da se omogući vezanje svih proteina s heksahistidinskim privjeskom. Nevezani proteini su s agaroze isprani s 30 mL pufera A, a zatim i 10 mL pufera B koji sadrži nešto veću koncentraciju imidazola (Hepes pH = 7,0, c = 20 mmol dm^{-3}, NaCl c = 500 mmol dm^{-3}, $MgCl_2$ c = 5 mmol dm^{-3}, β-merkaptoetanol c = 10 mmol dm^{-3}, imidazol c = 30 mmol dm^{-3}). Za eluciju proteina specifično vezanih na stupac Ni-NTA koristila se visoka koncentracija imidazola jer se imidazol može koordinirati na ion nikla i kompetira s vezanim histidinskim bočnim ograncima. Koncentracija imidazola u puferu B je nešto viša, pa ovo ispiranje služi da bi se isprali proteini koji su vlastitim histidinskim bočnim

ograncima (koji nisu dio privjeska) koordinarni na ione nikla. Proteini od interesa s kolone su eluirani sa 6 mL pufera C (Hepes pH = 7,0, c = 20 mmol dm^{-3}, NaCl c = 500 mmol dm^{-3}, $MgCl_2$ c = 5 mmol dm^{-3}, β-merkaptoetanol c = 10 mmol dm^{-3}, imidazol c = 200 mmol dm^{-3}). Kromatografska smola je prije skladištenja isprana s 2 mL imidazola (c = 2 mol dm^{-3}), 30 mL redestilirane vode, i 10 mL etanola (φ = 20 %). Analiza kromatografskog pročišćavanja provedena je pomoću elektroforeze u SDS-poliakrilamidnom gelu. Čiste frakcije proteina su prije skladištenja pri -80 °C spojene, koncentrirane ultrafiltracijom te prevedene u pufer za skladištenje (opisano u poglavljima 3.2.2.6 i 3.2.2.7).

3.2.2.3. *Gel-filtracijska kromatografija*

Proteini 10SAla IleRS iz bakterije *E. coli* i hsLeuRS dodatno su nakon afinitetne-kromatografije pročišćeni gel-filtracijskom kromatografijom. Zamijećeno je da se navedeni proteini supročišćavaju s tRNA, a preparacija hsLeuRS sadržavala je i druge proteine koji nisu uklonjeni pročišćavanjem afinitetnom kromatografijom na stupcu Ni-NTA. Gel-filtracijska kromatografija provodila se na koloni Superdex Increase 200 10/300 GL (*GE Healthcare*) na sustavu za tekućinsku kromatografiju visoke učinkovitosti Äkta Purifier 10 (*GE Healthcare*). Uzorci su prije nanošenja na kolonu centrifugirani 10 min pri 10000 g, da se moguće krute nečistoće prisutne u uzorku ne nanesu na kolonu. Kromatografija 10SAla IleRS se provodila u puferu sastava: NaCl (c = 0,5 mol dm^{-3}), Hepes (pH = 7,5, c = 50 mmol dm^{-3}), β-merkaptoetanol (c = 5 mmol dm^{-3}), glicerol (φ = 5 %). Kromatografija je provedena pri temperaturi od 4 °C, pri protoku 0,5 mL min^{-1}, a skupljane su frakcije volumena od 0,5 mL. Kromatografija je praćena spektrofotometrijski pri valnoj duljini 260 i 280 nm. Kako je cilj ove gel-filtracijske kromatografije bio odvojiti protein od tRNA, čistoća proteina nakon kromatografije je provjerena i elektroforezom u gelu agaroze (opisano u poglavlju 3.2.2.7), nakon grijanja odnosno denaturacije proteinskog uzorka 5 min pri 95 °C.

Gel-filtracijski pufer za protein hsLeuRS bio je sastava NaCl (c = 2 mol dm^{-3}), Na-fosfat (c = 10 mmol dm^{-3}), β-merkaptoetanol (c = 10 mmol dm^{-3}), glicerol (φ = 10 %). Kromatografija je provedena jednako kao za IleRS 10SAla, a čistoća uzorka nakon kromatografije provjerena je agaroznom elektroforezom i elektroforezom u SDS-poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE).

3.2.2.4. *Pročišćavanje enzima od aminoacil-adenilata*

Zamijećeno je da se neke aminoacil-tRNA-sintetaze supročišćavaju s pripadnim aminoacil-adenilatom u sintetskom aktivnom mjestu[48]. Isti problem zamijećen je i kod ValRS (divljeg tipa

i mutanta D286A). Kako takav enzim nije prikladan za kinetička istraživanja u prisustvu nepripadnih aminokiselina, a posebno u reakcijama jednog obrtaja gdje se koristi veća količina enzima u odnosu na količinu tRNA, potrebno je ukloniti aa-AMP. S čitavom preparacijom enzima napravljena je reakcija aminoaciliranja (odnosno korak prijenosa jer je valil-AMP već prisutan u sintetskom mjestu) kako bi sav valil-AMP bio preveden u Val-tRNA^{Val} koju je jednostavnije ukloniti iz preparacije enzima. S ciljem uklanjanja aminoacilirane tRNA, u reakciju se doda veća količina ureje i NaCl kojima se naruši interakcija između proteina i aminoacilirane tRNA, te se afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozi ponovno pročisti protein. U reakcijskoj smjesi za aminoaciliranje nalaze se u ekvimolarnim omjerima enzim (s vezanim aa-AMP) i tRNA^{Val}, Hepes (pH 7,5 c = 100 mmol dm^{-3}), $MgCl_2$ (c = 20 mmol dm^{-3}), DTT (c = 10 mmol dm^{-3}). Reakcija je inkubirana 17 minuta pri 37 °C, pri čemu je došlo do prijenosa aminokiseline s aminoacil-adenilata na tRNA (svi reaktanti osim aa-AMP su bili u suvišku). Nakon inkubacije, dodan je pufer s urejom (c = 4 mol dm^{-3}), NaCl (c = 4 mol dm^{-3}) i Hepes (c = 100 mmol dm^{-3}) (u omjeru 1:1), pa je finalno u reakcijskoj smjesi bilo Hepes (c = 100 mmol dm^{-3}, pH = 7,5), $MgCl_2$ (c 10 mmol dm^{-3}), DTT (c = 5 mmol dm^{-3}), ureja (c = 2 mol dm^{-3}) i NaCl (c = 2 mol dm^{-3}). Smjesa je inkubirana 1 h na ledu, a nakon toga je nanesena na kolonu za afinitetnu kromatografiju, te je kromatografija provedena kako je ranije opisano uz nekoliko modifikacija. Naime, nije korišteno ispiranje puferom B, obzirom da je protein već pročišćen od ostalih proteina, već je agaroza isprana samo s puferom A, nakon čega je ciljni protein eluiran.

3.2.2.5. *Elektroforeza u gelu poliakrilamida u prisustvu natrijevog dodecilsulfata*

Elektroforeza u gelu poliakrilamida u prisutnosti natrijevog dodecilsulfata (SDS-PAGE) je diskontinuirana denaturirajuća elektroforetska tehnika kojom se analiziraju proteinski uzorci. SDS-PAGE je tip elektroforeze u kojoj se negativno nabijeni SDS ravnomjerno veže na proteine, pa je tako omjer mase i naboja svih proteina podjednak. Zbog toga, različita pokretljivost svih proteina ovisi isključivo o razlikama u masi, dok naboj natvnih proteina ne bi trebao imati utjecaja na njihovu pokretljivost u gelu poliakrilamida. Diskontinuirani gelovi se sastoje od dva dijela odnosno, gornjeg i donjeg gela. Donji gel, gel za razdvajanje, sastoji se od 9 % (w/v) akrilamid-bisakrilamid (29:1), Tris-HCl (c = 0,375 mol dm^{-3}, pH = 8,8), SDS 0,1 % (w/v), APS (γ = 0,7 μg mL^{-1}), TEMED 0,05 % (w/v), a gornji gel, gel za sabijanje sastoji se od 4 % (w/v) akrilamid-bisakrilamid (29:1), Tris-HCl (c = 0,125 mol dm^{-3}, pH = 6,8), SDS 0,1 % (w/v), APS (γ = 0,7 μg mL^{-1}), TEMED 0,05 % (w/v). Prvo se izlije donji gel, na površinu

mu se doda voda, radi sprječavanja interakcije s atmosferskim kisikom i poravnavanja površine gela, a nakon polimerizacije donjeg gela, voda se odlijeva i dodaje se gornji gel.

Uzorci su prije nanošenja na gel pripremljeni tako da im se dodao pufer za nanošenje uzorka u sastavu Tris-HCl (c = 62,5 mmol dm^{-3}, pH = 6,8), β-merkaptoetanol (c = 12,5 mmol dm^{-3}), glicerol (φ = 6,25 %), SDS 1,25 % (w/v), bromfenolno plavilo 0,002 % (w/v) te su grijani 5 min na 95 °C radi denaturacije. Uz uzorke je na gel stavljan i marker molekulske mase *Precision Plus Protein Standards*, Unstained (*Bio-Rad*). Elektroforeza se odvijala u puferu sastava glicin (γ = 14,4 g L^{-1}), Tris (γ = 3,03 g L^{-1}), SDS 0,1 % (w/v), pH = 8,3, na sobnoj temperaturi u uređaju *PROTEAN TETRA* (*Bio-Rad*). Elektroforeza je provedena jedan sat, prvih 15 minuta pri 120 V za sabijanje uzoraka, a zatim 45 min pri 180 V tijekom čega su se proteini razdvajali.

Vizualizacija proteina provedena je bojanjem s Coomassie Brillant Blue R-250 (γ = 2,5 g L^{-1}, octena kiselina (φ = 10 %), etanol (φ = 45 %). Gelovi su se potresali 20 min u boji, nakon čega su kompletno obojani gelovi radi uklanjanja boje koja nije specifično vezana za proteinske vrpce, odbojeni kuhanjem u kipućoj vodi.

3.2.2.6. *Ultrafiltracija*

Proteinski uzorci su nakon provedene afinitetne kromatografije ili gel-filtracije bili previše razrijeđeni za daljnji rad te ih je bilo potrebno ukoncentrirati. Koncentriravanje proteina provodilo se ultrafiltracijom. Ultrafiltracija je metoda kojom se pomoću centrifugiranja kroz filter/membranu koji zadržava čestice određene molekulske mase, povećava koncentracija proteinske frakcije. Pod utjecajem centrifugalne sile dolazi do ultrafiltriranja čestica manjih molekulskih masa kroz membranu, dok proteini zbog veće mase, tj. veličine ne mogu proći. Postupnim smanjivanjem volumena uzorka koji ne može proći kroz membranu, povećava se koncentracija proteina. Ultrafiltracija je provedena pri 4 °C, centrifugiranjem pri 10000 g, a korišteni su *Amicon® Ultra centrifugal filters* (*Milipore*) s porama kroz koje prolaze samo čestice manje od 30 kDa.

3.2.2.7. *Metode izmjene otopine proteina*

3.2.2.7.1 Dijaliza

Dijaliza je tehnika kojom se prolaskom molekula/čestica kroz polupropusnu celuloznu membranu mijenja sastav otopine u kojoj se nalazi neka veća molekula koja kroz istu membranu ne može proći. Membranu je prije upotrebe potrebno pripremiti kuhanjem u otopini EDTA c = 1 mmol dm^{-3} (kelirajući agens) radi uklanjanja metala s njene površine u trajanju 1 min.

Proteinski uzorci su dijalizirani iz afinitetno-kromatografskog pufera C prema puferu za skladištenje proteina sastava Tris-HCl (c = 20 mmol dm^{-3}, pH = 7,5), NaCl (c =50 mmol dm^{-3}), β-merkaptoetanol (c = 5 mmol dm^{-3}), glicerol (φ = 10 %) (glicerol je dodan radi čuvanja proteina pri niskim temperaturama). Dijaliza se vršila u 3 obroka, dva u trajanju od 3 h, i jednim u trajanju od barem 16 h. Proteini su nakon dijalize spremljeni na -80 °C.

3.2.2.7.2 Kromatografija na PD-10 kromatografskim kolonama

Svi pročišćeni proteini su dijalizirani, međutim kod hsLeuRS nije bilo moguće koristiti dijalizu zbog taloženja proteina u dijaliznom crijevu pri duljoj inkubaciji u puferu za skladištenje koja je potrebna prilikom postupka dijalize. Za bržu izmjenu pufera korištena je komercijalno dostupna PD-10 kolonica (gel-filtracijska kolona, punjena smolom Sephadex G-25) prema uputama proizvođača. Proteinskom uzorku je izmjenjen pufer u pufer sastava NaCl (c = 300 mmol dm^{-3}), natrijev fosfat (pH = 7,2, c = 20 mmol dm^{-3}), β-merkaptoetanol (c = 10 mmol dm^{-3}) i glicerol (φ = 10 %), te je spremljen na -80 °C.

3.2.2.8. *Određivanje koncentracije proteina*

3.2.2.8.1 Određivanje koncentracije pomoću spektrofotometra NanoDrop 1000

Koncentracija proteina se određivala na spektrofotometru NanoDrop 1000, mjerenjem absorbancije pri valnoj duljini od 280 nm. Za određivanje koncentracije spektrofotomerom koristi se Beer-Lambertov zakon prema kojem je apsorbancija uzorka jednaka umnošku molarnog apsorbcijskog koeficijenta, duljine puta koji svjetlost prelazi i koncentracije uzorka, $A = \varepsilon \times l \times c$. Za određivanje koncentracije korištene su molekulske mase proteina i molarni apsorpcijski koeficijenti koji su određeni pomoću programa *ExPASy protParam*. Dobivene vrijednosti za IleRS iz bakterije *E. coli* jesu: molekulska masa IleRS je 104 kDa, a molarni apsorpcijski koeficijent je 176545 mol^{-1} dm^3 cm^{-1}, za ValRS iz bakterije *E. coli*: molekulska masa iznosa 108 kDa, a molarni apsorpcijski koeficijent iznosa 171240 mol^{-1} dm^3 cm^{-1}, a za hsLeuRS: molekulska masa iznosila je 134 kDa, a molarni apsorpcijski koeficijent 179330 mol^{-1} dm^3 cm^{-1}.

3.2.2.8.2 Određivanje koncentracije po Bradfordu

Koncentracija proteina hsLeuRS određena je osim upotrebom spektrofotometra NanoDrop 1000, i testom po Bradfordu. Ovaj test se temelji na obojenju proteina Brafordovim reagensom

(*Coomassie Brilliant Blue* G-250 (γ = 0,1 g dm^{-3}), etanol (φ = 5 %), H_3PO_4 (φ = 8,5 %))[102]. Obojenje proteina je izravno proporcionalno koncentraciji proteina u uzorku, a obično se koristi kao alternativa određivanju koncentracije intrinzičnom proteinskom apsorbancijom koja dolazi od aminokiselina triptofana i u manjoj mjeri tirozina, fenilalanina i disulfidnih veza u proteinu. Koncentracija se određuje pomoću baždarnog pravca. Za određivanje koncetracije pripremi se uzorak proteina, ali i otopine BSA poznate koncentracije za baždarni pravac. U tubice se doda po 3, 5, 8, 12, 15 i 18 μL BSA (γ = 1 g L^{-1}) i nadopuni vodom do 100 μL. Zatim se doda 1 mL Bradfordovog reagensa i smjesa se inkubira 20 min pri sobnoj temperaturi. Apsorbancija se mjeri pri valnoj duljini od 595 nm koja odgovara apsorbcijskom maksimumu boje *Coomassie Brilliant Blue* G-250 kada je vezana na protein, a iz pravca ovisnosti apsorbancije o masenoj koncentraciji uzoraka baždarnog pravca, odredi se nepoznata koncentracija ciljnog proteina.

3.2.3. Kinetičke metode

3.2.3.1. *Aktivacija aminokiselina mjerena ATP/PP$_i$ izmjenom*

Izmjena ATP/PP$_i$ je kinetički test kojim se određuje brzina prvog koraka reakcije aminoaciliranja, aktivacije aminokiseline. Brzina reakcije se određuje mjerenjem brzine povratne reakcije pirofosforolize u kojoj iz aa-AMP i PP$_i$ nastaju ATP i aminokiselina. Prati se ugradnja [^{32}P], koji se prvotno nalazi u [^{32}P]PP$_i$, a prelazi u [^{32}P]ATP. Kako je povratna reakcija brža od napredne, ono što se mjeri je zapravo napredna reakcija, jer nužno mora nastati aa-AMP kao supstrat za povratnu reakciju. Do povratne reakcije dolazi zbog visoke koncentracije drugog reaktanta povratne reakcije – pirofosfata, koji je pomiješan s tragovima radioaktivno obilježenog pirofosfata – [^{32}P]PP$_i$. Brzina nastajanja radioaktivno obilježenog ATP je funkcija brzine sinteze aa-AMP i pirofosforolize.

$$\text{ATP} + \text{aa} \rightleftarrows \text{aa-AMP} + \text{PP}_i$$
$$\text{aa-AMP} + [^{32}\text{P}]\text{PP}_i \rightarrow [^{32}\text{P}]\text{ATP} + \text{aa}$$

U ovom radu korištena je izmjena ATP/PP$_i$ za mjerenje aktivacije pripadnog izoleucina i nepripadnog valina s 10SAla IleRS, te nepripadnog norvalina s IleRS divljim tipom, te mutantima D342A i 10SAla IleRS, zatim aktivaciju norvalina s ValRS divljim tipom i mutantom D286A, (enzimi iz bakterije *E. coli*) te aktivaciju pripadnog leucina i nepripadnih norvalina i izoleucina s hsLeuRS.

Reakcijsku smjesu za aktivaciju ValRS i IleRS enzima (osim 10SAla) činili su Hepes (c = 100 mmol dm^{-3}, pH = 7,5), $MgCl_2$ (c = 20 mmol dm^{-3}), ATP (c = 4 mmol dm^{-3}), [^{32}P]PP$_i$ (c = 1 mmol dm^{-3}, specifična radioaktivnost 0,2-0,4 μCi μmol^{-1}), DTT (c = 2 mmol dm^{-3}), te enzim i

aminokiselina. Reakcijska smjesa za mjerenje aktivacije 10SAla IleRS enzima imala je još i NH_4Cl (c = 150 mmol dm^{-3}). Reakcijsku smjesu za mjerenje aktivacije enzimom hsLeuRS činili su Hepes (c = 100 mmol dm^{-3}, pH = 7,5), KCl (c = 150 mmol dm^{-3}), BSA (γ = 10 μg mL^{-1}), $MgCl_2$ (c = 10 mmol dm^{-3}), ATP (c = 4 mmol dm^{-3}), [^{32}P]PP_i (c = 1 mmol dm^{-3}, specifična radioaktivnost 0,2-0,4 μCi μmol^{-1}), DTT (c = 1 mmol dm^{-3}), te enzim i aminokiselina. Enzimi su razrijeđeni do željene koncentracije u puferu sastava BSA (γ = 1 mg mL^{-1}), Hepes (c = 50 mmol dm^{-3}, pH = 7,5) i uvijek su dodavani kao 1/10 ukupne reakcijske smjese, pa je s njim dodano Hepes (c = 5 mmol dm^{-3}, pH = 7,5) i BSA (γ = 0,1 mg mL^{-1}). Korištene koncentracije enzima prilagođene su pojedinim reakcijama, tako da reakcije budu u uvjetima ustaljenog stanja (Tablica 3.2).

Tablica 3.2: Koncentracija enzima korištenih u reakcijama izmjene pirofosfata.

Enzim	Supstrat	c / nmol dm^{-3}
IleRS divlji tip	Nva	25
IleRS D342A	Nva	25
10SAla IleRS	sve aminokiseline	50
ValRS divlji tip	Nva	100
ValRS D286A	Nva	100
hsLeuRS	sve aminokiseline	100

Koncentracije aminokiselina su izabrane tako da budu u rasponu od 0,1×K_M do 10×K_M. Kako za korak aktivacije kod istraživanih enzima nije potrebno prisustvo tRNA, ona nije dodana u reakcijsku smjesu, osim kad se radila aktivacija u prisutnosti oksidirane tRNA na koju nije moguće prenijeti aktiviranu aminokiselinu obzirom da ne sadrži vicinalne diole na terminalnom adenozinu. Oksidirana tRNA priređena je pomoću natrijevog perjodata. Reakcijskoj smjesi aktivacije uz oksidiranu $tRNA^{Ile}$, dodana je oksidirana tRNA konačne koncentracije iznosa c = 10 μmol dm^{-3}.

Reakcije aktivacije su napravljene pri 37 °C u mikrotitarskim pločicama, a volumen pojedinačne reakcijske smjese iznosio je 20 μL. Reakcije su započete dodavanjem aminokiseline (predgrijane na 37 °C) u predgrijanu reakcijsku smjesu, i tada je pokrenuto mjerenje vremena reakcija. Alikvoti od 1,5 μL reakcijske smjese su u izabranim vremenskim točkama izdvajani te je reakcija zaustavljana miješanjem s 3 μL otopine natrijevog acetata (c = 0,75 mol dm^{-3}, pH = 4,5), i SDS-a 0,15 % (w/v). Produkti reakcije analizirani su nanošenjem alikvota zaustavljenih reakcijskih smjesa na pločicu za tankoslojnu kromatografiju, koja je nakon sušenja podvrgnuta kromatografskom razdvajanju u razvijaču sastava KH_2PO_4 (c = 750

mmol dm^{-3}, pH = 3,5) i ureja (c = 4 mol dm^{-3}). Razvijanjem pločice omogućava se razdvajanje supstrata i produkata, konkretno najvažnije je razdvajanje komponenti koje će biti vidljive vizualizacijom radioaktivnih produkata, poput [^{32}P]PP_i, [^{32}P]ATP i [^{32}P]P_i. Razvijene pločice za tankoslojnu kromatografiju su posušene i izložene zaslonu s uskladištenim fosforom u trajanju od 12-16 h (prilagođeno obzirom na specifičnu radioaktivnost supstrata i željenu jačinu signala). Zasloni su zatim snimljeni na uređaju *Typhoon PhosphorImager 9410.* Dobiveni podaci su kvantificirani u računalnom programu ImageQuant 5.2 denzitometrijskom analizom. Iz različitih vremenskih tijekova određenih pri određenoj koncentraciji aminokiselina, izračunata je početna brzina reakcije nastanka ATP-a (v_0). Istovremeno su napravljeni svi vremenski tijekovi pri različitim koncentracijama aminokiselina (što omogućava visokoprotočni format izvedbe enzimskog testa u mikrotitarskoj pločici) koje su potrebne da bi se iz Michaelis-Mentenine jednadžbe odredili kinetički parametri K_M i k_{cat} za testiranu aminokiselinu. Ovisnost dobivenih početnih brzina v_0 o koncentraciji korištene aminokiseline je utočnjena nelinearnom regresijom na jednadžbu:

$$v_0 = \frac{V_{\max} \times [\mathrm{S}]}{K_\mathrm{M} + [\mathrm{S}]}$$

gdje je V_{max} je maksimalna brzina, [S] je početna koncentracija supstrata (ovdje aminokiseline), a K_M je Michaelisova konstanta. k_{cat} je obrtni broj enzima i računa se kao $V_{max}/[E_0]$, a definira se kao maksimalni broj molekula supstrata koje se pretvore u produkt po aktivnom mjestu enzima u jedinici vremena u uvjetima zasićenja enzima supstratom. Parametar koji se dobije dijeljenjem k_{cat} / K_M naziva se konstanta specifičnosti, i koristan je parametar u uspoređivanju rada enzima s drugim enzimima i različitim supstratima.

Navedena jednadžba Michaelis-Menten vrijedi u uvjetima ustaljenog stanja, kad su koncentracije međuprodukata stalne, a nije došlo do značajnog trošenja supstrata ([S] ≈ [S_0]). Utočnjavanje nelinearnom regresijom napravljeno je u programu GraphPad Prism 4.

3.2.3.2. *Aminoaciliranje uz [^{14}C]aminokiselinu*

Mjerenje brzine aminoaciliranja provedeno je s ciljem provjere efikasnosti enzima, nakon pročišćavanja enzima. Brzina ukupne reakcije aminoaciliranja pratila se pomoću radioaktivno obilježene aminokiseline s [^{14}C]. U ovom radu su korišteni [^{14}C]Ile, [^{14}C]Val i [^{14}C]Leu.

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

U reakcijsku smjesu su stavljeni svi potrebni sastojci za reakciju aminoaciliranja (detaljni reakcijski uvjeti za svaki enzim opisani su pri kraju ovog poglavlja), a reakcija je započeta

dodatkom odgovarajućeg enzima. Zbog reakcije aminoaciliranja radioaktivni biljeg na aminokiselini završava u nastalom aminoacil-adenilatu, te u konačnici na aminaciliranoj tRNA. Iz ukupne reakcijske smjese se u određenim vremenskim točkama uzimaju alikvoti i nanose se na filter papirić (*Whatman 3MM*), koji se trenutno uranja u hladnu 10 % (w/v) otopinu trikloroctene kiseline, čime se reakcija efektivno zaustavlja, te se na filter papiriću talože makromolekule. Filter papirići na kojima se nalaze istaložene makromolekule se potresaju još 10 min u hladnoj 10 % TCA (w/v), a zatim i ispiru po dva puta u 5 % TCA (w/v) po 10 min kako bi se uklonile male molekule poput radioaktivno obilježene slobodne aminokiseline. Papirići se zatim suše pri visokoj temperaturi i stavljaju u scintilacijsku otopinu sastava PPO (2,5-difenil oksazol) (γ = 5 g L^{-1}) i POPOP (1,4-bis(2-(4-metil-5-fenil)oksazolil)benzen (γ = 0,3 g L^{-1}) (otapalo je toluen). Količina radioaktiviteta na papirićima se kvantificira u scintilacijskom brojaču, te se usporedbom s baždarnim pravcem koji prikazuje ovisnost izmjerenih cpm (counts per minute) o koncentraciji radioaktivne aminokiseline može ekstrapolirati koncentracija radioaktivne aminokiseline odnosno radioaktivno obilježene aminoacilirane tRNA na papiriću jer je radioaktivitet zaostao na papiriću proporcionalan količini nastale aminoacil-tRNA. Iz ovisnosti koncentracije nastale aminoacil-tRNA o vremenu može se odrediti koeficijent brzine reakcije aminoaciliranja, k_{obs}. Uz svaku reakciju napravljena je i kontrolna reakcija, odnosno slijepa proba pri kojoj u reakcijsku smjesnu nije dodana tRNA, pa nije došlo do aminoaciliranja već je mjereno zaostajanje radioaktivne aminokiseline na diskiću ili u sintetskom mjestu enzima koji je istaložen na papiriću. Mjerenje iz slijepe probe oduzeto je od svake točke reakcijske smjese aminoaciliranja jer odražava količinu radioaktiviteta koja ne odgovara aminoaciliranoj tRNA.

U slučaju mjerenja aminoaciliranja s IleRS i ValRS reakcijske smjese za aminoaciliranje su sadržavale Hepes (pH = 7,5, c = 20 mmol dm^{-3}), BSA (γ = 10 μg mL^{-1}), $MgCl_2$ (c = 10 mmol dm^{-3}), ATP (c = 4 mmol dm^{-3}), tRNA (c = 15 μmol dm^{-3}), a mjerenje s 10SAla dodatno je sadržavalo NH_4Cl (c = 150 mmol dm^{-3}). Mjerenje aminoaciliranja s hsLeuRS sadržavalo je Hepes (pH = 7,5, c = 100 mmol dm^{-3}), KCl (c = 150 mmol dm^{-3}), BSA (γ = 10 μg mL^{-1}), $MgCl_2$ (c = 10 mmol dm^{-3}), ATP (c = 2 mmol dm^{-3}), tRNA (c = 15 μmol dm^{-3}). Koncentracije enzima su namještene tako da u vremenskom rasponu dolazi do linearnog porasta koncentracije produkta s vremenom (Tablica 3.3). U svakoj reakciji korišten je finalno [^{14}C]Ile, [^{14}C]Val ili [^{14}C]Leu (c = 40 μmol dm^{-3}, specifične aktivnosti 100 μCi $umol^{-1}$). Reakcije aminoaciliranja izvođene su pri 37 °C.

Tablica 3.3: Koncentracije enzima korištenih u aminoaciliranju uz [^{14}C]aminokiseline.

Enzim	c / nmol dm^{-3}
IleRS	20
ValRS	10
hsLeuRS	100

3.2.3.3. *Aminoaciliranje uz [^{32}P]tRNA*

Uz aminoaciliranje uz radioaktivni biljeg na aminokiselini, u ovom radu se aminoaciliranje pratilo i pomoći radioaktivno obilježene tRNA. Obilježavanje tRNA rađeno je pomoću tRNA-nukleotidil-transferaze, enzima koji katalizira uklanjanje terminalnog adenozina s 3'-kraja tRNA u prisustvu pirofosfata reakcijom pirofosforolize. U prisustvu novog ATP-a, u ovom slučaju radioaktivno obilježenog ([α-^{32}P]ATP), dolazi do ugradnje radioaktivno obilježenog adenozina na 3'-kraj tRNA čime se formira [^{32}P]-tRNA, odnosno tRNA kojoj je fosfat između zadnja dva nukleotida radioaktivno obilježen (revijalno prikazano u [103]). Reakcijska smjesa za obilježavanje tRNA sastojala se od tRNA (c = 5 μmol dm^{-3}), Tris-HCl (c = 200 mmol dm^{-3}, pH = 8,0), $MgCl_2$ (c = 20 mmol dm^{-3}), natrijeva pirofosfata (c = 5 mmol dm^{-3}), DTT (c = 0,5 mmol dm^{-3}), tRNA-nukleotidil-transferaza (c = 10 μmol dm^{-3}), a reakcija je započeta dodatkom obilježenog ATP ([α-^{32}P]ATP, c = 1 μmol dm^{-3}, specifična aktivnost 3000 Ci mmol^{-1}). Nakon inkubacije u trajanju 1 min pri 37 °C reakcija pirofosforolize, kojom se uklanja posljednji adenozin s 3'-kraja tRNA, a koja se odvija zbog visoke koncentracije pirofosfata, se zaustavlja. Enzim anorganska pirofosfataza (koja se dodaje u koncentraciji 0,1 U μL^{-1}) zaustavlja reakciju jer se uklanja pirofosfat iz reakcijske smjese i dolazi do ugradnje [α-^{32}P]ATP na kraj tRNA. Reakcija je nakon 2 min pri temperaturi od 37 °C zaustavljena dodatkom fenola, a [^{32}P]-tRNA je zatim pročišćena ekstrakcijom fenol-kloroformom i *Micro Bio-Spin 30 (BioRad)* kolonicama prema uputama proizvođača.

Kao i kod aminoaciliranja s [^{14}C] aminokiselinom, reakcija aminoaciliranja se zaustavlja u određenim vremenskim razmacima, izdvajanjem alikvota reakcijske smjese u otopinu smjese natrijevog acetata (c = 0,75 mol dm^{-3}, pH = 4,5), i SDS-a 0,15 % (w/v) kako bi se reakcija trenutno zaustavila. Nakon prikupljanja svih alikvota reakcijske smjese u željenim vremenskim točkama, alikvotima zaustavljene reakcije dodaje se P1-nukleaza koja odcjepljuje jednolančani kraj tRNA, pa tako i terminalni radioaktivno obilježeni adenozin na koji može biti vezana aminokiselina[104]. Smjesa se nakon inkubacije s P1-nukleazom u trajanju od 1 h pri sobnoj temperaturi, nanosi na pločicu za tankoslojnu kroamtografiju i razvija u razvijaču sastava

CH_3COONH_4 (c = 0,1 mol dm^{-3}) i CH_3COOH (φ = 5 %), pri čemu dolazi do odvajanja terminalnog adenozina na koji je vezana aminokiselina od onog na koji aminokiselina nije vezana. Kvantifikacija se radi kao što je već ranije opisano u poglavlju 3.2.3.1.

3.2.3.4. *Određivanje akceptorske aktivnosti tRNA*

Akceptorska aktivnost tRNA određuje maksimalni udio tRNA koji se može aminoacilirati određenom pripadnom aminokiselinom u reakcijskoj smjesi u koju su dodani svi drugi reaktanti u suvišku te služi za određivanje udjela funkcionalne tRNA. Korišteni su reakcijski puferi koji su ranije navedeni za aminociliranje, uz modifikaciju koncentracije tRNA i enzima. Uobičajeno, koncentracija tRNA u smjesi je bila c = 1-2 μmol dm^{-3}, dok je korištena koncentracija enzima oko bila c = 1 μmol dm^{-3}. Reakcija aminoaciliranja pri određivanju akceptorske aktivnosti se provodila do 1 h, uz uzimanje alikvota nakon 30 minuta te nakon punog sata. Reakcije su kvantificirane kako je ranije objašnjeno kod aminoaciliranja u [^{14}C] aminokiselinu. Također, uvijek je korištena kontrolna reakcija bez dodatka tRNA, kako bi se oduzeo udio radioaktivne aminokiseline koji zaostaje na papiriću nevezan za nastalu aminoaciliranu tRNA.

3.2.3.5. *Prijenos aktivirane aminokiseline na tRNA*

Kinetika drugog koraka ukupne reakcije aminoaciliranja, prijenosa aktivirane aminokiseline na 3'-kraj tRNA praćena je u uvjetima kinetike jednog obrtaja enzima. U tim uvjetima u reakcijskoj smjesi prisutan je enzim u suvišku u odnosu na tRNA, čime je omogućen samo jedan krug enzimske reakcije. Kod istraživanih enzima, odnosno enzima razreda I, najsporiji, odnosno ograničavajući korak ukupne reakcije aminoaciliranja je otpuštanje produkta u otopinu. Iz toga razloga je jedino u uvjetima jednog kruga enzima i izolirane reakcije prijenosa moguće odrediti koeficijent brzine prijenosa aminokiselina na tRNA u aktivnom mjestu enzima. Zbog relativno velike brzine prijenosa aminokiseline na tRNA, ovaj tip reakcija se izvodio uz pomoć instrumenta s mogućnošću brzog zaustavljanja reakcije (engl. *Rapid Chemical Quench*) (Slika 3.5). Uz pomoć takvog instrumenta, moguće je pratiti reakciju na milisekundnoj skali.

Slika 3.5: Instrument s mogućnošću brzog zaustavljanja reakcije (engl. *Rapid Chemical Quench*).

Dizajn eksperimenta obuhvaćao je miješanje reakcijske smjese s predformiranim aminoacil-adenilatom u sintetskom mjestu enzima s radioaktivno obilježnom tRNA jednakog volumena. Instrument je pri pokretanju reakcije pomiješao reakcijske smjese u omjeru 1:1 i u zadanim vremenskim razmacima zaustavio reakcije dodavanjem natrijevog acetata (c = 2 mol dm^{-3}, pH = 4,5), nakon čega je pomiješana zaustavljena reakcija prikupljena u tubici kojoj je prethodno dodano 9 µL SDS-a 1 % (w/v). Reakcijska smjesa s enzimom, a bez tRNA sadržavala je enzim (ValRS ili IleRS) (Tablica 3.4) i odgovarajuću aminokiselinu u puferu sastava Hepes (c = 100 mmol dm^{-3}, pH = 7,5), BSA (γ = 0,1 mg mL^{-1}), $MgCl_2$ (c = 20 mmol dm^{-3}), DTT (c = 2 mmol dm^{-3}), uz ATP (c = 8 mmol dm^{-3}) i anorgansku pirofosfatazu (0,008 U µL^{-1}). Druga reakcijska smjesa, s tRNA, sadržavala je pripadnu tRNA s tragovima radioaktivno obilježene pripadne tRNA. Reakcije prijenosa su se izvodile pri 37 °C. Smjese su zasebno inkubirane nekoliko minuta prije početka reakcije, pri čemu je došlo do formiranja aminoacil-adenilata u slučaju reakcijske smjese koja je sadržavala enzim, ATP i aminokiselinu, pa je u pravilu reakcija koja se pratila bila isključivo reakcija prijenosa aminokiseline na tRNA. Nakon zaustavljanja reakcije, kao i kod aminoaciliranja s [^{32}P]tRNA, reakcijska smjesa je podvrgnuta cijepanju s P1-nukleazom (opisano u poglavlju 3.2.3.3). Nastala aminoacilirana tRNA kvantificirana je denzitometrijski, i ovisnost udjela aminoacilirane tRNA o vremenu utočnjena je nelinearnom regresijom pomoću programa GraphPad Prism na monoeksponencijalnu jednadžbu:

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

pri čemu je y udio aminoacilirane tRNA, Y_0 je odsječak na y osi, A je amplituda aminoacilirane tRNA, a k_{trans} je opaženi koeficijent brzine prijenosa aminokiseline na tRNA.

Tablica 3.4: Finalne koncentracije enzima u reakcijama prijenos aminokiselina na tRNA.

Enzim	c / μmol dm^{-3}
IleRS D342A	10
ValRSD286A	10

3.2.3.6. *Test utroška ATP-a*

Aminoacil-tRNA-sintetaze za aminoaciliranje jedne molekule tRNA u pravilu koriste jednu molekulu ATP-a. Međutim, molekula ATP-a se troši i ako dođe do popravka pogreške nakon aktivacije aminokiseline, bilo prije ili nakon prijenosa aminokiseline na tRNA, ali bez nastanka stabilne pogrešno aminoacilirane tRNA. Stoga je dijagnostički test ukupnog popravka pogreške pojačana potrošnja [^{32}P]ATP-a u prisustvu divljeg tipa enzima i nepripadne aminokiseline[105]. Test utroška ATP-a je korišten u reakcijama s IleRS i ValRS, a reakcijske smjese sadržavale su: Hepes (c = 100 mmol dm^{-3}, pH = 7,5), $MgCl_2$ (c = 20 mmol dm^{-3}), DTT (c = 2 mmol dm^{-3}), BSA (γ = 0,1 mg mL^{-1}), (NH_4Cl (c = 150 mmol dm^{-3}), samo u reakciji s 10SAla IleRS), anorgansku pirofosfatazu (aktivnost = 0,004 U μL^{-1}), [α-^{32}P]ATP (c = 0,5 mmol dm^{-3}, specifične aktivnosti 0,01 – 0,1 mCi mL^{-1}), tRNA (c = 15 μmol dm^{-3}) ili nisu imale tRNA te varirajuće koncentracije aminokiselina i enzima (Tablica 3.5). Reakcije su započete dodatkom aminokiseline u reakcijsku smjesu predinkubiranu pri 37 °C. Alikvoti reakcije smjese su u određenim vremenskim razmacima izdvojeni u otopinu za zaustavljanje reakcije (1,5 μL reakcije u 3 μL mravlje kiseline (c = 1,5 mol dm^{-3})). Alikvoti od 1,5 μL zaustavljene reakcije naneseni su na TLC pločice, koja je nakon sušenja razvijena u razvijaču sastava CH_3COONH_4 (c = 0,1 mol dm^{-3}) i CH_3COOH (φ = 5 %). Razvijanjem se omogućava razdvajanje aa-AMP-a, ATP-a i AMP-a, a kvantifikacija radioaktivnih substrata odnosno produkata se izvodi kako je ranije objašnjeno. Iz ovisnosti nastalog AMP-a o vremenu dobiva se koeficijent brzine reakcije utroška ATP-a.

Tablica 3.5: Koncentracije enzima u reakcijama određivanja utroška ATP-a.

Enzim	Supstrat	Prisutna tRNA	c / nmol dm^{-3}
IleRS	Nva	–	2000
ValRS	Nva	–	2000
IleRS	Nva	+	50
ValRS	Nva	+	300

3.2.3.7. *Paralelno praćenje nastanka AMP-a i aminoacilirane tRNA*

Ranije opisani test utroška ATP-a može poslužiti kao metoda za otkrivanje popravka pogreške u slučaju ako enzim ne otpušta u značajnoj mjeri pogrešno aminoaciliranu tRNA, kao npr. divlji tip enzima IleRS, ValRS ili hsLeuRS. Međutim, ako je cilj eksperimenta utvrđivanje popravka pogreške prije prijenosa aminokiseline s enzimom koji ima ugašen popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline, nužno je identificirati AMP koji je nastao uslijed prijenosa aminokiseline i time nastajanja stabilne pogrešno aminoacilirane tRNA, za razliku od AMP koji nije rezultirao stvaranjem stabilne pogrešno aminoacilirane tRNA jer se dogodila hidroliza nepripadnog aminoacil-adenilata. Razlikovanje nastalih AMP je moguće ako se paralelno prati utrošak ATP-a i nastanak stabilne aminoacilirane, odnosno pogrešno aminoacilirane tRNA. Ako je brzina utroška ATP-a i aminoaciliranja, odnosno pogrešnog aminoaciliranja jednaka, to je znak da ne postoji tRNA-ovisni popravak pogreške prije prijenosa. Međutim, ako je brzina utroška ATP-a veća od brzine aminoaciliranja u reakciji s enzimom kojem je ugašen popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline, to je znak aktivnosti tRNA-ovisnog popravka pogreške prije prijenosa aminokiseline. Test utroška ATP-a se izvodi kako je ranije opisano, a druga reakcija koja se prati je aminoaciliranje uz radioaktivno obilježenu tRNA, koja se prati kako je ranije opisano. Obje reakcije se prate istovremeno, s istim razjeđenjima svih reaktanata. U odnosu na test utroška ATP-a, korištena je manja koncentracija ATP-a (c = 200 μmol dm^{-3} umjesto 500 μmol dm^{-3}) iz tehničkih razloga (bolji omjer signala produkta i pozadinskog signala). Koncentracije korištenih enzima su navedene u Tablici 3.6.

Tablica 3.6: Koncentracije enzima u reakcijama paralelnog praćenja nastanka AMP-a i aminoacilirane tRNA.

Enzim	c /nmol dm^{-3}
IleRS divlji tip	20
IleRS D342A/T243R	20
ValRS divlji tip	25
ValRS D286A	25

3.2.3.8. *Priprema pogrešno aminoacilirane tRNA*

Pogrešno aminoacilirana tRNA priređena je metodom preparativne pogrešne aminoacilacije prethodno radioaktivno obilježene tRNA. Korištene su varijante enzima za koje je poznato da su mutanti s ugašenim popravkom pogreške nakon prijenosa (IleRS D342A i ValRS D286A) da bi se umanjio popravak pogreške prisutan kod enzima divljeg tipa, odnosno omogućila

preparativna pogrešna aminoacilacija tRNA. Reakcija preparativne pogrešne aminoacilacije se izvodila na 37 °C, 40 minuta, u reakcijskoj smjesi koja je sadržavala obilježenu tRNA, Hepes (c = 100 mmol dm^{-3}, pH = 7,5), $MgCl_2$ (c = 20 mmol dm^{-3}), DTT (c = 2 mmol dm^{-3}), BSA (γ = 0.1 μg μl^{-1}), anorgansku pirofosfatazu (aktivnost = 0,004 U μL^{-1}), ATP (c = 4 mmol dm^{-3}) te koncentraciji nepripadne aminokiseline (c = 2 mmol dm^{-3}). Pogrešno aminoacilirana ili aminoacilirana tRNA je zatim pročišćena ekstrakcijom fenol-kloroformom i *Micro Bio-Spin 30 (BioRad)* kolonicama prema uputama proizvođača.

3.2.3.9. *Deacilacija u uvjetima jednog obrtaja enzima*

Popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline na tRNA podrazumijeva hidrolitičku deacilaciju pogrešno aminoacilirane tRNA. Deacilacija se odvija u domeni udaljenoj 30 Å od aktivnog sintetskog mjesta u kojem dolazi do prijenosa aminokiseline na tRNA. Deacilaciji prethodi translokacija 3'-kraja tRNA u domenu za popravak. Specifičnost domene je detaljnije objašnjena u poglavlju 2.3.4, 2.3.5 i 2.3.6. Deacilacija je u ovom radu praćena u uvjetima jednog obrtaja enzima, i to za enzime IleRS i ValRS s nepripadnim supstratima Nva-tRNA^{Ile}, odnosno Nva-tRNA^{Val}. Drugi supstrati koji su korišteni s navedenim enzimima su Thr-tRNA^{Val}, Ile-tRNA^{Ile} te Val-tRNA^{Ile}. Reakcija deacilacije se odvijala u uvjetima jednog obrtaja enzima, iz istih razloga kao i reakcija prijenosa aminokiseline (jer je najsporiji korak otpuštanje produkata s enzima). Reakcija deacilacije je izvođena s divljim tipom IleRS i ValRS, kao i s pretpostavljenim deacilacijskim mutantima (10SAla, D342A i D342A/T243R IleRS i D286A ValRS). Deacilacija Nva-tRNA^{Ile} odnosno Nva-tRNA^{Val} divljim tipovima enzima je relativno brz proces pri 37 °C, pa je reakcija rađena uz upotrebu instrumenta s brzim gašenjem protoka (engl. *Rapid Chemical Quench*), dok je deacilacija s deacilacijskim mutantima, kad je brzina to dopuštala, rađena ručno. Prije deacilacije, pogrešno aminoacilirane odnosno aminoacilirane tRNA su denaturirane 3 min pri 80 °C, i zatim sporo renaturirane hlađenjem do sobne temperature u prisustvu $MgCl_2$ (c = 10 mmol dm^{-3}). Reakcija je započinjala miješanjem jednakog volumena radioaktivno obilježene aa-tRNA i reakcijske smjese koja je sadržavala ciljni enzim (korištene koncentracije navedene u Tablici 3.7), sastava: Hepes (c = 100 mmol dm^{-3}, pH = 7,5), $MgCl_2$ (c = 20 mmol dm^{-3}), DTT (c = 2 mmol dm^{-3}), BSA (γ = 0,1 mg mL^{-1}). U određenim vremenskim intervalima je u alikvote reakcijske smjese dodan natrijev acetat (c = 0,75 mol dm^{-3}, pH = 4,5), i SDS 0,15 % (w/v), čime je reakcija zaustavljena. Zaustavljene reakcije su pocijepane nukleazom P1, i alikvoti su naneseni na TLC pločice. Produkti su razdvojeni razvijanjem pločice i pločice su kvantificirane kako je ranije opisano. Podaci

dobiveni kvantifikacijom reakcije deacilacije utočnjeni su nelinearnom regresijom računalnim programom GraphPad Prism na monoeksponencijalnu jednadžbu:

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

pri čemu je y udio aminoacilirane tRNA, Y_0 je odsječak na y osi, A je amplituda deacilirane tRNA, a k_{deacyl} je opaženi koeficijent brzine hidrolize aa-tRNA.

Tablica 3.7: Koncentracije enzima u reakcijama deacilacije u uvjetima jednog obrtaja enzima.

Enzim	Supstrat	c / μmol dm^{-3}
IleRS divlji tip	Nva-tRNA^{Ile}	15
IleRS D342A	Nva-tRNA^{Ile}	15
IleRS D342A/T243R	Nva-tRNA^{Ile}	15
ValRS divlji tip	Nva-tRNA^{Val}	15
ValRS divlji tip	Thr-tRNA^{Val}	15

3.2.3.10. *Provjera čistoće aminokiselina kinetičkim testom*

Kako je ranije pokazano[14] na parametre dobivene kinetičkim istraživanjima uvelike utječu čistoća aminokiselina, odnosno važno je da u reakciji u kojoj se koriste nepripadni supstrati, ti supstrati nemaju primjese pripadnog supstrata za koji enzim ima značajno veći afinitet. Za potrebe ovog rada provjerena je čistoća aminokiseline norvalina, odnosno napravljen je test prisustva izoleucina i valina u pripravku norvalina. Provjera čistoće je napravljena kako je ranije opisano[14]. Metoda se temelji na određivanju akceptorske aktivnosti tRNA u prisutnosti različitih koncentracija Nva. Koncentracija Nva je bila c = 10 mmol dm^{-3}, 20 mmol dm^{-3}, 40 mmol dm^{-3} i 60 mmol dm^{-3}, a koncentracija tRNA^{Ile} ili tRNA^{Val} je u smjesi bila c = 20 μmol dm^{-3}, dok je korištena koncentracija enzima bila c = 4 μmol dm^{-3}. U reakcijskoj smjesi je još bio ATP (c = 4 mmol dm^{-3}), Hepes (c = 100 mmol dm^{-3}, pH = 7,5), $MgCl_2$ (c = 15 mmol dm^{-3}) i DTT (c = 1 mmol dm^{-3}). Pratilo se aminoaciliranje tijekom četiri duga vremenska razmaka, kako bi došlo do aminoaciliranja sve prisutne tRNA. Indikacija prisutne nečistoće (uz pretpostavku da je prisutna u vrlo malim količinama) bilo bi linearno povećanje akceptorske aktivnosti s povećanjem koncentracije prisutnog Nva. Reakcije su napravljene s IleRS u svrhu provjere prisustva izoleucina u norvalinu odnosno s ValRS s ciljem provjere prisustva valina u preparaciji norvalina.

Za eksperimente u kojima je izoleucin korišten kao nepripadni supstrat za hsLeuRS, korišten je ranije pripremljeni izoleucin maksimalno pročišćen od tragova leucina[14]. Ostale

korištene aminokiseline su prethodno provjerene za potrebe ranijih kinetičkih istraživanja (provjerila dr. sc. Morana Dulić).

3.2.4. Metode rada s bakterijama in vivo

Osim kinetičkog *in vitro* dijela, u ovoj disertaciji napravljeni su i *in vivo* eksperimenti u bakteriji *E. coli* s ciljem određivanja toksičnosti nepripadnih aminokiselina. Korišten je laboratorijski divlji tip bakterije MG1655 (detaljnije opisan u poglavlju 3.1.9.1) i soj 10SAla, varijanta MG1655 u kojem je gen za divlji tip IleRS u genomu zamijenjen s mutiranom varijantom gena koja ima niz od 10 alanina na mjestima 241 do 250. Soj nam je ustupljen od dr. Paula Schimmela. Za enzim koji se sintetizira u tom soju ranije je pokazano da ne koristi popravak pogreške nakon prijenosa na tRNA. Kako taj tip popravka čini većinu ukupnog popravka pogreške kod IleRS, smatralo se da bi ovakav soj mogao imati veću mistranslaciju u određenim uvjetima. Soj je u *in vivo* eksperimentima uspoređivan s divljim tipom bakterije *E. coli* (MG1655), a uspoređivani su parametri rasta u uvjetima s dodanim valinom i norvalinom u različitim koncentracijama. Cilj je bio usporedba toksičnosti navedenih nepripadnih aminokiselina za IleRS. Testovi toksičnosti valina i norvalina *in vivo* napravljeni su određivanjem parametra IC50 i testom rasta bakterija na krutim podlogama u prisutnosti valina i norvalina pri povišenoj temperaturi.

3.2.4.1. *Određivanje toksičnosti nepripadnih aminokiselina mjerenjem IC50*

Zasićene bakterijske kulture su nasađene u minimalni M9 medij bez dodatka aminokiselina, a rasle su pri 37 °C uz potresanje od 200 rpm. Bakterije su zatim razrjeđene do OD_{600} = 0,02 u M9 mediju uz dodatak Ile, Leu i Val (c = 100 μmol dm^{-3}) i dodatak različitih koncentracija norvalina i valina (od c = 0,2 do 50 mmol dm^{-3}). Kulture su uzgajane pri 37 °C, uz mjerenje OD_{600} svakih sat vremena (ili češće po potrebi), sve dok nisu ušle u stacionarnu fazu, obično nakon 10 sati. Iz ovisnosti OD_{600} o vremenu uzgoja, dobivene su krivulje rasta. Krivulje su utočnjene na logističku jednadžbu

$$y = \frac{A}{1 + \exp(4 \times \frac{v}{A} \times (L - x) + 2)}$$

gdje je A maksimalni rast stanica, L je duljina lag-faze, a v je brzina diobe stanica. Brzina diobe stanica je zatim utočnjena na jednadžbu za određivanje 50 % inhibitorne koncentracije (IC50):

$$y = y_0 + \frac{y_{max} - y_0}{1 + 10^{(logIC50 - x) \times nagib}}$$

Parametri su određeni uz korištenje programa GraphPad Prism. Sva mjerenja su ponovljena najmanje 3 puta.

Mjerenja IC50 napravljena su i na 42 °C, kao kontrola svojstva primijećenog pri 37 °C. Zasićene kulture koje su rasle pri 37 °C su razrijeđene u predgrijanom mediju na OD_{600} = 0,02. Rast je praćen spektrofotometrijski, a podaci su analizirani kako je ranije objašnjeno za IC50 na 37 °C.

3.2.4.2. *Test rasta bakterija na krutim hranjivim podlogama*

Kao drugi test za istraživanje rasta bakterija *in vivo* korišten je test sposobnosti bakterija da stvaraju kolonije na krutim podlogama. Kao krute hranjive podloge korišten je bogat LB medij, LB ploče. Pojedinačne kolonije su nasađene u minimaln M9 medij bez dodatka aminokiselina, te uzgajane pri 37 °C uz potresanje od 200 rpm.

Zatim su kulture razrijeđene u minimalnom M9 mediju s dodanim Ile, Leu i Val (c = 100 μmol dm^{-3}) i inkubirane pri 37 °C uz potresanje od 200 rpm. Nakon 4,5 h, kad su bakterije bile u sredini eksponencijalne faze rasta, bakterijama je dodan valin ili norvalin, te su nakon toga inkubirane još pola sata pri 37 °C. Kulture su zatim uzgajane pri višoj temperaturi, odnosno 53 °C, gdje su uz potresanje rasle još 1,5 sati. Prije početka uzgoja pri 53 °C, i zatim nakon svakih pola sata uzimani su alikvoti bakterija koji su razijeđeni u PBS puferu (sastava NaCl c =137 mmol dm^{-3}, Na_2HPO_4 c =10 mmol dm^{-3}, KH_2PO_4 c =1,8 mmol dm^{-3}, KCl c =2,7 mmol dm^{-3}, pH = 7,4) decimalnim razrijeđenjima do razrijeđenja 10^{-6}. 100 μL razrijeđenja 10^{-4}, zatim 10^{-5} i 10^{-6} nasađeni su na krute hranjive podloge i kulture su uzgajane 16 h pri 37 °C. Sljedeći dan su izbrojene kolonije na pločama. U obzir su se uzimale samo ploče na kojima je broj kolonija bio od 30 do 300. Koncentracije valina i norvalina koje su se dodale bakterijama su bile relativne s obzirom na ranije određene IC50 vrijednosti: dodana je koncentracija koja odgovara 10 puta većoj koncentraciji od ranije određene IC50 vrijednosti, što je za valin bilo 18,9 mmol dm^{-3}, a za norvalin 5,8 mmol dm^{-3}.

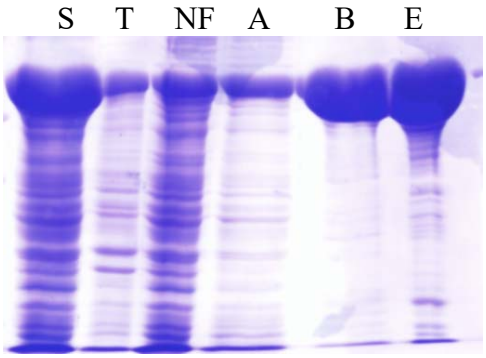
4. Rezultati

4.1. Proizvodnja i pročišćavanje IleRS, ValRS i LeuRS

4.1.1. Proizvodnja i pročišćavanje izoleucil- i valil-tRNA-sintetaze iz bakterije Escherichia coli

Proteini IleRS i ValRS, divlji tipovi i mutirane varijante proizvedene su pomoću rekombinantnih ekspresijskih vektora sustava pET koje su ustupile dr. sc. Morana Dulić i dr. sc. Nevena Cvetešić. Iznimka je 10SAla IleRS, za kojeg je rekombinantni ekspresijski vektor proizveden u sklopu ove disertacije. Proteini IleRS su eksprimirani s vektora pET22, a ValRS i 10SAla IleRS proteini s vektora pET28. Svi proteini su klonirani tako da im je na N-kraju heksahistidinski privjesak. Vektori su elektroporirani u soj bakterije *E. coli* BL21 (DE3), a ekspresija je inducirana dodatkom IPTG-a. Proteini su nakon ekspresije pročišćeni afinitetnom kromatografijom kako je ranije opisano, nakon čega su u pravilu bili spremni za korištenje u kinetičkim eksperimentima. Svi proteini su nakon pročišćavanja prvotno provjereni SDS-PAGE elektroforezom. Na Slici 4.1 je prikazano standardno pročišćavanje proteina IleRS iz bakterije *E. coli* (divljeg tipa). Iz slike je vidljiva prekomjerna ekspresija proteina. Također se uočava da se najveći dio proteina nalazi u supernatantu nakon soniciranja, iako se dio proteina nalazi i u talogu. SDS-PAGE elektroforeza za mutante IleRS i proteine ValRS izgleda jednako. Proteini ValRS (divlji tip i mutant D286A) supročistili su se s aminoacil-adenilatom (valil-adenilatom), zbog čega ih nije moguće rabiti u uvjetima jednog obrtaja enzima u prisustvu nepripadnih aminokiselina. Supročišćavanje je primjećeno u kontrolnoj reakciji prijenosa aminokisleine na [^{32}P]tRNA^{Val} u reakciji u koju nije dodana aminokiselina niti ATP. Kako je kod ovakve reakcije došlo do prijenosa aminokiseline na tRNA (podaci nisu prikazani), potvrđeno je da je enzim supročišćen s aminoacil-adenilatom. Za uklanjanje aa-AMP iz sintetskog mjesta, enzim je inkubiran s tRNA^{Val} u puferu za aminoaciliranje (sastav naveden u Metodama), te je reakcija provedena kako je opisano u Metodama. U tim uvjetima je došlo do prijenosa aktiviranog valina na tRNA^{Val}. Reakcijskoj smjesi se nakon prijenosa dodao pufer s NaCl i urejom, da bi se dokinule interakcije između enzima i supstrata odnosno produkata reakcije. Protein je podvrgnut afinitetnoj kromatografiji na Ni-NTA agarozi, čime je pročišćen, dok su svi ostali produkti reakcije su isprani s kolone. Protein je nakon pročišćavanja provjeren, te je bio aktivan. Reakcijom prijenosa aminokiseline na tRNA bez dodatka aminokiseline i bez dodatka ATP-a s kojom nakon pročišćavanja nije bio vidljiv prijenos potvrđeno se da poročišćeni protein nije imao na sebi vezan aminoacil-adenilat. Svi pročišćeni proteini su nakon

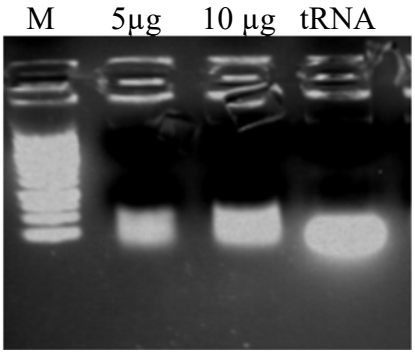
toga provjereni u pripadnom aminoaciliranju uz aminokiselinu obilježenu s [^{14}C]. Svi dobiveni parametri su odgovarali ranije objavljenim parametrima[7].



Slika 4.1: SDS-PAGE analiza pročišćavanja divljeg tipa IleRS iz bakterije *E. coli*. S: supernatant nakon sonikacije, T: talog nakon sonikacije, NF: frakcija nevezana na kolonu, A, B: 1. i 2. ispiranje, E: eluat.

4.1.1.1. *Proizvodnja i pročišćavanje 10SAla izoleucil-tRNA-sintetaze*

Bakterijski soj *E. coli* 10SAla je ustupljen od dr. Paula Schimmela. Soj je varijanta standardnog laboratorijskog soja MG1655, s nizom mutacija u genu za IleRS (*ileS*) – deset aminokiselina u domeni za popravak pogreške izmijenjeno je u alanin, zbog čega takav protein nema popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline. S ciljem kinetičke karakterizacije proteina *in vitro*, izolirana je genomska DNA soja, a mutirani gen za IleRS je specifično umnožen reakcijom PCR, te kloniran u ekspresijski vektor pET28b tako da rekombinantni protein na N-kraju sadrži heksahistidinski privjesak. Nastali rekombinantni vektor je sekvenciran, i potvrđeno je da soj ima mutaciju u alanine na mjestima od 241 do 250. Rekombinantni vektor s genom za 10SAla IleRS elektroporiran je u BL21 (DE3) bakterijski soj *E. coli*. 10SAla IleRS je eksprimiran kako je ranije opisano, te je pročišćen afinitetnom kromatografijom. Nakon pročišćavanja protein je na sebi imao vezanu značajnu količinu tRNA (Slika 4.2), te je zato podvrgnut dodatnom koraku pročišćavanja gel-filtracijskom kromatografijom, kako je opisano u poglavlju 3.2.2.3. Nakon gel-filtracijske kromatografije, protein na sebi nije imao vezanu tRNA.



Slika 4.2: Elektroforeza u gelu agaroze 5 i 10 µg proteina 10SAla IleRS, uz 1,5 µg $tRNA^{Ile}$ kao kontrolu, i marker molekulskih veličina (M).

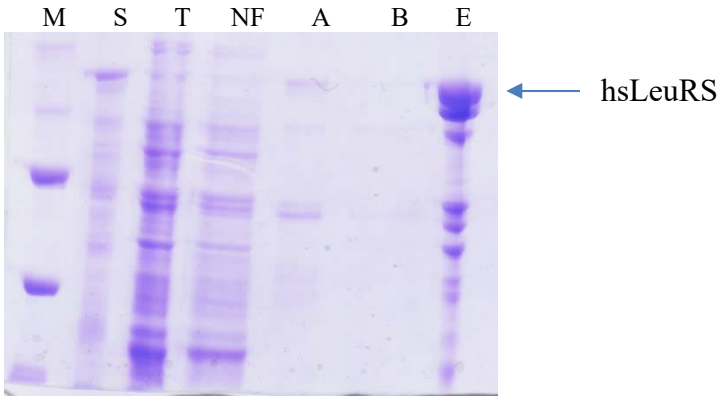
4.1.1.1.1 Testiranje aktivnosti IleRS 10SAla

Protein je nakon finalnog pročišćavanja provjeren u reakciji aminoaciliranja s [^{14}C] izoleucinom. Protein je aminoacilirao $tRNA^{Ile}$ pripadnim izoleucinom s opaženim koeficijentom brzine iznosa k_{obs} = 0,3 s^{-1}. S ciljem optimiziranja aktivnosti, ispitano je aminoaciliranje u prisustvu i odsustvu NH_4Cl (c = 150 mmol dm^{-3}). Veća aktivnost nije postignuta, odnosno 10SAla IleRS je pokazivao nižu aktivnost u odsustvu NH_4Cl (k_{obs} = 0,15 s^{-1}), pa je u daljnjim kinetičkim analizama korišten pufer s NH_4Cl. Aktivnost proteina je testirana i u aminoaciliranju uz [^{32}P], i to s Nva, Val i Ile. Pokazano je da mutirani protein aminoacilira i pogrešno aminoacilira tRNA sa svim navedenim aminokiselinama. Koeficijenti brzine pogrešne aminoacilacije odnosno aminoacilacije su uz sve tri aminokiseline bili jednaki i iznosili su k_{obs}(Ile) = k_{obs}(Val) = k_{obs} (Nva) = 0,4 s^{-1}.

4.1.2. Proizvodnja i pročišćavanje leucil-tRNA-sintetaze iz Homo sapiens

Citosolni gen za leucil-tRNA-sintetazu iz *Homo sapiens* naručen je iz cDNA baze *Kazusa*. Gen je sa standardnog visokokopijskog plazmida umnožen reakcijom PCR-a pomoću početnica s restrikcijskim mjestima za NdeI i HindIII. Produkt PCR reakcije je razgrađen navedenim restrikcijskim enzimima i kloniran u ekspresijski vektor pET28b kako bi rekombinantni protein na N-kraju imao heksahistidinski privjesak. Ovako konstruiran ekspresijski vektor je pomoću elektroporacije unesen u bakteriju *E. coli*, soj Rosetta. Ovaj soj je pogodan za ekspresiju eukariotskih proteina jer sadrži pRARE plazmid s genima koji kodiraju za izoakceptore tRNA rijetko korištene u *E. coli*. Ekspresija proteina je inducirana dodatkom IPTG-a, a protein je pročišćen standardnom afinitetnom kromatografijom kao što je opisano u Metodama. Prilikom prevođenja proteina u standardni pufer za skladištenje (Tris-HCl c = 20 mmol dm^{-3}, pH = 7,5,

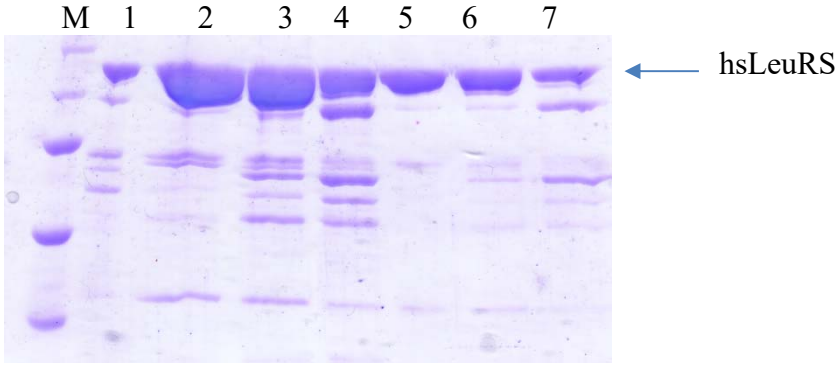
NaCl c = 50 mmol dm^{-3}, β-merkaptoetanol c = 5 mmol dm^{-3}, glicerol (φ = 10 %), primijećeno je da se gotovo sav protein istaložio u crijevu za dijalizu. Obzirom da je navedeno znak agregacije, povećana je koncentracija soli u puferu za skladištenje kako bi se spriječile intramolekulske interakcije i time agregacija. U konačnici je korišten pufer sastava NaCl (c = 300 mmol dm^{-3}), natrijev fosfat (pH = 7,2, c = 20 mmol dm^{-3}), β-merkaptoetanol (c = 10 mmol dm^{-3}) i glicerol (φ = 10 %), te protein nije dijaliziran već je preveden u pufer za skladištenje gel-filtracijom na PD-10 kolonici kako bi se izbjegla duga inkubacija koja je potrebna pri dijalizi. Konačna analiza elektroforezom u gelu SDS-poliakrilamida pročišćenog proteina pokazala je da protein nije sasvim pročišćen od ostalih staničnih proteina (Slika 4.3). Vidljivo je da dolazi do prekomjerne ekspresije proteina, ali značajno manje nego kod ekspresije IleRS i ValRS. Većina proteina je u supernatanu nakon soniciranja, ali mali dio odlazi i u talog. Vidljivo je da u eluatu postoji niz drugih manjih proteina uz hsLeuRS.



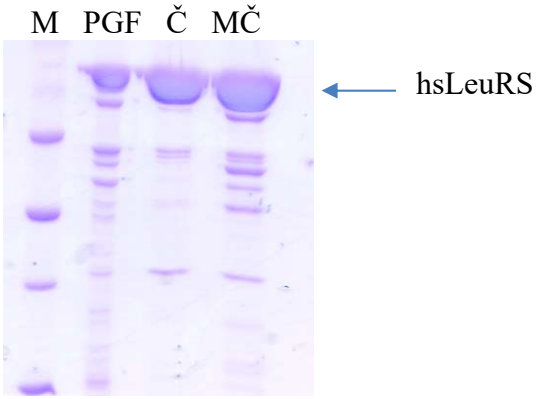
Slika 4.3: SDS-PAGE pročišćavanja hsLeuRS. S: supernatant nakon sonikacije, T: talog nakon sonikacije, NF: nevezana frakcija, A, B: 1. i 2. ispiranje, E: eluat.

Niži prinos, kao i stvaranje proteinskih agregata tijekom pročišćavanja upućuju na nižu stabilnost hsLeuRS proteina proizvedenog u bakteriji *E. coli*. Također, analizom denaturiranog proteina elektroforezom u gelu agaroze, primijećena je značajna količina tRNA u uzorku, koja se na protein vezala prilikom prekomjerne ekspresije u bakteriji *E. coli*. Za dodatno pročišćavanje i uklanjanje supročišćene tRNA, protein je inkubiran 30 min pri 4 ºC u puferu s NaCl (c = 2 mol dm^{-3}; ostatak kao pufer za skladištenje natrijev fosfat (pH = 7,2, c = 20 mmol dm^{-3}), β-merkaptoetanol (c = 10 mmol dm^{-3}) i glicerol (φ = 10 %), kako bi se narušile interakcije između hsLeuRS i drugih proteina te hsLeuRS i tRNA, te je ponovno pročišćen gel-filtracijskom kromatografijom, pri čemu je korišten isti pufer s NaCl (c = 2 mol dm^{-3}) u kojem je protein inkubiran. Protein je u kromatografskom puferu bio stabilan, odnosno nije dolazilo do taloženja. Frakcije pročišćavanja su analizirane elektroforezom u gelu SDS-poliakrilamida. Uočljivo je da pojedine frakcije sadrže veći udio hsLeuRS, odnosno sadržavaju manje ostalih

staničnih proteina (Slika 4.4). Skupljene frakcije su spojene u dva uzorka hsLeuRS: hsLeuRS veće čistoće i hsLeuRS manje čistoće, pri čemu je čistoća definirana procjenom prisustva ostalih proteina u frakciji hsLeuRS (Slika 4.5). Uzorci hsLeuRS su zasebno prevedeni u pufer za skladištenje pomoću PD-10 kolonica. Izmjerena koncentracija na NanoDrop spektrofotometru pokazala je da čišći proteinski uzorak ima omjer $A_{260/280}$ 1,12, dok je omjer manje čistog prikladniji te iznosi 0,6. Viši omjer upućuje na prisustvo nukleinskih kiselina u uzorku proteina[95]. Obje frakcije su analizirane na agaroznom gelu i nisu imale vezane tRNA. Zaključak je da je čišća frakcija na sebi imala vezane AMP, aa-AMP ili ATP, koji se ne može ukloniti. Konačni prinos proteina iz 2 L medija je iznosio 0,5 mg uzorka hsLeuRS veće čistoće, i 0,6 mg uzorka hsLeuRS manje čistoće.



Slika 4.4: SDS-PAGE nakon gel-filtracije hsLeuRS. U "čišću" frakciju su skupljeni 2., 5. i 6. , a u "manje čistu" frakciju 3., 4., i 7. uzorak.

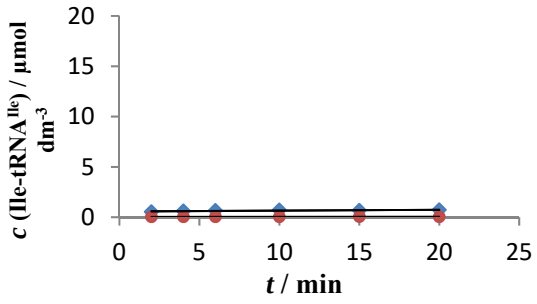


Slika 4.5: SDS-PAGE hsLeuRS. Usporedni prikaz uzoraka prije i nakon gel-filtracijske kromatografije. Slika prikazuje razlike u čistoći dviju skupljenih frakcija, u uzorku manje čistoće prisutno je više supročišćenih proteina. M: marker molekulskih veličina, PGF: uzorak prije gel-filtracije, Č: čišća frakcija, MČ: manje čista frakcija.

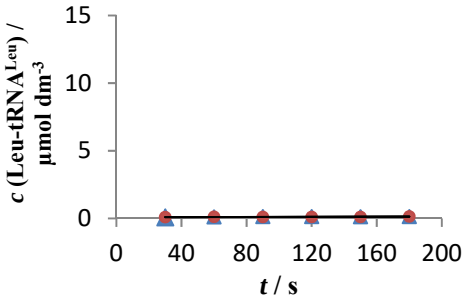
4.1.2.1. *Provjera aktivnosti hsLeuRS nakon pročišćavanja*

Prekomjerna ekspresija proteina u bakteriji *E. coli* se često koristi za ekspresiju eukariotskih proteina, međutim zbog opterećenja staničnog translacijskog aparata te nedostatka mašinerije za posttranslacijske modifikacije koje su često prisutne kod eukariotskih proteina, moguć je

nastanak nefunkcionalnih proteina ili proteina smanjene funkcionalnosti. S ciljem provjere aktivnosti hsLeuRS, najprije je napravljeno aminoaciliranje $tRNA^{Leu}$ iz bakterije *E. coli* jer su ranija istraživanja pokazala da hsLeuRS može aminoacilirati $tRNA^{Leu}$ iz bakterije *E. coli*[90]. Ovakvo heterologno aminoaciliranje je opravdano kao test funkcionalnosti obzirom da je u laboratoriju prethodno pripremljena $tRNA^{Leu}$ iz bakterije *E. coli* visoke aktivnosti, dok bez detaljne provjere aktivnosti *H. sapiens* $tRNA^{Leu}$ (koje je moguće jedino s aktivnim hsLeuRS), homologna tRNA ne može služiti kao test aktivnosti proteina. Međutim, u testu aktivnosti proteina aminoaciliranjem uz [^{14}C] leucin i $tRNA^{Leu}$ iz bakterije *E. coli,* nije došlo do aminoaciliranja. Rezultat se može protumačiti ili inaktivnošću enzima, ili posljedicom korištenja drugog izoakceptora $tRNA^{Leu}$ u odnosu na onaj za koji je pokazana aktivnost u heterolognom aminoaciliranju. Aktivnost hsLeuRS je nakon gel-filtracije iz tog razloga provjerena reakcijom aktivacije leucina metodom izmjene ATP-PP_i, u uvjetima zasićenja s leucinom (procijenjeno prema publiciranim kinetičkim parametrima). U aktivaciji su provjerene obje frakcije hsLeuRS dobivene gel-filtracijom. Interesantno je da je frakcija koja je u elektroforezi u gelu SDS-poliakrilamida izgledala čišća pokazala značajno manju aktivnost od frakcije proteina manje čistoće (k_{obs}(hsLeuRS, čišći) = 1 s^{-1}, k_{obs}(hsLeuRS manje čisti) = 6 s^{-1}). Obzirom da nije bilo moguće proizvesti aktivni protein veće čistoće, provedeni su testovi za utvrđivanje aktivnosti supročišćenih proteina, odnosno testirano je koliko je proizvedeni hsLeuRS upotrebljiv za osnovne kinetičke testove. Naime, na kinetičke rezultate može značajno utjecati aktivnost proteina koji se supročišćavaju s hsLeuRS, pogotovo ukoliko je nativna aaRS iz bakterije *E. coli* supročišćena. Najviše kinetičkih artefakata bi pritom mogle uzrokovati kontaminacije s nativnim IleRS i LeuRS iz bakterije *E. coli*, obzirom da je cilj ispitati sposobnost hsLeuRS u diskriminaciji izoleucina. Iz tog razloga, provjereno je amioaciliranje s [^{14}C] leucinom i izoleucinom, i to s $tRNA^{Leu}$, odnosno $tRNA^{Ile}$ iz bakterije *E. coli*. Nije došlo do aminoaciliranja ni u jednom slučaju, iz čega se može zaključiti da supročišćeni proteini neće utjecati na podatke dobivene u reakcijama s hsLeuRS (Slika 4.6 i Slika 4.7).



Slika 4.6: Aminoaciliranje s hsLeuRS uz supstrat Ile i $tRNA^{Ile}$ iz bakterije *E. coli* (Plavi simboli). Ne dolazi do aminoaciliranja. Crveni simboli predstavljaju kontrolnu reakciju aminoaciliranja bez dodatne $tRNA^{Ile}$. Reakcije su mjerene u uvjetima ustaljenog stanja.



Slika 4.7: Aminoaciliranje s hsLeuRS uz supstrat Leu i $tRNA^{Leu}$ iz bakterije *E. coli* (Plavi simboli). Ne dolazi do aminoaciliranja. Crveni simboli predstavljaju kontrolnu reakciju aminoaciliranja bez dodane tRNA. Reakcije su mjerene u uvjetima ustaljenog stanja.

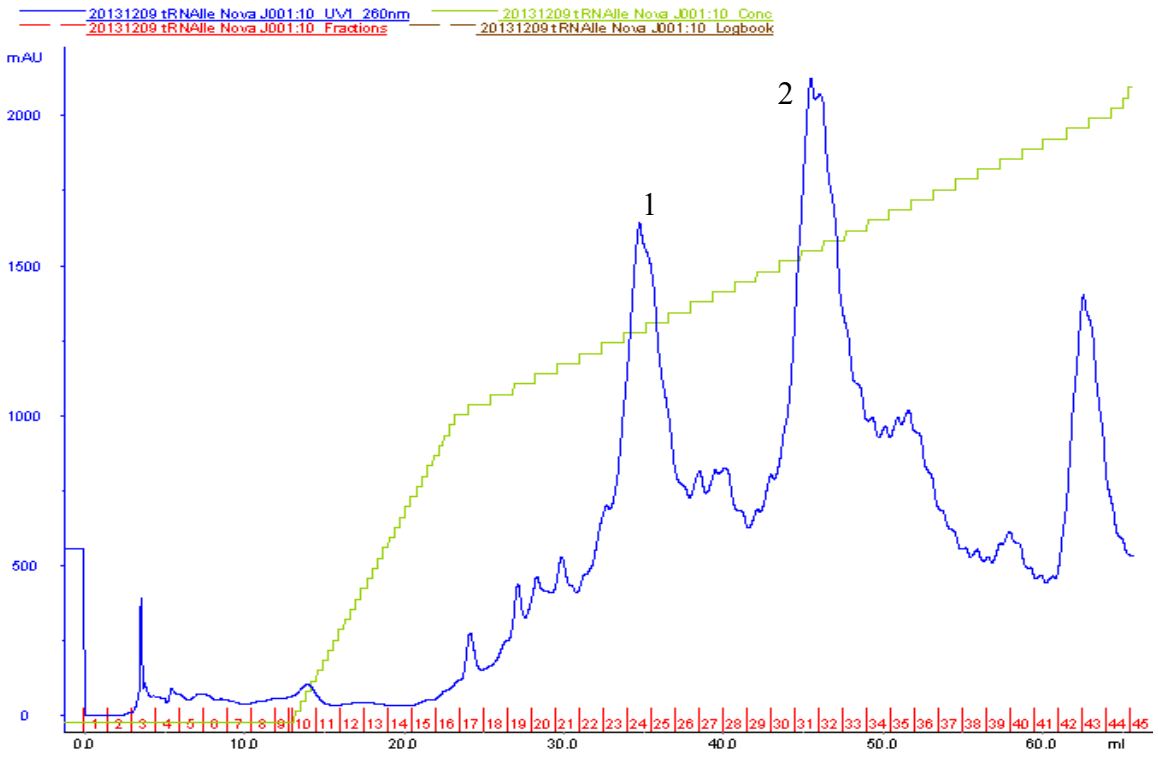
Kao zadnja provjera aktivnosti enzima, nakon pročišćavanja $tRNA^{Leu}$ iz *H. sapiens* proizvedene prekomjernom ekspresijom u bakteriji *E. coli* (opisano u poglavlju 3.2.1.5), napravljeno je aminoaciliranje uz [^{14}C] leucin s aktivnijom preparacijom enzima (aktivnijom prema rezultatima aktivacije leucina). Određen je koeficijent brzine reakcije za reakciju aminoaciliranja leucinom u iznosu k_{obs} = 0,48 ± 0,03 s^{-1} (srednja vrijednost i standardna pogreška određeni su iz tri neovisna eksperimenta, korišten je CAA izoakceptor $tRNA^{Leu}$), što je konačna potvrda funkcionalnosti pripremljenog hsLeuRS. Ranije publicirani podaci za aminoaciliranje enzimom koji je proizveden u bakteriji *E. coli* aminoaciliraju *in vitro* transkript $tRNA^{Leu}$ s k_{cat} = 0,33 ± 0,01 s^{-1}, a *in vivo* prekomjerno eksprimiranu $tRNA^{Leu}$ s k_{cat} = 2,56 ± 0,2 s^{-1} [90]. Iz toga je vidljivo da vrijednost odgovara ranije dobivenim vrijednostima, a razlika u aktivnosti vjerojatno je posljedica različite kvalitete korištene tRNA ili razlika u korištenom izoakceptoru.

4.2. Proizvodnja i pročišćavanje tRNA

4.2.1. Proizvodnja i pročišćavanje $tRNA^{Ile}$ i $tRNA^{Val}$

$tRNA^{Ile}$ i $tRNA^{Val}$ iz bakterije *E. coli* su proizvedene ekspresijom s rekombinantnih ekspresijskih vektora ΔpET3 (ustupila dr. Nevena Cvetešić). Plazmidi su elektroporirani u bakterijski soj BL21 (DE3), a ekspresija je potaknuta pomoću IPTG-a, kako je opisano u poglavlju 3.2.1.5. Ukupna stanična tRNA s prekomjerno eksprimiranom $tRNA^{Ile}$ ili $tRNA^{Val}$ pročišćena je standardnim postupkom pomoću fenol-kloroforma, nakon čega je tRNA pretaložena i dijalizirana prema redestiliranoj vodi. $tRNA^{Val}$ je nakon pročišćavanja bila spremna za korištenje, obzirom da je određena akceptorska aktivnost $tRNA^{Val}$ iznosila preko 80 %. Akceptorska aktivnost $tRNA^{Ile}$ je nakon pročišćavanja bila niska (30-40 %), pa je $tRNA^{Ile}$ podvrgnuta daljnjem koraku pročišćavanja kromatografijom obrnutih faza. Nakon kromatografije, prikupljene frakcije (vrh 2, frakcije 30 do 33) su testirane u reakcijama

aminoaciliranja, te su spojene one frakcije čija je akceptorska aktivnost bila dovoljno visoka (preko 70 %). Vrh 1 (Slika 4.8) sadrži tRNA slabe aktivnosti, vjerojatno nepotpuno modificirane $tRNA^{Ile}$, što je od ranije poznato, pa te frakcije nisu ni skupljane[98]. Nepotpuno modificirane tRNA, koje vjerojatno čine vrh 1, posljedica su prekomjerne ekspresije tRNA *in vivo*, pri čemu dolazi do velikog opterećenja za stanični sustav za posttranskripcijsku doradu tRNA. Akceptorska aktivnost konačnog uzorka pročišćene $tRNA^{Ile}$ iznosila je 70-80 %.



Slika 4.8: Kromatogram preparativnog pročišćavanja $tRNA^{Ile}$ kromatografijom obrnutih faza, na koloni Jupiter C4 (*Phenomenex*). Zeleno je prikazana rastuća koncentracija pufera B koji sadrži etanol. Frakcije od 30 do 33 su skupljene i testirane u reakciji aminoaciliranja radi odabira onih koje imaju najveću akceptorsku aktivnost.

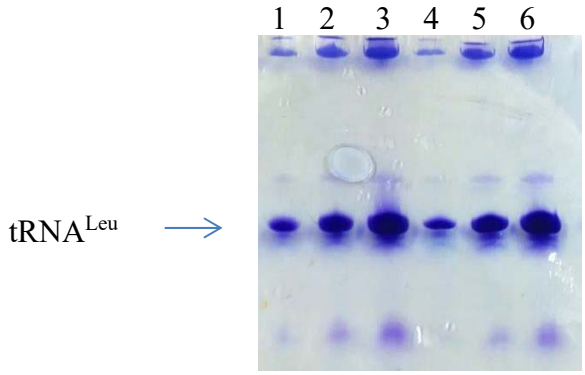
4.2.2. Proizvodnja i pročišćavanje nativne $tRNA^{Ile}$ iz bakterije E. coli

Gen za $tRNA^{Ile}$ koji je ukloniran u plazmid ΔpET3 i iz kojeg je pročišćena $tRNA^{Ile}$, ima mutaciju u prvom i zadnjem nukleotidu, radi bolje ekspresije pomoću T7 polimeraze. Prethodno je pokazano da je takva tRNA kinetički istovrijedna nativnoj tRNA. Međutim, provedeni testovi napravljeni su isključivo u uvjetima ustaljenog stanja, i to u reakciji ukupnog aminoaciliranja[34]. Obzirom na navedeno, moguće je da postoje razlike između tRNA te ovakve mutirane tRNA u drugim aktivnostima poput popravka pogreške ili reakciji prijenosa aminokiseline na tRNA. Kako je za potrebe ove disertacije potrebna veća količina tRNA, koju je lakše dobiti prekomjernom ekspresijom *in vivo*, opravdanost upotrebe mutirane tRNA ispitana je

kinetičkom usporedbom s nativnim izoakceptorom u testovima popravka pogreške i testovima u uvjetima jednog obrtaja enzima. Nativni izoakceptor $tRNA^{Ile}$ (izoakceptor GAU) pročišćen je iz bakterije *E. coli*, metodom afinitetne kromatografije s biotiniliranim oligonukleotidima. Biotinilirani oligonukleotidni slijed koji je komplementaran dijelu molekule $tRNA^{Ile}$ iz bakterije *E. coli* naručen je iz tvrtke *Macrogen* (Slika 3.4). Oligonukleotidi su vezani na kolonice sa streptavidinskom smolom, na taj način čineći afinitetnu kromatografsku matricu koja će specifično „vezati" $tRNA^{Ile}$ iz smjese ukupne tRNA iz bakterije *E. coli*. Korištena je komercijalno dostupna ukupna tRNA iz bakterije *E. coli* (*Roche*). Postupak pročišćavanja je detaljnije objašnjen u poglavlju 3.2.1.6. Nakon ovakvog pročišćavanja dobivna je $tRNA^{Ile}$ s visokom izoakceptorskom aktivnošću, preko 80 %. Ovakva tRNA je podvrgnuta kinetičkim testovima radi usporedbe s mutiranom $tRNA^{Ile}$ dobivene prekomjernom ekspresijom *in vivo*.

4.2.3. Proizvodnja i pročišćavanje $tRNA^{Leu}$ iz H. sapiens *prekomjerno eksprimirane u bakteriji* E. coli

Za potrebe ove doktorske disertacije, proizvedena su dva konstrukta $tRNA^{Leu}$ iz *Homo sapiens*, jedan česti (engl. *major*) CAG i jedan rijetki (engl. *minor*) CAA izoakceptor. Konstrukti su priređeni komplemntarnim sparivanjem dvaju oligonukleotidnih sljedova koji su kupljeni od kompanije *Macrogen*. Konstrukti su uklonirani u ekspresijski vektor ΔpET3a. Obje tRNA su metodom prekomjerne ekspresije u bakteriji *E. coli* priređene i pročišćene ekstrakcijom fenol-kloroformom kako je ranije objašnjeno. Navedenom metodom se zajedno s prekomjerno eksprimiranom $tRNA^{Leu}$ pročišćava i ukupna stanična bakterijska tRNA koja bi trebala činiti manji udio izolirane tRNA ukoliko je ciljna tRNA značajno prekomjerno eksprimirana. Na Slici 4.9 prikazana je analiza prekomjerne ekspresije $tRNA^{Leu}$. Vidljivo je da dolazi do prekomjerne ekspresije tRNA, i to oba izakceptora. Također, uspoređujući jažice 1 i 4, 2 i 5, i 3 i 6 koje predstavljaju jažice s ekvivalentom količinom uzoraka vidljivo je da se oba izoakceptora podjednako dobro eksprimiraju.



Slika 4.9: Denaturirajuća poliakrilamidna elektroforeza u gelu s urejom. Prikazana je analiza ukupne tRNA s prekomjerno eksprimiranom tRNA^{Leu}. Frakcije 1, 2 i 3 su izoakceptor CAA, a frakcije 4, 5 i 6 su izoakceptor CAG. Na gel su nanesene po 3 različite koncentracije tRNA, uzorci 1 i 4, 2 i 5 i 3 i 6 imaju jednaku količinu tRNA. Vidljivo je da se oba izakceptora jednako dobro eksprimiraju.

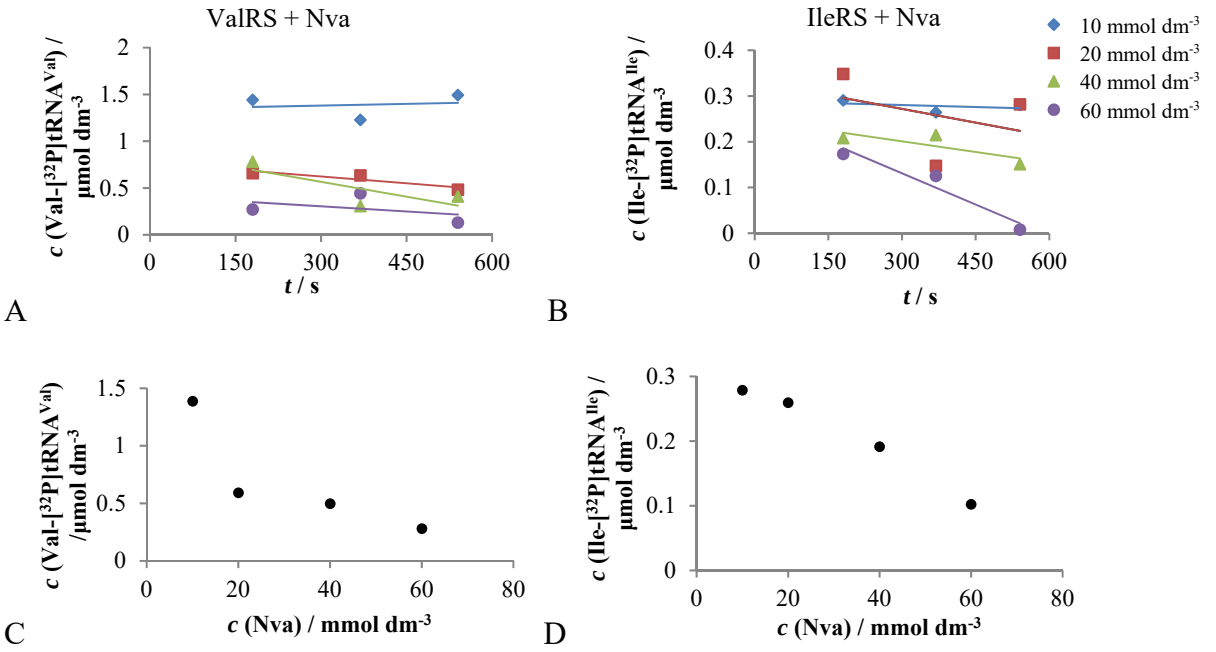
Prilikom prekomjerne ekspresije tRNA u bakterijskim stanicama, moguće je da u stanici ne postoje svi enzimi koji su potrebni za posttransripcijsku doradu željene tRNA, a također i zbog preopterećenja transkcripcijske mašinerije, moguće je da nisu sve molekule tRNA jednoliko modificirane. Unatoč tome, ekspresija *in vivo* i dalje je često bolji način proizvodnje od transkripcije *in vitro,* gdje se dobije potpuno nemodificirani transkript. Također, ekspresijom *in vivo* često se mogu dobiti značajno veće količine ciljne tRNA. Radi provjere aktivnosti pročišćene tRNA, određivana je akceptorska aktivnost dvaju izoakceptora, prema ranije opisanom protokolu. CAA, „minor" izoakceptor koji je napravljen prema slijedu publiciranom u Breitschoph i Gross 1994[96], pokazao je nešto bolju aktivnost od CAG („major") izoakceptora koji je napravljen prema genomskom slijedu iz tRNA baze podataka. CAA je imala akceptorsku aktivnost od 53 %, dok je CAG imala akceptorsku aktivnost od 45 %. Obzirom da pojedinim tRNA renaturacija pomaže u funkcionalnosti, testiran je standardni protokol renaturacije s obje pripremljene tRNA prema protokolu iz Metoda. Međutim, došlo je do nepovratnog taloženja obje isprobane tRNA odmah nakon dodatka $MgCl_2$. Zbog veće aktivnosti, u daljnjim eksperimentima je korištena tRNA^{Leu} CAA.

4.3. Provjera aminokiselina kao nepripadnih supstrata aminoacil-tRNA-sintetaza

Iz nedavnih istraživanja poznato je da se u komercijalno dostupnim preparacijama izoleucina koji je bio deklarirane čistoće iznosa 99,5 % nalazila vrlo mala količina leucina, koja je unatoč malom postotku u ukupnoj smjesi uzrokovala kinetičke artefakte te onemogućila određivanje točnih kinetičkih parametara. Iz tog razloga bilo je potrebno provjeriti prisustvo izoleucina i valina u preparaciji norvalina, obzirom da je cilj istraživanje diskriminacije norvalina s IleRS i ValRS enzimima. Za potrebe ranijih istraživanja dr. Morana Dulić je provjerila čistoću treonina

(nije prisutan valin) i valina (nije prisutan izoleucin). Provjera se temelji na određivanju ovisnosti akceptorske aktivnosti o povećanju koncentracije nepripadne aminokiseline u reakciji s divljim tipom enzima koji ima aktivan popravak pogreške, pa pritom ne bi smjelo doći do aminoacilacije nepripadnom aminokiselinom. Ako pritom dođe do linearnog porasta akceptorske aktivnosti, aminokiselina je kontaminirana pripadnom aminokiselinom, te se iz nagiba pravca može odrediti udio pripadne aminokiseline u nepripadnoj.

Iz rezultata (Slika 4.10) je vidljivo da ne dolazi do povećanja akceptorske aktivnosti u reakcijama s IleRS ni ValRS pri povećanju koncentracije norvalina, što bi bio slučaj da je kontaminiran bilo izoleucinom ili valinom. Rezultati sugeriraju da je norvalin zadovoljavajuće čistoće, te nema potrebe za dodatnim pročišćavanjem.



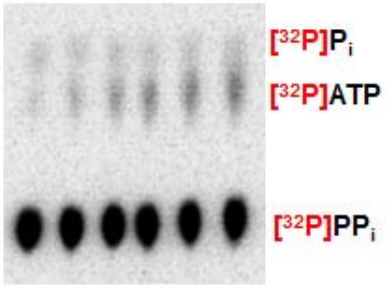
Slika 4.10: A) Akceptorske aktivnosti $tRNA^{Val}$ u tri vremenske točke i pri četiri koncentracije norvalina u reakciji kataliziranoj divljim tipom ValRS. B) Akceptorske aktivnosti $tRNA^{Ile}$ u tri vremenske točke i pri četiri koncentracije norvalina u reakciji kataliziranoj divljim tipom IleRS C) Ovisnost srednje vrijednosti akceptorskih aktivnosti $tRNA^{Val}$ u tri vremenske točke, o koncentraciji norvalina. D) Ovisnost srednje vrijednosti akceptorskih aktivnosti $tRNA^{Ile}$ u tri vremenske točke, o koncentraciji norvalina.

Izoleucin koji se koristio u reakcijama s LeuRS je komercijalni izoleucin koji je dodatno pročišćen do zanemarivih koncentracija leucina, kako je ranije objavljeno[14].

4.4. Diskriminacija nepripadnih aminokiselina u reakcijama aktivacije aminokiselina

4.4.1. Diskriminacija norvalina enzimima IleRS i ValRS iz bakterije E. coli

U sklopu ove disertacije provjerena je diskriminacija nepripadne aminokiseline norvalin u reakciji aktivacije s IleRS i ValRS. Aktivacija je napravljena s divljim tipovima navedenih enzima, kao i s mutantima enzima za popravak pogreške nakon prijenosa, D342A IleRS[106] i D286A ValRS. Aktivacija je mjerena standardnom metodom ATP/PP_i izmjene, kako je opisano u poglavlju 3.2.3.1. Pritom se prati povratna reakcije pirofosforolize, koja je funkcija napredne reakcije aktivacije aminokiselina jer ovisi o nastanku aminoacil-adenilata. U reakciji pirofosforolize iz [^{32}P]PP_i nastaje [^{32}P]ATP koji se kvantificira kao konačni produkt. Nakon zaustavljanja reakcija u određenim vremenskim razmacima, alikvoti zaustavljene reakcije se nanose na TLC pločice, gdje se supstrati i produkti razdvajaju uslijed razvijanja, a razvijene pločice se izlažu na zaslon s uskladištenim fosforom i kvantificiraju na uređaju *PhosphorImager Typhoon 9410*. Nakon razdvajanja moguće je odijeliti nastali [^{32}P]ATP, [^{32}P]PP_i i [^{32}P]P_i (Slika 4.11), denzitometrijski ih kvantificirati i iz ovisnosti koncentraciju nastalog ATP-a o vremenu mogu se dobiti brzine reakcije pri određenoj koncentraciji aminokiseline, a zatim korištenjem programa GraphPad Prism i k_{cat} i K_M nelinearnom regresijom iz Michaelis-Mentenine jednadžbe.



Slika 4.11: Pločica za tankoslojnu kromatografiju nakon razdvajanja supstrata produkata reakcije izmjene ATP-PP_i

IleRS divlji tip kao i mutant u mjestu za popravak pogreške nakon prijenosa uspješno aktiviraju norvalin (Tablica 4.1). ValRS enzimi, divlji tip i mutant u mjestu za popravak pogreške nakon prijenosa, slabije aktiviraju norvalin nego IleRS – k_{cat} je 10 puta niži pri aktivaciji norvalina s ValRS nego kod IleRS, a K_M je viši preko 10 puta. U tablici su izračunate i konstante specifičnosti: omjer k_{cat}/K_M, koji za enzime IleRS u prisutnosti Nva iznosi 50, a za ValRS u prisutnosti Nva iznosi 0,3.

Tablica 4.1: Kinetički parametri u aktivaciji aminokiseline norvalina enzimima IleRS divlji tip i mutant D342A i ValRS divlji tip i mutant D286A (iz bakterije *E. coli*). Reakcije su mjerene u uvjetima ustaljenog stanja. Prikazane su srednje vrijednosti tri neovisna eksperimenta i standardne pogreške.

Enzim	Supstrat	K_M(aa) / mmol dm^{-3}	k_{cat} / s^{-1}	k_{cat}/K_M / s^{-1} mmol^{-1} dm^3
IleRS divlji tip	Nva	0,82 ± 0,07	41 ± 1	50
IleRS D342A	Nva	0,67 ± 0,06	33,4 ± 0,8	50
ValRS divlji tip	Nva	14 ± 2	4,3 ± 0,2	0,3
ValRS D286A	Nva	10 ± 4	3,1 ± 0,4	0,3

Aktivacija je napravljena i za enzim 10SAla IleRS, i to aktivacija pripadnog izoleucina, i nepripadnih valina i norvalina. Rezultati su prikazani u Tablici 4.2. Vidljivo je da dolazi do aktivacije sve tri aminokiseline, a konstanta specifičnosti za valin i norvalin je gotovo jednaka. Uspoređujući aktivaciju norvalina divljim tipom IleRS s 10SAla IleRS vidljivo je da je konstanta specifičnosti značajno manja, što je doprinos za red veličine većeg K_M, ali i oko 3 puta slabijeg k_{cat}.

Tablica 4.2: Kinetički parametri u aktivaciji aminokiseline izoleucina, valina i norvalina enzimom 10SAla IleRS. Reakcije su mjerene u uvjetima ustaljenog stanja. Prikazane su srednje vrijednosti tri neovisna eksperimenta i standardne pogreške.

Enzim	Supstrat	K_M (aa) / mmol dm^{-3}	k_{cat} / s^{-1}	k_{cat}/K_M / s^{-1} mmol^{-1} dm^3
10SAla IleRS	Ile	0,018 ± 0,002	22,0 ± 0,5	1222
10SAla IleRS	Nva	3,3 ± 0,5	14,9 ± 0,6	4,52
10SAla IleRS	Val	3 ± 1	13 ± 1	4,18

4.4.2. Diskriminacija izoleucina i norvalina enzimom hsLeuRS

U sklopu ove disertacije određeni su parametri aktivacije izoleucina i norvalina, kao i pripadnog leucina s hsLeuRS. Unatoč tome što su parametri za hsLeuRS za aktivaciju od ranije poznati[90], u ovoj disertaciji preispitani su kinetički parametri koristeći čisti izoleucin, bez tragova leucina. Reakcija aktivacije je mjerena isto kao aktivacija IleRS i ValRS, kako je opisano u poglavlju 3.2.3.1.

Za kinetičke eksperimente je korištena „manje čista“ preparacija hsLeuRS, jer je u kontrolnim eksperimentima pokazala značajno veću aktivnost, blisku ranije publiciranoj aktivnosti. Svi eksperimenti aktivacije napravljeni su najmanje 3 puta. U Tablici 4.3 su prikazani kinetički parametri u aktivaciji enzimom hsLeuRS. Vidljivo je da enzim aktivira

pripadni leucin, ali i nepripadni norvalin. Prikazane su i konstante specifičnosti, a izračunat je i faktor diskriminacije, omjer konstanti specifičnosti za pripadni i nepripadni supstrat.

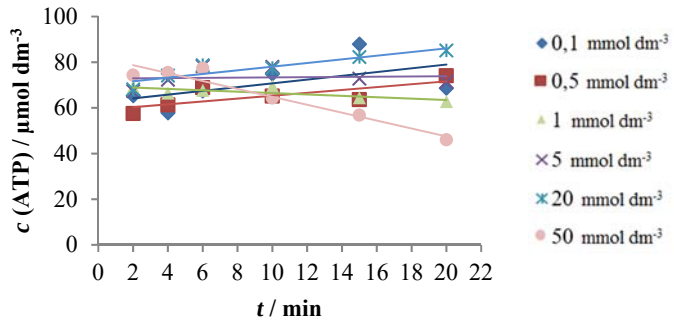
Tablica 4.3: Kinetički parametri u aktivaciji aminokiselina s hsLeuRS. Prikazana je srednja vrijednost tri neovisna mjerenja i standardna pogreška. Reakcije su mjerene u uvjetima ustaljenog stanja.

Supstrat	K_M / μmol dm^{-3}	k_{cat} / s^{-1}	k_{cat}/K_M / μmol^{-1} dm^3 s^{-1}	Faktor diskr.[a]
Leucin	90 ± 30	12 ± 2	0,13	1
Norvalin	(5 ± 1) ×10^3	3,6 ± 0,2	6,7×10^{-4}	192
Izoleucin	–[b]	–	–	–

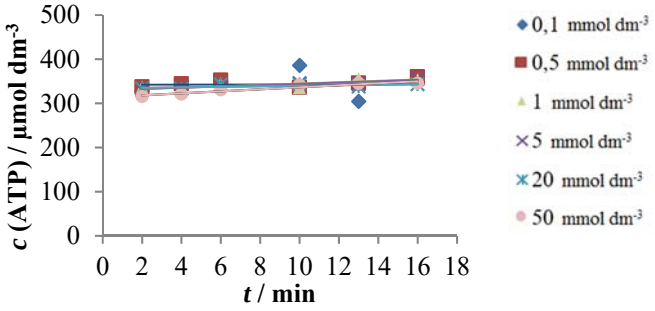
[a] Faktor diskriminacije: $(k_{cat}/K_M)_{leucin}/(k_{cat}/K_M)_{norvalin\ ili\ izoleucin}$
[b] Kinetičke parametre za aktivaciju izoleucina nije bilo moguće odrediti zbog izuzetno spore aktivacije

hsLeuRS je u reakciji aktivacije korišten u konačnoj koncentraciji iznosa c = 100 nmol dm^{-3}. Faktor diskriminacije norvalina, dobiven kao omjer vrijednosti k_{cat}/K_M za pripadnu (leucin) u odnosu na nepripadnu reakciju (norvalin) iznosi 192. Takav rezultat znači da hsLeuRS mora koristiti mehanizme popravka pogreške kako bi spriječio nastanak norvalilirane tRNA. U ovom radu nije primjećeno da dolazi do značajne aktivacije izoleucina, no ne može se isključiti da do aktivacije ipak dolazi, ali da je vrlo spora.

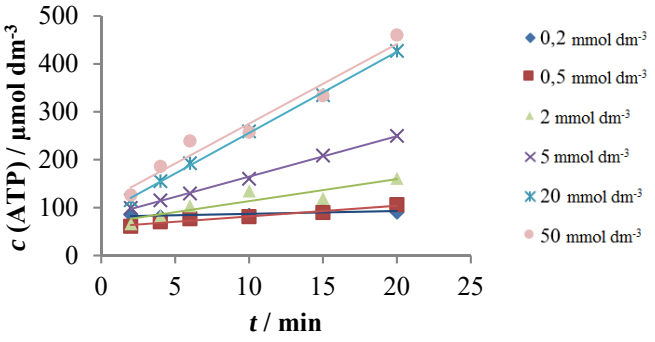
Iz dobivenih vremenskih ovisnosti je vidljivo da ne dolazi do vidljive aktivacije u ovom koncentracijskom rasponu ove aminokiseline, pa nije moguće dobiti smislene kinetičke parametre. Na Slici 4.12. su prikazani vremenski tijekovi reakcije izmjene pirofosfata u prisutnosti izoleucina. Vidljivo je da ne dolazi do aktivacije, odnosno pri povećanju koncentracije aminokiseline ne dolazi do povećanja brzine reakcije, odnosno nagiba pravaca koji opisuju nastanak produkta u vremenu. Radi kontrole napravljena je aktivacija s većom koncentracijom enzima, 500 nmol dm^{-3} hsLeuRS. Na Slici 4.13. su prikazani rezultati izmjene pirofosfata u tim uvjetima. Međutim, vidljivo je da opet ne dolazi do povećanja v_0 pri povećanju koncentracije supstrata, ali je odsječak pravaca pet puta veći u odnosu na rezultate s pet puta manjom koncentracijom enzima. Radi usporedbe, prikazani su i vremenski tijekovi reakcija aktivacije norvalina ovim enzimom (Slika 4.14), gdje je vidljivo da dolazi do povećanja početne brzine reakcije povećanjem koncentracije norvalina. Iz ovako određenih početnih brzina reakcija moguće je dobiti prikaz Michaelis-Menten te odrediti parametre k_{cat} i K_M (za aktivaciju norvalina) (Slika 4.15).



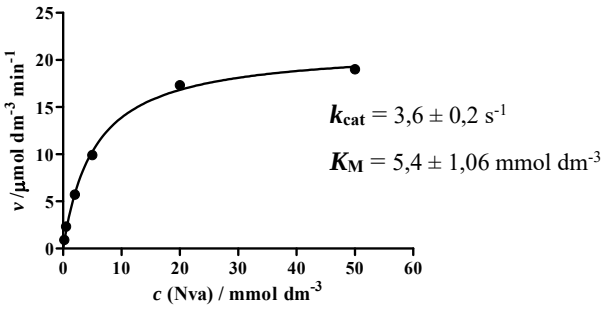
Slika 4.12: Vremenski tijekovi reakcije aktivacije izoleucina (jedan reprezentativni set). Prikazani su vremenski tijekovi pri šest različitih koncentracija izoleucina. Konačna koncentracija hsLeuRS je 100 nmol dm^{-3}. Povećanjem koncentracije aminokiseline nije došlo do povećanja brzine nastanka ATP-a. Reakcije su mjerene u uvjetima ustaljenog stanja.



Slika 4.13: Vremenski tijekovi reakcije aktivacije izoleucina. Prikazani su vremenski tijekovi pri šest različitih koncentracija izoleucina, uz korištenje hsLeuRS konačne koncentracije 500 nmol dm^{-3}. Povećanjem koncentracije aminokiseline nije došlo do povećanja brzine nastanka ATP-a. Reakcije su mjerene u uvjetima ustaljenog stanja.



Slika 4.14: Vremenski tijekovi reakcije aktivacije norvalina (jedan set). Prikazani su vremenski tijekovi pri šest različitih koncentracija aminokiseline. Povećanjem koncentracije aminokiseline povećavaju se nagibi pravca, odnosno raste v_0. Reakcije su mjerene u uvjetima ustaljenog stanja.



Slika 4.15: Michaelis-Mentetin prikaz ovisnosti početne brzine o koncentraciji supstrata (norvalina) u reakciji kataliziranoj enzimom hsLeuRS. Prikazana je srednja vrijednost tri neovisna mjerenja. Reakcije su mjerene u uvjetima ustaljenog stanja.

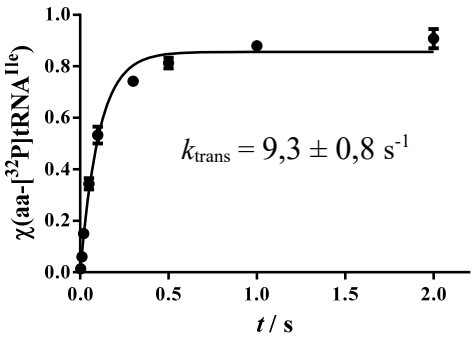
Odsječak je također vidljiv prilikom aktivacije norvalina (Slika 4.14), i odgovara iznosu odsječka vidljivog prilikom aktivacije izoleucina kada je u oba slučaja korišten 100 nmol dm^{-3} enzim. Odsječak se može objasniti prisustvom leucina supročišćenog u sintetskom mjestu hsLeuRS, obzirom da se proporcionalno povećava s rastom koncentracije hsLeuRS (Slika 4.14 i Slika 4.15). Međutim, kako je u pitanju reakcija u ustaljenom stanju s relativno niskom koncentracijom enzima, takva kontaminacija ne predstavlja problem pri mjerenju aktivacije za supstrate koje enzim katalizira sličnim koeficijentom brzine kao pripadni supstrat, jer se leucin iz sintetskog mjesta brzo oslobodi, a zbog male koncentracije u otopini se ne veže ponovno na enzim. U prilog tome idu reakcije mjerenja aktivacije izoleucina, gdje se nedvojbeno uočava da prisustvo tragova leucina u sintetskom mjestu ne doprinosi mjerenoj brzini, obzirom da su mjerene brzine u prisustvu izoleucina praktički jednake nuli, te da kontaminacija utječe samo na odsječak. Rezultat je logičan, jer je aktivacija leucina brza, te je leucin već prisutan u sintetskom mjestu enzima, što doprinosi većoj koncentraciji produkta u vremenu koje odgovara samom startu reakcije. Zbog korištenja enzima s tragovima leucina u sintetskom mjestu nije bilo moguće odrediti kinetičke parametre aktivacije izoleucina od strane hsLeuRS, međutim ne postojanje vidljive aktivacije u ovom radu ipak sugerira da su do sad publicirani podaci precijenjeni (k_{cat} = 0,1 do 0,3 s^{-1} [90, 107]).

4.5. Diskriminacija norvalina u koraku prijenosa na $tRNA^{Ile}$ i $tRNA^{Val}$ u reakcijama kataliziranim enzimima IleRS i ValRS

Drugi korak aminoacilacijske reakcije, prijenos aktivirane aminokiseline na 3'-kraj tRNA praćen je u reakcijama enzima IleRS i ValRS s nepripadnom aminokiselinom norvalinom. Zbog postojanja aktivnog popravka pogreške, nije moguće koristiti divlji tip enzima u ovoj reakciji, jer bi se mjerio prijenos aminokiseline na tRNA, te bi se nastala pogrešno aminoacilirana tRNA

brzo deacilirala. Iz tog razloga u ovakvom tipu reakcije (nepripadne) koristi se deacilacijski mutant, za IleRS D342A, a za ValRS D286A. Reakcija prijenosa napravljena je na instrumentu za brzo miješanje i zaustavljanje reakcije (engl. *Rapid Chemical Quench*). Kako je najsporiji korak ukupne reakcije aminoaciliranja kod aaRS razreda I otpuštanje produkta s enzima, reakcija prijenosa se izvodi u uvjetima jednog kruga enzima, tako da je enzim u suvišku u odnosu na druge reaktante. U jednoj reakcijskoj smjesi se pomiješaju ATP, pirofosfataza, aminokiselina i enzim u puferiranoj otopini, pa dolazi do formiranja kompleksa aktivirane aminokiseline i enzima, a reakcija prijenosa započinje miješanjem s tRNA. Reakcija se zaustavlja zakiseljavanjem natrijevim acetatom u određenim vremenskim točkama. Prikupljeni alikvoti reakcija tretiraju se nukleazom P1 koja odcjepljuje krajnji adenozin, i produkti razgradnje se nanose na TLC pločicu, i razdvajaju i kvantificiraju kako je ranije opisano. Podaci nastanka produkta (aminoacilirane, odnosno pogrešno aminoacilirane tRNA) u vremenu utočnjeni su na eksponencijalnu jednadžbu pomoću programa GraphPad Prism.

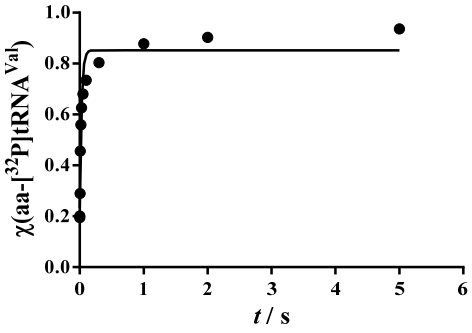
Rezultati prijenosa norvalina na $tRNA^{Ile}$ u reakciji kataliziranoj enzimom IleRS D342A pokazuju da je koeficijent brzine prijenosa norvalina $tRNA^{Ile}$ $k_{trans} = 9{,}3 \pm 0{,}8\ s^{-1}$ (iz tri neovisna eksperimenta) (Slika 4.16). Rezultati odgovaraju prethodno publiciranim koeficijentima brzine prijenosa nepripadnog valina[7, 73].



Slika 4.16: Prijenos norvalina na $tRNA^{Ile}$. Prikazana je srednja vrijednost tri neovisna mjerenja i standardna pogreška.

Prijenos norvalina na $tRNA^{Val}$ napravljen je također s deacilacijskim mutantom enzima, a za ValRS to je D286A. Kako se dobiveni podaci nisu dobro utočnili na monoeksponencijalnu jednadžbu (Slika 4.17), podaci su utočnjeni na bieksponencijalnu jednadžbu:

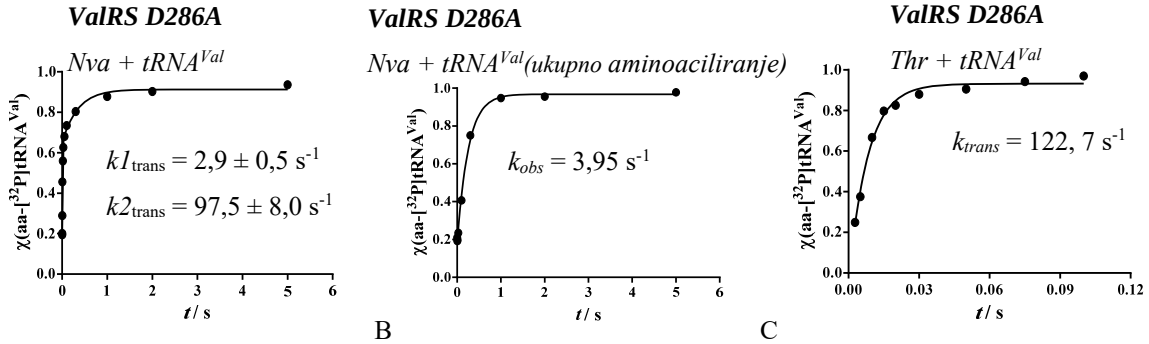
$$y = Y_0 + A1 \times (1 - e^{-k1_{trans} \times t}) + A2 \times (1 - e^{-k2_{trans} \times t})$$



Slika 4.17: Prijenos norvalina na tRNA^{Val}. Prikazan je pokušaj utočnjavanja na monoeksponencijalnu jednadžbu.

Iz bieksponencijalne funkcije su dobivena dva koeficijenta brzine (Slika 4.18 A).

Zbog pretpostavke da je prva sporija faza posljedica sporije aktivacije, odnosno da je ono što se mjeri aktivacija norvalina, a ne prijenos, napravljena je kontrola tako da je napravljen eksperiment ukupnog aminoaciliranja na instrumentu za brzo miješanje i zaustavljanje reakcije (Slika 4.18 B). Zasebno su pomiješani svi reaktanti potrebni za reakciju aminoaciliranja (ValRS D286A, tRNA, pufer, ATP, pirofosfataza), a reakcija je pokrenuta dodatkom norvalina. Dobiveni rezultati su utočnjeni na monoeksponencijalnu krivulju. Iz rezultata je vidljivo da koeficijent brzine ukupnog aminoaciliranja odgovara jednom od koeficijenata dobivenih prilikom mjerenja izoliranog prijenosa norvalina, te odgovara brzini aktivacije dobivenoj reakcijom izmjene pirofosfata. Iz navedenog se može zaključiti da je sporiji koeficijent brzine dobiven mjerenjem prijenosa zapravo koeficijent brzine aktivacije norvalina. Izmjeren je i prijenos treonina na tRNA^{Val} (Slika 4.17 C)



Slika 4.18: A) Prijenos norvalina na tRNA^{Val}. Prikazana je srednja vrijednost tri neovisna mjerenja i standardna pogreška. Krivulja je utočnjena na bieksponencijalnu jednadžbu B) Ukupno norvaliliranje mjereno u uvjetima jednog obrtaja enzima. C) Prijenos treonina na tRNA^{Val}. Krivulja je utočnjena na monoeksponencijalnu jednadžbu

Prijenos treonina je brz što odgovara ranije publiciranim podacima[7], te obzirom da je aktivacija treonina brza, vidi se samo jedna faza u mjerenju prijenosa treonina. Rezultat potvrđuje da

postojanje dvije faze pri mjerenju prijenosa norvalina na $tRNA^{Val}$ nije posljedica postojanja dviju frakcija $tRNA^{Val}$ ili enzima različite funkcionalnosti.

4.6. Ukupni popravak pogreške enzima IleRS i ValRS iz bakterije *E. coli*

Od ranije je poznato da enzimi IleRS, ValRS i LeuRS koriste hidrolitičke mehanizme popravka pogreške kako bi spriječili ugradnju valina, treonina odnosno norvalina u proteom umjesto izoleucina, valina odnosno leucina. Pokazano je da ovi enzimi koriste popravak pogreške prije prijenosa (tRNA-neovisni, a IleRS iz bakterije *E. coli* i tRNA-ovisni), ali i popravak pogreške nakon prijenosa. Mjerenjem ukupnog popravka pogreške mjeri se popravak prije i poslije prijenosa aminokiseline u prisutnosti nepripadnog supstrata. Reakcija mjerenja ukupnog popravka pogreške se temelji na mjerenju utroška ATP-a pri reakciji aminoaciliranja uz nepripadnu aminokiselinu. Pri tome se ATP troši pri aktivaciji aminokiseline, i ako dođe do popravka pogreške ne nastaje aminoacilirana tRNA, a zamjećuje se pojačani utrošak ATP-a. U reakciji mjerenja ukupnog popravka pogreške kvantificira se udio ATP-a koji je preveden u AMP. ATP se naravno troši i pri aminoaciliranju, međutim znak popravka pogreške je nakupljanje AMP-a do koncentracija koje značajno premašuju koncentraciju tRNA u reakciji. U okviru ovog istraživanja napravljeni su eksperimenti utroška ATP-a s divljim tipom enzima IleRS i ValRS, u prisustvu norvalina. Eksperimenti su napravljeni uz koncentracijski raspon norvalina, a dobivene početne brzine reakcije su utočnjene na Michaelis-Menteninu jednadžbu u programu GraphPad Prism. Dobiveni rezultati su prikazani u Tablici 4.4, a pokazuju da kod ovih dvaju enzima postoji aktivan popravak pogreške uz norvalin kao supstrat, s time da je ValRS oko četiri puta manje aktivan od IleRS-a.

Tablica 4.4: Kinetički parametri ukupnog popravka pogreške norvalina u reakcijama i IleRS i ValRS. Prikazane su srednje vrijednosti 3 neovisna eksperimenta i standardna pogreška. Reakcije su mjerene u uvjetima ustaljenog stanja.

Enzim	K_M / mmol dm^{-3}	k_{cat} / s^{-1}	k_{cat}/K_M / $mmol^{-1}$ dm^3 s^{-1}
IleRS divlji tip	12 ± 1	3,7 ± 0,1	0,3
ValRS divlji tip	8 ± 1	0,63 ± 0,03	0,08

4.7. Popravak pogreške prije prijenosa

4.7.1. tRNA-neovisni popravak pogreške prije prijenosa norvalina za enzime IleRS i ValRS

U okviru ove disertacije okarakterizirani su mehanizmi popravka pogreške enzima IleRS i ValRS uz supstrat norvalin. Prvo je mjeren tRNA-neovisni popravak pogreške prije prijenosa,

za kojeg se zna da ga većina enzima ima, ali je vrlo slabe aktivnosti te time čini vrlo mali udio u ukupnom popravku pogreške. Za određivanje ovog tipa popravka reakcija se izvodi isto kao u određivanju ukupnog popravka pogreške, osim što se u reakciju ne dodaje tRNA, pa ne može doći do aminoaciliranja. Tako sav ATP koji se utroši dolazi od tRNA-neovisnog popravka pogreške prije prijenosa, odnosno hidrolize aminoacil-adenilata. Pri tome se dobivena aktivnost uspoređuje s aktivnošću u prisustvu pripadne aminokiseline – znak popravka pogreške je pojačani utrošak ATP-a u prisustvu nepripadne u odnosu na pripadnu aminokiselinu. Koeficijenti k_{cat} i K_M u tRNA-neovisnom popravku pogreške prije prijenosa prikazani su u Tablici 4.5. Kao što je očekivano radi se o relativno malim vrijednostima.

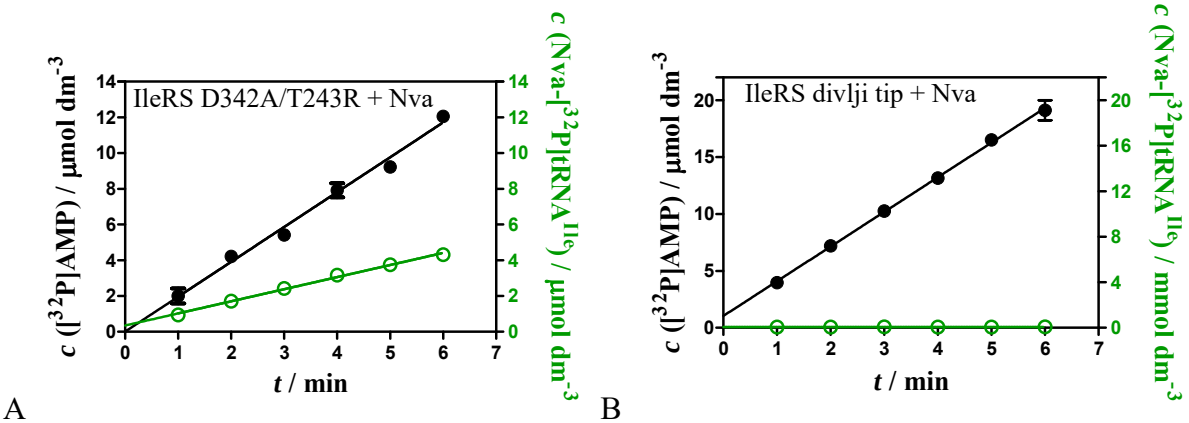
Tablica 4.5: tRNA-neovisni popravak pogreške prije prijenosa enzima IleRS i ValRS sa supstratom norvalinom. Prikazane vrijednosti predstavljaju srednju vrijednost tri neovisna eksperimenta i pripadnu standardnu pogrešku. Navedeni su kinetički parametri nastanka AMP-a. Reakcija se prati u ustaljenom stanju.

Enzim	Supstrat	K_M / mmol dm^{-3}	k_{cat} / s^{-1}	k_{cat}/K_M / mmol^{-1} dm^3 s^{-1}
IleRS	Nva	7,6 ± 0,1	0,11 ± 0,004	0,014
ValRS	Nva	24 ± 3	0,19 ± 0,007	0,008

4.7.2. tRNA-ovisni popravak pogreške prije prijenosa norvalina kod enzima IleRS

Da bi se bolje okarakterizirao popravak pogreške potrebno je odrediti udio pojedinih vrsta popravka u ukupnom popravku pogreške. Za karakteriziranje tRNA-ovisnog popravka pogreške prije prijenosa koristi se metoda paralelnog praćenja aminoaciliranja i utroška ATP-a, u reakcijama kataliziranim mutiranim enzimima, kojima je ugašen popravak pogreške nakon prijenosa. Obzirom da mutirana varijanta enzima s ugašenim popravkom pogreške može pogrešno aminoacilirati tRNA, nužno je utvrditi podrijetlo AMP-a, odnosno utvrditi je li AMP nastao uslijed prijenosa aminokiseline na tRNA ili hidrolize aa-AMP. Time se utvrđuje i stehiometrija utroška ATP-a po aminoaciliranoj odnosno pogrešno aminoaciliranoj tRNA. Standardno se očekuje da je za nastanak jedne aminoacilirane tRNA potrebno utrošiti jedan ATP. Omjeri veći od jedan i veći u odnosu na omjer određen u prisustvu pripadne aminokiseline, upućuju na aktivan popravak pogreške. Ako se od vrijednosti ukupnog utroška ATP-a određene s enzimom ugašenog popravka pogreške nakon prijenosa, oduzme brzina aminoaciliranja (odnosno pogrešnog aminoaciliranja) dobije se koeficijent brzine tRNA-ovisnog popravka pogreške prije prijenosa[11]. U okviru ove disertacije karakteriziran je tRNA-ovisan popravak pogreške prije prijenosa za reakcije katalizirane s IleRS mutantima u popravku pogreške nakon prijenosa uz supstrat norvalin. Prvo je korišten enzim IleRS D342A za koji je

ranije pokazano da ne deacilira Val-tRNA^{Ile}, odnosno mutacijom D342A ugašena je deacilacija valil-tRNA^{Ile}. Kako se u reakciji deacilacije, odnosno mjerenja brzine popravka pogreške nakon prijenosa s ovim enzimom uz Nva-tRNA^{Ile} pokazalo da je deacilacija značajno usporena, a ne i potpuno ugašena uz ovaj supstrat, za utvrđivanje tRNA-ovisnog popravka pogreške prije prijenosa korišten je dvostruki mutant IleRS D342A/T243R, za kojeg je pokazano da je deacilacija Nva-tRNA^{Ile} potpuno ugašena (rezultati prikazani u sljedećem poglavlju). Starija istraživanja su sugerirala da IleRS s mutacijom T243R nema popravka pogreške prije prijenosa, no to je opovrgnuto u novijim istraživanjima, gdje je pokazano da IleRS koji ima mutaciju T243R ima i popravak pogreške prije i poslije prijenosa[7, 108]. Također, radi karakterizacije IleRS enzima koji se nalazi u soju korištenom u *in vivo* istraživanjima (soj PS7066, odnosno 10SAla) napravljena je karakterizacija tRNA-ovisnog popravka pogreške prije prijenosa i enzima 10SAla IleRS, za kojeg je pokazano da ima ugašen popravak pogreške nakon prijenosa norvalina (rezultati u sljedećem poglavlju). Rezultati određivanja koeficijenta brzine tRNA-ovisnog popravka pogreške prije prijenosa navedeni su u Tablici 4.6 i prikazani su na Slici 4.19. Vidljivo je da u reakcijama kataliziranim IleRS enzimima postoji tRNA-ovisni popravak pogreške prije prijenosa. Također, napravljen je test tRNA-ovisnog popravka pogreške prije prijenosa s 10SAla IleRS u prisutnosti valina. Pokazano je da i kod ovog enzima postoji tRNA-ovisni popravk pogreške prije prijenosa i uz valin kao supstrat, kao i uz norvalin.



A B

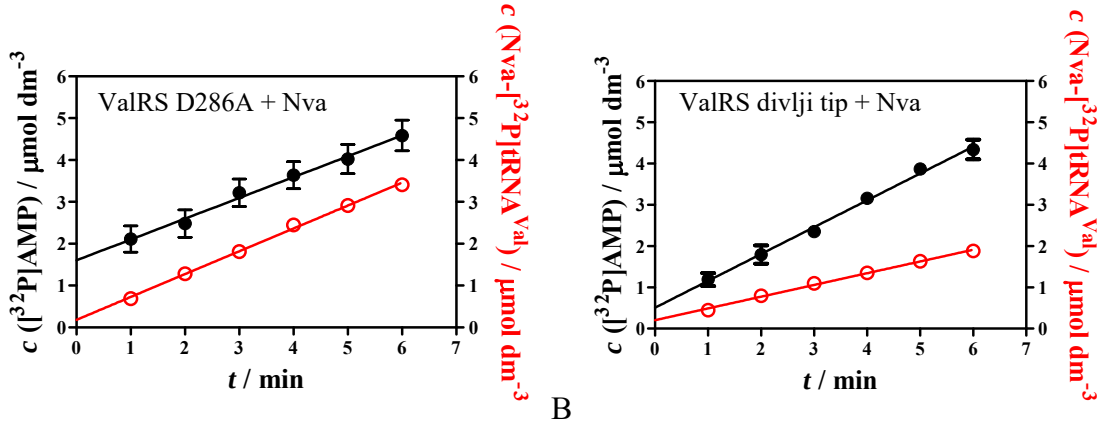
Slika 4.19: Prikaz paralelnog praćenja nastanka AMP-a i aa-tRNA u reakciji kataliziranoj enzimom IleRS D342A/T243R (A), i divljim tipom enzima (B), uz supstrat norvalin. Crni pravci predstavljaju vremenske tijekove utroška ATP-a, a zeleni pravci predstavljaju vremenske tijekove nastanka aa-tRNA. Prikazane su srednje vrijednosti tri neovisna eksperimenta i pripadna standardna pogreška. Reakcije su mjerene u uvjetima ustaljenog stanja.

Tablica 4.6: Koeficijenti brzina reakcija utroška ATP-a, odnosno nastajanja AMP-a i nastajanja aa-tRNA u reakcijama kataliziranim enzimima IleRS. Iz dobivenih vrijednosti određeni su omjeri k_{AMP} / $k_{aa\text{-}tRNA}$ i k_{ed} = k_{AMP} -$k_{aa\text{-}tRNA}$. Reakcije su mjerene u uvjetima ustaljenog stanja. Prikazane su srednje vrijednosti 3 neovisna eksperimenta i standardna pogreška.

Enzim	Supstrat	k_{AMP} / s^{-1}	$k_{aa\text{-}tRNA}$ / s^{-1}	k_{AMP} / $k_{aa\text{-}tRNA}$	k_{ed} = k_{AMP} -$k_{aa\text{-}tRNA}$ / s^{-1}
Divlji tip IleRS	Nva	2,54 ± 0,08	~1,25 × 10^{-3}	~2035	2,54
D342A/T243R IleRS	Nva	1,63 ± 0,07	0,56 ± 0,02	2,9	1,07
10SAla IleRS	Nva	0,31 ± 0,06	0,11 ± 0,01	2,8	0,20
10SAla IleRS	Val	0,3 ± 0,2	0,15 ± 0,01	2,0	0,15

4.7.3. tRNA-ovisni popravak pogreške prije prijenosa norvalina kod enzima ValRS

U ovoj disertaciji karakteriziran je i tRNA-ovisni popravak pogreške prije prijenosa u reakcijama kataliziranim enzimom ValRS uz supstrat norvalin. Reakcija je izvedena istovjetno kao i reakcije s enzimima IleRS, i također je korišten mutant s ugašenim popravkom pogreške nakon prijenosa, ValRS D286A. Rezultati karakterizacije tRNA-ovisnog popravka pogreške prije prijenosa prikazani su u Tablici 4.7 i Slici 4.20. Kao što je vidljivo, ova vrsta popravka pogreške kod ValRS nije prisutna jer su pravci nastanka AMP-a i Nva-tRNA paralelni u slučaju kada je korišten ValRS D286A. Navedeni rezultat znači da se svaki nastali norvalil-AMP prevodi u norvalil-$tRNA^{Val}$, odnosno jedan ATP se utroši za nastanak jedne norvalilirane $tRNA^{Val}$. Zanimljivo je i da divlji-tip pokazuje značajnu pogrešnu aminoacilaciju u prisustvu norvalina, te da troši svega 2,3 ATP-a za nastajanje norvalilirane $tRNA^{Val}$.



Slika 4.20: Prikaz paralelnog praćenja nastanka AMP-a i aa-tRNA u reakciji kataliziranoj enzimom ValRS D286A (A), i divljim tipom enzima (B), uz supstrat norvalin. Crni pravci predstavljaju vremenske tijekove utroška ATP-a, a crveni pravci predstavljaju vremenske tijekove nastanka aa-tRNA. Prikazane su srednje vrijednosti 3 neovisna eksperimenta i standardna pogreška. Reakcije su mjerene u uvjetima ustaljenog stanja.

Tablica 4.7: Koeficijenti brzina reakcija utroška ATP-a i nastajanja aa-tRNA u reakcijama kataliziranim enzimima ValRS. Iz dobivenih vrijednosti određeni su omjeri k_{AMP} / $k_{aa\text{-}tRNA}$ i $k_{ed} = k_{AMP} - k_{aa\text{-}tRNA}$. Reakcije su mjerene u uvjetima ustaljenog stanja, a prikazane su srednje vrijednosti 3 neovisna eksperimenta i standardna pogreška.

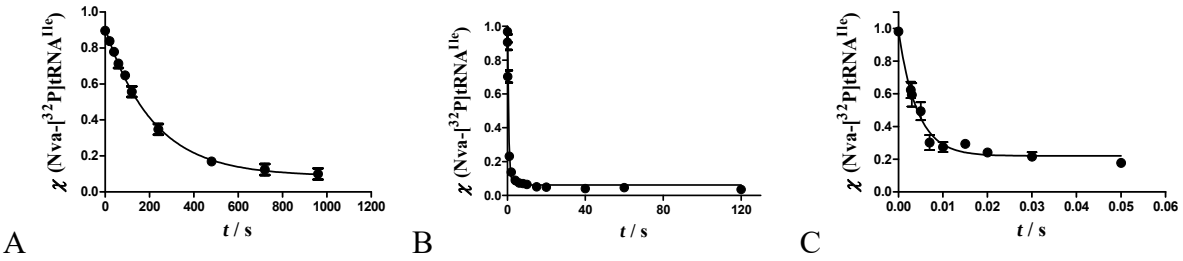
Enzim	k_{AMP} / s^{-1}	$k_{aa\text{-}tRNA}$ / s^{-1}	k_{AMP} / $k_{aa\text{-}tRNA}$	$k_{ed} = k_{AMP} - k_{aa\text{-}tRNA}$ / s^{-1}
Divlji tip ValRS	0,43 ± 0,02	0,190 ± 0,005	2,26	0,24
D286A	0,33 ± 0,05	0,364 ± 0,007	0,91	~0

4.8. Popravak pogreške nakon prijenosa

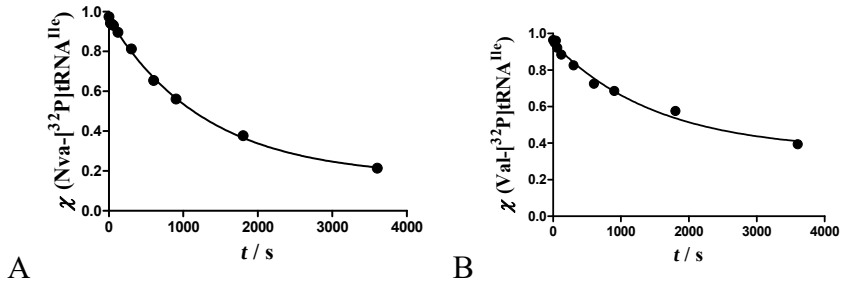
U okviru ove disertacije određeni su koeficijenti brzine popravka pogreške nakon prijenosa, odnosno deacilacije pogrešno aminocilirane tRNA za reakcije katalizirane s enzimima IleRS i ValRS. Reakcija deacilacije se izvodi tako da se prethodno pripremljena pogrešno aminoacilirana tRNA pomiješa s enzimom i prati se nestanak pogrešno aminoacilirane tRNA. Reakcija se radi s radioaktivno obilježenom tRNA na koju je preparativnom reakcijom pogrešnog aminoaciliranja pomoću enzima s ugašenim popravkom pogreške nakon prijenosa vezana aminokiselina. Reakcija deacilacije se zaustavlja u određenim vremenskim razmacima, i kvantificiraju se produkti reakcije kako je ranije opisano. Dobivene koncentracije produkata se nelinearnom regresijom utočnavaju na monoeksponencijalnu jednadžbu u programu GraphPad Prism, a iz jednadžbe se određuje k_{deacyl} – koeficijent brzine deacilacije. Slično kao i kod reakcije prijenosa aminokiseline, ove reakcije se ne rade u ustaljenom stanju, već uvjetima jednog kruga enzima, jer je disocijacija produkta najsporiji korak ukupne reakcije aminoaciliranja. Za reakcije u kojima se koristi divlji tip enzima s nepripadnom aminokiselinom deacilacija je često vrlo brza (poluvrijeme reakcije na milisekundnoj skali), pa se reakcija izvodi korištenjem instrumenta za brzo miješanje i zaustavljanje reakcije. Ukoliko je reakcija značajno sporija (poluvrijeme reakcije na razini minuta), reakcija se može izvesti ručno.

Za potrebe ove disertacije napravljene su reakcije deacilacije Nva-$tRNA^{Ile}$ s enzimima IleRS divlji tip i mutantima D342A, D342A/T243R i 10SAla IleRS, zatim deacilacija Val-$tRNA^{Ile}$ s enzimom IleRS 10SAla, te deacilacija Nva-$tRNA^{Val}$ i Thr-$tRNA^{Val}$, u reakciji kataliziranoj enzimom ValRS divlji tip.

Rezultati deacilacija su prikazani na Slici 4.21 i Slici 4.22, i u Tablici 4.8, gdje su navedeni koeficijenti brzine deacilacije.



Slika 4.21: Deacilacija mjerena u uvjetima jednog kruga enzima. A) Deacilacija Nva-tRNA^{Ile} enzimom IleRS D342A/T243R B) Deacilacija Nva-tRNA^{Ile} enzimom IleRS D342A C) Deacilacija Nva-tRNA^{Ile} divljim tipom enzima IleRS. Sve reakcije su napravljene tri puta, i prikazana je srednja vrijednost i standardna pogreška. (Vremenska skala A, B i C dijela se značajno razlikuju.)



Slika 4.22: Deacilacija mjerena u uvjetima jednog kruga enzima A) Deacilacija Nva-tRNA^{Ile} enzimom IleRS 10SAla. B) Deacilacija Val-tRNA^{Ile} enzimom IleRS 10SAla. Sve reakcije su napravljene tri puta, i prikazana je srednja vrijednost i standardna pogreška.

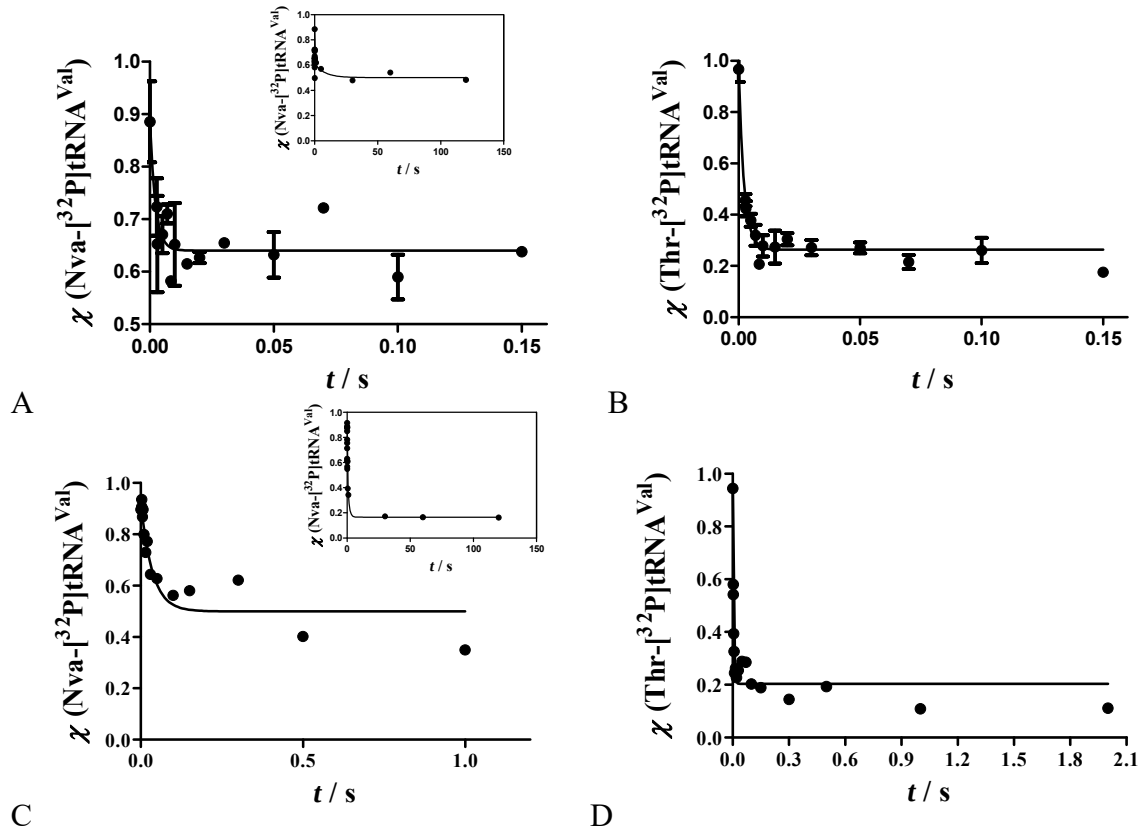
Tablica 4.8: Deacilacija enzimima IleRS supstrata Nva- i Val-tRNA^{Ile}. Reakcije su napravljene u uvjetima jednog kruga enzima. Prikazana je srednja vrijednost tri eksperimenta i standardna pogreška.

Enzim	Supstrat	k_{deacyl} / s^{-1}
IleRS wt	Nva-tRNA^{Ile}	236 ± 27
IleRS D342A	Nva-tRNA^{Ile}	1,6 ± 0,1
IleRS D342A/T243R	Nva-tRNA^{Ile}	0,0046 ± 0,0003
IleRS 10SAla	Nva-tRNA^{Ile}	0,0008±0,0002
IleRS 10SAla	Val-tRNA^{Ile}	0,0007± 0,0002

Iz tablice je vidljivo da mutant IleRS D342A nije sasvim inaktivan u deacilaciji uz Nva-tRNA^{Ile}, unatoč tome što je aktivnost u potpunosti ugašena za supstrat Val-tRNA^{Ile}. Drugi mutant, dvostruki D342A/T243R, je zaista deacilacijski mutant, odnosno brzina deacilacije Nva-tRNA^{Ile} umanjena je za faktor × 10^5. Pomoću ove metode pokazano je da je enzim IleRS 10SAla inaktivan u reakciji deacilacije Nva-tRNA^{Ile}, kako što je i ranije objavljeno za Val-tRNA^{Ile} [94].

Za potrebe karakterizacije popravka pogreške ValRS u prisutnosti norvalina, test deacilacije napravljen je i s enzimom ValRS u prisutnosti norvalina. Rezultati su prikazani u Tablici 4.9 i na Slici 4.23.

Kako je brzina deacilacije Nva-tRNA^{Val} bila prebrza za precizno određivanje čak i korištenjem instrumenta za brzo miješanje i zaustavljanje reakcije, reakcija je usporena mijenjanjem pH pufera u kojem se reakcija izvodi. Dobiveni rezultati su prikazani u Tablici 4.9 i Slici 4.23.



Slika 4.23: Deacilacija mjerena u uvjetima jednog kruga enzima A) Deacilacija Nva-tRNA^{Val} enzimom ValRS B) Deacilacija Thr-tRNA^{Val} enzimom ValRS C) Deacilacija Nva-tRNA^{Val} enzimom ValRS pri pH = 6,0 D) Deacilacija Thr-tRNA^{Val} enzimom ValRS pri pH = 6,0 Inserti: krivulje deacilacije kroz dulji vremenski raspon utočnjene na biekseponencijalnu jednadžbu. Prikazana je srednja vrijednost tri eksperimenta i pripadna standardna pogreška.

Tablica 4.9: Deacilacija enzimima ValRS supstrata Val- i Thr-tRNA^{Val}. Reakcije su napravljene u uvjetima jednog kruga enzima. Prikazana je srednja vrijednost tri neovisna eksperimenta i pripadna standardna pogreška.

Enzim	Supstrat	k_{deacyl} / s^{-1}
ValRS divlji tip	Nva-tRNA^{Val}	450 ± 131
ValRS divlji tip	Thr-tRNA^{Val}	438 ± 47
ValRS divlji tip (pH = 6,0)	Nva-tRNA^{Val}	28 ± 10
ValRS divlji tip (pH = 6,0)	Thr-tRNA^{Val}	262 ± 45

Kao kontrola, reakcija deacilacije je napravljena i s Thr-tRNA^{Val}, i to u standardnom puferu pri pH = 7,5 i pri pH = 6. Pri smanjenju pH došlo je do smanjena brzine deacilacije Nva-tRNA^{Val} na razinu koja se može odrediti pomoću instrumenta za brzo miješanje i zaustavljanje reakcije.

U usporenoj reakciji deacilacije Nva-tRNA^{Val} je vidljivo da je krivulja monoeksponencijalna na vremenskoj skali do 1 sekunde. Ako se reakcija deacilacije prati na duljim vremenima, u reakciji na oba pH vidljiva je dodatna spora faza: k_{obs} = 0,13 ± 0,3 s^{-1} pri pH = 7,5 i k_{obs} = 0,87 ± 0,44 s^{-1} pri pH = 6 (Slika 4.23, inserti).

4.9. Utjecaj tRNA na koeficijente brzine reakcija kod IleRS

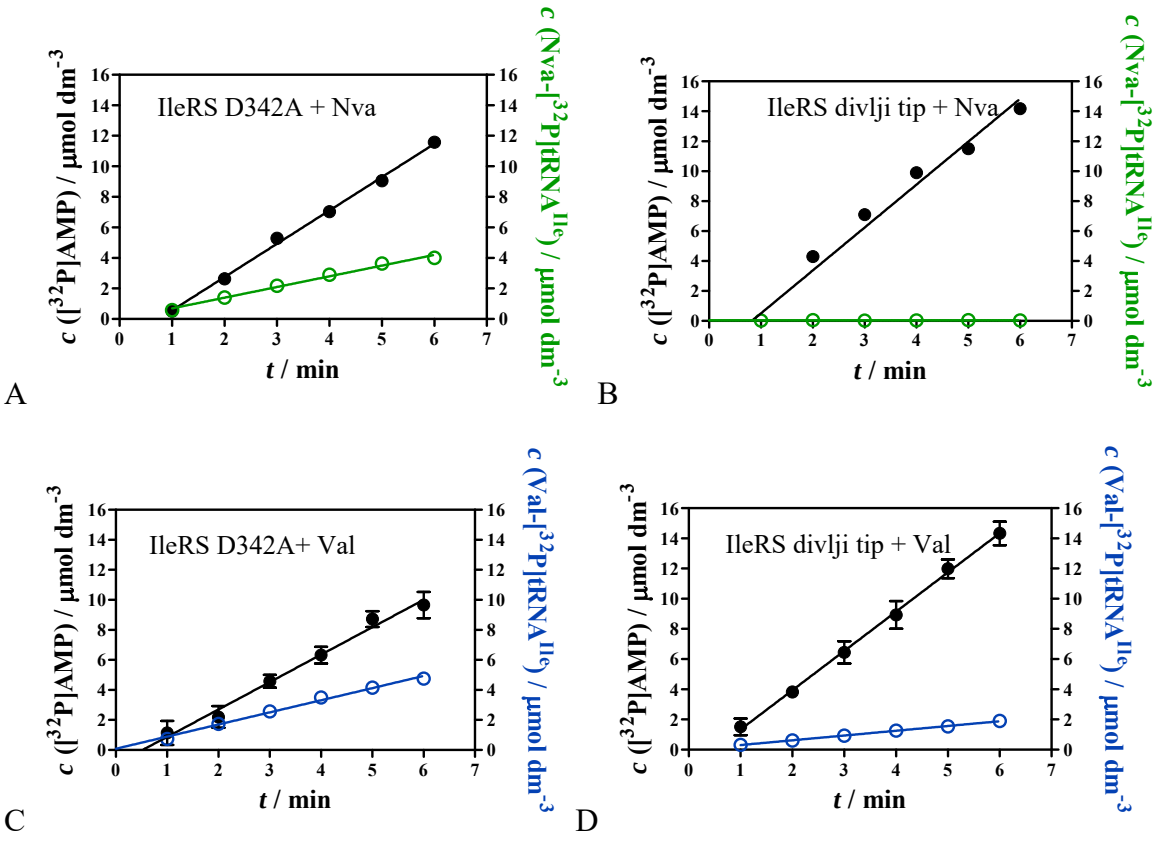
U okviru ove disertacije priređena je oksidirana varijanta tRNA^{Ile}, na koju se ne može prenijeti aktivirana aminokiselina. Takva tRNA korištena je u eksperimentu aktivacije, s ciljem da se pokaže utjecaj tRNA na aktivaciju norvalina. Aktivacija je mjerena izmjenom pirofosfata kako je ranije navedeno, uz dodatak tRNA$^{Ile}_{ox}$. Rezultati aktivacije, zajedno s ponovljenim rezultatima aktivacije u odsutnosti tRNA navedeni su u Tablici 4.10.

Tablica 4.10: Kinetički parametri aktivacije aminokiseline norvalina enzimom IleRS divlji tip bez prisutnosti tRNA i uz oksidiranu tRNA^{Ile}. Prikazane su srednje vrijednosti triju eksperimenata i pogreška.

tRNA	K_M / mmol dm^{-3}	k_{cat} / s^{-1}	k_{cat}/K_M / mmol^{-1} dm^3 s^{-1}
–	0,82 ± 0,07	41 ± 1	50
tRNA$^{Ile}_{ox}$	7,9 ± 0,5	25 ± 3	3,1

Vidljivo je da prisutnost oksidirane tRNA povećava K_M za jedan red veličine, što je u skladu s prethodno dobivenim rezultatima uz pripadni izoleucin i nepripadni valin.

Radi kontrole pouzdanosti rezultata u kojima je korištena prekomjerno eksprimirana tRNA^{Ile} s promijenjenim prvim parom, neki kinetički parametri su određeni i s nativnom tRNA^{Ile}. U poglavlju 3.2.1.6 navedeno je da je proizvedena i nativna varijanta tRNA^{Ile} iz bakterije *E. coli* koja je zatim korištena u eksperimentima aminoaciliranja uz [^{14}C] aminokiselinu, tRNA-ovisnog popravka pogreške prije prijenosa, te prijenosu pripadnog izoleucina. U reakciji aminoaciliranja s nativnom tRNA k_{obs} je bio 1,5 ± 0,2 s^{-1} (određeno kao srednja vrijednost tri neovisna eksperimenta uz pripadnu standardnu pogrešku). Prijenos aminokiselina na ovu tRNA, mjeren s aminokiselinom izoleucin (pripadna reakcija) bio je k_{trans} = 4,9 ± 0,4 s^{-1}. I s ovom tRNA postoji tRNA-ovisni popravak pogreške prije prijenosa, u reakcijama i s valinom i norvalinom (Slika 4.24 i Tablica 4.11). Za reakcije s norvalinom je korišten enzim za koji je pokazano da ima umanjen, ali ne i ugašen popravak pogreške nakon prijenosa u prisustvu norvalina (D342A IleRS), pa dio utroška ATP-a dolazi i od tog tipa popravka. Kako se kod reakcije s valinom vidjelo da postoji tRNA-ovisni popravak pogreške prije prijenosa, reakcija nije ponovljena s dvostrukim mutantom IleRS u kojem je popravak pogreške nakon prijenosa potpuno ugašen.



Slika 4.24: Prikaz paralelnog praćenja nastanka AMP-a i aa-tRNA u reakciji kataliziranoj enzimom IleRS D342A (A), i divlji tip enzima (B), uz supstrat norvalin uz nativnu $tRNA^{Ile}$. Prikaz paralelnog praćenja nastanka AMP-a i aa-tRNA u reakciji kataliziranoj enzimom IleRS D342A (C), i divlji tip enzima (D), uz supstrat valin uz nativnu $tRNA^{Ile}$. Pravci pod (C) i (D) predstavljaju srednju vrijednost triju eksperimenata i pripadnu standardnu pogrešku.

Tablica 4.11: Koeficijenti brzina reakcija utrška ATP-a i nastajanja aa-tRNA u reakcijama kataliziranim enzimima IleRS, uz nativnu $tRNA^{Ile}$. Iz dobivenih vrijednosti određeni su omjeri $k_{AMP}/k_{aa\text{-}tRNA}$ i $k_{ed} = k_{AMP} - k_{aa\text{-}tRNA}$. Reakcije su mjerene u uvjetima ustaljenog stanja. Prikazane su srednje vrijednosti i standardna pogreška.

Enzim	Supstrat	k_{AMP} / s^{-1}	$k_{aa\text{-}tRNA}$ / s^{-1}	$k_{AMP}/k_{aa\text{-}tRNA}$	$k_{ed} = k_{AMP} - k_{aa\text{-}tRNA}$ / s^{-1}
IleRS divlji tip	Nva	2,4 ± 0,2	~0	~3590	2,4
IleRS D342A	Nva	1,82 ± 0,05	0,58 ± 0,03	3,14	1,24
IleRS divlji tip	Val	2,2 ± 0,1	0,26 ± 0,02	9,3	1,94
IleRS D342A	Val	1,5 ± 0,1	0,67 ± 0,02	2,3	0,83

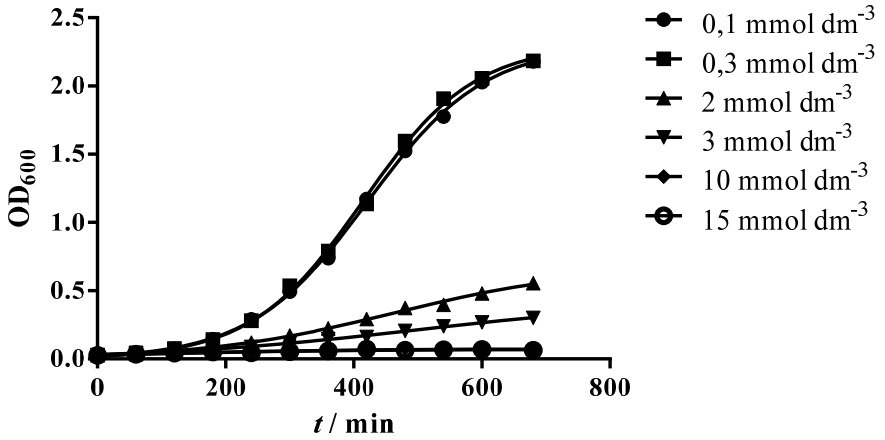
4.10. *In vivo* rezultati

Osim kinetičkog dijela u kojem je karakterizirana supstratna specifičnost IleRS i ValRS enzima uz supstrat norvalin u reakcijama aminoaciliranja i popravka pogreške, u okviru ove disertacije napravljeno je i istraživanje *in vivo* toksičnosti neproteinogenog norvalina bakteriji *E. coli*, u usporedbi s proteinogenim valinom. Korišten je divlji tip bakterije, laboratorijski soj MG1655, i soj 10SAla koji je genetički identičan soju MG1655, osim mutacija u genu za IleRS (*ileS*), gdje je su aminokiseline na pozicijama 241 do 250 zamijenjene alaninima. Kako se radi o

aminokiselinama u domeni za popravak pogreške nakon prijenosa, proteini IleRS koji se eksprimiraju u ovom bakterijskom soju nemaju popravak pogreške nakon prijenosa. Ranije su prikazani podaci iz kojih je vidljivo da u reakcijama s norvalinom 10SAla IleRS zaista nema popravak pogreške nakon prijenosa, kao što je to pokazano za valin[94]. Toksičnost nepripadnih aminokiselina norvalina i valina ovom soju istražena je pomoću dvije metode: određivanjem 50 % inhibitorne koncentracije (engl. *inhibitory concentration*, IC50) i testom rasta bakterija na krutim podlogama (engl. *colony forming units*, CFU).

4.10.1. Određivanje toksičnosti nepripadnih aminokiselina mjerenjem IC50

Kako je opisano u istoimenom poglavlju u Metodama, bakterije su rasle u tekućem hranjivom mediju uz prisutnost različitih koncentracija valina i norvalina. Bakterije su iz zasićenih kultura inokulirane u svježi medij i praćen je rast spektrofotometrijskim mjerenjem turbiditeta na valnoj duljini od 600 nm (OD_{600}). Bakterijske kulture su razrijeđene na početni OD_{600} = 0,02 i svakih sat vremena, (ili češće, ovisno o brzini diobe) je mjeren OD_{600}. Crtanjem OD_{600} u ovisnosti o vremenu dobivene su krivulje rasta (primjer je Slika 4.25).



Slika 4.25: Reprezentativni prikaz ovisnosti OD_{600} o vremenu, za bakterije (soj 10SAla bakterije *E. coli*) u mediju s različitom koncentracijom dodanog valina (navedeno sa strane).

Krivulje rasta su nelinearnom regresijom utočnjene na jednadžbu

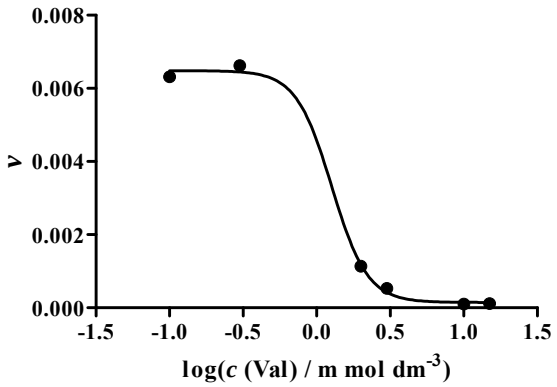
$$y = \frac{A}{1 + \exp(4 \times \frac{v}{A} \times (L - x) + 2)}$$

gdje je A maksimalni rast stanica (maksimalni OD_{600}) L je duljina lag-faze, a v je brzina diobe stanica. Koncentracije norvalina i valina su odabrane na način da najmanja koncentracija dodane aminokiseline nije imala gotovo nikakav utjecaj na izgled krivulje rasta, a najveća

dodana koncentracija je gotovo u potpunosti inhibirala diobu stanica od 0,1×IC50 do 10×IC50. Za određivanje parametra IC50 odabrana je brzina diobe u hranidbenom mediju. Brzina diobe stanica je utočnjena nelinearnom regresijom na jednadžbu za određivanje 50 % inhibitorne koncentracije (IC50):

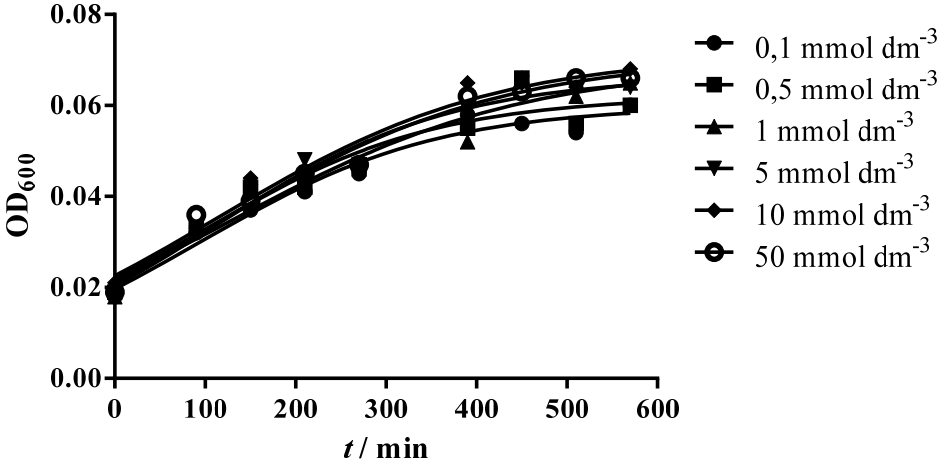
$$y = y_0 + \frac{y_{max} - y_0}{1+10^{(logIC50-x)\times nagib}}.$$

Primjer krivulje iz koje se određivao IC50 je Slika 4.26.



Slika 4.26: Ovisnost brzine diobe stanica o logaritmu koncentracije dodanog valina u hranidbeni medij. Prikazan je graf ovisnosti za soj 10SAla bakterije *E. coli*.

Radi kontrole, uvijek su paraleno rađeni eksperimenti s divljim tipom bakterije *E. coli* i mutiranim sojem, i to s dodanim valinom ili norvalinom u minimalnim hranidbenim medijima za oba soja. Bakterije su raste u fiziološkim uvjetima, pri 37 °C, u tresilici, uz standardnu razinu aeracije, i dovoljnu količinu hranidbenih tvari u mediju za rast. U hranidbeni medij su uvijek bile dodane aminokiseline izoleucin, leucin i valin (svaka koncentracije c = 100 μmol dm^{-3}) radi bržeg rasta stanica. Vrijednosti IC50 su se pokušale dobiti i u mediju bez dodanih izoleucina, leucina i valina, međutim veća količina valina u stanici inhibira biosintezu izoleucina i dolazi do pseudoauksotrofije za izoleucin pa je i pri najmanjim koncentracijama dodanog valina utjecaj na brzinu diobe bio prevelik, i nije dolazilo do mjerljivog rasta, odnosno rast je bio prespor za pouzdano mjerenje i određivanje IC50 za oba korištena soja (Slika 4.27).



Slika 4.27: Krivulje rasta soja MG1655 bez dodanih aminokiselina Ile, Leu i Val, uz dodatak različitih koncentracija valina u hranidbeni medij.

Rezultati IC50 određeni prema brzini diobe stanica iz krivulja rasta navedeni su u Tablici 4.12.

Tablica 4.12: Parametri IC50 za norvalin i valin, za sojeve MG1655, PS7068 i 10SAla bakterije *E. coli*, određeni pri 37 °C.

soj *E. coli*	IC50 za norvalin / mmol dm^{-3}	IC50 za valin / mmol dm^{-3}
MG1655[1]	8,6	8,8
PS7068	10,3 ± 1,7	8,6 ± 1,1
10SAla	0,55 ± 0,04	1,8 ± 0,2

Prikazane su srednje vrijednosti barem 3 nezavisna eksperimenta i pogreške, osim za eksperimente s MG1655,koji su napravljeni samo jednom.

[1] U analizi su sojevi MG1655 i PS7068 tretirani kao identični. Iako je PS7068 auksotrof za Ile, Leu i Val, u ovim eksperimentima su u medij dodane sve tri aminokiseline pa je rast sojeva MG1655 i PS7068 bio jednak.

Prema dobivenim rezultatima vidljivo je da su divljem tipu obje aminokiseline podjednako toksične, s IC50 od 8-10 mmol dm^{-3}, što je značajno više od standardnih koncentracija tih aminokiselina u stanici. Soju s ugašenim popravkom pogreške nakon prijenosa 3 do 4 puta je toksičniji norvalin od valina, a toksičnost je vidljiva pri značajno nižim koncentracijjama aminokiselina od onih za divlji tip bakterije *E. coli*.

Mjerenja IC50 napravljena su i pri 42 °C, kao kontrola svojstva primijećenog pri 37 °C. 42 °C je temperatura koja je iz literature poznata kao temperatura koja izaziva toplinski stres [109]. Rezultati su prikazani u Tablici 4.13. Kako se radi o kontrolnim rezultatima, napravljeni su samo jednom.

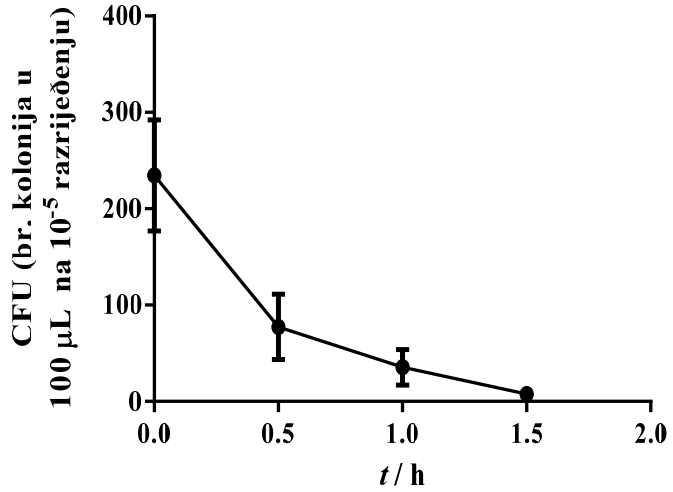
Tablica 4.13: Parametri IC50 za norvalin i valin, za sojeve MG1655 i 10SAla bakterije *E. coli*, određeni pri 42 °C.

soj *E. coli*	IC50 za norvalin /mmol dm^{-3}	IC50 za valin / mmol dm^{-3}
MG1655	7,3	9,6
10SAla	0,26	1,7

Iz tablice je vidljivo da je i pri višoj temperaturi prisutan trend veće toksičnosti norvalina, koja nije prisutna kod divljeg tipa, gdje obje aminokiseline podjednako štetno djeluju na stanicu.

4.10.2. Test rasta bakterija na krutim podlogama

Osim određivanja IC50 napravljen je i test rasta bakterija na krutim podlogama. Test rasta na krutim hranjivim podlogama (CFU) napravljen je na način da su bakterije rasle do sredine eksponencijalne faze, 4,5 h pri 37 °C, te su zatim uzgajane pri višoj temperaturi (53 °C). Navedena temperatura je izabrana kao temperatura gdje je kroz 1,5 h primijećen trend padanja CFU, odnosno pad vijabilnosti za soj 10SAla bakterije *E. coli*. U probnim eksperimentima soju nisu dodane aminokiseline valin i norvalin, već je samo praćen CFU kroz vrijeme prilikom uzgoja u minimalnom mediju s dodanim Ile, Leu i Val. Od nekoliko provjerenih temperatura, 53 °C je bila temperatura pri kojoj CFU soja 10SAla pada kroz 1,5 h koliko je praćen, kao što je vidljivo na Slici 4.28.

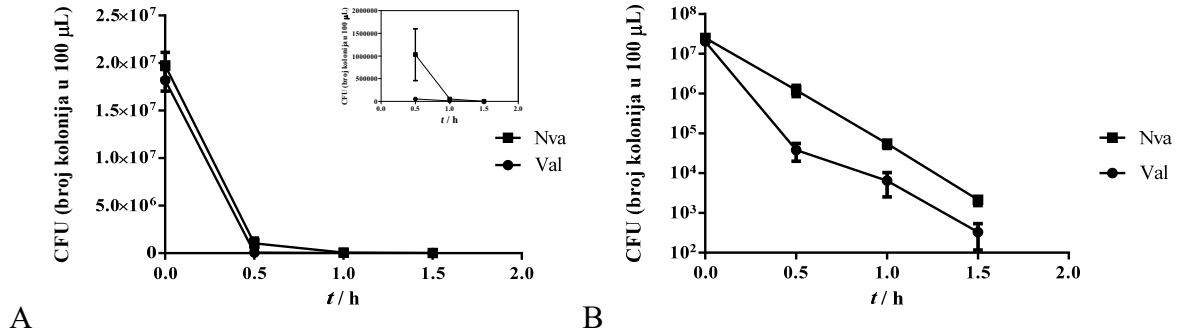


Slika 4.28: CFU kroz vrijeme na 53 °C. Praćen je CFU soja 10SAla bakterije *E. coli* kroz vrijeme, na temperaturi od 53 °C. CFU je prikazan kao broj kolonija u 100 µL na razrijeđenju 10^{-5}. Prikazana je srednja vrijednost 6 eksperimenata i standardna pogreška.

Navedeni uvjeti su korišteni u daljnjim eksperimentima, gdje su bakterije rasle do sredine eksponencijalne faze, 4,5 h, te su zatim inkubirane u mediju s velikom koncentracijom valina ili norvalina, pola sata na 37 °C, zatim su dalje inkubirane na 53 °C, i praćen je CFU s ciljem

kvantifikacije preživljenja, odnosno uspješnog nastanka kolonija. Aminokiseline su dodavane u relativnim koncentracijama u hranidbeni medij, prema ranije određenim IC50. Dodane su 10 puta veće vrijednosti koncentracija aminokiselina od njihovog IC50. Na taj način je dodana koncentracija za koju se pretpostavlja da ima značajan utjecaj na bakterije. Kako se pretpostavlja da toksičnost norvalina i valina ovom soju dolazi od ugradnje aminokiselina na mjesta izoleucina, pretpostavljeno je da će pri ovim koncentracijama doći do ugradnje valina i norvalina u bakterijski proteom.

Na Slici 4.29 su prikazani rezultati CFU iz tri neovisna eksperimenta.



Slika 4.29: A) CFU soja 10SAla bakterije *E. coli* kroz vrijeme na 53 °C u mediju s dodanim valinom ili norvalinom. CFU je prikazan kao broj kolonija u 100 µL početne bakterijske kulture. Insert: Prikaz s isključenom prvom vremenskom točkom (0 h) gdje je izraženije vidljiv efekt razlike u broju nastaih kolonija. B) CFU soja 10SAla bakterije *E. coli* kroz vrijeme na 53 °C u mediju s dodanim valinom ili norvalinom. CFU je prikazan kao broj kolonija u 100 µL početne bakterijske kulture na logaritamskoj skali. Prikazana je srednja vrijednost 3 eksperimenta i standardna pogreška.

Iz rezultata je vidljivo da su kulture s dodanim norvalinom imale veći CFU u odnosu na kulture s dodanim valinom, u relativno jednakoj koncentraciji u odnosu na IC50. Efekt je uočljiviji na duljim vremenskim točkama, odnosno nakon pola sata inkubacije na višoj temperaturi.

5. Rasprava

Aminoacil-tRNA-sintetaze su enzimi s esencijalnom ulogom u staničnom životu jer sudjeluju u prijenosu genetičke informacije. Svoju ulogu moraju obavljati uz minimalnu pogrešku, no zbog velike sličnosti u strukturi njihovih aminokiselinskih supstrata u staničnoj citoplazmi, neke aaRS moraju imati korektivne funkcije, odnosno popravljati vlastite pogreške prije nego one uzrokuju trajnu pogrešku u procesu translacije. Među enzimima koji imaju mehanizme popravka pogreške su IleRS, ValRS i LeuRS, aaRS podrazreda Ia, koji su istraživani u okviru ove disertacije. Zbog relativno male strukturne razlike proteinogenih aminokiselinama s alifatskim bočnim ograncima (izoleucin, valin, leucin), ali i postojanja drugih aminokiselina koje im nalikuju svojstvima bočnog ogranka (norvalin, treonin), ovi enzimi bi bez postojanja robusnog popravka pogreške uzrokovali znatno smanjenu vjernost procesa biosinteze proteina i ugradnju nepripadnih aminokiselina u rastući polipeptidni lanac, suprotno poruci kodiranoj nukleotidnim slijedom protein-kodirajućeg gena. Ranija istraživanja pokazuju da je afinitet elongacijskog faktora Tu jednak za Nva-tRNA^{Leu} i Leu-tRNA^{Leu}, pa nema daljnje selekcije točnosti aminoaciliranja prije same translacije, iz čega je jasno da su točnost enzima i efikasan popravak pogreške nužnost za točnost biosinteze proteina[26].

5.1. IleRS

Strukturna sličnost izoleucina i valina i pogrešna aktivacija koja se zbog toga događa na IleRS već je dugo poznat i dobro objašnjen fenomen: izoleucin i valin se razlikuju za jednu metilensku skupinu, a budući da je valin manji, uspješno se smješta u aktivno mjesto IleRS i dolazi do aktivacije sa samo 200 puta manjom učinkovitošću nego u reakciji s pripadnim izoleucinom. Kako se u ukupnoj translaciji pogreške događaju puno rjeđe od 1 u 200 događaja (eksperimentalno izmjerena pogreška u translaciji je 1 u 1000-10000 biosinteza peptidne veze[2-4]), pretpostavljeno je da aaRS moraju imati mehanizme popravka vlastitih pogrešaka[110]. Danas, pedesetak godina nakon što je pretpostavljeno postojanje popravka pogrešaka, može se reći da je mehanizam popravka pogreške kod IleRS iz bakterije *E. coli*, uz valin kao nepripadni supstrat, relativno dobro karakteriziran[7-9].

U sklopu ove doktorske disertacije, IleRS iz bakterije *E. coli* je karakteriziran u reakcijama s nepripadnim supstratom norvalinom. Uspoređujući strukture pripadnog izoleucina, te nepripadnog proteinogenog valina i neprotoeinogenog norvalina, vidljivo je da su izoleucin,

valin i norvalin vrlo sličnih struktura, norvalin i valin čak i jednake molekulske mase te sastava bočnog ogranka, i da je norvalin ravnolančan s lancem duljine kao izoleucin (bez jedne CH_3 skupine). Obzirom na navedeno, za pretpostaviti je da se bočni ogranak ravnolančanog norvalina može vezati u sintetsko mjesto IleRS, te da bi aktivnost IleRS s norvalinom mogla nalikovati aktivnosti s valinom.

Uspoređujući kinetičke parametre u aktivaciji za sve tri aminokiseline, izoleucin, valin i norvalin (Tablica 5.1), vidljivo je da IleRS ostvaruje specifičnost uslijed značajno višeg K_M za nepripadne valin i norvalin u odnosu na izoleucin (oko 100 puta viši K_M za valin, odnosno oko 200 puta viši K_M za norvalin), dok je k_{cat} podjednak za sve tri aminokiseline. Takvi rezultati upućuju da se diskriminacija ostvaruje na temelju vezanja aminokiseline u osnovnom stanju (engl. *ground state binding*), dok se jednom vezana aminokiselina (pripadni izoleucin ili nepripadni valin odnosno norvalin) jednako učinkovito prevode u aminoacil-adenilat. Usporedbom konstanti specifičnosti (omjer k_{cat}/K_M za izoleucin kao pripadnu aminokiselinu te k_{cat}/K_M za nepripadnu aminokiselinu) (Tablica 5.1) vidljivo je da IleRS akivira valin oko 149 puta slabije, dok norvalin aktivira oko 238 puta slabije. Navedeni brojevi služe kao faktor diskriminacije valina odnosno norvalina u 1. koraku aminoaciliranja, te sugeriraju nužnost postojanja popravka pogreške jer bi inače sveukupna razina pogreške u translaciji bila znatno veća od eksperimentalno izmjerene (1 na 1000-10000 peptidnih veza[2-4]).

Tablica 5.1: Usporedni prikaz kinetičkih parametara u aktivaciji enzimom IleRS uz pripadne i nepripadne supstrate. Podaci za sve osim reakcija s norvalinom preuzeti iz [7].

Enzim	Supstrat	K_M (aa) / µmol dm^{-3}	k_{cat} / s^{-1}	k_{cat} / K_M / s^{-1} µmol^{-1} dm^3	Faktor diskr.
IleRS	Ile	4,6 ± 0,5	55 ± 9	11,9	
IleRS	Val	465 ± 28	35 ± 6	0,08	149
IleRS	Nva	823 ± 74	41 ± 1	0,05	238

Obzirom da određena diskriminacija predstavlja samo 1. korak aminoaciliranja, teoretski, za postizanje dovoljne točnosti IleRS bi mogao sporo prenositi nepripadne aminokiseline na tRNA, te na taj način usporiti pogrešnu aminoacilaciju i postići veću specifičnost. Od ranije je poznato da IleRS ne diskriminira valin u koraku prijenosa, odnosno da je koeficijent brzine prijenosa valina jednak kao i koeficijent brzine prijenosa izoleucina. Rezultati ovoga rada pokazuju da je i prijenos norvalina brz (k_{trans} je 9,3 s^{-1}), odnosno da IleRS ne diskriminira norvalin kao ni valin u koraku prijenosa te da je potreban popravak pogreške kako bi se spriječilo nakupljanje norvalilirane $tRNA^{Ile}$. Iako korišteni mutant D342A IleRS nema sasvim ugašenu deacilaciju, korištenje navedenog mutanta za mjerenje prijenosa norvalina je

opravdano jer postignuta amplituda u reakciji prijenosa približno odgovara amplitudi koju postiže divlji tip u prijenosu pripadnog izoleucina. Također, deacilacija Nva-tRNA^{Ile} sporija je od očekivanog koeficijenta brzine prijenosa koji prema enzimu IleRS D342A i prijenosu norvalina odgovora k_{trans} = 9,3 s^{-1} (Tablica 5.2). Obzirom da prijenos prethodi sporijoj deacilaciji, ne očekuje se vidljiv doprinos deacilacije.

Tablica 5.2: Koeficijenti brzine prijenosa supstrata na tRNA^{Ile} u reakcijama kataliziranim IleRS (divlji tip i mutant D342A). Reakcije su izvođene u uvjetima jednog kruga enzima. Podaci za valin i izoleucin su preuzeti iz [73].

Enzim	Supstrat	k_{trans} / s^{-1}
IleRS D342A	Nva	9,3 ± 0,8
IleRS D324A	Val	2,3 ± 0,1
IleRS divlji tip	Ile	3,8 ± 0,1
IleRS D342A (nativna tRNA)	Ile	4,9 ± 0,44

U sklopu ove disertacije, istraženi su mehanizmi popravka pogreške IleRS iz bakterije *E. coli* uz norvalin kao nepripadni supstrat. Mehanizmi popravka pogreške IleRS detaljno do sad su karakterizirani za valin[7-9]. Rezultati ove disertacije i karakterizacije mehanizama popravka pogreške u prisustvu norvalina doprinose uvidu u mehanistička svojstva enzima, odnosno, koriste li se neki mehanizmi preferentno u ovisnosti o nepripadnom supstratu. Pogotovo je IleRS zanimljiv primjer, obzirom da prijetnju točnosti predstavljaju proteinogeni valin i neproteinogeni norvalin. S norvalinom se IleRS u staničnim uvjetima ipak rjeđe susreće (samo u mikroaerobnim uvjetima) u odnosu na valin, kojem je procijenjena citoplazmatska koncentracija 4 mmol dm^{-3} [17]. Intuitivno je očekivati da je IleRS bolje prilagođen otklanjanju valina, odnosno da su mehanizmi očuvanja točnosti evoluirali s ciljem učinkovitog sprječavanja nastanka valil-tRNA^{Ile}.

Kao što je to već prethodno opisano, IleRS koristi sve mehanizme popravka pogreške u prisustvu valina – tRNA-neovisni popravak pogreške, te tRNA-ovisne mehanizme popravka pogreške – prije prijenosa i poslije prijenosa. tRNA-ovisni popravak pogreške prije prijenosa nije dovoljno učinkovit da spriječi nastajanje Val-tRNA^{Ile}, jer gašenjem popravka pogreške nakon prijenosa (uvođenjem mutacije D342A[106]), nastali mutirani enzim značajno pogrešno aminoacilira, iako tRNA-ovisni popravak pogreške prije prijenosa ima čak do 30 % udjela u ukupnom popravku[11]. tRNA-ovisni popravak pogreške prije prijenosa ne postoji kod ValRS i LeuRS[7, 48], a nedavno je pokazano da ne postoji čak ni kod IleRS iz svih organizama[10]. Otkriveno je da IleRS iz bakterije *Streptomyces griseus* ne koristi tRNA-ovisan popravak pogreške prije prijenosa, već se oslanja isključivo na robustan popravak pogreške nakon

prijenosa valina na tRNA – deacilaciju valil-tRNA^{Ile} u zasebnoj domeni CP1. Prisutnost tRNA-ovisnog popravka pogreške prije prijenosa pokazana je pak kod IleRS iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, kao nižeg eukariota, također u prisustvu valina. Obzirom da tRNA-ovisan popravak prije prijenosa nije očuvan kod svih IleRS, te da su dosadašnji eksperimenti bili rađeni s proteinogenim valinom, u sklopu ove disertacije cilj je bio odrediti iskorištava li bakterija *E. coli* IleRS taj mehanizam također i u prisustvu neproteinogenog norvalina. Za detaljnu karakterizaciju mehanizama popravka, potrebno ih je zasebno mjeriti. Popravak nakon prijenosa aminokiseline mjeri se enzimskim testom u kojem se *in trans* enzimu dodaje predformirana pogrešno aminoacilirana tRNA te se prati deacilacija, odnosno nastanak slobodne tRNA. tRNA-neovisni popravak pogreške prije prijenosa jednostavno se mjeri u odsustvu tRNA, testom koji prati nastanak AMP-a odnosno utrošak ATP-a u prisustvu nepripadne aminokiseline, dok se tRNA-ovisni popravak pogreške prije prijenosa mjeri sličnim testom utroška ATP-a, ali u prisustvu tRNA te s varijantom enzima kojoj je ugašen popravak pogreške nakon prijenosa. Najprije je ispitan tRNA-neovisni popravak pogreške u prisustvu norvalina. Iznenađujuće, rezultati su vrlo slični rezultatima dobivenim u prisustvu valina, što pokazuje da je kapacitet sintetskog mjesta jednak za uklanjanje obje nepripadne aminokiseline. Kako bi testirali sposobnost tRNA u stimulaciji hidrolize norvalil-adenilata, bila je potrebna varijanta enzima koja ne radi popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline. Testiran je D342A IleRS mutant, kojem je izmijenjen ključni aspartat koji pozicionira amino skupinu aminokiseline u domeni CP1, za kojeg je pokazano da je očuvan kod svih enzima razreda Ia te da ima važnu ulogu u deacilaciji, jer izmjenom u alanin, u potpunosti se ugasi deacilacija[7, 48, 77, 79, 106]. Međutim u testu deacilacije norvalil-tRNA^{Ile}, zamjećeno je da D342A IleRS nema posve ugašenu deacilaciju. Koeficijent brzine deacilacije norvalil-tRNA^{Ile} određen s D342A IleRS u uvjetima jednog enzimskog kruga iznosio je 1,59 s^{-1}. Kako s tom varijantom enzima nije bio posve ugašen popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline, nije se mogao se koristiti za mjerenje tRNA-ovisnog popravka pogreške prije prijenosa. Zatim je u deacilaciji testiran dvostruki mutant – D342A/T243R, i pokazano je da ta varijanta zaista ne deacilira norvalil-tRNA^{Ile}. Kada je njome testiran tRNA-ovisni popravak pogreške prije prijenosa, u uvjetima paralelnog praćenja nastanka norvalilirane tRNA^{Ile} i utroška ATP-a, pokazano je da IleRS i u prisustvu norvalina koristi tRNA-ovisni popravak pogreške prije prijenosa. Time je pokazano da je tRNA-ovisni popravak pogreške prije prijenosa svojstvo enzim-tRNA kompleksa, koje je neovisno o supstratu. Međutim ostavlja se mogućnost da prisutnost dosad neistraženih aminokiselinskih supstrata promijeni particioniranje te da enzim u tom slučaju koristi samo popravak pogreške nakon prijenosa. Obzirom na aktivnost, kod norvalina je udio

tRNA-ovisnog popravka pogreške prije prijenosa u ukupnom popravku do 40 % (omjer koeficijenta brzine tRNA-ovisnog popravka pogreške prije prijenosa, 1,07 s^{-1} i koeficijenta brzine popravka pogreške divljeg tipa enzima u istim uvjetima, 2,54 s^{-1}), slično kao i kod valina gdje je iznosio 30 %. Udio popravka izračunava se prema omjeru koeficijenta brzine nastanka AMP koji odgovara popravku pogreške prije prijenosa aminokiseline, i omjera koeficijenta brzine nastanka AMP-a mjerenog u ukupnom popravku pogreške. Za određivanje popravka pogreške prije prijenosa koristi se mutant s mutacijom u domeni za popravak pogreške nakon prijenosa. Ako ta mutacija utječe na translokaciju ili disocijaciju tRNA, odnosno translokaciju ili disocijaciju aminoacilirane/pogrešno aminoacilirane tRNA, parametri mjerenja tRNA-ovisnog popravka prije prijenosa neće odgovarati stvarnima. Pritom, za očekivati je da je izmjereni popravak pogreške prije prijenosa veći, ako je disocijacija aminoacilirane/pogrešno aminoacilirane tRNA sporija. Naime, nedavno je pokazano kod IleRS da i aminoacilirana i pogrešno aminoacilirana tRNA izazivaju tRNA-ovisni popravak pogreške prije prijenosa, što znači da 3'-kraj tRNA ne mora biti pozicioniran u sintetsko mjesto, te da je učinak pojačane hidrolize aa-AMP vjerojatno posljedica konformacije promjene uslijed vezanja tRNA tijela za enzim. Ukoliko se tRNA, ili aminoacilirana tRNA duže zadržavaju na enzimu, duže će se stimulirati hidroliza aa-AMP.

Rezultati s norvalinom u potpunosti se slažu s rezultatima s valinom i u skladu su s teorijom kinetičkog particioniranja. Brzine prijenosa norvalina na $tRNA^{Ile}$ te hidrolize norvalil-AMP vjerojatno su usporedive, kao što je to slučaj za valin, pa se hidroliza u sintetskom mjestu događa istovremeno kako nastaje pogrešno aminoacilirana tRNA. Međutim za konačni dokaz navedenoga, potrebno je mjeriti hidrolizu norvalil-AMP u uvjetima jednog enzimskog kruga, obzirom da se u uvjetima ustaljenog stanja mjeri najsporiji korak, što može biti i disocijacija produkta.

Okarakteriziran je i popravak pogreške nakon prijenosa na $tRNA^{Ile}$, odnosno deacilacija norvalil-$tRNA^{Ile}$. Određen je koeficijent brzine hidrolize Nva-$tRNA^{Ile}$ u uvjetima jednog enzimskog kruga (k_{deacyl} = 235,9 s^{-1}). U usporedbi s postojećim podacima za deacilaciju Val-$tRNA^{Ile}$, vidljivo je da je deacilacija Nva-$tRNA^{Ile}$ znatno brža – čak 3,7 puta (deacilacija Val-$tRNA^{Ile}$ je k_{deacyl} = 64 s^{-1} [73]). Takav rezultat se dobro slaže s deacilacijom Nva-$tRNA^{Leu}$ u prisustvu LeuRS iz bakterije *E. coli*, gdje je deacilacija Nva-$tRNA^{Leu}$ također brza (k_{deacyl} = 310 s^{-1} [48]). Zanimljivo je i da je deacilacija Ile-$tRNA^{Leu}$ u prisustvu LeuRS iz bakterije *E. coli* sporija od deacilacije Nva-$tRNA^{Leu}$, te odgovara deacilaciji Val-$tRNA^{Ile}$ u prisustvu IleRS (Ile-$tRNA^{Leu}$: 42 s^{-1}, Nva-$tRNA^{Leu}$: 310 s^{-1}, Val-$tRNA^{Ile}$: 64 s^{-1}). Uzorak koji se iz navedenih usporedbi može vidjeti, je da se nepripadne aminokiseline razgranatog bočnog ogranka ipak

nešto lošije deaciliraju, odnosno lošije pozicioniraju u hidrolitičko mjesto domene CP1. Obzirom na zajedničko podrijetlo domene CP1, te da IleRS i LeuRS moraju spriječiti efikasnu hidrolizu pripadnih aminoaciliranih tRNA, gdje je pritom pripadna aminokiselina razgranata, razlika u hidrolizi pogrešno aminoaciliranih tRNA prema razgranatosti bočnog ogranka nepripadne aminokiseline vjerojatno je posljedica postizanja ravnoteže maksimalne deacilacije nepripadne razgranate pogrešno aminoacilirane tRNA, te sprječavanja deacilacije razgranate pripadne aminoacilirane.

Zanimljiv rezultat kinetičke karakterizacije popravka pogreške nakon prijenosa je već prethodno spomenuti D342A IleRS. Iako je prethodno pokazano da ne deacilira Val-tRNA^{Ile}, u ovoj disertaciji pokazano je da ipak nije posve ugašena deacilacije Nva-tRNA^{Ile} (za IleRS D342A k_{deacyl} = 1,59 s^{-1}, a za divlji tip k_{deacyl} = 235,9 s^{-1}). To je prvi poznati slučaj da mutacija ključnog aspartata, koji ima ulogu pozicioniranja amino skupine aminokiseline pogrešno aminoacilirane tRNA u domenu CP1, nije sasvim ugasila popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline. Činjenica da D342A koji ne hidrolizira Val-tRNA^{Ile}, a donekle ipak hidrolizira Nva-tRNA^{Ile} dodatno potvrđuje da se ta dva supstrata ipak različito pozicioniraju u hidrolitičkom mjestu. Mutacija bočnog ogranka umanjuje deacilaciju Nva-tRNA^{Ile} 150 puta (236 s^{-1} za deacilaciju divljim tipom / 1,6 s^{-1} za deacilaciju s D342A), dok ista mutacija umanjuje deacilaciju Val-tRNA^{Ile} preko 4000 (64 s^{-1} za deacilaciju divljim tipom / 0,014 s^{-1} za deacilaciju s D342A). Daljni uvid u mehanizam popravka pogreške nakon prijenosa te način diskriminacije pripadne od nepripadnih aminokiselina u hidrolitičkom mjestu mogao bi se dobiti molekulskim modeliranjem reakcija u domeni CP1 s validacijom rezultata pomoću ciljane mutageneze, i kinetičkih mjerenja u prisustvu mutiranih enzima.

U ovom radu pročišćena je tRNA^{Ile} proizvedena na dva načina: 1) prekomjerna ekspresija s rekombinantnog transkripcijskog vektora u bakteriji *E. coli*; 2) direktna izolacija nativnog tRNA^{Ile} izoakceptora iz bakterije *E. coli*. Zbog potrebe za velikom količinom tRNA^{Ile}, u većini do sada objavljenih kinetičkih istraživanja korištena je prekomjerno eksprimirana tRNA^{Ile}. Njenu produkciju dodatno komplicira činjenica što je za aktivnost potrebna posttranskripcija modifikacija (treonilkarbamoil-adenozin A37), zbog čega transkript proizveden *in vitro* nije aktivan[34]. Komplikacija s transkripcijom *in vivo* je preopterećenost posttranskripcijske mašinerije za doradu tRNA, zbog čega nastaje spektar hipomodificiranih tRNA, uz ciljne potpuno modificirane tRNA. Za daljnji rad je potrebna izolacija potpuno modificirane tRNA, najčešće uz pomoć kromatografije obrnutih faza. Za učinkovitu ekspresiju *in vivo*, korišten je sustav T7 RNA-polimeraze koji prepoznaje gen ukloniran nizvodno od promotora T7. Međutim, za učinkovitu ekspresiju preferentni početak gena je G:C par baza. Nativni gen za

$tRNA^{Ile}$ započinje s A:U, stoga je uvedena mutacija odnosno zamjena prvog nukleotidnog para A:U u G:C. Iz prethodnih publikacija bilo je poznato da taj par baza nije identitetni element $tRNA^{Ile}$, a takva mutirana tRNA radi jednako kao i nativna u aminoaciliranju u uvjetima ustaljenog stanja. Međutim, mutirana tRNA nije provjerena u reakcijama popravka pogreške niti reakcijama jednog obrtaja enzima. Kako je u pitanju mutirani prvi par nukleotida, i to iz para koji ostvaruje slabije interakcije (A:U) u par koji ostvaruje jače interakcije (G:C), moguće je da ukoliko prilikom translokacije dolazi do pucanja veza koje se ostvaruju između baza prvog nukleotidnog para, mutacija ima utjecaj na kinetiku translokacije, a time i sintetske, odnosno hidrolitičke reakcije. S ciljem provjere opravdanosti korištenja mutirane tRNA u kinetičkim eksperimentima, izolirana je nativna tRNA pomoću afinitetne kromatografije s biotiniliranim oligonukleotidima komplementarnim dijelu $tRNA^{Ile}$ izoakceptora. S takvom nativnom tRNA ponovljeni su eksperimenti poput stimulacije hidrolize valil-adenilata (tRNA-ovisan popravak pogreške prije prijenosa) te reakcije prijenosa aminokiseline izoleucina na tRNA. Dobiveni su istovjetni kinetički rezultati kao i s mutiranom prekomjerno eksprimiranom tRNA, što opravdava njeno korištenje i potvrđuje prijašnje rezultate (koeficijenti brzine prijenosa izoleucina na $tRNA^{Ile}$ su 4,9 s^{-1} za nativnu $tRNA^{Ile}$, a 3,8 s^{-1} za $tRNA^{Ile}$ korištenu u drugim eksperimentima[73]).

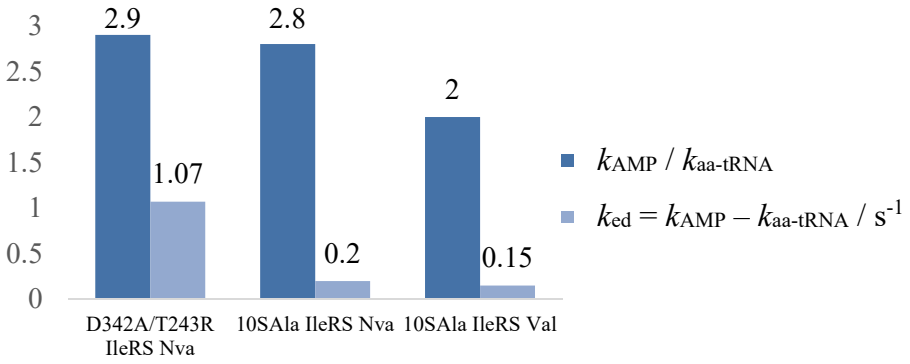
Nedavno je objavljeno istraživanje u kojem je pokazano da se IleRS ponaša kao ribonukleoprotein jer optimalnu djelotvornost u diskriminaciji nepripadnih kiselina postiže tek kada je na enzim vezana $tRNA^{73}$[73]. U tim uvjetima dolazi do povećanja brzine hidrolize za nepripadni aminoacil-adenilat, a i afinitet prema aminokiselinama je niži u odnosu na slobodni enzim, što omogućava da enzim u *in vivo* uvjetima nije u zasićenju s nepripadnim valinom. U radu su korištene varijante tRNA koje se ne mogu aminoacilirati. U ovoj disertaciji napravljena je aktivacija aminokiseline norvalina uz tRNA tretiranu perjodatom koja se također ne može aminoacilirati jer dolazi do oksidacije vicinalnog diola riboze zadnjeg nukleotida u strukturi tRNA. I ovdje je primjećeno povećanje K_M za norvalin od oko 10 puta u prisutnosti tRNA, jednako kako je ranije objavljeno za valin i izoleucin[73].

Do sada prikazani rezultati odnose se na usporedbu valina i norvalina u *in vitro* kinetičkim istraživanjima, što da je dobar uvid u mehanističke mogućnosti enzima. Međutim, u staničnim uvjetima enzim je u značajno drugačijem okruženju, mnogi supstrati istovremeno kompetiraju za vezanje na enzim, koncentracije supstrata (pripadnih ili nepripadnih) su drugačije, te enzim nije u uvjetima zasićenja, a i zbog prisutnosti drugih enzima, efektivna koncentracija drugih supstrata je promijenjena. Zato je korisno uz *in vitro* istraživanja napraviti i *in vivo* eksperimente za usporedbu supstratne specifičnosti enzima u realnim uvjetima. Jedan od ciljeva

ovog rada bio je usporediti toksičnost proteinogenog i neproteinogenog nepripadnog supstrata. Najprije je bilo potrebno identificirati prikladni modelni enzim, koji ima približno jednak faktor diskriminacije obje nepripadne aminokiseline. IleRS iz bakterije *E. coli* se pokazao najboljim izborom, obzirom da je u reakciji aktivacije faktor diskriminacije norvalina 238, a valina 149, u usporedbi s ValRS koji ima faktor diskriminacije norvalina 4500, a treonina 270. Cilj je bio ispitati toksičnost ugradnje proteinogene, odnosno neproteinogene aminokiseline u proteom umjesto pripadne aminokiseline, pa je za te potrebe pokušano proizvesti soj bakterije *E. coli* s ugašenim popravkom pogreške nakon prijenosa homolognom rekombinacijom divljeg tipa gena s mutiranom varijantom. Međutim, takvi pokušaji nisu uspjeli, vjerojatno zbog visoke koncentracije valina u stanici što pogoduje negativnoj selekciji mutiranih sojeva, te reverziji točkaste mutacije u takvim nepovoljnim uvjetima. U konačnici, korišten je soj bakterije *E. coli* koji umjesto divljeg tipa gena ima gen s 10 alanina u mjestu za popravak pogreške nakon prijenosa na pozicijama 241 do 250 je zamijenjano alaninima (soj je ustupio dr. Paul Schimmel). Time je značajno narušena djelotvornost domene te ona više nije radila popravak. Važno je naglasiti da nije bilo drugih promjena u genomu soja, a gen koji kodira za IleRS i dalje se nalazio pod kontrolom nativnog promotora pa je razina ekspresije ostala jednaka kao u divljem tipu soja. Također, kako se radilo o velikoj mutaciji (10 aminokiselina izmijenjeno), nije moglo doći do reverzije mutacije u nepovoljnim uvjetima. Soj s ovakvom mutacijom u esencijalnom enzimu nije pokazivao znakove problema s vijabilnošću u normalnim uvjetima, pa se očekivalo da je 10SAla IleRS relativno normalno aktivan u aminoaciliranju.

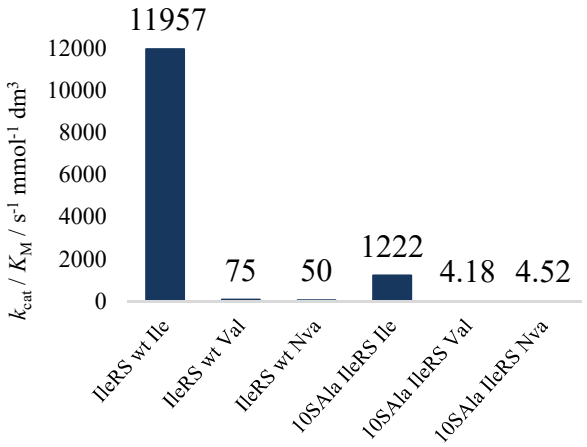
Radi boljeg razumijevanja *in vivo* sustava, 10SAla IleRS enzim je prekomjerno eksprimiran i pročišćen, te je kinetički okarakteriziran *in vitro*. Enzim je unatoč značajnoj mutaciji u domeni za popravak pogreške nakon prijenosa bio aktivan *in vitro*, odnosno vršio je reakciju aminoaciliranja uz pripadni supstrat izoleucin, ali je također pogrešno aminoacilirao $tRNA^{Ile}$ uz nepripadne valin i norvalin. Koeficijent brzine aminoaciliranja je bio nešto niži (0,3 s^{-1} za 10SAla IleRS) od publiciranog koeficijenta brzine s divljim tipom enzima (divlji tip IleRS 0,7 s^{-1} [7]), što može biti posljedica mutacija na cjelokupnu sktrukturu proteina ili interakciju tRNA s IleRS koja je važna obzirom da se IleRS ponaša kao ribonukleoprotein[73]. Unatoč umanjenom koeficijentu brzine aminoaciliranja, enzim je radio na razini koja je odgovarala ranije publiciranom koeficijentu brzine enzima s dvostrukom mutacijom (D342/T243R), k_{obs}(10SAla) = 0,3 s^{-1}, k_{obs} (D342A/T243R) = 0,33 s^{-1} [7]. Također, provjereno je i ima li enzim zaista ugašen popravak pogreške nakon prijenosa i to uz Nva- i $Val\text{-}tRNA^{Ile}$. Uz oba supstrata enzim nije vršio popravak pogreške nakon prijenosa. Dalje, radi usporedbe s divljim tipom enzima, određeni su parametri popravka pogreške prije prijenosa, koji bi također teoretski mogli biti

promijenjeni u značajno mutiranom enzimu. No popravak pogreške prije prijenosa je i dalje bio prisutan. Iako bi bilo idealno koristiti enzim s posve ugašenim popravkom, tRNA-ovisni popravak prije prijenosa nije moguće ugasiti bez značajnog negativnog učinka na sintetske reakcije zbog isprepletenosti sintetskog i hidrolitičkog podmjesta[11]. Određen je omjer utroška ATP-a i nastanka pogrešno aminoacilirane tRNA s 10SAla IleRS enzimom u prisustvu valina i norvalina. Navedeni omjer odražava prisutnost tRNA-ovisnog popravka pogreške prije prijenosa, i odgovorao je omjeru dobivenom s dvostrukim mutantom D342A/T243R u prisutnosti norvalina (k_{AMP} / $k_{aa\text{-}tRNA}$, Tablica 4.6, Slika 5.1) iako je k_{ed} vrijednost koja se računa kao koeficijent brzine nastanka AMP-a minus koeficijent brzine aminoaciliranja ($k_{AMP} - k_{aa\text{-}tRNA}$) ipak nešto umanjen ($k_{ed}$, Tablica 4.6, Slika 5.1).



Slika 5.1: Prikaz koeficijenata brzina reakcija utroška ATP-a, odnosno nastajanja AMP-a i nastajanja aa-tRNA u reakcijama kataliziranim enzimima IleRS. Podaci iz Tablice 4.6.

Također, provjerena je aktivacija izoleucina, valina i norvalina – određeni su kinetički parametri k_{cat} i K_M u aktivaciji. Dobiveni parametri približno su odgovarali parametrima dobivenim s divljim tipom enzima (K_M je nešto viši, a k_{cat} niži, zbog čega je konstanta specifičnosti ukupno oko 10 puta manja) (Tablica 4.1,Tablica 4.2 i Slika 5.2).



Slika 5.2:Prikaz parametra k_{cat}/K_M u aktivaciji aminokiselina enzimima IleRS iz bakterije *E. coli*. Podaci prema Tablici 4.1 i Tablici 4.2.

Kinetička provjera enzima 10SAla pokazala je da je takav enzim pogodan za testiranja *in vivo*: 1) aktivacija izoleucina i nepripadnih valina i norvalina je jednaka – nije promijenjena specifičnost, i približno jednaka aktivacijama dobivenim s divljim tipom enzima 2) enzim ima ugašen popravak pogreške nakon prijenosa u prisustvu Val- i Nva-$tRNA^{Ile}$ 3) enzim podjednako pogrešno aminoacilira u prisustvu valina i u prisustvu norvalina. Soj 10SAla je pribavljen od grupe koja je na njemu već radila i objavila neke rezultate[94]. Pokazano je da da su norvalin i valin toksični ovom soju, u odnosu na jednake količine aminokiselina dodanih soju divljeg tipa. U njihovim istraživanjima, toksičnost norvalina i valina su kvantificirani praćenjem promjene turbiditeta bakterija u hranidbenim medijima s rastućom koncentracijom egzogeno dodanog valina i norvalina. Problem rada s valinom je što dodatak većih koncentracija inhibira biosintezu izoleucina, odnosno uzrokuje pseudoaksotrofiju za izoleucin, pa je u mjerenjima u ovoj disertaciji uvijek u medij dodana mala količina izoleucina, leucina i valina (svaka je bila prisutna u koncentraciji c = 100 μmol dm^{-3}), iako je korišteni soj zapravo prototrof za sve aminokiseline. Također, mala količina dodanih aminokiselina, ubrzala je rast stanica, što je omogućilo mjerenja u prikladnom vremenskom razdoblju. U ovoj disertaciji korišten je sličan pristup kao u ranijem radu, a za test toksičnosti korišteno je mjerenje inhibitorne koncentracije (IC50) za norvalin i valin jer je cilj bio točno kvantificirani toksičnost i utvrditi koja mistranslacija je toksičnija. Pokazalo se da je norvalin nekoliko puta toksičniji 10SAla soju bakterije *E. coli* od valina (IC50(Nva) = 0,55 mmol dm^{-3}, IC50(Val) = 1,77 mmol dm^{-3}), dok su divljem tipu soja obje aminokiseline jednako toksične, i to značajno manje nego mutiranom soju (IC50(Nva) = 8,6 mmol dm^{-3}, IC50(Val) = 8,78 mmol dm^{-3}). Takav rezultat pokazuje da je toksičnost vjerojatno posljedica ugradnje valina i norvalina umjesto izoleucina u proteom

bakterije *E. coli*. Preliminarni podaci dr. Morane Dulić dobiveni spektrometrijom masa pokazuju da s korištenim mutiranim sojem zaista dolazi do ugradnje i valina i norvalina u proteom bakterije na mjesta izoleucina te da je toksičnost posljedica mistranslacije, obzirom da se uspoređuju divlji tip i mutirani soj, gdje je jedina razlika nemogućnost popravka pogreške kod IleRS u mutiranom soju. Prema rezultatima, norvalin je nešto toksičniji, odnosno zamjena izoleucina norvalinom djeluje toksičnija u odnosu na zamjenu valinom (niža vrijednost IC50). Moguće objašnjenje veće toksičnosti dolazi iz strukturne razlike valina i norvalina: zamislivo je da će ravnolančani norvalin stvarati veće poteškoće proteinima prilikom ugradnje na mjesta gdje bi se trebao nalaziti izoleucin, nego razgranati valin, koji je strukturno sličniji izoleucinu, samo za jednu metilensku skupinu kraći. Ravnolančani bočni ogranak norvalina također ima veću slobodu rotacije, što može uzrokovati probleme u smatanju proteina i ostvarivanju hidrofobnih kontakata na sučeljima domena[111]. Povećana količina nestrukturiranih proteina dovodi do pojačane razgradnje čime se opterećuju i translacijska i degradacijska stanična mašinerija i troši značajno veća količina ATP-a za sintezu proteina[112].

U ranijem istraživanju pokazano je da u određenim situacijam mistranslacija može biti selektivna prednost stanicama[113-115]. U određenim uvjetima norvalin ili valin ugrađen na izoleucinska mjesta u proteomu može i pospiješiti rast stanica[94]. Iz tog razloga napravljen je test preživljenja bakterija mutiranog soja u stresnim uvjetima. Napravljen je test rasta bakterija na krutim podlogama (CFU), tako da su bakterije prvo rasle do sredine eksponencijalne faze bez stresa, a zatim im je dodana veća količina valina ili norvalina (10 puta veća koncentracija od pripadnog IC50) i bakterije su dalje inkubirane pola sata na 37 °C da se omogući mistranslacija staničnih proteina. Bakterije su zatim premještene na inkubaciju na temperaturu za koju je pokazano da izaziva smanjenje vijabilnosti (izmjereno pomoću metode CFU, vidi poglavlje 3.2.4.2). Dodatak i valina i norvalina u korištenim količnama, prema preliminarnim podacima dr. Dulić, svakako je rezultirao ugradnjom aminokiselina na mjesta izoleucina u proteomu, a rezultirao je i značajnim smanjenjem preživljenja, odnosno smanjenom sposobnošću stvaranja kolonija. Ipak, dodatak norvalina je omogućio nešto bolje preživljenje od dodatka valina (posebno vidljivo nakon sat vremena na visokoj temperaturi, Slika 4.29), suprotno rezultatima toksičnosti. Navedeno sugerira da je ugradnja norvalina na mjesta izoleucina u uvjetima povišene temperature za stanicu pogodnija od ugradnje valina. Obzirom da su stanice izložene temperaturnom stresu, očekivali bi da prednost ima ugradnja valina, jer bi norvalin trebao imati povećanu konformacijsku slobodu bočnog ogranka u odnosu na valin, što bi na povišenoj temperaturi trebala biti mana jer s porastom temperature molekulska gibanja postaju još brža. Moguće objašnjenje ovakvih rezultata je da su stanice gdje su proteini

mistranslatirani norvalinom predpripremljenije na temperaturni stres jer mistranslacija norvalinom izaziva snažniji stanični odgovor nalik odgovoru na povišenu temperaturu, tzv. *heat shock response*. Međutim, potrebno je uzeti u obzir da je IC50 za valin veći nekoliko puta, pa je zato u medij i dodana značajno veća koncentracija valina od norvalina. Također, validnost ovog pristupa je upitna, budući da su uspoređivani uvjeti u kojima je maksimalna inhibitorna djelatnost norvalina odnosno valina relativno prema vrijednosti IC50. Naime, u tim uvjetima je maksimalna inhibicija, odnosno učinak na brzinu diobe stanica različita za norvalin ili valin. Iz krivulja iz kojih je određen IC50 vidljivo je da je maksimalni toksični učinak norvalina na brzinu diobe stanica ipak manji nego maksimalni toksični učinak valina na brzinu diobe stanica, odnosno dodatak norvalina manje umanjuje brzinu diobe stanica od valina. Međutim, moguće objašnjenje boljeg preživljenja uz predinkubaciju s dodanim norvalinom u odnosu na valin dolazi iz nedavno dobivenih proteomskih rezultata (Dulic i sur., neobjavljeni podaci) gdje je pokazano da se u staničnom proteomu bakterije *E. coli* (soj s ugašenim popravkom pogreške nakon prijenosa) u uvjetima dodatka pripadne vrijednosti IC50 valin u proteomu nalazi ugrađen na 24 % izoleucinskih mjesta, dok je ta vrijednost za ugradnju norvalina pri dodatku koncentracije IC50 tek 7,5 %. Ugradnja valina na izoleucinska mjesta je veća u odnosu na norvalin i kada se u medij doda veća koncentracija norvalina, i to koncentracija koja odgovara vrijednosti IC50 za valin. Tada se norvalin ugrađuje na 16 % izoleucinskih mjesta. Ovi rezultati upućuju da je uzrok boljeg preživljenja u mediju s norvalinom značajno manja stopa ugradnje norvalina u proteom u odnosu na valin. Obzirom na navedeno, do sad publicirani rezultati kao i rezultati u sklopu ove disertacije, ne rasvjetljuju da li norvalilirani proteom zaista omogućava stanicama bolje preživljenje na povišenoj temperaturi. Prema sadašnjim saznanjima, najtočniji način praćenja boljeg preživljenja uslijed norvaliliranosti ili valiliranosti proteoma bi bio uz točno određenu razinu mistranslacije, koja bi trebala biti jednaka i eksperimentalno izmjerena za valin i norvalin.

5.2. ValRS

Izoleucin, valin, norvalin, leucin su aminokiseline s alifatskim bočnim ograncima i sve strukturno sliče. Ipak, kada se gledaju enzimske reakcije s aaRS, priroda bočnih ogranaka nije jedini faktor za potencijalne pogreške enzima u odabiru supstrata. ValRS, na primjer, uz pripadni valin aktivira i aminokiselinu treonin, koji iako ima polarni bočni ogranak (-CH_2-OH) i dalje ga ValRS uspješno veže u sintetsko aktivno mjesto, aktivira u treonil-adenilat te prenosi s treonil-adenilata na $tRNA^{Val}$. ValRS iz bakterije *E. coli* je dobro karakteriziran u sintetskim

reakcijama i u reakcijama popravka pogreške, uz treonin, najčešće spominjani nepripadni supstrat[7]. U ovom radu, ispitana je sposobnost diskriminacije norvalina s ValRS, te su određeni kinetički parametri za sintetske reakcije i reakcije popravka pogreške kako bi se usporedila učinkovitost enzima u prisustvu proteinogenog nepripadnog supstrata – treonina, i neproteinogenog nepripadnog supstrata – norvalina.

Za razliku od IleRS, ValRS znatno slabije aktivira norvalin. U Tablici 5.3 su navedeni parametri u aktivaciji ValRS uz supstrate norvalin, treonin i valin. Vidljivo je da ValRS uspješno diskriminira nepripadni norvalin, kao i nepripadni treonin i to temeljno na razini K_M (za treonin oko 100 puta veći, a za norvalin oko 300 puta veći), ali i na razini k_{cat} (za treonin oko 3 puta manji a za norvalin čak 16 puta manji). Ako se usporedi konstanta specifičnosti k_{cat}/K_M dobije se da je ona za treonin 270 puta manja nego za pripadni supstrat, a za norvalin zbog značajnijeg utjecaja oba promjenjena parametra čak 4500 puta manja. Iz toga je vidljivo da je zapravo isključivanje norvalina na temelju sintetske reakcije dovoljno dobro da nisu potrebni mehanizmi popravka pogreške u prisustvu norvalina jer je diskriminacija na razini eksperimentalno utvrđene razine pogreške u biosintezi proteina. Iako ovo isključuje ValRS kao dobar modelni enzim za ispitivanje toksičnosti ugradnje nepripadne proteinogene u odnosu na nepripadnu neproteinogenu aminokiselinu umjesto pripadnog valina u proteom, zbog mehanističke perspektive, karakterizirane su sintetske reakcije i reakcije popravka pogreške u prisustvu norvalina.

Tablica 5.3: Usporedni prikaz kinetičkih parametara u aktivaciji enzimom ValRS uz pripadne i nepripadne supstrate. Podaci za sve osim reakcija s norvalinom preuzeti iz [7].

Enzim	Supstrat	K_M (aa) / µmol dm^{-3}	k_{cat} / s^{-1}	k_{cat} / K_M / s^{-1} µmol^{-1} dm^3	Faktor diskr.
ValRS	Val	48 ± 8	64,1 ± 2	1,35	
ValRS	Thr	(46 ± 8) × 10^2	22 ± 1	0,005	270
ValRS	Nva	(14 ± 2) × 10^3	4,3 ± 0,2	0,0003	4500

Prijenos pripadnog valina i nepripadnog treonina na tRNA^{Val} je ranije istražen, i vidljivo je da je prijenos jednako brz u prisustvu obje aminokiseline, te da je značajno brži od prijenosa aminokiseline kataliziranog enzimom IleRS (za reakcije katalizirane enzimom ValRS k_{trans}(Val) = 39 s^{-1}, k_{trans}(Thr) = 55 s^{-1} [7]). Prilikom mjerenja prijenosa norvalina na tRNA^{Val} u sklopu ove disertacije, uočeno je da se podaci utočnjavaju na bifaznu krivulju, pri čemu sporiju fazu opisuje konstanta brzine reakcije od oko 2,9 s^{-1}, a bržu fazu opisuje konstanta brzine reakcije iznosa 97,5 s^{-1}. Pokazano je da je sporija konstanta brzine približno jednakog iznosa kao i k_{cat} u aktivaciji norvalina (2,9 s^{-1} u odnosu na 4,25 s^{-1}). Kako bi dokazali da je sporija faza

uistinu posljedica aktivacije norvalina u korištenim reakcijskim uvjetima, reakcija je započeta u uvjetima u kojima su prethodno pomiješani enzim, ATP i tRNA, te je reakcija pogrešne aminoacilacije započeta dodatkom norvalina. Konstanta brzine pogrešne aminoacilacije dobivena na opisani način iznosila je 3,95 s^{-1}, a krivulja se utočnjavala na monofaznu eksponencijalnu jednadžbu. Takvi rezultati objašnjivi su s relativno brzom hidrolizom Nva-AMP u sintetskom mjesto ValRS (tRNA-neovisan popravak prije prijenosa, k_{cat} = 0,19 s^{-1}), nakon čega prije prijenosa aminokiseline nužno mora nastati Nva-AMP, a obzirom da je aktivacija relativno spora, taj korak ograničava mjerenje reakcije prijenosa norvalina na $tRNA^{Val}$. Iz toga je zaključivo da druga faza, brža faza, odgovara reakciji prijenosa norvalina na tRNA, te da je prijenos norvalina vrlo brz, te približno odgovara prijenosu treonina na $tRNA^{Val}$. Takvi rezultati pokazuju da ValRS ne diskriminira nepripadne aminokiseline treonin ili norvalin u koraku prijenosa.

Nadalje, ValRS kao IleRS i LeuRS, koristi tRNA-neovisni popravak pogreške prije prijenosa, koji iako je relativno spor, obzirom na brzinu ukupnog popravka pogreške čini pozamašan udio ukupnog popravka pogreške, do 30 % (dobiveno iz omjera koeficijenata tRNA-neovisan popravak prije prijenosa, k_{cat} = 0,19 s^{-1} i ukupnog popravka, k_{cat} = 0,63 s^{-1}). Prethodno je pokazano da ValRS ne koristi tRNA-ovisni popravak pogreške prije prijenosa u prisustvu treonina[7], a u sklopu ove disertacije korištenjem deacilacijskog mutanta D286A pokazano je da ne koristi taj tip popravka niti u prisustvu norvalina. Zanimljivo je da čak i divlji tip ValRS pogrešno aminoacilira $tRNA^{Val}$ s norvalinom, međutim u takvim reakcijama korištena je visoka koncentracija norvalina jer je K_M u aktivaciji norvalina 13,8 mmol dm^{-3}, a takva se koncentracija u staničnim uvjetima ne može postići. Najznačajni tip popravka pogreške kod ValRS, kao i kod IleRS i LeuRS, te kao što je to već pokazano u prisustvu treonina[7], je popravak pogreške nakon prijenosa, odnosno hidroliza aa-tRNA. Ovim tipom popravka ValRS efikasno hidrolizira Thr-$tRNA^{Val}$, kako je u ovom radu pokazano i Nva-$tRNA^{Val}$ u reakciji s konstantom brzine k_{deacyl} = 449 s^{-1}. Deacilacija je vrlo brza, te je neobično da je toliko učinkovit popravak pogreške kada zapravo norvalin niti ne predstavlja prijetnju točnosti dekodiranja valinskih kodona, obzirom da se učinkovito isključuje na temelju sintetskih reakcija. Međutim, također je neobično da se svega 50 % Nva-$tRNA^{Val}$ deacilira, iz za sada nepoznatih razloga. Iako je moguće da je u pitanju eksperimentalni artefakt, takvo opažanje može imati i mehanističke implikacije. Učinkovita deacilacija Nva-$tRNA^{Val}$ dodatno podupire teoriju zajedničkog podrijetla domene CP1 koja je evoluirala za učinkovito isključivanje tada zajedničkih nepripadnih aminokislina, uz zadršku da ne hidrolizira pripadne supstrate.

5.3. LeuRS

O LeuRS iz bakterije *E. coli*, organizmu iz kojeg su izolirani IleRS i ValRS koji su se koristili u ovom radu, se već zna mnogo toga: određena je kristalna struktura ovog enzima[78], nedavno su određeni važni kinetički parametri za sintetske reakcije i reakcije popravka, i enzim je detaljno mehanistički karakteriziran uz pripadni supstrat i nepripadne aminokiseline izoleucin i norvalin[14]. Nedavno je u našem laboratariju pokazano da su u publiciranim javno dostupnim kinetičkim istraživanjima korištene komercijalne preparacije izoleucina koje su sadržavale leucin u tragovima. Pokazano je da je to svojstveno za sve testirane uzorke leucina, pri čemu je uzorak leucina u skladu s deklariranom čistoćom tvrtke koja ga proizvodi[14]. Kako je leucin pripadni suptrat za kojeg enzim ima znatno bolji afinitet, tragovi leucina u izoleucinu uzrokuju kinetičke artefakte koji čine izoleucin prividno boljim supstratom LeuRS-a, nego što to zaista jest. S pročišćenim izoleucinom pokazano je da LeuRS iz bakterije *E. coli* vrlo učinkovito isključuje izoleucin na temelju sintetskih reakcija, te da su dotadašnji publicirani rezultati prema kojima je izoleucin dobar supstrat LeuRS, bili rezultat kinetičkog artefakta rada s kontaminiranim izoleucinom. Pokazano je da najveću prijetnju točnosti translacije na leucinskim mjestima predstavlja upravo neproteinogeni norvalin[14]. Potaknuto navedenim rezultatima, sve nepripadne aminokiseline korištene u sklopu ove doktorske disertacije, testirane su na prisutnost pripadne aminokiseline, ovisno o korištenoj aaRS, a sve testirane aminokiseline pokazale su zadovoljavajuću čistoću.

U ovom radu je također istraživana citosolna LeuRS iz *Homo sapiens*. Cilj je bio ustvrditi razinu diskriminacije izoleucina, obzirom na spomenuta saznanja da su kinetička istraživanja s izoleucinom uglavnom pogrešna zbog prisustva tragova leucina. U sklopu ove disertacije, proizvedeni su *H. sapiens* LeuRS te *H. sapiens* $tRNA^{Leu}$ prekomjernom ekspresijom *in vivo* u bakteriji *E. coli*.

U testovima aktivacije pripadne aminokiseline leucina, hsLeuRS se pokazao aktivnim te su dobiveni parametri približno slični već publiciranima (Tablica 5.4). Također, pokazano je da enzim aktivira i nepripadni norvalin, te da su parametri slični do sada objavljenima (Tablica 5.4). Kada je testirana aktivacija izoleucina pročišćenog od tragova leucina, nije uočeno da hsLeuRS aktivira izoleucin (Tablica 5.4). Reakcija s nepripadnim izoleucinom toliko je slaba da nije moguće odrediti kinetičke parametre. Dobiveni podaci su u skladu s dosadašnjim istraživanjima koji su pokazali vrlo sporu aktivaciju izoleucina, ali sugeriraju da su publicirani podaci brzina aktivacije izoleucina precijenjeni. Već je u ranijim radovima faktor diskriminacije izoleucina na enzimu hsLeuRS bolji nego faktor diskriminacije publiciran na

enzimu iz bakterije *E. coli*[26, 107]. Prema novijim istraživanjima enzim hsLeuRS je prema kinetičkim parametrima aktivacije sličan bakterijskom enzimu, odnosno LeuRS iz bakterije *E. coli*: oba slabo, odnosno uopće ne aktiviraju izoleucin. Važno je naglasiti da je uočen jedan kinetički artefakt prilikom mjerenja aktivacije izoleucina. Primijećeno je da krivulje koje opisuju nastajanje produkta u ovisnosti o vremenu pri određenoj koncentraciji izoleucina zapravo imaju odsječak, odnosno da koncentracija produkta u vremenu nula ne iznosi nula. Kako je povećana koncentracija enzima, također je i porastao odsječak. Takav odsječak vidljiv je i u reakcijama s norvalinom, a obzirom da je u prisustvu izoleucina vidljiv samo odsječak, dok je nagib pravca, odnosno početna brzina gotovo zanemariva, može se zaključiti da fenomen nema učinak na mjerene brzine reakcije. Kako se nagib ne mijenja u ovisnosti o koncentraciji izoleucina, dok se odsječak mijenja u ovisnosti o koncentraciji enzima, može se zaključiti da hsLeuRS ne aktivira izoleucin ili ga aktivira vrlo sporo, što se na ovaj način ne može odrediti, a odsječak je podrijetlom od produkta koji vrlo brzo nastaje, vjerojatno kao posljedica leucina prisutnog u aktivnom mjestu enzima.

Tablica 5.4: Kinetički parametri u aktivaciji aminokiselina s hsLeuRS. Prvi dio tablice su ponovljene vrijednost iz Tablice 4.3 Drugi dio tablice su podaci iz rada Chen i sur. [90]

Supstrat	K_M / µmol dm^{-3}	k_{cat} / s^{-1}	k_{cat}/K_M / µmol^{-1} dm^3 s^{-1}	Faktor diskr.[a]
Leucin	93,2 ± 32,5	11,9 ± 1,5	0,13	1
Norvalin	5400 ± 1061	3,6 ± 0,2	$6{,}7\times10^{-4}$	192
Izoleucin	–[b]	–	–	–
Leucin[c]	45,6 ± 9,5	25,8 ± 1	0,57	1
Norvalin[c]	2195 ± 68	12,4 ± 0.5	$5{,}6\times10^{-3}$	102
Izoleucin[c]	1248 ± 254	0,162 ± 0,028	$1{,}3\times10^{-4}$	4385

[a] Faktor diskriminacije: $(k_{cat}/K_M)_{leucin}/(k_{cat}/K_M)_{norvalin\ ili\ izoleucin}$
[b] Kinetičke parametre za aktivaciju izoleucina nije bilo moguće odrediti zbog izuzetno spore aktivacije
[c] Podaci preuzeti iz rada Chen i sur. 2011

Činjenica da je enzim iz *H. sapiens* kinetički sličan enzimu iz bakterije *E. coli* govori o zajedničkom porijeklu oba enzima. Oba enzima dobro diskriminiraju izoleucin u sintetskoj reakciji, zbog čega je upitno postojanje domene za popravak pogreške nakon prijenosa. Kod enzima iz bakterije *E. coli* poznato je da opasnost predstavlja norvalin, koji se može akumulirati u mikroaerobnim uvjetima, dok kod humanog enzima, obzirom da kod viših eukariota nije moguća biosinteza norvalina zbog nedostatka aktivnih enzima za biosintezu razgranatih aminokiselina, nije jasno kako norvalin može u staničnim uvjetima predstavljati prijetnju, te čemu služi domena za popravak pogreške.

Enzim hsLeuRS je proizveden prekomjernom ekspresijom s rekombinantnog vektora u bakteriji *E. coli*. Pri ekspresiji većih proteina, bakterijska stanica nije uvijek idealno mjesto za njihovu translaciju. Prinos hsLeuRS proizvedenog na ovaj način je bio vrlo skroman, te se ekspresijom na ovaj način ukloniranog gena nisu mogle proizvesti veće količine proteina. Za daljnje kinetičko karakteriziranje diskriminacije nepripadnih supstrata, potrebno je raditi u uvjetima jednog obrtaja enzima, za što je potrebno proizvesti značajno veće količine proteina. Kako se radi o relativno velikom eukariotskom proteinu, vjerojatnije bi bolja sredina za proizvodnju ovakvog proteina bio eukariotski organizam, primjerice kvasac ili stanice insekata.

6. Zaključak

- Do sada je pokazano da izoleucil-tRNA-sintetaza iz bakterije *E. coli* uspješno aktivira i prenosi valin na $tRNA^{Ile}$, a u ovom radu je pokazano da također uspješno aktivira i prirodnu neproteinogenu aminokiselinu norvalin te ju prenosi na $tRNA^{Ile}$. Faktor diskriminacije IleRS u aktivaciji norvalina je samo 238, pa postoji potreba za mehanizmima popravka pogreške da ne bi dolazilo do ugradnje norvalina na izoleucinska mjesta u proteomu, pogotovo jer je poznato da se norvalin u mikroaerobnim uvjetima može naći u stanici u koncentraciji do 1 mmol dm^{-3}.

- IleRS koristi mehanizme popravke pogreške prije prijenosa, i to tRNA-ovisni i tRNA-neovisni, te popravak pogreške poslije prijenosa za otklanjanje norvalina. Kako je u ovom radu pokazano da IleRS koristi tRNA-ovisan popravak pogreške i u prisustvu norvalina, kao i valina, može se zaključiti da je tRNA ovisni popravak pogreške svojstvo samog enzim:tRNA kompleksa, neovisno o supstratu. Ipak u slučaju da je aminokiselinski supstrat značajno drugačiji od do sada istraženih moguće je da će enzim koristiti drugi mehanizam popravka, pa na primjer neće dolaziti do popravka pogreške prije prijenosa.

- Popravak pogreške nakon prijenosa kod IleRS čini najveći dio popravak pogreške, a tRNA-ovisni popravak pogreške prije prijenosa može činiti najviše 40 % ukupnog popravka.

- Norvalin je čak 3 do 4 puta toksičniji od valina bakteriji *E. coli* koja eksprimira IleRS s ugašenim popravkom pogreške nakon prijenosa. Kako prema preliminarnim rezultatima u ovom soju dolazi do ugradnje norvalina i valina na mjesta izoleucina, izgleda da su norvalilirani proteini pogubniji za stanicu od valiliranih, odnosno da je neproteinogena mistranslacija toksičnija.

- ValRS iz bakterije *E. coli* slabo aktivira norvalin, odnosno efikasno ga diskriminira u reakciji aktivacije s konstantom specifičnosti od 4500, čime nadilazi granicu ukupne eksperimentalno izmjerene pogreške u biosintezi proteina pa popravak pogreške nije niti potreban za očuvanje točnosti. Obzirom na nizak afinitet ValRS iz bakterije *E. coli* za norvalin, mogućnost mistranslacije *in vivo* gotovo ne postoji (K_M u aktivaciji je 13,8 mmol dm^{-3} taj, dok je koncentracija norvalina najviše 1 mmol dm^{-3})

- ValRS nakon aktivacije norvalina, jednako uspješno prenosi norvalin na $tRNA^{Val}$ kao i valin (korak prijenosa aminokiseline nije diskriminacijski). Međutim, ValRS također i vrlo brzo deacilira Nva-$tRNA^{Val}$. Neobično je da je amplituda deacilacije svega 50 %, zbog čega ValRS i značajno nakuplja pogrešno aminoaciliranu Nva-$tRNA^{Val}$, što je pokazano u mjerenjima u ustaljenom stanju, ali i deacilaciji u uvjetima jednog obrtaja. Nije jasno je li to eksperimentalni artefakt ili postoji mehanistički razlog.

- hsLeuRS proizveden u stanicama bakterije *E. coli* uspješno aktivira leucin i nepripadni norvalin, u skladu s ranije objavljenim rezultatima. U ovom radu nije bilo moguće odrediti parametre u aktivaciji izoleucina, a ako do aktivacije dolazi ona je vrlo spora, sukladno ranijim istraživanjima. hsLeuRS je prema tome mehanistički sličan LeuRS iz bakterije *E. coli* koji također učinkovito isključuje izoleucin u sintetskim reakcijama.

7. Popis oznaka, kratica i simbola

7.1. Popis aminokiselina

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

7.2. Popis kratica

aa-AMP: aminoacil-adenilat

aaRS: aminoacil-tRNA-sintetaza. Za aaRS specifične za određenu aminokiselinu koristi se kratica sastavljene od troslovne kratice pripadne aminokiseline i dodatka RS

aa-tRNA: aminoacil-tRNA

AMP: adenozin-5'-monofosfat

APS: amonijev persulfat

ATP: adenozin-5'-trifosfat

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

cAMP: 3'-5'- ciklički adenozin-monofosfat

CP1: eng. *connective peptide* I

D: dihidrouridin

DNA: deoksiribonukleinska kiselina

DTT: ditiotreitol

EDTA: etilendiamintetraoctena kiselina

EF: elongacijski faktor

GTP: gvanozin-5'-trifosfat

GDP: gvanozin-5'-difosfat

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

IPTG: izopropil-β-tiogalaktozid

k_{cat}: obrtni broj

k_{obs}: primijećena konstanta brzine reakcije

K_M: Michaelisova konstanta

L: lizidin

LB: Luria-Bertani medij za uzgoj bakterija

M9: minimalni medij za uzgoj bakterija

mRNA: glasnička ribonukleinska kiselina

Ni-NTA: nikal-nitrilotrioctena kiselina

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

PEG_{8000}: polietilenglikol 8000

P_i: ortofosfat, PO_4^{3-}

PMSF: fenilmetilsulfonil-fluorid

PP_i: pirofosfat, $P_2O_7^{4-}$

RNA: ribonukleinska kiselina

RF: (eng. *release factor*) faktor otpuštanja

rRNA: ribosomska ribonukleinska kiselina

SDS: natrijev dodecilsulfat

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

tRNA: transfer RNA

$tRNA^{aa}$: tRNA za određenu aminokiselinu

TCA: trikloroctena kiselina

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

Tris: Tris(hidroksimetil)-aminometan

Val-AMS: *N*-[L-valil]-*N*'-adenozildiaminosulfon

V_{max}: maksimalna brzina reakcije

v_0: početna brzina reakcije

Ψ: pseudouridin

8. Literaturni izvori

1. M. Ibba and D. Soll, *Annual Review of Biochemistry* **69** (2000) 617-650.
2. J.Q. Ling, N. Reynolds and M. Ibba, *Annual Review of Microbiology* **63** (2009) 61-78.
3. E.B. Kramer and P.J. Farabaugh, *Rna* **13** (2007) 87-96.
4. F. Bouadloun, D. Donner and C.G. Kurland, *Embo Journal* **2** (1983) 1351-1356.
5. J.J. Perona and I. Gruic-Sovulj, *Aminoacyl-Trna Synthetases in Biology and Medicine* **344** (2014) 1-41.
6. R. Giege, M. Sissler and C. Florentz, *Nucleic Acids Research* **26** (1998) 5017-5035.
7. M. Dulic, N. Cvetesic, J.J. Perona and I. Gruic-Sovulj, *Journal of Biological Chemistry* **285** (2010) 23799-23809.
8. A.R. Fersht, *Biochemistry* **16** (1977) 1025-1030.
9. A.N. Baldwin and P. Berg, *Journal of Biological Chemistry* **241** (1966) 831-&.
10. N. Cvetesic, M. Dulic, M. Bilus, N. Sostaric, B. Lenhard and I. Gruic-Sovulj, *Journal of Biological Chemistry* **291** (2016) 8618-8631.
11. M. Dulic, J.J. Perona and I. Gruic-Sovulj, *Biochemistry* **53** (2014) 6189-6198.
12. A.R. Fersht and M.M. Kaethner, *Biochemistry* **15** (1976) 3342-3346.
13. S. Englisch, U. Englisch, F. Vonderhaar and F. Cramer, *Nucleic Acids Research* **14** (1986) 7529-7539.
14. N. Cvetesic, A. Palencia, I. Halasz, S. Cusack and I. Gruic-Sovulj, *Embo Journal* **33** (2014) 1639-1653.
15. V.A. Karkhanis, A.P. Mascarenhas and S.A. Martinis, *Journal of Bacteriology* **189** (2007) 8765-8768.
16. J. Soini, C. Falschlehner, C. Liedert, J. Bernhardt, J. Vuoristo and P. Neubauer, *Microbial Cell Factories* **7** (2008)
17. B.D. Bennett, E.H. Kimball, M. Gao, R. Osterhout, S.J. Van Dien and J.D. Rabinowitz, *Nat Chem Biol* **5** (2009) 593-599.

18. I. Apostol, J. Levine, J. Lippincott, J. Leach, E. Hess, C.B. Glascock, M.J. Weickert and R. Blackmore, *Journal of Biological Chemistry* **272** (1997) 28980-28988.

19. B.S. Schuwirth, M.A. Borovinskaya, C.W. Hau, W. Zhang, A. Vila-Sanjurjo, J.M. Holton and J.H. Cate, *Science* **310** (2005) 827-834.

20. S. Klinge, F. Voigts-Hoffmann, M. Leibundgut, S. Arpagaus and N. Ban, *Science* **334** (2011) 941-948.

21. D.V. Voet, J.G., 2011: Wiley.

22. D.L.C. Nelson, M.M., 2008: W. H. Freeman.

23. F.J. Lariviere, A.D. Wolfson and O.C. Uhlenbeck, *Science* **294** (2001) 165-168.

24. H. Asahara and O.C. Uhlenbeck, *Biochemistry* **44** (2005) 11254-11261.

25. T. Dale, L.E. Sanderson and O.C. Uhlenbeck, *Biochemistry* **43** (2004) 6159-6166.

26. N. Cvetesic, I. Akmacic and I. Gruic-Sovulj, *Croatica Chemica Acta* **86** (2013) 73-82.

27. M. Mann and O.N. Jensen, *Nature Biotechnology* **21** (2003) 255-261.

28. M. Ibba, H.D. Becker, C. Stathopoulos, D.L. Tumbula and D. Soll, *Trends in Biochemical Sciences* **25** (2000) 311-316.

29. M. Helm, *Nucleic Acids Research* **35** (2007) 7041-7041.

30. E.M. Phizicky and J.D. Alfonzo, *Febs Letters* **584** (2010) 265-271.

31. R.K. Hartmann, M. Gossringer, B. Spath, S. Fischer and A. Marchfelder, *Prog Mol Biol Transl Sci* **85** (2009) 319-368.

32. T. Muramatsu, K. Nishikawa, F. Nemoto, Y. Kuchino, S. Nishimura, T. Miyazawa and S. Yokoyama, *Nature* **336** (1988) 179-181.

33. B.E.S. Nordin, P., *Isoleucyl-tRNA synthetases*. The aminoacyl-tRNA synthetases.2005: Landes Bioscience/Eurekah.com.

34. O. Nureki, T. Niimi, T. Muramatsu, H. Kanno, T. Kohno, C. Florentz, R. Giege and S. Yokoyama, *Journal of Molecular Biology* **236** (1994) 710-724.

35. W.C. Chu and J. Horowitz, *Nucleic Acids Research* **17** (1989) 7241-7252.

36. J. Horowitz, W.C. Chu, W.B. Derrick, J.C.H. Liu, M.S. Liu and D.X. Yue, *Biochemistry* **38** (1999) 7737-7746.

37. J. Cavarelli and D. Moras, *Faseb Journal* **7** (1993) 79-86.

38. D.C. Larkin, A.M. Williams, S.A. Martinis and G.E. Fox, *Nucleic Acids Research* **30** (2002) 2103-2113.

39. K. Breitschopf, T. Achsel, K. Busch and H.J. Gross, *Nucleic Acids Research* **23** (1995) 3633-3637.

40. J.J. Perona and A. Hadd, *Biochemistry* **51** (2012) 8705-8729.

41. G. Eriani, M. Delarue, O. Poch, J. Gangloff and D. Moras, *Nature* **347** (1990) 203-206.

42. L. Ribas De Pouplana and P. Schimmel, *Cell* **104** (2001) 191-193.

43. E. First, *Catalysis of the tRNA aminoacylation reaction*. The aminoacyl-tRNA synthetases.2005: Landes Bioscience/Eurekah.com.

44. J.G. Arnez and D. Moras, *Trends in Biochemical Sciences* **22** (1997) 211-216.

45. J.G. Arnez and D. Moras, *Aminoacyl-tRNA Synthetases*. Encyclopedia of Life Sciences2009: Wiley.

46. C.M. Zhang, J.J. Perona, K. Ryu, C. Francklyn and Y.M. Hou, *Journal of Molecular Biology* **361** (2006) 300-311.

47. H. Jakubowski and A.R. Fersht, *Nucleic Acids Research* **9** (1981) 3105-3117.

48. N. Cvetesic, J.J. Perona and I. Gruic-Sovulj, *Journal of Biological Chemistry* **287** (2012) 25381-25394.

49. I. Gruic-Sovulj, J. Rokov-Plavec and I. Weygand-Durasevic, *Febs Letters* **581** (2007) 5110-5114.

50. J. Ling, K.M. Peterson, I. Simonovic, D. Soll and M. Simonovic, *Journal of Biological Chemistry* **287** (2012) 28518-28525.

51. A.C. Dock-Bregeon, B. Rees, A. Torres-Larios, G. Bey, J. Caillet and D. Moras, *Molecular Cell* **16** (2004) 375-386.

52. W.C. Tsui and A.R. Fersht, *Nucleic Acids Research* **9** (1981) 4627-4637.

53. M. Sokabe, T. Ose, A. Nakamura, K. Tokunaga, O. Nureki, M. Yao and I. Tanaka, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106** (2009) 11028-11033.

54. S. An and K. Musier-Forsyth, *Journal of Biological Chemistry* **279** (2004) 42359-42362.

55. F.C. Wong, P.J. Beuning, M. Nagan, K. Shiba and K. Musier-Forsyth, *Biochemistry* **41** (2002) 7108-7115.

56. O. Vargas-Rodriguez and K. Musier-Forsyth, *Journal of Biological Chemistry* **288** (2013) 14391-14399.

57. S. An and K. Musier-Forsyth, *Journal of Biological Chemistry* **280** (2005) 34465-34472.

58. R. Fukunaga and S. Yokoyama, *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **63** (2007) 390-400.

59. L.F. Silvian, J.M. Wang and T.A. Steitz, *Science* **285** (1999) 1074-1077.

60. R.M. Starzyk, T.A. Webster and P. Schimmel, *Science* **237** (1987) 1614-1618.

61. O. Nureki, D.G. Vassylyev, M. Tateno, A. Shimada, T. Nakama, S. Fukai, M. Konno, T.L. Hendrickson, P. Schimmel and S. Yokoyama, *Science* **280** (1998) 578-582.

62. S. Fukai, O. Nureki, S. Sekine, A. Shimada, J.S. Tao, D.G. Vassylyev and S. Yokoyama, *Cell* **103** (2000) 793-803.

63. J.F. Chen, N.N. Guo, T. Li, E.D. Wang and Y.L. Wang, *Biochemistry* **39** (2000) 6726-6731.

64. L. Lin, S.P. Hale and P. Schimmel, *Nature* **384** (1996) 33-34.

65. M. Tukalo, A. Yaremchuk, R. Fukunaga, S. Yokoyama and S. Cusack, *Nature Structural & Molecular Biology* **12** (2005) 923-930.

66. X.L. Zhou, B. Zhu and E.D. Wang, *Journal of Biological Chemistry* **283** (2008) 36608-36616.

67. B. Xu, B. Trawick, G.A. Krudy, R.M. Phillips, L. Zhou and P.R. Rosevear, *Biochemistry* **33** (1994) 398-402.

68. O. Nureki, T. Kohno, K. Sakamoto, T. Miyazawa and S. Yokoyama, *Journal of Biological Chemistry* **268** (1993) 15368-15373.

69. J.A. Landro, E. Schmidt, P. Schimmel, D.L. Tierney and J.E. Pennerhahn, *Biochemistry* **33** (1994) 14213-14220.

70. E.W. Eldred and P.R. Schimmel, *Journal of Biological Chemistry* **247** (1972) 2961-&.

71. A. Fersht, *Structure and Mechanism inProtein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*1998: W. H. Freeman.

72. A.R. Fersht and C. Dingwall, *Biochemistry* **18** (1979) 2627-2631.

73. N. Cvetesic, M. Bilus and I. Gruic-Sovulj, *Journal of Biological Chemistry* **290** (2015) 13981-13991.

74. T.K. Nomanbhoy, T.L. Hendrickson and P. Schimmel, *Molecular Cell* **4** (1999) 519-528.

75. S. Fukai, O. Nureki, S. Sekine, A. Shimada, D.G. Vassylyev and S. Yokoyama, *Rna-a Publication of the Rna Society* **9** (2003) 100-111.

76. K.D. Tardif, M.S. Liu, O. Vitseva, Y.M. Hou and J. Horowitz, *Biochemistry* **40** (2001) 8118-8125.

77. R. Fukunaga and S. Yokoyama, *Journal of Biological Chemistry* **280** (2005) 29937-29945.

78. A. Palencia, T. Crepin, M.T. Vu, T.L. Lincecum, S.A. Martinis and S. Cusack, *Nature Structural & Molecular Biology* **19** (2012) 677-+.

79. T.L. Lincecum, M. Tukalo, A. Yaremchuk, R.S. Mursinna, A.M. Williams, B.S. Sproat, W. Van Den Eynde, A. Link, S. Van Calenbergh, M. Grotli, S.A. Martinis and S. Cusack, *Molecular Cell* **11** (2003) 951-963.

80. M. Tan, B. Zhu, X.L. Zhou, R. He, X. Chen, G. Eriani and E.D. Wang, *Journal of Biological Chemistry* **285** (2010) 3235-3244.

81. M.T. Boniecki, M.T. Vu, A.K. Betha and S.A. Martinis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105** (2008) 19223-19228.

82. S.W. Lue and S.O. Kelley, *Biochemistry* **44** (2005) 3010-3016.

83. Y. Tang and D.A. Tirrell, *Biochemistry* **41** (2002) 10635-10645.

84. P.J. Beuning and K. Musier-Forsyth, *Proc Natl Acad Sci U S A* **97** (2000) 8916-8920.

85. N.M. Reynolds, J. Ling, H. Roy, R. Banerjee, S.E. Repasky, P. Hamel and M. Ibba, *Proc Natl Acad Sci U S A* **107** (2010) 4063-4068.

86. R.S. Mursinna, T.L. Lincecum and S.A. Martinis, *Biochemistry* **40** (2001) 5376-5381.

87. J.M. Han, J.Y. Kim and S. Kim, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **303** (2003) 985-993.

88. C. Ling, Y.N. Yao, Y.G. Zheng, H. Wei, L. Wang, X.F. Wu and E.D. Wang, *Journal of Biological Chemistry* **280** (2005) 34755-34763.

89. E. Seiradake, W. Mao, V. Hernandez, S.J. Baker, J.J. Plattner, M.R.K. Alley and S. Cusack, *Journal of Molecular Biology* **390** (2009) 196-207.

90. X. Chen, J.J. Ma, M. Tan, P. Yao, Q.H. Hu, G. Eriani and E.D. Wang, *Nucleic Acids Research* **39** (2011) 235-247.

91. P. Nandi and G.P. Sen, *Nature* **172** (1953) 871-872.

92. G. Bogosian, B.N. Violand, E.J. Dorwardking, W.E. Workman, P.E. Jung and J.F. Kane, *Journal of Biological Chemistry* **264** (1989) 531-539.

93. H.E. Umbarger, *Annual Review of Biochemistry* **47** (1978) 533-606.

94. V. Pezo, D. Metzgar, T.L. Hendrickson, W.F. Waas, S. Hazebrouck, V. Doring, P. Marliere, P. Schimmel and V. De Crecy-Lagard, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101** (2004) 8593-8597.

95. J. Sambrook and D.W. Russel, *Molecular cloning, a laboratory manual.*2001, New York: Spring Harbor Laboratory Press.

96. K. Breitschopf and H.J. Gross, *Embo Journal* **13** (1994) 3166-3169.

97. M. Sprinzl, T. Hartmann, F. Meissner, J. Moll and T. Vorderwulbecke, *Nucleic Acids Research* **15** (1987) R53-R188.

98. N. Cvetesic, *Kloniranje, prekomjerna ekspresija te pročišćavanja molekula* $tRNA^{Ile}$ *i* $tRNA^{Val}$ *iz bakterije Escherichia coli*, 2010, Sveučilište u Zagrebu.

99. T. Yokogawa, Y. Kitamura, D. Nakamura, S. Ohno and K. Nishikawa, *Nucleic Acids Research* **38** (2010)

100. A. Pingoud and A. Jeltsch, *Nucleic Acids Research* **29** (2001) 3705-3727.

101. F.W. Studier and B.A. Moffatt, *Journal of Molecular Biology* **189** (1986) 113-130.

102. M.M. Bradford, *Analytical Biochemistry* **72** (1976) 248-254.

103. S. Ledoux and O.C. Uhlenbeck, *Methods* **44** (2008) 74-80.

104. A.D. Wolfson and O.C. Uhlenbeck, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99** (2002) 5965-5970.

105. I. Gruic-Sovulj, N. Uter, T. Bullock and J.J. Perona, *Journal of Biological Chemistry* **280** (2005) 23978-23986.

106. A.C. Bishop, T.K. Nomanbhoy and P. Schimmel, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99** (2002) 585-590.

107. Y.L. Pang and S.A. Martinis, *Biochemistry* **48** (2009) 8958-8964.

108. T.L. Hendrickson, T.K. Nomanbhoy, V. De Crecy-Lagard, S. Fukai, O. Nureki, S. Yokoyama and P. Schimmel, *Molecular Cell* **9** (2002) 353-362.

109. D.B. Straus, W.A. Walter and C.A. Gross, *Nature* **329** (1987) 348-351.

110. L. Pauling, *The probability of errors in the process of synthesis of protein molecules*. In Festschrift, ed. S. Arthur1957, Basel: Birkhauser Verlag. 597-602.

111. A.L. Weber and S.L. Miller, *Journal of Molecular Evolution* **17** (1981) 273-284.

112. D.A. Drummond and C.O. Wilke, *Nature Reviews Genetics* **10** (2009) 715-724.

113. J.A. Paredes, L. Carreto, J. Simoes, A.R. Bezerra, A.C. Gomes, R. Santamaria, M. Kapushesky, G.R. Moura and M.a.S. Santos, *Bmc Biology* **10** (2012)

114. M.a.S. Santos, C. Cheesman, V. Costa, P. Moradas-Ferreira and M.F. Tuite, *Molecular Microbiology* **31** (1999) 937-947.

115. L. Li, M.T. Boniecki, J.D. Jaffe, B.S. Imai, P.M. Yau, Z.A. Luthey-Schulten and S.A. Martinis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108** (2011) 9378-9383.

9. Životopis

Rođena sam 15.05.1989. u Zagrebu gdje sam završila Osnovnu školu Tina Ujevića i V. Gimnaziju 2008. godine. Iste godine sam upisala Preddiplomski studij molekularne biologije, kojeg sam završila 2011. godine sa završnim radom „Farmakogenetika – individualizirani način liječenja genetičkih poremećaja“ pod vodstvom prof. dr. sc. Mirjane Pavlica. 2011. godine sam upisala Diplomski studij molekularne biologije, a 2013. godine sam diplomirala s radom „Eukariotske karakteristike izoleucil-tRNA-sintetaze iz bakterije *Streptomyces griseus*“ pod vodstvom prof. Dr. Sc. Ite Gruić-Sovulj. Od 2013. godine sam zaposlena kao asistent na Zavodu za biokemiju kemijskog odsjeka PMF-a.

9.1. Publikacije

Cvetesic, Nevena; Bilus, Mirna; Gruic-Sovulj, Ita.
The tRNA A76 Hydroxyl Groups Control Partitioning of the tRNA-dependent Pre- and Post-transfer Editing Pathways in Class I tRNA Synthetase. *The Journal of biological chemistry.* 290 (2015) 22; 1398-1391

Cvetesic, Nevena; Dulic, Morana; Bilus, Mirna; Sostaric, Nikolina; Lenhard, Boris; Gruic-Sovulj, Ita.
Naturally Occurring Isoleucyl-tRNA Synthetase without tRNA-Dependent Pre-Transfer Editing. *The Journal of biological chemistry.* 291 (2016) 8618-8631.

9.2. Radionice

2015 “Symposium & Workshop on Microscale Thermophoresis”, Zagreb, Hrvatska

2015 “The application of transient kinetic methods to biological macromolecules EMBO practical course”, Canterbury, Ujedinjeno Kraljevstvo

2014 Biluš, Mirna; Gruić-Sovulj, Ita
Postersko priopćenje: IleRS eliminates norvaline from *Escherichia coli* proteome via pre- and post-transfer editing pathways. “12th Greta Pifat Mrzljak International School of Biophysics”, Primošten, Hrvatska

9.3. Stipendije

2008 Stipendija Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta
Temeljena na prijamnom ispitu na fakultet, za najbolje plasiranih 10 % studenata

2013 Stipendija Sveučilišta u Zagrebu