Elongacijski faktor Tu kao potencijalni marker mistranslacijskog stresa u bakteriji Escherichia coli

Hloušek-Kasun, Andrea

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:217:575209

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Andrea Hloušek-Kasun

Elongacijski faktor Tu kao potencijalni marker mistranslacijskog stresa u bakteriji *Escherichia coli*

Diplomski rad

U Zagrebu, 2018

Ovaj diplomski rad, izrađen u laboratoriju Zavoda za biokemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom dr. sc. Ite Gruić Sovulj, izv. prof. i neposrednim vodstvom dr. sc. Nine Franičević predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Zahvale

Od srca se zahvaljujem:

Dragoj mentorici Iti Gruić Sovulj na pruženoj prilici za izradu ovog diplomskog rada na Zavodu za biokemiju. No, još više joj se zahvaljujem na pomoći te brojnim savjetima i sugestijama kojima me je vodila kroz izradu ovog diplomskog rada.

Nini... na velikoj podršci, uloženom vremenu te brojnim savjetima - znanstvene, a često i neznanstvene prirode.

Neveni... koja je uvijek spremna pomoći oko mojih znanstvenih i neznanstvenih nedoumica.

Svim dragim zaposelenicima Zavoda za biokemiju (Mariju, Maji, Morani, Igoru, Jurici, Marku i Jasmini)... na brojnim savjetima i odličnoj radnoj atmosferi u laboratoriju.

Ivanu... na velikoj podršci, ljubavi i prijateljstvu.

Mojim prijateljima...

I naposljetku, beskrajno se zahvaljujem mojim dragim roditeljima koji su mi omogućili da slijedim svoje snove. Hvala vam što ste uvijek tu i vjerujete u mene.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

ELONGACIJSKI FAKTOR Tu KAO POTENCIJALNI MARKER MISTRANSLACIJSKOG STRESA U BAKTERIJI *Escherichia coli*

Andrea Hloušek-Kasun

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb

Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) su enzimi koji kovalentno povezuju odgovarajuću molekulu tRNA s njoj pripadnom aminokiselinom u reakciji aminoaciliranja. Nastala aminoacilirana tRNA se pomoću elongacijskog faktora Tu (EF-Tu) doprema do ribosoma gdje sudjeluje u procesu biosinteze proteina. Ukoliko aaRS pogriješe pri odabiru pripadne aminokiseline ili tRNA, dolazi do ugradnje nepripadne aminokiseline u proteine (mistranslacije). Pokazano je da leucil-tRNA-sintetaza (LeuRS) iz bakterije *Escherichia coli* ponekad griješi pri diskriminaciji pripadnog leucina od norvalina, zbog čega je evolucijski razvila deacilacijsku domenu koja omogućuje popravak pogreške. Inaktiviranjem deacilacijske domene dolazi do povremene ugradnje norvalina u uvjetima njegove povišene koncentracije. Stanice s norvaliranim proteomom pokazuju značajno smanjenu vijabilnost, a smatra se da bi to mogla biti posljedica nepravilnog smatanja i agregacije mistranslatiranih proteina. Stoga je u ovom diplomskom radu, kako bi stekli uvid u stanični odgovor na mistranslacijski stres, odabran EF-Tu kao modelni protein. Dobiveni rezultati pokazuju da u uvjetima mistranslacijskog stresa, ipak ne dolazi do značajne promjene u njegovoj stabilnosti te povećane agregacije u citoplazmi, već smanjenja njegove razine. Stoga je EF-Tu zanimljiv modelni protein za izučavanje biološkog odgovora bakterijske stanice na mistranslaciju. Međutim, da bi se utvrdio utjecaj mistranslacije na strukturu i topivost proteina, potrebno je provesti dodatna istraživanja i biokemijske analize drugih modelnih proteina.

(104 + IX stranica, 44 slike, 8 tablica, 144 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: aminoacil-tRNA-sintetaze / elongacijski faktor Tu / mistranslacija / *Escherichia coli* / leucil-tRNA-sintetaza / norvalin / stanični odgovor / modelni protein

Voditelj: Dr. sc. Ita Gruić Sovulj, izv. prof.

Ocjenitelji: Dr. sc. Ita Gruić Sovulj, izv. prof.

Dr. sc. Biljana Balen, izv. prof.

Dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, izv. Prof.

Rad prihvaćen: 30.11.2017.

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

ELONGATION FACTOR Tu AS A POTENTIAL MARKER OF MISTRANSLATIONAL STRESS IN *Escherichia coli*

Andrea Hloušek-Kasun

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb

Aminoacyl-tRNA-synthetases (aaRS) are enzymes that covalently couple tRNA molecules with their cognate amino acids in aminoacylation reaction. The aminoacyl tRNAs are then escorted to the ribosome by the elongation factor Tu (EF-Tu) for protein biosynthesis. Deficiencies in aaRS editing mechanisms can lead to mistranslation and incorporation of noncognate amino acids into proteins. It has been shown that *Escherichia coli* LeuRS sometimes misacylates norvaline instead its cognate leucine. Consequently, through evolution LeuRS has developed a deacilation domain which ensures error correction. Deactivation of LeuRS deacylation domain leads to norvaline misincorporation in growth conditions where norvaline accumulates. Cells with high level of norvaline incorporation show loss in cell viability, probably because of misfolding and aggregation of mistranslated proteins. To obtain insights into biological cell response to mistranslational stress, we decided to monitor EF-Tu as a model protein. Our results show that mistranslated EF-Tu does not aggregate in bacterial cells nor does it exhibit changes in its stability. However, we observed that mistranslation leads to decrease in the EF-Tu levels. Hence, we concluded that EF-Tu could be an interesting model protein for investigation of biological cell response to mistranslation. In order to gain clear insights in misfolding and aggregation of proteins due to stress conditions caused by mistranslation, it is necessary to monitor and biochemically characterize other possible model proteins.

(104 + IX pages, 44 figures, 8 tables, 144 references, original in Croatian language)
Thesis deposited in the Central Biological Library.
Keywords: aminoacyl-tRNA-synthetases / elongation factor Tu / mistranslation/ *Escherichia coli* / leucyl-tRNA synthetase / norvaline / cell response / model protein
Supervisor: Dr. sc. Ita Gruić Sovulj, Assoc. Prof.
Reviewers: Dr. sc. Ita Gruić Sovulj, Assoc. Prof.
Dr. sc. Biljana Balen, Assoc. Prof.
Dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, Assoc. Prof.
Thesis accepted: 30.11.2017.

Popis kratica

aaRS – aminoacil-tRNA-sintetaze

aa-tRNA – aminoacilirana tRNA

aaAMP – aminoacil-adenilat

AMP – adenozin-monofosfat

APS – amonijev-persulfat

ATP – adenozin-trifosfat

BSA – goveđi serumski albumin; eng. ***b****ovine* ***s****erum* ***a****lbumin*

CBB- *Coomassie Brilliant Blue*

CP1 – deacilacijska domena LeuRS, engl. ***c****onnective* ***p****olypeptide* ***1***

GDP – gvanozin-difosfat

HSP – proteini odgovora na toplinski stres; *engl.* ***H****eat* ***s****hock* ***p****roteins*

LB hranjiva podloga – ***L****uria-****B****ertani* hranjiva podloga

LeuRS – leucil-tRNA-sintetaza

MD simulacije – simulacije molekulske dinamike

SDS-PAGE – SDS poliakrilamidna gel-elektroforeza

WB – metoda Western blot

Popis kratica za aminokiseline

Ala - alanin

Arg - arginin

Asn - asparagin

Asp - aspartat

Cys - cistein

Gln - glutamin

Glu - glutamat

Gly - glicin

His - histidin

Ile - izoleucin

Leu - leucin

Lys - lizin

Met – metionin

Nva - norvalin

Phe - fenilalanin

Pro - prolin

Ser - serin

Thr - treonin

Trp - triprofan

Tyr - tirozin

Val - valin

Sadržaj

1.Uvod 1
1.1. Biosinteza proteina 1
1.2. Molekule tRNA 4
1.3. Aminoacil-tRNA-sintetaze 6
1.3.1. Mehanizmi popravka pogrešaka aminoacil-tRNA-sintetaza 7
1.3.2. Podjela aminoacil-tRNA-sintetaza 8
1.3.3. Leucil-tRNA-sintetaza (LeuRS) iz bakterije E. coli 9
1.4. Elongacijski faktor Tu 12
1.4.1. Uloge elongacijskog faktora Tu 13
1.4.2. Struktura elongacijskog faktora Tu 15
1.5. Nekanonske aminokiseline 17
1.5.1. Norvalin 19
1.6. Točnost biosinteze proteina 21
1.6.1. Utjecaj mistranslacije na stanicu 22
1.7. Smatanje i agregacija proteina 26
1.7.1. Spontano smatanje proteina 27
1.7.2. Smatanje proteina uz pomoć molekularnih šaperona 29
2. Cilj rada 32
3. Materijali 33
3.1. Standardne kemikalije 33
3.2. Biljezi molekulskih masa 33
3.3. Aminokiseline i nukleotidi 33
3.4. Boje 33
3.5. Enzimi i proteini 33
3.6. Protutijela 33
3.7. Ostali materijali 34
3.8. Korišteni sojevi bakterije *E. coli* 34
3.9.Hranjive podloge i mediji za uzgoj bakterije *E. coli* 34
3.9.1. M9 minimalni medij 34
3.9.2. Kruta hranjiva podloga *Luria-Bertani (LB)* 35
4. Metode 36
4.1. Metode rada s bakterijama *in vivo* 36
4.1.1. Priprema prekonoćne kulture bakterijskih stanica 36

4.1.2. Praćenje rasta bakterijskih kultura u mistranslatirajućim uvjetima 36
4.2. Metode rada s proteinima 37
4.2.1. Priprema uzoraka ukupnih proteinskih ekstrakta za SDS-PAGE i Western blot analizu 37
4.2.2. Diskontinuirana SDS-poliakrilamidna gel-elektroforeza (SDS-PAGE) 38
4.2.3. Western Blot analiza 40
4.2.4. Pročišćavanje endogenog proteina EF-Tu s histidinskim privjeskom na C-kraju metodom afinitetne kromatografije 42
4.2.5. Gel-filtracijska kromatografija 45
4.2.6. Koncentriranje proteina ultrafiltracijom 46
4.2.7. Limitirana proteoliza tripsinom 46
4.2.8. Određivanje koncentracije proteina 47
5. Rezultati 49
5.0. Eksperimentalni pristup dobivanju mistranslatiranog proteina EF-Tu *E. coli* u svrhu određivanja njegove stabilnosti u uvjetima *in vivo* i *in vitro* 49
5.1. Povišena koncentracija Nva značajno smanjuje vijabilnost bakterijskog soja D345A EF-Tu-C-His_6 51
5.2. Optimizacija metode praćenja ekspresije i agregacije proteina EF-Tu u mistranslatirajućim uvjetima 54
5.3. Mistranslatirajući uvjeti dovode do smanjene ekspresije proteina EF-TuB obilježenog histidinskim privjeskom 58
5.4. Provjera reproducibilnosti rezultata Western Blot analize 61
5.5. Pročišćavanje endogeno eksprimiranog proteina EF-Tu potvrđuje njegovu smanjenu ekspresiju u mistranslatirajućim uvjetima 62
5.6. Preparativno pročišćavanje proteina EF-Tu afinitetnom kromatografijom 65
5.7. Mistranslatirani protein nije EF-Tu skloniji agregaciji 68
5.8. Proteinske domene nemistranslatiranog i mistranslatiranog uzorka proteina EF-Tu su jednako stabilne 73
6. Rasprava 77
6.1.Mistranslacijski stres smanjuje vijabilnost bakterije *E. coli* 77
6.2.Mistranslacija ne uzrokuje agregaciju modelnog proteina EF-TuB, već smanjenje njegove ekspresije 79
6.3.Mistranslatirani protein EF-Tu nije pokazao značajnu promjenu u stabilnosti prilikom analize gel-filtracijskom kromatografijom i limitiranom proteolizom tripsinom 84
6.4.Rezultati simulacija molekulske dinamike potvrđuju stabilnost mistranslatiranog proteina EF-Tu 89
7. Zaključak 92
8. Literatura 94

9. Životopis 104

1.Uvod

1.1. Biosinteza proteina

Proteini su najsvestranije biološke makromolekule koje u svim živim organizmima obavljaju niz esencijalnih uloga poput: katalize različitih biološki važnih kemijskih reakcija, prijenosa i pohrane iona i molekula, prijenosa signala te izvođenja različitih strukturnih uloga u stanici. Izgrađeni su od 20 različitih aminokiselina koje se u polipeptidne lance povezuju peptidnom vezom. Aminokiseline se međusobno razlikuju po bočnim ograncima koji mogu varirati u svojoj veličini, strukturi, naboju te polarnosti. Svestranost proteina proizlazi upravo iz raznolikosti struktura i kemijskih svojstava aminokiselinskih bočnih ogranaka (revijalno prikazano u Nelson i Cox, 2013).

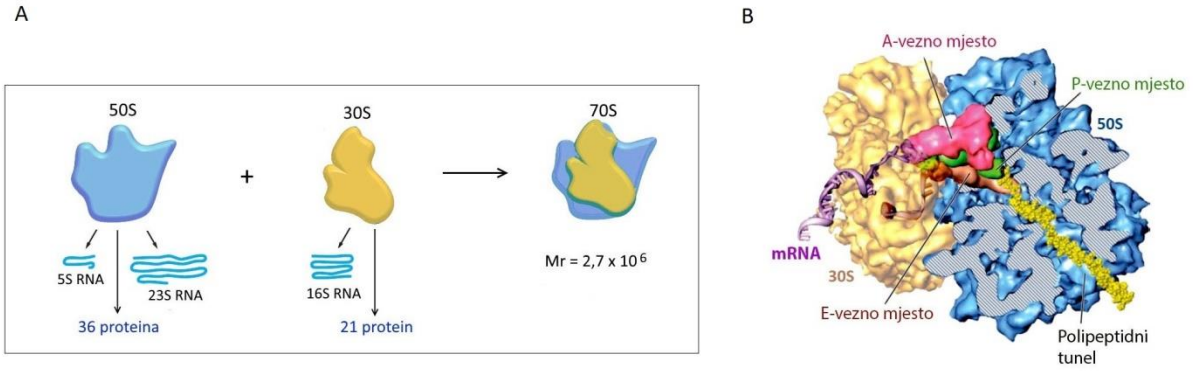
Biosinteza proteina sastoji se od dva osnovna procesa: transkripcije i translacije. Sve biosintetske procese, pa tako i transkripciju i translaciju, možemo podijeliti na tri osnovna stadija: inicijaciju, elongaciju i terminaciju. Slijedu ovih osnovnih stadija pribrajamo i dva dodatna koraka: aktivaciju prekursora za sintezu biopolimera te postsintetsku modifikaciju sintetiziranog biopolimera (revijalno prikazano u Nelson i Cox, 2013).

Transkripcija je proces u kojem se genetička informacija, pohranjena u obliku slijeda nuklotida u molekuli DNA, prepisuje u glasničku RNA (engl. *messenger RNA*, mRNA). Sintezu mRNA katalizira DNA-ovisna RNA-polimeraza, koja na temelju DNA kalupa produljuje lanac RNA ugradnjom ribonukleotid-5'-trifosfatnih prekursora. Elongacija molekule mRNA se odvija u 5' → 3' smjeru dodavanjem ribonukleotidnih jedinica na 3'-hidroksilnu skupinu (3' –OH) prethodno ugrađenog ribonukleotida. Sintetizirana molekula mRNA se dodatno posttranskripcijski modificira, nakon čega se na ribosomu prevodi u aminokiselinski slijed procesom translacije (revijalno prikazano u Nelson i Cox, 2013).

Prekursori za sintezu polipeptidnog lanca su aminokiseline vezane na odgovarajuću transportnu molekulu RNA (engl. *transfer RNA*, tRNA). Molekule tRNA koje nose vezanu aminokiselinu (aminoacilirane tRNA, aa-tRNA) se uz pomoć elongacijskog faktora Tu (EF-Tu) dopremaju do ribosoma na kojem se ispravne aminokiseline povezuju u polipeptidne lance na temelju informacije pohranjene u molekuli mRNA (Slika 1.2) (revijalno prikazano u Nelson i Cox, 2013).

Ribosomi su izrazito složeni makromolekulski kompleksi, građeni od molekula rRNA (engl. *ribosomal RNA*) i proteina. Prokariotski ribosomi su sastavljeni od dvije podjedinice: male podjedinice (30S) koju sačinjava 16S ribosomska RNA i 21 protein te velike podjedinice (50S) koja sadrži 5S i 23S rRNA te 36 ribosomskih proteina (Slika 1.1) (revijalno prikazano u Nelson i Cox, 2013). Na dodiru dviju

ribosomskih podjedinica formiraju se tri vezna mjesta koja prepoznaju i vežu molekule tRNA: akceptorsko (A mjesto), peptidilno (P mjesto) i izlazno (E mjesto) (Slika 1.1) (Carter i sur, 2000).

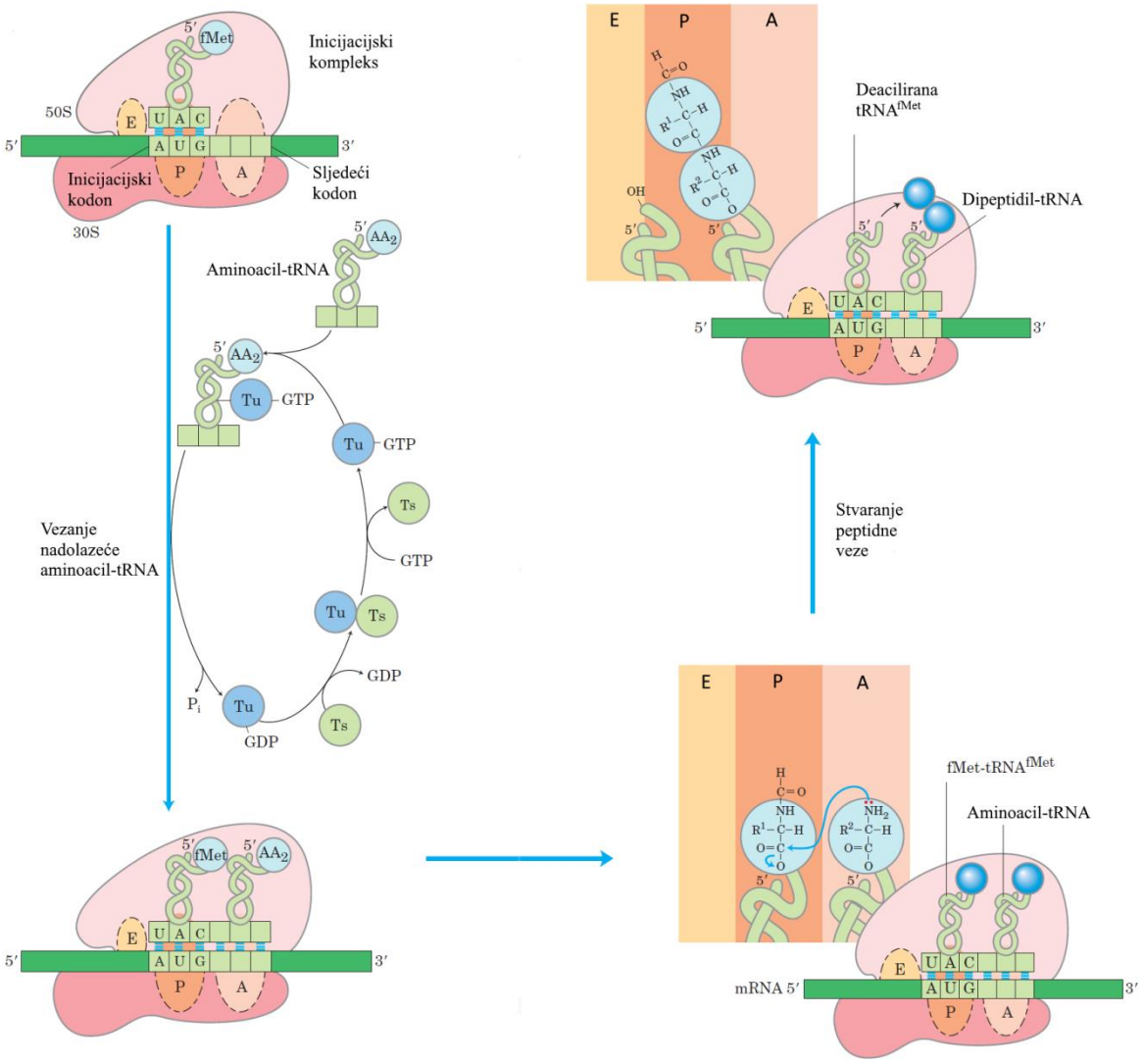


Slika 1.1. Građa ribosoma prokariota. Pod (A) je prikazan shematski prikaz građe. Ribosomske podjedinice se identificiraju po Svadberg jedinicama tj. sedimentacijskim koeficijentima koji se odnose na brzinu taloženja prilikom centrifugiranja. (B) Trodimenzionalni prikaz građe prokariotskog ribosoma. Plavom bojom prikazana je 50S podjedinica, a žutom 30S podjedinica. Vezna mjesta A, P i E nastaju udruživanjem male i velike podjedinice. Preuzeto i prilagođeno iz Nelson i Cox, 2013.

U vezno mjesto A se vežu sve aminoacilirane molekule tRNA koje sudjeluju u fazi elongacije polipeptidnog lanca. Inicijatorska molekula tRNA koja sadrži *N*-formilmetionil-tRNA^{fMet} (fMet-tRNA^{fMet}) i kojom započinje svaka sinteza proteina ne može se vezati u A vezno mjesto. Naime, u počenoj fazi translacije –inicijaciji, početni kodon AUG na molekuli mRNA se pozicionira u P vezno mjesto ribosoma, koje jedino može vezati inicijatorsku tRNA^{fMet}. Nakon vezanja fMet-tRNA^{fMet} na početni kodon iduća aa-tRNA se uz pomoć proteina EF-Tu doprema do A veznog mjesta ribosoma (revijalno prikazano u Simonetti i sur, 2008). Ukoliko dolazi do komplementarnog sparivanja antikodona aa-tRNA i sljedećeg kodona mRNA pozicioniranog u vezno mjesto A, EF-Tu otpušta aa-tRNA i ona se čvrsto veže u A mjesto (Pape i sur, 1999). Nastanak peptidne veze postiže se nukleofilnim napadom dušika iz α-amino skupine aminokiseline s aa-tRNA na α-karbonilni ugljik rastućeg polipeptidnog lanca vezanog na tRNA u P veznom mjestu ribosoma. Reakcijski centar peptidil-transferazne aktovnosti građen je od 23S rRNA čineći ribosom ribozimom (Nissen i sur, 2000). Rastući peptidni lanac, koji je sada duži za jednu aminokiselinu, nalazi se vezan na 3' -kraju tRNA u veznom mjestu A te se pomiče u P vezno mjesto, dok deacilirana tRNA odlazi na E vezno mjesto ribosoma (Slika 1.2) (revijalno prikazano u Prashant i Simpson, 2011). Cijeli ribosom se translocira za jedan kodon duž molekule mRNA, a novonastala peptidil-tRNA se pomiče u P vezno mjesto ribosoma (revijalno prikazano u Nelson i Cox, 2013). Elongacija polipeptidnog lanca se odvija duž cijele molekule mRNA sve dok se na A veznom mjestu ne pojavi jedan od tri STOP kodona koji

signaliziraju početak stadija terminacije translacije i koji nisu komplementarni s antikodonom niti jedne molekule tRNA. Na slobodno mjesto A ribosoma se tada vežu terminacijski faktori, odnosno faktori otpuštanja, nakon čega se polipeptidni lanac oslobađa s ribosoma (revijalno prikazano u Nelson i Cox, 2013).

U svrhu postizanja konačne trodimenzionalne strukture i funkcionalnosti, novosintetizirani polipeptidni lanci se posttranslacijski modificiraju te pravilno smataju uz pomoć drugih enzima (detaljno prikazano u poglavlju 1.6.1). Posttranslacijske modifikacije obično uključuju uklanjanje jedne ili više aminokiselina; dodavanje acetilne, metilne, karboksilne ili neke druge funkcionalne skupine na određene aminokiselinske bočne ogranke; te dodavanje oligosaharidnih ili prostetičkih grupa (revijalno prikazano u Karve i Cheema 2011).



Slika 1.2. Shematski prikaz elongacije translacije. Na inicijacijski kompleks ribosoma i mRNA prvo se veže inicijatorska molekula tRNAfMet u P vezno mjesto. Slijedeću aminoaciliranu tRNA do ribosoma doprema

elongacijski faktor Tu koji sadrži vezan GTP. Nakon komplemetarnog sparivanja kodona mRNA i antikodona tRNA dolazi do hidrolize GTP na GDP i Pi, pri čemu se aa-tRNA otpušta s EF-Tu te veže u A mjesto ribosoma. EF-Tu se reaktivira otpuštanjem GDP-a i vezanjem GTP-a u čemu mu pomaže elongacijski faktor Ts. Peptidna veze nastaje nuklofilnim napadom dušika iz α-amino skupine aminokiseline s aa-tRNA na ugljik α-karboksilne skupine inicijatorske tRNA u P veznom mjestu ribosoma. Novonastali dipeptid sad se pomiče se u P vezno mjesto, dok deacilirana tRNA odlazi u E vezno mjesto ribosoma. Preuzeto i prilagođeno iz Nelson i Cox, 2013.

1.2. Molekule tRNA

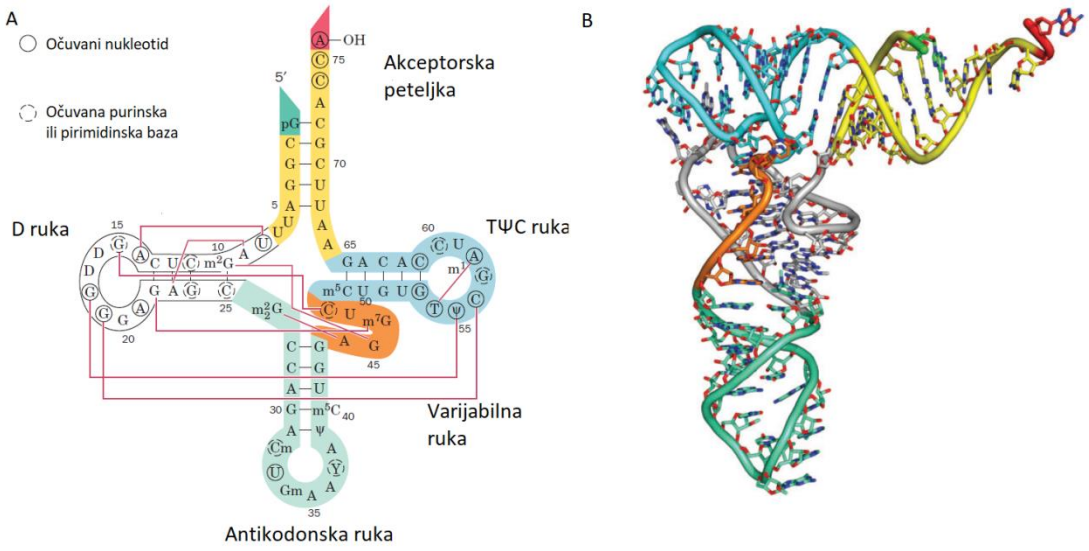
Molekule tRNA služe kao adapterske molekule koje osiguravaju prevođenje slijeda nukleotida mRNA u slijed aminokiselina polipeptidnog lanca (Hoagland, 1996). Svaka tRNA je zapravo jednolančana molekula RNA precizno smotana u odgovarajuću trodimenzionalnu strukturu (revijalno prikazano u Nelson i Cox, 2013).

Komplementarnim sparivanjem nukleotida vodikovim vezama nastaje karakteristična sekundarna struktura oblika djeteline (Slika 1.3) u kojoj se razlikuje: akceptorska peteljka, D-ruka, TψC-ruka, antikodonska ruka, koja sadrži antikodonski slijed i varijabilna ruka (revijalno prikazano u Nelson i Cox, 2013). Akceptorska peteljka je mjesto gdje se komplementarnim sparivanjem približavaju 5' -kraj i 3' -kraj molekule tRNA. Sve tRNA na svom 3'-kraju imaju triplet nukleotida slijeda CCA, a na terminalni adenozin se uz pomoć aminoacil-tRNA-sintetaza kovalentno veže odgovarajuća aminokiselina u reakciji aminoaciliranja (revijalno prikazano u Nelson i Cox, 2013; detaljno prikazano u poglavlju 1.3). D ruka je dobila ime prema modificiranoj bazi dihidrouridinu koju sadrži. Obično se sastoji od 3 - 4 parova baza, a završava omčom duljine 5 do 7 nukleotida. Modificirani nukleotidi nalaze 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. Još uvijek nije razjašnjena uloga modificiranih baza, ali je poznato da često pogoduju kompaktnosti i stabilnosti trodimenzionalne strukture tRNA (Agris, 2008). Također, modifikacije mogu imati ulogu u ostvarivanju specifičnih interakcija tRNA i pripadne aminoacil-tRNA-sintetaze (Agris, 2008). Varijabilna ruka je mjesto najveće raznolikosti među različitim molekulama tRNA, a može sadržavati od 3 do 21 nukleotida.

Uz sekundarnu strukturu, za sve molekule tRNA karakteristična je i očuvana tercijarna struktura u obliku slova „L“ (Slika 1.3, B), što je pokazano usporedbom nekoliko dobivenih kristalnih struktura molekula tRNA (revijalno prikazano u Nelson i Cox, 2012).

Zbog degeneriranosti genetičkog koda za svaku aminokiselinu postoji skupina izoakceptorskih molekula tRNA. Iako su specifične za istu aminokiselinu, izoakceptorske tRNA se razlikuju po svojoj

strukturi, antikodonskom slijedu (koji kodira za istu aminokiselinu) te po svojoj zastupljenosti u stanici (revijalno prikazano u Ibba i Söll, 2000).



Slika 1.3. Strukturna obilježja kvaščeve tRNA^{Phe}. Pod (A) je prikazana sekundarna struktura. Vodikove veze među pojedinim nukleotidima prikazane su crnom crtom, a tercijarne vodikove interakcije nukleotida prikazane su crvenim linijama. Nukleotidi koji su potpuno očuvani zaokruženi su punom linijom, a visoko očuvani isprekidanom linijom. Akceptorska peteljka označena je žutom, D ruka bijelom, antikodonska ruka zelenom, varijabilna ruka narančastom, a Tψc ruka plavom bojom. 3' akceptorska baza A, na koju se esterskom vezom veže aminokiselina označena je crvenom, a 5' -kraj zelenom bojom. Pod (B) je prikazana trodimenzionalna struktura kvašćeve tRNA^{Phe}, koja se postiže tercijarnim vodikovim interakcijama između pojedinih nukleotida. Odgovarajuće sekundarne strukture obojane su istom bojom kao pod (A). Preuzeto i prilagođeno iz Voet i Voet, 2011.

Osim što služe kao prekursori u biosintezi proteina, aa-tRNA obavljaju još cijeli niz uloga u stanici kao npr. doniranje aminokiselina u proteinskoj i lipidnoj postsintetskoj modifikaciji, sudjelovanje u biosintezi antibiotika (Banerjee i sur, 2010) te sudjelovanje u signalnim putovima. Kao signalne molekule aktiviraju brojne senzore u slučaju smanjene razine nekog od važnih nutrijenata (Raina i Ibba, 2014). Naime, omjer aminoaciliranih i deaciliranih tRNA predstavlja signale za usporavanje translacije te regulaciju ekspresije gena potrebnih za biosintezu ili unos pojedinih aminokiselina u uvjetima stresa izazvanog oskudicom (Henkin i Yanofsky, 2002).

1.3. Aminoacil-tRNA-sintetaze

Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) (EC 6.1.1.) su enzimi koji osiguravaju vjeran prijenos genetičke informacije sparivanjem odgovarajuće aminokiseline s njoj pripadnom molekulom tRNA (Allen i sur, 1960; revijalno prikazano u Yadavalli i Ibba, 2012). Sparivanje se ostvaruje kovalentnim povezivanjem 3' -OH kraja molekule tRNA i odgovarajuće aminokiseline u reakciji aminoaciliranja koja glasi:

$$\text{aminokiselina + tRNA + ATP} \xrightleftharpoons{Mg^{2+}} \text{aminoacil-tRNA + AMP + PPi}$$

Reakcija se odvija u sintetskom aktivnom mjestu enzima aaRS u 2 koraka (Fersht i Keathner, 1976): u 1. koraku aktivacije, aaRS koriste energiju pohranjenu u molekuli ATP-a kako bi sintetizirale aminoacil-adenilatni (aa-AMP) intermedijer, a u 2. koraku aktivirana aminokiselina se prenosi na 2' ili 3' -OH kraj odgovarajuće molekule tRNA (Fersht i Keathner, 1976):

(1) ATP + aa ⇄ aa-AMP + PPi
(2) aa-AMP + tRNA → aa-tRNA + AMP

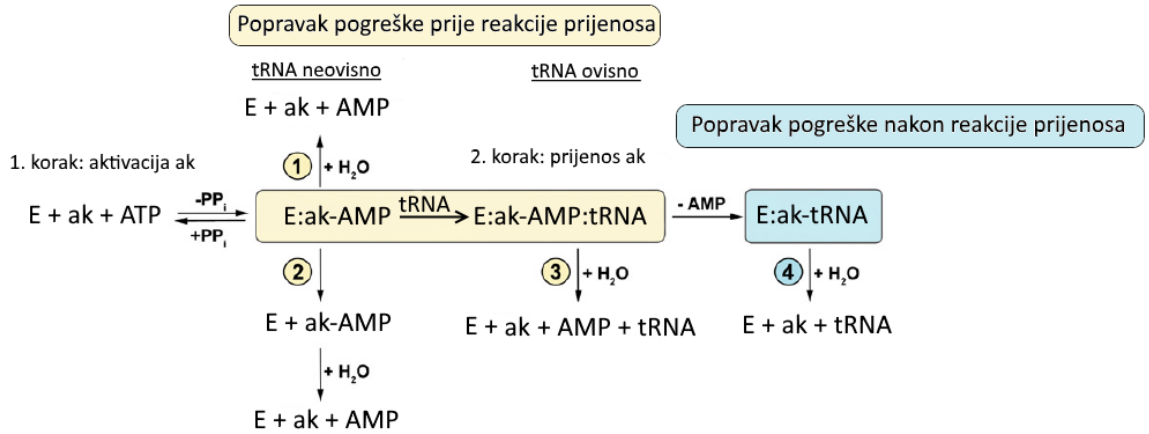
Tijekom prvog koraka kisik karboksilne skupine aminokiseline nukleofilno napada fosfor α-fosfatne skupine ATP-a pri čemu nastaje anhidridna veza tj. miješani anhidrid aminoacil-adenilat (aa-AMP) uz oslobađanje pirofosfata (PPi). Nakon toga slijedi prijenos aktivirane aminokiseline na 2' -OH ili 3' -OH skupinu riboze terminalnog adenozina molekule tRNA, pri čemu nastaje esterska veza i konačni produkt aa-tRNA. Reakcijski mehanizam pretpostavlja nukleofilni napad kisika iz 2' -OH ili 3' -OH skupine riboze na α-karbonilni ugljikov atom aminoacil-adenilata (Cusack, 1997).

Kako bi došlo do reakcije aminoaciliranja, prvo mora nastati produktivni kompleks tRNA: aaRS u kojem je 3' -OH skupina molekule tRNA pravilno pozicionirana u sintetskom aktivnom mjestu i spremna za katalitičku reakciju (revijalno prikazano u Giege i sur, 1998). Prepoznavanje i pravilno pozicioniranje pripadne molekule tRNA omogućuje interakcija aaRS i seta identitetnih nukleotida tRNA koji osiguravaju produktivno smještanje 3'-OH kraja u sintetsko aktivno mjesto aaRS (revijalno prikazano u Giege i sur, 1998).

1.3.1. Mehanizmi popravka pogrešaka aminoacil-tRNA-sintetaza

Aminoacil-tRNA-sintetaze reakciju aminoaciliranja provode s velikom točnošću te je eksperimentalno pokazano da se pogreška događa tri puta na svakih 10000 aminokiselina (Loftfield i Vanderjagt, 1972). Takva minimalna pogreška ne predstavlja problem biološkim sustavima i nije prijetnja funkcioniranju i životu stanice (revijalno prikazano u Nelson i Cox, 2013). Visoku razinu točnosti u povezivanju odgovarajuće aminokiseline s njoj pripadnom molekulom tRNA, aminoacil-tRNA-sintetaze su postigle na dva načina. Kao prvo, (1.) većina aaRS može izvrsno diskriminirati pripadnu aminokiselinu od nepripadne već na razini samog vezanja u sintetsko aktivno mjesto te pri katalitičkom koraku aktivacije aminokiseline (Ibba i sur, 1999). Drugo (2.), obzirom da neke aaRS ne mogu dobro razlikovati pripadnu od njoj strukturno slične nepripadne aminokiseline, razvile su različite načine hidrolitičkog popravka aminoacil-adenilatnog intermedijera ili aa-tRNA produkta (revijalno prikazano u Yadavalli i Ibba, 2012). Mehanizmi popravka pogrešaka podijeljeni su u dvije skupine: mehanizme popravka prije i nakon reakcije prijenosa aminokiseline na molekulu tRNA (revijalno prikazano u Perona i Gruić Sovulj, 2013).

Popravak pogreške prije reakcije prijenosa odvija se u sintetskom aktivnom mjestu, a može biti tRNA-neovisan ili tRNA-ovisan (Slika 1.4). U tRNA-neovisni popravak pogreške ubrajaju se enzimska hidroliza, kao i selektivno otpuštanje nepripadnog aminoacil-adenilata koje prati neenzimska spontana hidroliza u otopini. tRNA-ovisan popravak podrazumijeva enzimski kataliziranu hidrolizu aminoacil-adenilatnog intermedijera stimuliranu vezanjem pripadne molekule tRNA na aaRS (revijalno prikazano u Perona i Gruić Sovulj, 2013).



Slika 1.4. Shematski prikaz reakcije aminoaciliranja i tipova mehanizma popravka pogreške aminoacil-tRNA-sintetaza. Preuzeto i prilagođeno iz Cvetešić i sur, 2014.

Popravak pogreške nakon reakcije prijenosa nepripadne aminokiseline na tRNA odvija se u zasebno strukturiranoj domeni za popravak pogreške koja se još naziva i deacilacijska domena. Ovisno o tipu aaRS može se provesti na dva načina: (1) *in trans* - aminoacilirana tRNA se prvo otpusti s enzima u otopinu, nakon čega se neispravni aa-tRNA produkt ponovno veže u deacilacijsku domenu u kojoj se odvija hidrolitički popravak; (2) *in cis* - pri čemu se 3' –kraj tRNA s vezanom aminokiselinom translocira u domenu za popravak pogreške gdje se ujedno vrši hidroliza esterske veze između neispravne aminokiseline i tRNA (Slika 1.4) (revijalno prikazano u Perona i Gruić Sovulj, 2013).

1.3.2. Podjela aminoacil-tRNA-sintetaza

Aminoacil-tRNA-sintetaze su svrstane su u dva razreda (I i II) i nekoliko podrazreda (Tablica 1.1), a njihova podjela se temelji na strukturnim i funkcionalnim razlikama (Cusack,1997).

Tablica 1.1. Klasifikacija aminoacil-tRNA-sintetazaa. Preuzeto iz revijalnog rada Perona i Gruić Sovulj, 2013.

Razred I aaRS	Razred II aaRS
podrazred IA	podrazred IIA
MetRS	SerRS
LeuRS	ProRS
IleRS	ThrRS
ValRS	GlyRS
podrazred IB	HisRS
GlnRS	podrazred IIB
CysRS	AspRS
GluRS	AsnRS
podrazred IC	LysRS[b]
TyrRS	podrazred IIC
TrpRS	PheRS
podrazred ID	AlaRS
ArgRS	
podrazred IE	
LysRS[b]	

[a] Svrstavanje u podrazrede je utemeljeno na filogeniji konstruiranoj prema strukturnom sravnavanju sekvenci (O'Donoghue i sur, 2003).

[b] LysRS je jedina aaRS koja krši pravila razreda te ju možemo svrstati u razred I ili II, ovisno o tome iz kojeg je organizma.

AaRS razreda I su uglavnom monomerni enzimi koji imaju veliku površinu interakcije s molekulom tRNA (Rould i Perona, 1989). Katalitička domena aaRS smještena je u blizini N-kraja proteina, a strukturirana je u pet uzastopnih i paralelnih β-ploča koje su međusobno povezane α-zavojnicama. Takav tip strukture još se naziva i Rossmannova struktura (Irwin i sur, 1976; Brick i sur, 1989), a karakteristična je za sve proteine koji zahtijevaju kofaktore ATP ili NAD+ i direktno sudjeluju u vezanju nukleotida (Arnez i Moras, 1997). Vezno mjesto za ATP unutar Rossmanove strukture tvore dva očuvana aminokiselinska slijeda: motivi HIGH i KMSKS karakteristična za aaRS razreda I (revijalno prikazano u Perona i Gruić Sovulj, 2013).

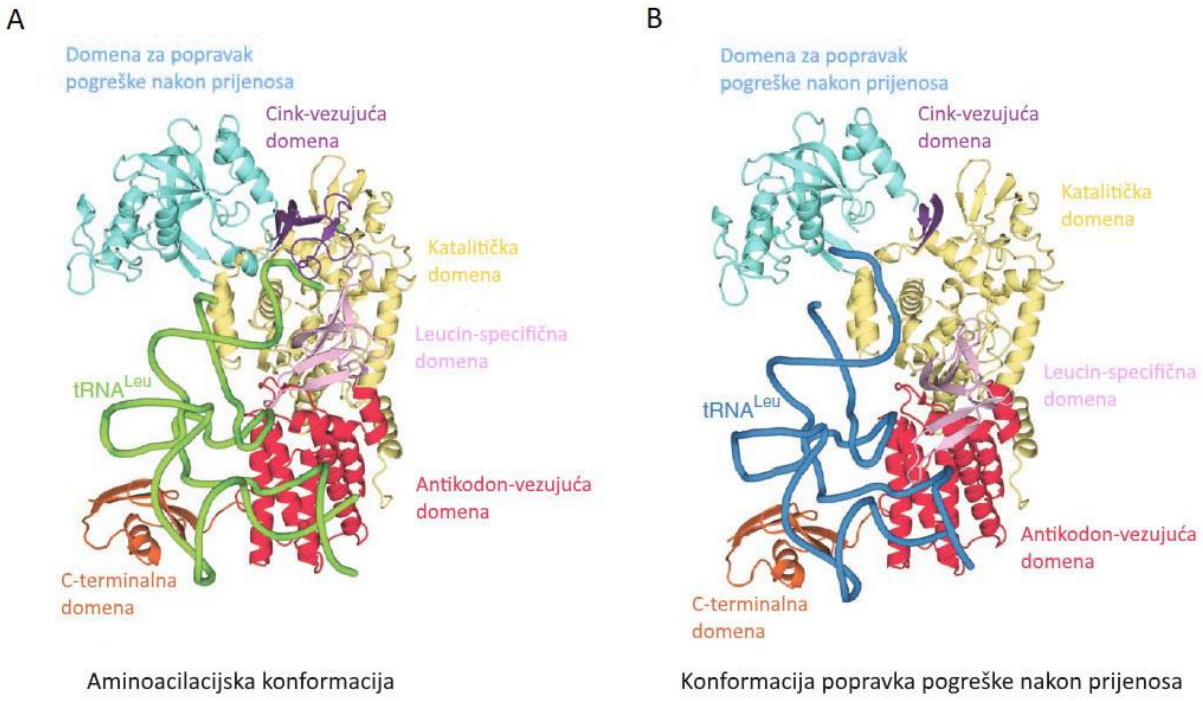
Većina aaRS razreda II su homodimeri, no poznati su i slučajevi monomerne i tetramerne kvaterne strukture (revijalno prikazano u Perona i Gruić Sovulj, 2013). Katalitička domena građena je od sedmeročlane antiparalelne β-ploče omeđene s tri α-zavojnice. Karakteristika svih članova razreda II su i tri visoko očuvana aminokiselinska slijeda nazvana motiv 1, 2 i 3 (revijalno prikazano u Perona i Gruić Sovulj, 2013). Motiv 1 je strukturno vezan za formiranje dimera, a sastavljen je od dugačke α-zavojnice. Motivi 2 i 3 nalaze se unutar sintetskog aktivnog mjesta. Motiv 2 sudjeluje u vezanju ATP-a, aminokiseline i akceptorskog kraja molekule tRNA, a građen je od dva antiparalelna β-lanca povezana dugačkom petljom. Motiv 2 također sudjeluje u formiranju veznog mjesta za molekulu ATP-a, a čini ga β-lanac na koji se nastavlja α-zavojnica (Cavarelli i sur, 1994).

Uz mnoge strukturne razlike između aaRS razreda I i II, primijećene su i razlike u mehanizmu enzimski katalizirane reakcije. AaRS razreda I kataliziraju prijenos aminokiseline na 2' -OH skupinu nukleotida A76 molekule tRNA, dok aaRS razreda II kataliziraju aminoaciliranje 3' -OH kraja (revijalno prikazano u Perona i Gruić Sovulj, 2013). Korak koji određuje brzinu enzimski katalizirane reakcije za aaRS razreda I je otpuštanje aminoacilirane tRNA, dok je kod aaRS razreda II najsporiji korak nastajanje aminoacil-adenilatnog intermedijera u prisutnosti tRNA (Zhang i sur, 2006).

1.3.3. Leucil-tRNA-sintetaza (LeuRS) iz bakterije E. coli

Leucil-tRNA-sintetaza (EC 6.1.1.4.) iz bakterije *Escherichia coli* je monomerni enzim koji se sastoji od više domena i provodi reakciju esterifikacije leucina na izoakceptorske molekule $tRNA^{Leu}$. Sintetsko aktivno mjesto građeno je kao Rossmannova struktura, a gradi srž enzima (Berg i sur, 1961; Lincecum i sur, 2003). Okosnicu enzima čine aktivno mjesto i antikodon-vezujuća domena karakteristična za sintetaze razreda I (Slika 1.5). Dodatne fleksibilne domene su: cink-vezujuća domena (ZN1), domena CP1, domena specifična za leucin (engl. *leucine specific domain*, LSD) i C-terminalna domena (Slika 1.5) (Lincecum i sur, 2003). Funkcija domene LSD nije još uvijek posve razjašnjena, ali je pokazano da ima važnu ulogu u reakciji aminoaciliranja (Palencia i sur, 2012). Budući da uklanjanje C-terminalne

domene narušava aminoacilacijsku aktivnost LeuRS pretpostavlja se da ima važnu ulogu u reakciji aminoaciliranja; vjerojatno putem pozicioniranja tRNA u svrhu postizanja reakcijski produktivnog kompleksa (Tukalo i sur, 2005). Uz pomoć antikodon-vezujuće domene enzim ostvaruje interakcije s antikodonskom rukom $tRNA^{Leu}$. U slučaju LeuRS iz bakterije *E. coli* antikodonska domena ne prepoznaje baze antikodonskog slijeda (Tukalo i sur, 2005), što nije neobično, budući da LeuRS iz *E. coli* prepoznaje i aktivira pet izoakceptorskih molekula $tRNA^{Leu}$ ($tRNA^{Leu}_{CAG}$, $tRNA^{Leu}_{UAA}$, $tRNA^{Leu}_{CAA}$, $tRNA^{Leu}_{GAG}$ i $tRNA^{Leu}_{UAG}$) (Lincecum i Martinis, 2002).

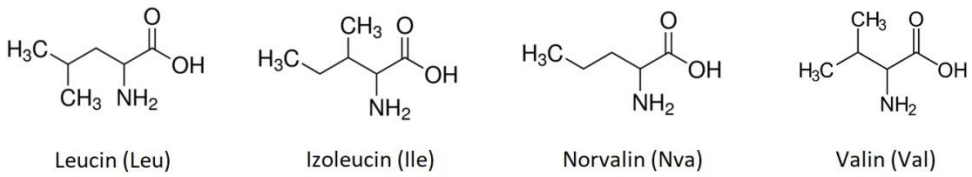


Slika 1.5. Struktura divljeg tipa enzima *E. coli* LeuRS u (A) aminoacilacijskoj konformaciji i (B) u konformaciji za popravak pogreške nakon prijenosa. Žutom bojom označena je katalitička domena, ljubičastom cink-vezujuća domena, plavom domena za popravak pogreške nakon prijenosa, crvenom antikodon specifična domena, ružičastom leucin specifična domena, a narančastom C-terminalna domena. Pod (A) $tRNA^{Leu}$ je prikazana zelenom bojom, a pod (B) plavom bojom. Preuzeto i prilagođeno iz Palencia i sur, 2012.

Kao i druge aminoacil-tRNA-sintetaze razreda IA (valil-tRNA-sinetaza i izoleucil-tRNA-sintetaza) i LeuRS posjeduje aktivno mjesto za popravak pogreške nakon prijenosa čime se povećava točnost reakcije aminoaciliranja (revijalno prikazano u Perona i Gruić Sovulj, 2013). U aktivnom mjestu za popravak pogreške nakon prijenosa (deacilacijskom aktivnom mjestu) odvija se hidrolitičko deaciliranje $tRNA^{Leu}$ na koju je prenesena nepripadna aminokiselina strukturno slična leucinu (Boniecki i sur, 2008). Naime, nakon prijenosa aminokiseline na molekulu tRNA u sintetskom aktivnom mjestu, 3' -kraj tRNA s kovalentno vezanom aminokiselinom se translocira u aktivno mjesto

za popravak pogreške nakon prijenosa koje je udaljeno ~35 Å od sintetskog aktivnog mjesta i nalazi se u zasebno strukturiranoj CP1 fleksibilnoj domeni umetnutoj u Rossmannovu strukturu (Slika 1.5) (Cusack i sur, 2000). Ukoliko je na 3' -kraju vezana nepripadna aminokiselina dolazi do hidrolitičkog deaciliranja $tRNA^{Leu}$, nakon čega deacilirana tRNA i nepripadna aminokiselina disociraju s enzima. Ako je na 3' -kraju vezan leucin, aminoacilirana $tRNA^{Leu}$ se otpušta s enzima, budući da Leu-$tRNA^{Leu}$ nije dobar supstrat reakcije deacilacije (Tukalo i sur, 2005; Cvetešić i sur, 2012).

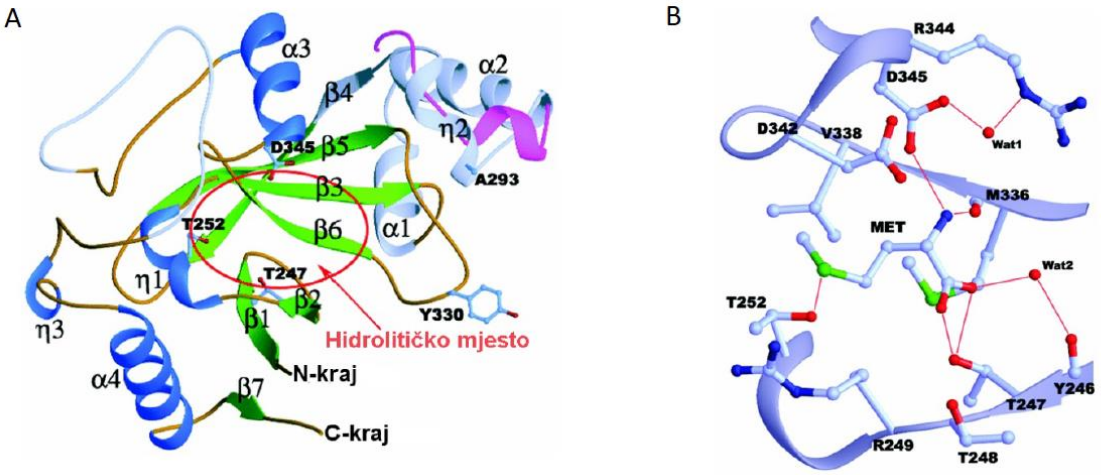
Zbog strukturne sličnosti leucinu, izoleucin, valin i norvalin (Slika 1.6) često su u literaturi navođeni kao dobri supstrati LeuRS iz *E. coli* koji ugrožavaju točnost reakcije aminoaciliranja (Chen i sur, 2000; Tang i Tirrell, 2002; Boniecki i sur, 2008). Nedavna kinetička istraživanja su pokazala da LeuRS uspješno razlikuje valin od leucina faktorom diskriminacije* od 3260 u prvom koraku reakcije aminoaciliranja, te da jednako tako izvrsno razlikuje i izoleucin od leucina već prilikom vezanja u sintetsko aktivno mjesto (Cvetešić i sur, 2012; Cvetešić i sur, 2014). S druge strane, faktor diskriminacije za norvalin u sintetskom aktivnom mjestu iznosi samo 116, što dovodi do zaključka da zapravo najveću prijetnju točnosti LeuRS predstavlja norvalin (Cvetešić i sur, 2012; Cvetešić i sur, 2014; Cvetešić i sur, 2016), koji se u bakterijskoj stanici prirodno akumulira u anaerobnim uvjetima rasta (Soini i sur, 2008).



Slika 1.6. Leucin i njemu strukturno slične aminokiseline – izoleucin, valin i neproteinogena aminokiselina norvalin.

Uočeno je da se mutacijom visoko očuvanog aspartata u alanin na poziciji 345 unutar deacilacijske domene LeuRS iz *E. coli* gubi mogućnost popravka nakon prijenosa krive aminokiseline na $tRNA^{Leu}$ (Lincecum i sur, 2003; Cvetešić i sur, 2012). Naime, kristalografski model je pokazao da Asp-345 sudjeluje u ostvarivanju ionskog mosta s α-aminoskupinom norvalina (Slika 1.7) (Liu i sur, 2006). Zamjenom očuvanog aspartata alaninom dolazi do smanjenja brzina reakcije deacilacije Nva-$tRNA^{Leu}$ 10^5 puta, što ukazuje da je interakcije između Asp i α-aminoskupine norvalina ključna za pravilno pozicioniranje karbonilnog ugljikovog atoma esterske veze između Nva i $tRNA^{Leu}$ u odnosu na vezanu nukleofilnu molekulu vode (Cvetešić i sur, 2012).

** Faktor diskriminacije definiran je kao omjer konstanti specifičnosti (kcat/KM) za pripadnu i nepripadnu aminokiselinu u reakciji aktivacije aminokiseline.*



Slika 1.7. Kristalna struktura domene za popravak LeuRS iz bakterije *E. coli* (A). Hidrolitičko mjesto je označeno crvenim, a tri očuvane aminokiseline aktivnog mjesta domene za popravak (Thr247, Thr252 i Asp345) prikazane su bočnim ograncima. Plavom bojom prikazane su α-zavojnice, zelenom - β-ploče, a smeđom - omče. Pod (B) prikazana je kristalna struktura domene za popravak LeuRS iz bakterije *E. coli* s vezanim metioninom aktivnom mjestu. Vodikove veze bočnog ogranka Met i bočnih ogranaka aminokiselina u aktivnom mjestu domene za popravak LeuRS označena su crvenim linijama (Liu i sur, 2006).

Analizom proteinskog esktrakta izoliranog iz bakterijskog soja D345A *E. coli*, uzgajanog u mikroaerobnim uvjetima, uočena je visoka razina mistranslacije norvalinom do čak 10 % na razini cijelog proteoma (Cvetešić i sur, 2016). Dobiveni kinetički rezultati, kao i rezultati analize spekrometrijom masa ukazuju da domena popravka pogreške nakon prijenosa služi gotovo isključivo za popravak $tRNA^{Leu}$ misacilirane norvalinom, budući da ga LeuRS ne može dovoljno dobro diskriminirati u sintetskom aktivnom mjestu (Cvetešić i sur, 2014; Cvetešić i sur, 2016).

1.4. Elongacijski faktor Tu

Elongacijski faktor Tu (EF-Tu) je najzastupljeniji protein u bakteriji *E. coli* te čini 5 – 10 % ukupnih staničnih proteina (Bosch i sur, 1983). Kodiran je s dva gena *tufA* i *tufB* (Jaskunas i sur, 1975), čiji se proteinski produkti razlikuju u samo jednoj aminokiselini na C-kraju proteina. Naime, produkt gena *tufA* na C-kraju ima glicin, dok produkt gena *tufB* na C-kraju ima aminokiselinu serin (Jones i sur, 1980).

Gen *tufA* nalazi se pod promotorom *rpsl* operona zajedno s genima za protein EF-G i ribosomske proteine S12 i S7 (Lindahl i sur, 1997), dok se *tufB*, kao dio operona *tufB/tRNA*,

kotranskribira s četiri tRNA gena: *thrU*, *tyrT*, *glyT* i *thrT* (Lee i sur, 1981). Pokazano je da pri različitim stacionarnim uvjetima rasta omjer proteina EF-TuA i EF-TuB ostaje konstantan, što ukazuje na njihovu koordiniranu ekspresiju (Van der Meide i sur, 1983). Također, u nekoliko neovisno provedenih istraživanja uočeno je da razina ekspresije gena *tufA* značajno utječe na ekspresiju gena *tufB* (Van der Meide i sur, 1983; Bosh i sur, 1985; Van Delft i sur 1988), dok se, čak ni delecijom gena *tufB*, ne mijenja razina ekspresije proteina EF-TuA (Zuurmond i sur, 1999).

Dosadašnja istraživanja pokazuju da ne postoji biokemijska i funkcionalna razlika između ova dva proteina, a zanimljivo je da delecija bilo kojeg od *tuf* gena nema utjecaja na vijabilnost bakterije *E. coli* uzgajane u minimalnom mediju (Zuurmond i sur, 1999).

EF-Tu svrstavamo u porodicu G-proteina (eng. *guanosine nucleotide-binding proteins*) koji vežu molekulu GTP-a i hidroliziraju ju u GDP, te sudjeluju u mnogim staničnim signalnim putevima i procesima (revijalno prikazano u Nelson i Cox, 2013). Karakteristika svih G-proteina je prelazak iz aktivne forme u neaktivnu i obrnuto, ovisno o tome sadrže li vezan GTP ili GDP. Mehanizmi koji omogućuju prijelaz između dviju formi jednak je za sve G-proteine (revijalno prikazano Nelson i Cox, 2013).

1.4.1. Uloge elongacijskog faktora Tu

Glavna uloga elongacijskog faktora Tu je dopremanje aminoacilirane tRNA do ribosoma (revijalno prikazano u Miller i Weissbach, 1977). Naime, u prvom koraku elongacijskog ciklusa translacije EF-Tu, koji sadrži vezan GTP, veže aminoaciliranu tRNA pri čemu nastaje ternarni kompleks EF-Tu:GTP:aa-tRNA. Nastali kompleks se potom reverzibilno veže u A vezno mjesto ribosoma (Slika 1.2) (revijalno prikazano u Kavaliuskas i sur, 2012). Ako su kodon mRNA u A veznom mjestu i antikodon aa-tRNA komplementarni, dolazi do hidrolize GTP-a i otpuštanja Pi, a s time i velike konformacijske promjene EF-Tu koja rezultira smanjenim afinitetom prema aa-tRNA (Pape i sur, 1999). Nastali EF-Tu:GDP disocira s ribosoma, dok se aa-tRNA čvrsto veže u A mjesto ribosoma. Aminoacilirana tRNA ostvaruje reverzibilnu interakciju s A veznim mjestom ribosoma sve dok ne dođe do nastanka peptidne veze (revijalno prikazano u Kavaliauskas i sur, 2012).

Spontana disocijacija GDP-a s EF-Tu je veoma spora i bez fiziološke relevantnosti, stoga se njegova disocijacija nakon otpuštanja aa-tRNA stimulira elongacijskim faktorom Ts (EF-Ts) (Slika 1.2) (Gromadski i sur, 2002). Formacijom labilnog kompleksa EF-Tu:GDP:EF-Ts stimulira se otpuštanje GDP-a čime nastaje stabilni binarni kompleks EF-Tu:EF-Ts u kojem EF-Tu posjeduje visoki afinitet

prema GTP-u. Vezanjem GTP-a potiče se disocijacija elongacijskog faktora Ts, nakon čega je aktivirani EF-Tu ponovno spreman vezati aminoaciliranu tRNA (Gromadski i sur, 2002).

Pokazano je da EF-Tu doprinosi kontrolnim mehanizmima translacije na dva načina (revijalno prikazano u Reynolds i sur, 2010). Prvo (1.), EF-Tu je važan za odabir molekule tRNA aminoacilirane ispravnom aminokiselinom. Naime, istraživanja su pokazala da je odabir ispravno aminoacilirane tRNA od strane EF-Tu utemeljen na termodinamičkoj kompenzaciji (LaRiviere i sur, 2001). Afiniteti kojim EF-Tu veže aminokiseline i tRNA se međusobno upotpunjuju. Stoga, ako EF-Tu jače veže određenu tRNA onda posjeduje slabiji afinitet prema njoj pripadnoj aminokiselini i obrnuto. Ukupni zbroj afiniteta jednak je za sve ispravno aminoacilirane tRNA (LaRiviere i sur, 2001). Prejako vezani parovi aa-tRNA presporo disociraju s EF-Tu, usporavaju translaciju te češće u obliku ternarnog kompleksa EF-Tu:GTP:aa-tRNA disociraju s ribosoma (LaRiviere i sur, 2001). S druge strane preslabo vezani parovi uglavnom disociraju iz ternarnog kompleksa EF-Tu:GTP:aa-tRNA prije nego li uspiju ostvariti produktivne interakcija na ribosomu (Schrader i sur, 2011).

Drugi (2.) kontrolni mehanizam translacije sprječava otpuštanje aa-tRNA s EF-Tu u A vezno mjesto ribosoma dok se ne provjeri ispravnost sparivanja antikodona aa-tRNA i kodona mRNA (revijalno prikazano u Reynolds i sur, 2010). Prilikom inicijalnog vezanja EF-Tu:GTP:aa-tRNA ternarnog kompleksa na ribosom, aa-tRNA ostvaruje slabu interakciju s A veznim mjestom, dok EF-Tu ostvaruje reverzibilnu interakciju s velikom podjedinicom ribosoma (Pape i sur, 1999). EF-Tu ostaje reverzibilno vezan za ribosom i u kompleksu s aa-tRNA dok mala podjedinica ribosoma vrši provjeru geometrije sparivanja antikodona tRNA i kodona mRNA. Ukoliko je sparivanje komplementarno, dolazi do niza konformacijskih promjena u ternarnom kompleksu EF-Tu:GTP:aa-tRNA koje potiču brzu hidrolizu GTP-a. Suprotno tome, neispravna geometrija sparivanja ne dovodi do konformacijskih promjena čime se povećava vjerojatnost disocijacije ternarnog kompleksa s ribosoma prije no što dođe do hidrolize GTP-a i otpuštanja aa-tRNA u A vezno mjesto (Pape i sur, 1999).

Sinteza proteina je jedan od energetski najzahtjevnijih staničnih procesa zbog čega je pravilna regulacija inicijacije i elongacije translacije iznimno važna u uvjetima nedostatka pojedinih nutrijenata (Browne i Proud, 2002). Uočeno je da se aktivnost proteina koji posreduju u procesu translacije, poput esencijalnog i univerzalno očuvanog elongacijskog faktora Tu, može regulirati fosforilacijom konzerviranih aminokiselinskih bočnih ogranaka (Maček i Mijaković, 2011). Regulatorna fosforilacija proteina EF-Tu do sada je primijećena u nekoliko organizama među kojima su i bakterije *E. coli* te *Bacillus subtilis* (Maček i Mijaković, 2011; Pereira i sur, 2015). Naime, primijećeno je da se u bakteriji *B. subtilis* fosforilacija EF-Tu događa pri nepovoljnim okolišnim uvjetima, u kojima stanici nedostaju esencijalni nutrijenti za rast i normalno funkcioniranje (Pereira i sur, 2015). Fosforilacija se događa na visoko očuvanom Thr bočnom ogranku, a njome se onemogućava konformacijska promjena koja

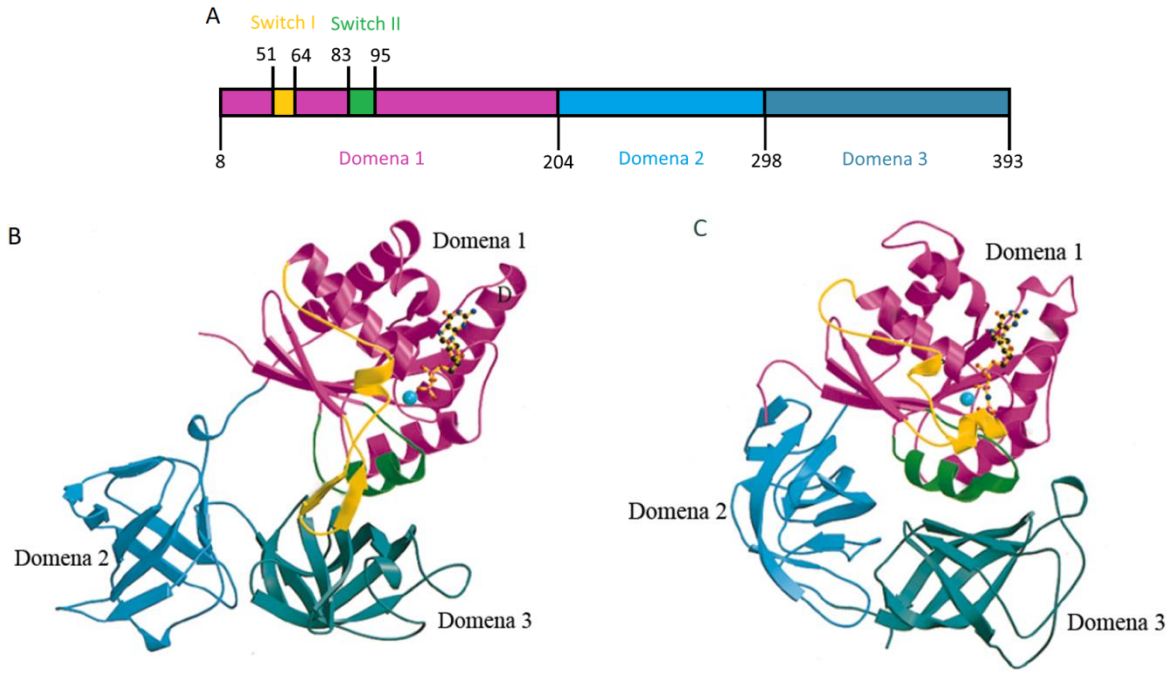
dovodi do hidrolize GTP. Gubitak GTP-azne aktivnosti zadržava EF-Tu na ribosomu i usporava proces translacije (Sprinzl i sur, 2000). Fosforilaciju provodi Ser/Thr kinaza koja je specifično eksprimirana tijekom sporulacije koja osigurava preživljenje *B. subtilis* u uvjetima nedostatka potrebnih nutrijenata (Pereira i sur, 2015).

1.4.2. Struktura elongacijskog faktora Tu

EF-Tu iz bakterije *E. coli* je monomerni protein mase 43,3 kDa. Sastoji se od tri domene: N-terminalna domena 1, domene 2 i C-terminalne domene 3 (Slika 1.8). Domena 1 ima katalitičku ulogu – vezanje nukleotida i GTP-aznu aktivnost, a sastoji se od srži koju čini šest β-ploča okruženih sa šest α-zavojnica u petlji karakterističnoj za sve GTP-vezujuće proteine. Domene 2 i 3 imaju regulatornu ulogu te su građene samo od β-ploča (revijalno prikazano u Krab i Parmeggiani, 2002).

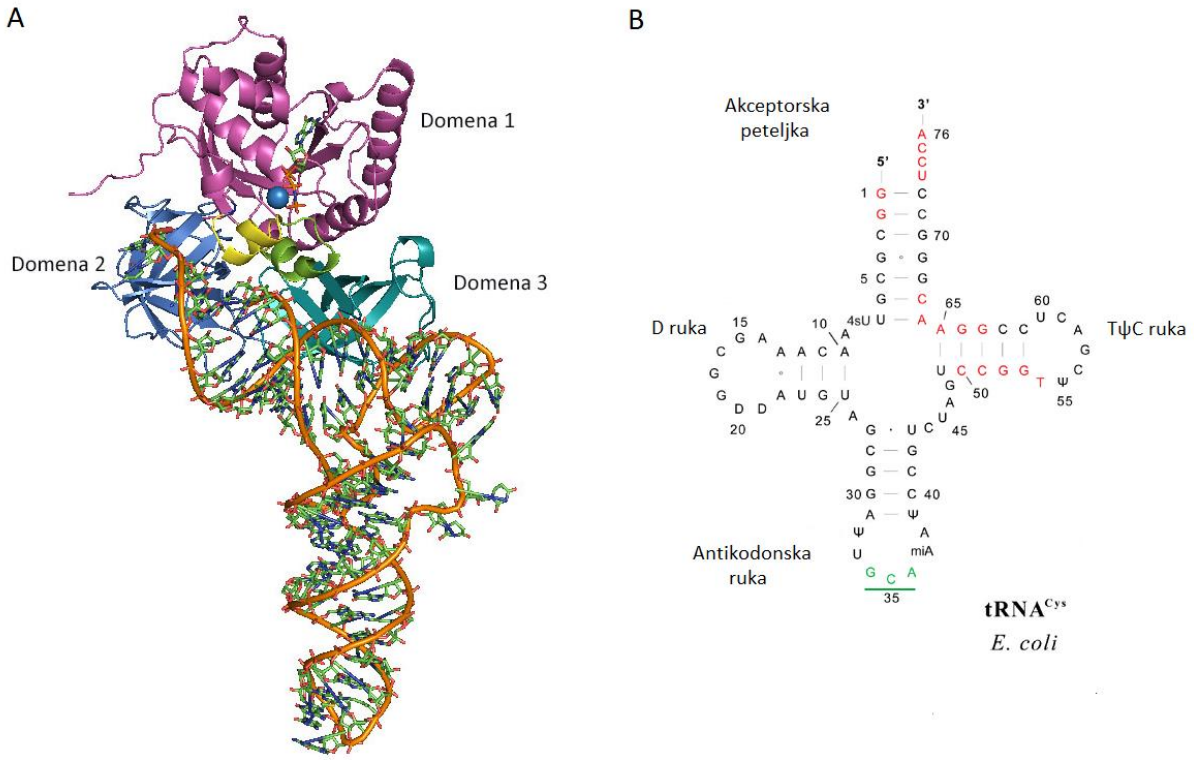
Vezanje GTP-a i prelazak u aktivni oblik proteina EF-Tu popraćen je konformacijskom promjenom u kojoj se domena 1 u odnosu na domene 2 i 3 zarotira za 90° (Slika 1.8) (Song i sur, 1999). Takav pomak zatvara centralnu šupljinu vidljivu u inaktivnoj konformaciji, čime se poprima zatvorena aktivna konformacija (Kjeldgaard i Nyborg, 1992; Song i sur, 1999). Dramatična promjena konformacije posljedica je rearanžmana dviju visoko očuvanih regija nazvanih *Switch* I (efektorska omča) i *Switch* II (Slika 7). Te dvije regije izlažu se samo u aktivnoj konformaciji proteina EF-Tu čime se omogućuje vezanje liganda (Slika 1.8) (Kjeldgaard i sur, 1993).

Uz GTP važan kofaktor je i ion Mg^{2+} koji koordinira fosfatne skupine te omogućuje pravilno pozicioniranje GTP-a u njegovo vezno mjesto u domeni 1 (revijalno prikazano u Kavaliuskas i sur, 2012).



Slika 1.8. Strukturna organizacija proteina EF-Tu. Pod (A) je prikazan shematski prikaz poretka i duljina triju domena proteina EF-Tu iz bakterije *E. coli*. (B) Struktura kompleksa EF-Tu·GDP iz *E. coli* (PDB ID: 1EFC). (C) struktura EF-Tu·GTP iz *T. aquaticus* (PSB ID: 1EFT). Tri domene su prikazane različitim bojama. U domeni 1 posebno su obilježene promjenjive regije (eng. *Switch* regions): *Switch* I regija obojana je žutom, a *Switch* II zelenom bojom. GDP i GTP su prikazani modelom kuglica i štapića, a Mg^{2+} plavom kuglicom (Song i sur, 1999).

Kristalna struktura kompleksa *E. coli* Cys-$tRNA^{Cys}$ i EF-Tu:GDPNP iz bakterije *Thermus aquaticus* dobivena pri rezoluciji od 2,6 Å dala je uvid u očuvane interakcije koje EF-Tu ostvaruje s aminoaciliranom tRNA (Slika 1.9) (Nissen i sur, 1999). U ternarnom kompleksu EF-Tu:GTP:aa-tRNA, TψC ruka molekule tRNA stupa u interakcije s domenom 3, akceptorska peteljka, odnosno aminoacilirani 3' -kraj se veže između domene 1 i 2, dok D ruka i antikodonska ruka ne interagiraju s EF-Tu (Nissen i sur, 1999). Promjena afiniteta EF-Tu prema molekuli aa-tRNA nakon hidrolize GTP-a proizlazi iz restrukturiranja efektorske omče (Eargle i sur, 2008). Naime, u EF-Tu:GTP:tRNA kompleksu efektorska omča je strukturirana u formu zavojnice, dok se nakon hidrolize GTP-a restrukturira u dvije β-ploče. Takva konformacijska promjena dovodi do smanjenja afiniteta prema aa-tRNA nakon čega se ona otpušta s EF-Tu:GDP kompleksa i čvrsto veže u A vezno mjesto ribosoma (Eargle i sur, 2008).

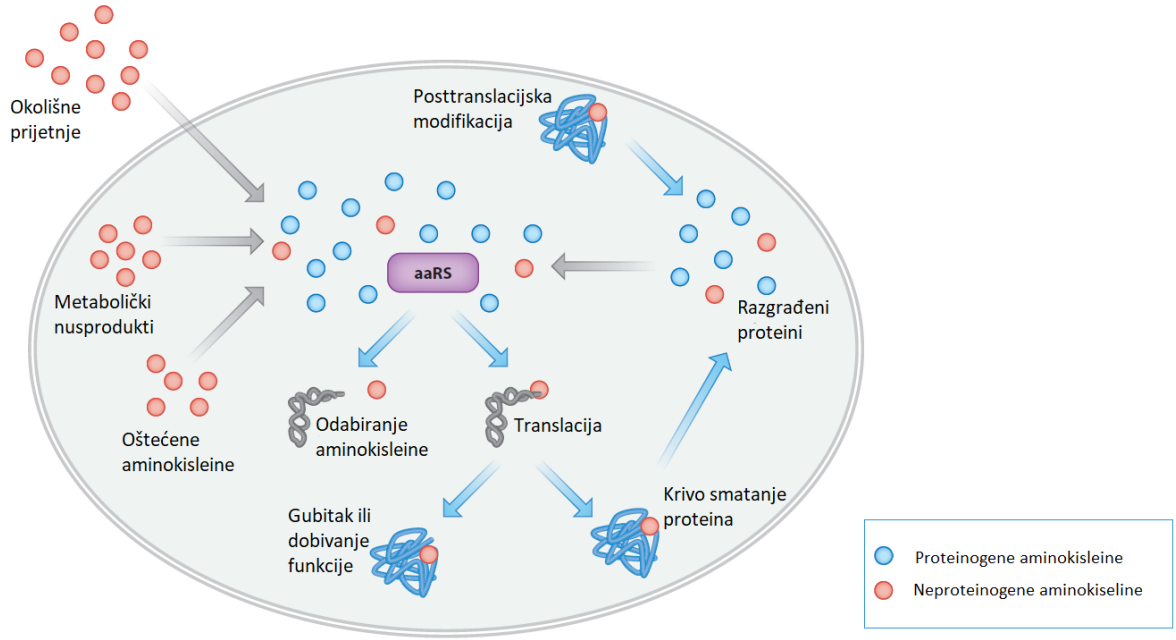


Slika 1.9. Struktura kompleksa EF-Tu iz *T. aquaticus* s GDPNP-om (analogom GTP-a koji se ne može hidrolizirati) i Cys-tRNACys iz *E. coli* (PDB ID: 1B23) dobivena difrakcijom X-zraka (A). EF-Tu je prikazan vrpčastim prikazom pri čemu je domena 1 obojana ljubičasto, domena 2 plavo, domena 3 tirkizno, *Switch* I regija žuto, a Switch II regija zeleno. Svijetlo plava kuglica označava ion Mg^{2+}, a GTP analog prikazan je štapičastim prikazom. Molekula $tRNA^{Cys}$ je prikazana štapičastim prikazom i obojana prema tipu atoma (C atom prikazan je zeleno, N plavo, O crveno i P narančasto). Pod (B) je prikazana sekundarna struktura $tRNA^{Cys}$ iz *E. coli*. Označeni su položaji modificiranih baza. Nukleotidi u kontaktu s EF-Tu označeni su crvenom bojom, a antikodon zelenom. Ovoj tRNA nedostaju nukleotidi 17 i 479. Preuzeto i prilagođeno iz Eargle i sur, 2008.

1.5. Nekanonske aminokiseline

Genetički kod kodira ugradnju 20 kanonskih aminokiselina u proteine (engl. *genetically encoded protein amino acids,* GPA), a osim njih u stanicama se mogu pronaći i neproteinogene aminokiseline (engl. *nonproteinogenic amino acids,* NPA) (revijalno prikazano u Bullwinkle i sur, 2014). U stanicama se NPA prirodno pojavljuju najčešće kao nusprodukti metaboličkih putova, kao produkti razgradnje proteina koji sadrže modificirane aminokiseline (Slika 1.10), a mogu nastati i oksidacijom GPA reaktivnim kisikovim vrstama koje se nakupljaju u uvjetima oksidativnog stresa (Bullwinkle i sur,

2014). Iako nisu genetički kodirane, ponekad može doći do njihove slučajne ugradnje u proteine (revijalno prikazano u Jakubowski i Goldman, 1992). Potencijalna ugradnja nekanonskih aminokiselina ovisi o tome koliko ih dobro aminoacil-tRNA-sintetaze mogu razlikovati od strukturno sličnih, kanonskih aminokiselina (revijalno prikazano u Jakubowski i Goldman, 1992).



Slika 1.10. Glavna uloga aaRS je odabir pripadne proteinogene aminokiseline i njen prijenos na odgovarajuću molekulu tRNA. Strukturno slične neproteinogene aminokiseline često predstavljaju veliku prijetnju točnosti reakcije aminoaciliranja. Izvori neproteinogenih aminokiselina su prikazani sivim strelicama. Njihovom ugradnjom nastaju mistranslatirani proteini čija je sudbina prikazana plavim strelicama. Preuzeto i prilagođeno iz Bullwinkle i sur, 2014.

Kako bi se spriječila ugradnja NPA u proteine, neke aaRS su razvile dodatne deacilacijske domene koje ciljano prepoznaju i hidroliziraju neproteinogene aminokiseline prenesene na molekule tRNA (revijalno prikazano u Bullwinkle i sur, 2014). Na primjer, PheRS uspješno deacilira m-Tyr-tRNA^{Phe} i para-Tyr-tRNA^{Phe} (Roy i sur, 2004) dok LeuRS u deacilacijskoj domeni specifično prepoznaje i hidrolizira norvalin vezan na tRNA^{Leu} (Cvetešić i sur, 2014). Specifično prepoznavanje neproteinogenih aminokiselina u deacilacijskim domenama aaRS, te njihovo uklanjanje iz procesa translacije sugerira da NPA doista predstavljaju veliku prijetnju točnosti biosinteze proteina te normalnom funkcioniranju staničnog proteoma.

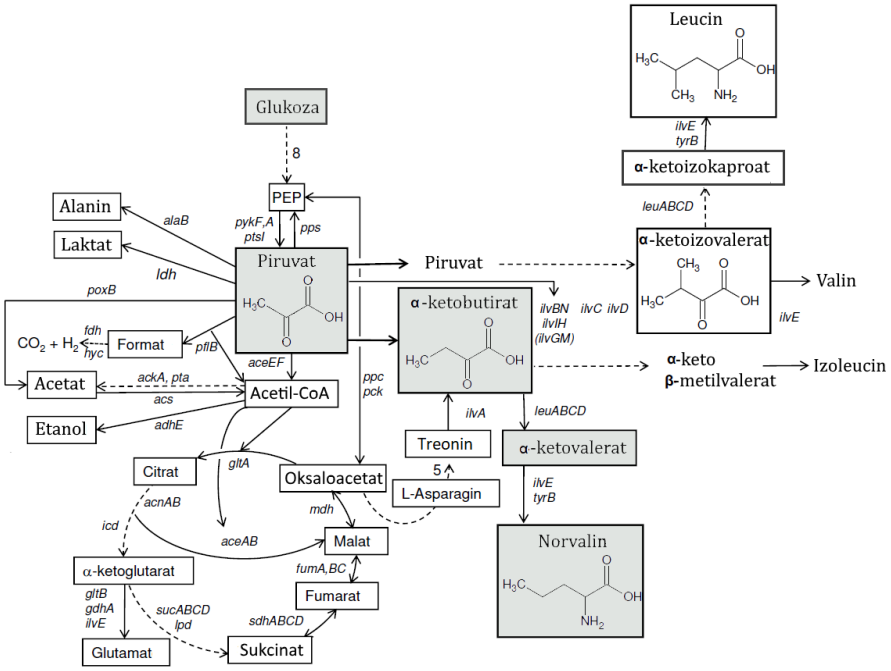
Ugradnja NPA u proteine zabilježena je u svim domenama života (revijalno prikazano u Bullwinkle i sur, 2014), a novija istraživanja su uglavnom usredotočena na izučavanje bolesti u ljudi, koje se razvijaju kao posljedica njihove ugradnje (Sharma i sur, 2015). Naime, dosadašnji radovi ukazuju da citotoksičnost ugradnje neproteinogenih aminokiselina uvelike ovisi o njihovoj kemijskoj

prirodi, kao i o kemijskoj prirodi proteinogene aminokiseline na čijem je mjestu došlo do ugradnje NPA (revijalno prikazano u Mohler i Ibba, 2017).

1.5.1. Norvalin

Norvalin je neproteinogena aminokiselina koja se u određenim uvjetima može akumulirati kao nusprodukt biosinteze razgranatih aminokiselina izoleucina, leucina i valina (Umbarger, 1997). Prvi put je pronađen unutar strukture antifungalnog peptida koji proizvodi bakterija *Bacillus subtilis* (Nandi, 1953), a tek je kasnije pokazano da nastaje kao nusprodukt u biosintezi izoleucina i ostalih hidrofobnih aminokiselina (Kisumi i sur, 1976).

Pretpostavlja se da se norvalin u stanicama sintetizira zbog slabe supstratne specifičnosti enzima koji sudjeluju u biosintezi aminokiselina izoleucina, leucina i valina (Slika 1.11). Najvjerojatniji put nastanka norvalina je direktno preko piruvata iz kojeg nastaje α-ketobutirat te potom α-ketovalerat. Iz α-ketovalerata transaminacijom nastaje norvalin (Soini i sur, 2008). 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*) dok transaminaciju provode enzimi koje kodira *ileE* ili *tyrB* (Slika 1.11). U radu Soina i suradnika iz 2008. pokazano je da se norvalin u divljem tipu *E. coli* K-12 akumulira u anaerobnim uvjetima u prisutnosti visoke koncentracije glukoze. U tim uvjetima dolazi i do akumulacije piruvata, budući da se on ne troši u ciklusu limunske kiseline. Na temelju toga predložen je model sinteze norvalina koji podrazumijeva direktno pretvaranje piruvata u α-ketobutirat (Slika 1.11) (Soini i sur, 2008).



Slika 1.11. Shematski prikaz biosintetskog puta razgranatih aminokiselina s predloženim putem nastanka norvalina iz piruvata koji čini poveznicu s glikolizom i ciklusom limunske kiseline u *E. coli.* U shemu su uključene i anaerobne rute. Radi pojednostavljenog prikaza neki metabolički putevi s više koraka su prikazani isprekidanom linijom. Brojevi se odnose na količinu enzimskih reakcija, a enzimi su označeni imenom gena koji ih kodiraju. Preuzeto i prilagođeno iz rada Soini i sur, 2008.

Pretpostavlja se da se norvalin može sintetizirati u svim mikroorganizmima koji mogu preživjeti u mikroaerobnim uvjetima i koji imaju enzime potrebne za sintezu razgranatih aminokiselina. Budući da u humanim stanicama enzimi za sintezu Ile, Leu i Val nisu aktivni, pretpostavlja se da ne može doći ni do sinteze norvalina (revijalno prikazano u Bullwinkle i sur, 2014). On se u stanicama može naći unosom iz okoline – putem prehrane ili pak putem simbiotskih mikroorganizama koji ga mogu sintetizirati (revijano prikazano u Bullwinkle i sur, 2014).

Apostol i suradnici su 1997. svojim eksperimentima pokazali da se prilikom prekomjerne ekspresije rekombinantnog proteina hemoglobina u stanicama *E. coli* na mjesta leucina može krivo ugraditi norvalin (Apostol i sur, 1997). Također, uvidjeli su da razina ugradnje ovisi o fermentacijskim uvjetima u stanici te količini akumuliranog norvalina. Prema dobivenim rezultatima predložili su model prema kojem je glavni uzrok misinkorporacije norvalina omjer između slobodnog Nva u odnosu na Leu kao i stanična potreba za leucinom. Naime, u normalnim stanicama je zbog niske endogene produkcije Nva omjer Nva/Leu nizak, te on ne predstavlja prijetnju pri aminoaciliranju $tRNA^{Leu}$. No, prekomjerna ekspresija proteina bogatim leucinom narušava taj omjer, čime se povećava vjerojatnost misacilacije $tRNA^{Leu}$ norvalinom (Apostol i sur, 1997).

Kako bi se ustvrdio postotak mistranslacije norvalinom na razini cijelog proteoma nedavno su provedene analize ukupnog proteinskog ekstrakta izoliranog iz bakterijskih stanica uzgajanih u mikroaerobnim uvjetima (Cvetešić i sur, 2016). Korištena su dva soja bakterije *E. coli*: divlji tip te mutant D345A kojem je ugašena aktivnost domene za popravak pogreške enzima LeuRS (Cvetešić i sur, 2012). Analiza spektrometrijom masa je zabilježila nisku razinu misinkorporacije norvalina do 0,27 % u slučaju divljeg tipa, dok je u mutantu zabilježena misinkorporacija Nva na 8,47 % leucinskih pozicija. Plato misinkorporacije postignut je nakon 10 sati rasta u stacionarnoj fazi u mikroaerobnim uvjetima (Cvetešić i sur, 2016). Prema tome može se zaključiti da je razina mistranslacije ovisna o vremenu uzgoja u mistranslatirajućim uvjetima, što je u suglasnosti i s rezultatima Apostola i suradnika iz 1997. Ovakvi rezultati ujedno ukazuju na važnost očuvanja domene za popravak pogreške leucil-tRNA-sintetaze, budući da je njezina glavna uloga upravo hidroliza norvalinom misacilirane $tRNA^{Leu}$ (Cvetešić i sur, 2016).

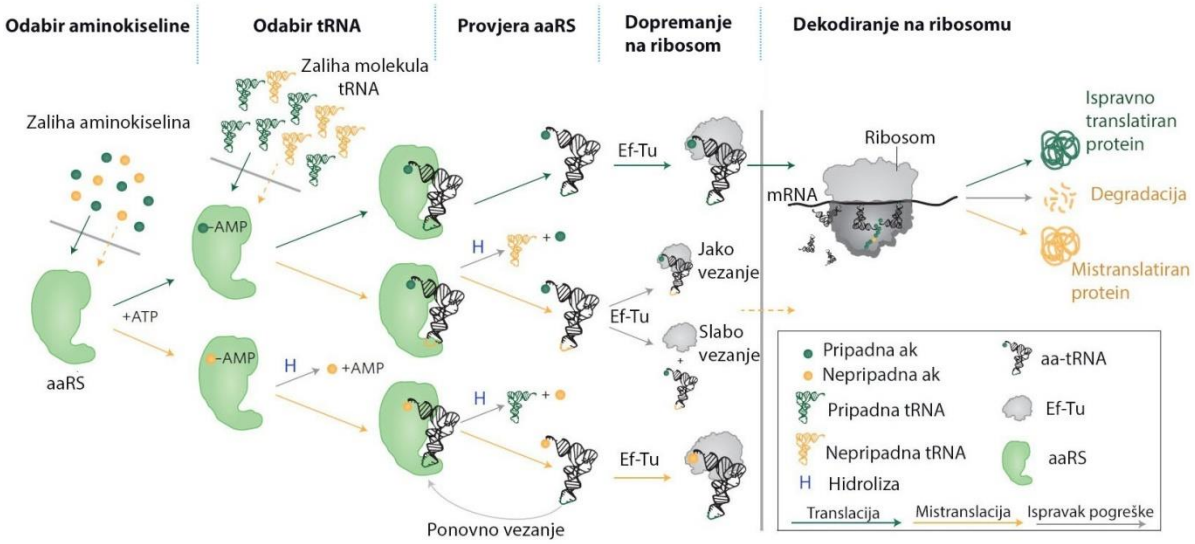
1.6. Točnost biosinteze proteina

Ispravna translacija mRNA u odgovarajući polipeptidni lanac je proces koji se sastoji od više koraka, a preciznost svakog od njih je nužna kako bi se očuvao integritet staničnog proteoma (Drummond i Wilke, 2009). Netočna biosinteza polipeptidnog lanca može biti posljedica zamjena jedne aminokiseline drugom, prerane terminacije translacije, promjene okvira čitanja mRNA na ribosomu ili ne zaustavljanja translacije na STOP kodonu. Čak ako se translacijom dobije ispravan aminokiselinski slijed određenog proteina, pogreške tijekom njegovog smatanja ili posttranslacijskog modificiranja mogu onemogućiti zauzimanje nativne konformacije i vršenje predodređene funkcije (revijalno prikazano u Mohler i Ibba, 2017).

Mnogim eksperimentima se do sada nastojala odrediti ukupna razina pogreške tijekom translacije, a danas je najčešće citirana vrijednost od 3 pogreške na 10000 kodona (Loftfield i Vanderjagt, 1972). Navedena brojka zapravo reflektira pogreške nakupljene tijekom svih koraka translacije, pri čemu se aminoaciliranje molekula tRNA i dekodiranje mRNA na ribosomu smatraju najskloniji pogreškama (Loftfield i Vanderjagt, 1972; Parker, 1989).

1.6.1. Utjecaj mistranslacije na stanicu

Mistranslacija dovodi do nastanka polipetidnog lanca čiji je slijed aminokiselina drugačiji od genetički kodiranog slijeda. Mistranslatirani protein može biti posljedica krive transkripcije gena ili pogrešaka akumuliranih tijekom pojedinih koraka procesa translacije (revijalno prikazano u Mohler i Ibba, 2017). Kako bi osigurale što točniju biosintezu proteina, stanice su razvile različite mehanizme popravka koji osiguravanju nisku razinu pogreške prilikom transkripcije gena (10^{-5}) (Blank i sur, 1986) i prilikom translacije mRNA u proteine (10^{-4}) (Loftfield i Vanderjagt, 1972). Shematski prikaz mehanizama koji osiguravaju kontrolu kvalitete translacije prikazani su na Slici 1.12.



Slika 1.12. Shematski prikaz mehanizama koji osiguravaju kontrolu kvalitete translacije. AaRS uglavnom ispravno odabiru pripadnu tRNA kroz strukturnu i kinetičku diskriminaciju, no ponekad mogu aktivirati i prenijeti nepripadnu aminokiselinu na molekulu tRNA. Takva se pogreška može riješiti hidrolizom krivo aktiviranog aminoacil-adenilata (popravak prije reakcije prijenosa) ili hidrolizom krivog aa-tRNA para (popravak nakon prijenosa). EF-Tu također pruža kontrolu translacije na temelju afiniteta kojim veže ispravno i neispravno aminoacilirane tRNA. Naime, nepripadni parovi aa-tRNA se mogu preslabo ili prejako vezati na EF-Tu, čime se smanjuje njihova vjerojatnost opuštanja u A vezno mjesto ribosoma. Dekodiranje mRNA na ribosomu postiže se komplementarnim sparivanjem antikodona tRNA i kodona mRNA. Komplementarnost sparivanja provjerava mala podjedinica ribosoma (preuzeto i prilagođeno iz Mohler i Ibba, 2017).

Glavnim čuvarima genetičkog koda smatraju se aminoacil-tRNA-sintetaze koje odgovarajuće aminokiseline odabiru na temelju strukturnih i kinetičkih razlika te ih prenose njihove pripadne molekule tRNA (revijalno prikazano u Perona i Gruić Sovulj, 2013). Diskriminacija pripadne od

nepripadne aminokiseline ponekad je prilično zahtjevna za aaRS, a kako bi se osigurala veća točnost rakcije aminoaciliranja, aaRS su razvile različite mehanizme koji osiguravaju popravak neispravno aminoacilirane tRNA (detaljno prikazano u poglavlju 1.3.1). Ukoliko neispravno aminoacilirane molekule tRNA izbjegnu sve mehanizme popravka aaRS, različiti afinitet vezanja ispravnog i neispravnog aa-tRNA para od strane proteina EF-Tu još uvijek može smanjiti vjerojatnost ugradnje neispravne aminokiseline u proteine (LaRiviere i sur, 2001).

Posljednja kontrola translacije odvija se prilikom dekodiranja mRNA na ribosomu, gdje se uz pomoć EF-Tu odabire tRNA čiji je antikodonski slijed komplementaran kodonu na mRNA (Pape i sur, 1999). Ako pak neispravno aminoacilirana tRNA ili neodgovarajuća aa-tRNA izbjegnu sve ove kontrolne točke kvalitete translacije dolazi do ugradnje neodgovarajuće aminokiseline u polipeptidni lanac (revijalno prikazano u Mohler i Ibba, 2017).

Pokazano je da se odabir neispravne aminokiseline ili tRNA od strane aaRS te krivo dekodiranje kodona na ribosomu može dogoditi i uslijed stresa induciranog narušavanjem zalihe aminokiselina ili molekula tRNA u stanici (Pang i sur, 2014). Naime, Swanson i suradnici (1988) su pokazali da unatoč velikim strukturnim razlikama aaRS mogu odabrati krivu tRNA ukoliko je u stanici ograničen broj pripadnih molekula tRNA. U njihovim eksperimentima povišena ekspresija glutaminil-tRNA-sintetaze (GlnRS) dovela je do visoke razine misacilacije $tRNA^{Tyr}$, a njezino snižavanje postignuto je povišenom ekspresijom pripadnog supstrata $tRNA^{Gln}$. Takvi rezultati ukazuju da je za točnost aminoacilacije nužno i očuvanje pravilnog omjera aaRS i njima pripadnih molekula tRNA (Swanson i sur, 1988).

Stohastička priroda uzorkovanja zalihe parova aa-tRNA od strane ribosoma prilikom dekodiranja dovodi do usporavanja translacije i mistranslacije u uvjetima smanjene količine aminokiselina u stanici, posebno prilikom dekodiranja kodona niske zastupljenosti (Fluitt i sur, 2007). U takvim uvjetima stresa stanica može odgovoriti na dva oprečna načina: (1) indukcijom staničnog odgovora na oskudicu (engl. *stringent response*) (Srivatsan i Wang, 2008). Naime, u uvjetima nedostatka aminokiselina raste udio deaciliranih molekula tRNA što dovodi do zastajkivanja sinteze proteina na ribosomu i slučajnog vezanja deacilirane tRNA u A vezno mjesto ribosoma (Srivatsan i Wang, 2008). Njenim vezanjem dolazi do otpuštanja proteina RelA, medijatora staničnog stresa na oskudicu, i dodatne produkcije signalnih molekula (p)ppGpp čiji porast inhibira transkripciju gena potrebnih za sintezu proteina (Srivatsan i Wang, 2008; Zuo i sur, 2013; Ross i sur, 2013). Ovim staničnim odgovorom postiže se smanjenje razine ukupne ekspresije proteina u stanici, kao i razina mistranslacije. Drugi (2.) mogući stanični odgovor na nedostatak aminokiselina podrazumijeva sprječavanje zastajkivanja ribosoma i *stringent response-a* upotrebom gotovo odgovarajućih parova

aa-tRNA koji se u svom antikodonskom slijedu razlikuju za jednu bazu od odgovarajuće aa-tRNA (revijalno prikazano u Mohler i Ibba, 2017).

1.6.1.1. Različite potrebe za kontrolom kvalitete translacije

Istraživanja na citosolnoj fenilalanil-tRNA-sitetazi (ctPheRS) i mitohondrijskoj mtPheRS organizma *Saccharomyces cerevisiae* su pokazala da mitohondriji za funkcionalnu biosintezu proteina zahtjevaju strožu kontrolu kvalitete translacije (Reynolds i sur, 2010). ctPheRS je svojom strukturom slična PheRS iz *E. coli*, a posjeduje dvije podjedinice: α-podjedinicu koja sadrži aktivno sintetsko mjesto i β-podjedinicu u kojoj se nalazi aktivno mjesto za popravak pogreške nakon prijenosa (deacilacijsko aktivno mjesto) (Roy i sur, 2004). mtPheRS s druge strane ne posjeduje β-podjedinicu i mogućnost deacilacije te se u potpunosti oslanja na precizno prepoznavanje aminokiseline u sintetskom aktivnom mjestu (Lue i Kelly, 2005). Unatoč tome, mtPheRS odabire 15 puta preciznije fenilalanin od strukturno sličnog tirozina u usporedbi s ctPheRS (Martinez-Force i Benitez 1995; Ross-Inta i sur, 2008). Uvođenjem mutacije u mtPheRS koja smanjuje njenu preciznost za 17 puta onemogućen je normalan rast kvasca na respiratornom mediju te dolazi do gubitka mitohondrijskog genoma. Suprotno tome, u stanicama s mutiranim ctPheRS, bez mogućnosti deacilacije, biosinteza proteina se odvijala normalno te nije uočena promjena u njihovoj vijabilnosti (Reynolds i sur, 2010).

Lee i suradnici su 2006 godine, svojim *in vivo* istraživanjem na mišjim modelima pokazali da se potreba za kontrolom kvalitete translacije razlikuje i između pojedinih tipova stanica. Uvođenjem *missense* mutacije u aktivno mjesto deacilacijske domene alanil-tRNA-sintetaze (AlaRS) dovelo je do akumulacije krivo smotanih proteina u terminalno diferenciranim Purkinjeovim neuralnim stanicama. No, samo taj tip stanica (koji nema mogućnost daljnje diobe) pokazao je takav fenotip dok su ostale stanice s istom mutacijom AlaRS funkcionirale normalno (Lee i sur, 2006).

Rezultati navedenih istraživanja pokazali su da stanice/organeli, ovisno o njihovim fiziološkim uvjetima, zahtjevaju različitu strogost kontrole kvalitete translacije koju pružaju aaRS (Reynolds i sur, 2010).

1.6.1.3. Pozitivni učinci mistranslacije

Unatoč brojnim primjerima kojima je pokazano da mistranslacija smanjuje vijabilnost stanice i njen fitnes, postoje primjeri u kojima mistranslacija ima povoljne učinke na stanicu (revijalno prikazano u

Mohler i Ibba, 2017). Nedavno je otkrivena regulirana mistranslacija u stanicama sisavaca koja je posljedica namjerne misacilacija metioninom tRNA koje za njega nisu specifične (Netzer i sur, 2009). Bazalna razina mismetionilacije je oko 1 %, što je značajno više od tipične pogreške u mistranslaciji (~0,01 %), a u uvjetima stresa ta razina poraste na čak 10 % (Netzer i sur, 2009). Mismetionilacija je potaknuta reaktivnim kisikovim vrstama i selektivna je za određene tRNA izoakceptore koje metionil-tRNA-sintetaza (MetRS) može prepoznati i vezati. Isti učinak pokazan je i u drugim organizmima, poput *S. cerevisiae* (Wiltrout i sur, 2012) i *E. coli* (Jones i sur, 2011). Naime, povišena ugradnja metionina štiti proteine od oštećenja reaktivnom kisikovim vrstama jer se on može oksidirati i time zaštititi ostale bočne ogranke, a jednostavno se redukcijom vraća u izvorno stanje putem peptidil-Met-sulfoksid-reduktaze (Netzer i sur, 2009). Kakav koristan učinak bazalna mistranslacija metioninom ima na stanicu još uvijek nije posve razjašnjeno.

Smatra se da sličnu dobrobit povremene mistranslacije na razini proteoma imaju i bakterijske stanice u organizmima sisavaca, budući da pogreške u sintezi proteina dovode do veće raznolikosti antigena prezentiranih na površini stanice (Yewdell, 2011), što omogućava njihovo lakše zaobilaženje stanica imunološkog odgovora domadara.

Još jedan od primjera dobrobiti mistranslacije daju i rezultati i istraživanja u kojem je $tRNA^{Ser}$ s antikodonom CAG eksprimirana u *S. cerevisiae.* Time je na mjesta leucina u određenom postotku dolazilo do ugradnje serina (Santos i sur, 1999). Zanimljivo je da u normalnim fiziološkim uvjetima takve stanice nisu imale značajno smanjenu vijabilnost, a s druge strane lakše su podnosile uvjete stresa poput povišene koncentracije arsena, kadmija, cikloheksimida, vodikovog peroksida i natrijevog klorida. Jedno od objašnjenja takve prilagodbe na dodatne uvjete stresa jest da su stanice tokom rasta u mistranslacijskim uvjetima već pripremile zaštitne mehanizme protiv krivo smotanih proteina (Santos i sur, 1999).

1.7.1.2. Negativni učinci mistranslacije

Ugradnja neodgovarajuće aminokiseline na strukturno važne pozicije može dovesti do velikih konformacijskih i funkcionalnih promjena mistranslatiranog proteina (revijalno prikazano u Mohler i Ibba, 2017). Rezultati provedenih istraživanja ukazuju da citotoksičnost mistranslacije ne ovisi samo o kemijskim svojstvima i strukturi neodgovarajuće aminokiseline, već i o svojstvima aminokiseline na čije mjesto se neodgovarajuća aminokiselina ugrađuje (revijalno prikazano u Mohler i Ibba, 2017).

U brojnim istraživanjima je testirana toksičnost ugradnje nepripadnih aminokiselina za bakterijske sojeve u kojima određena aaRS ima ugašen popravak pogreške (Bacher i sur, 2005;

Karkhanis i sur, 2007; Cvetešić i sur, 2014; Cvetešić i sur, 2016). Bacher i suradnici su svojim eksperimentima pokazali smanjenu vijabilnost u prisustvu norvalina bakterijskog soja *E. coli* čiji enzim IleRS ima ugašen popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline na tRNA (Bacher i sur, 2005). Pretpostavlja se da je uzrok smanjene vijabilnosti zamjena izoleucina norvalinom na razini čitavog proteoma. Naime, bakterije s mistranslatiranim proteomom pokazivale su manje preživljenje u raznim uvjetima uzgoja poput različitih temperatura ili medija te su bile osjetljivije na tretman antibioticima (Bacher i sur, 2005).

Slično istraživanje na LeuRS iz *E. coli* pokazalo je da su stanice s ugašenim popravkom pogreške nakon prijenosa osjetljive na niz nepripadnih aminokiselina poput proteinogenih aminokiselina izoleucina, metionina, valina ili neproteinogenih norvalina, norleucina, homocisteina ili homoserina (Karkhanis i sur, 2007; Cvetešić i sur, 2014; Cvetešić i sur, 2016).

Smanjenje staničnog preživljenja u mistranslatirajućim uvjetima potvrdili su i eksperimenti na kvascu u kojem je mistranslacija postignuta plazmidnim konstruktom Ser-tRNA$^{Leu}_{CAG}$, koji misinkorporira Ser na leucinskim pozicijama (Kalapis i sur, 2015). Kvanitativnom spektrometrijom masa pokazano je da takav konstrukt dovodi do zamjene 1,4 % leucinskih pozicija serinom (Kalapis i sur, 2015), što je 1400 puta više od normalne razine mistranslacije u kvascu (Stansfield i sur, 1998). Njegovim uzgojem i mjerenjem optičke gustoće tekućih kultura pokazano je da mistranslacija smanjuje rast za čak 40 % (Kalapis i sur, 2015).

Smatra se da je najčešća posljedica mistranslacije gubitak funkcije te agregiranje krivo smotanih proteina. U rijetkim slučajevima mistranslatirani protein može uslijed drugačije strukture obavljati alternativnu funkciju, nekanonsku za normalan protein (Slika 1.10) (Drummond i Wilke, 2009). Okolišni uvjeti koji dovode do razmatanja proteina, poput povišene temperature imaju sinergistički negativni efekt na stanice koje ne posjeduju neki od mehanizama kontrole kvalitete translacije (detaljno prikazano u poglavlju 1.6.1; revijalno prikazano u Mohler i Ibba, 2017). Pokazano je da, baš kao i stres induciran povišenom temperaturom engl. *heat shock response,* i mistranslacijski stres dovodi do povećane sinteze molekularnih šaperona (Ji i sur, 2017), koji pomažu stabilizaciji i pravilnom smatanju krivo smotanih proteina (detaljno prikazano u poglavlju 1.7.2).

1.7. Smatanje i agregacija proteina

Nakon sinteze proteina na ribosomima slijedi njihovo pravilno smatanje u definiranu trodimenzionalnu strukturu (nativnu konformaciju), koja će omogućiti izvođenje njihove biološke

uloge (revijalno prikazano u Kim i sur, 2013). Budući da su proteini strukturno najsloženije i najraznovrsnije makromolekule odgovorne za gotovo sve stanične funkcije, ni ne čudi da su stanice razvile složenu mašineriju koja osigurava visoku kvalitetu njihovog proteoma (revijalno prikazano u Kim i sur, 2013).

Anfinsenova istraživanja su pokazala da se dio novosintetiziranih proteina nakon otpuštanja s ribosoma može spontano smotati u svoju nativnu strukturu *in vitro* (Anfinsen, 1973), dok su kasnija istraživanja ukazala na činjenicu da većina *de novo* sintetiziranih proteina u stanici, a posebice veliki proteini kompleksne trodimenzionalne strukture, zahtjevaju pomoć mreže molekularnih šaperona kako bi postigli svoju nativnu strukturu na biološki relevantnoj vremenskoj skali (Hartl, 1996).

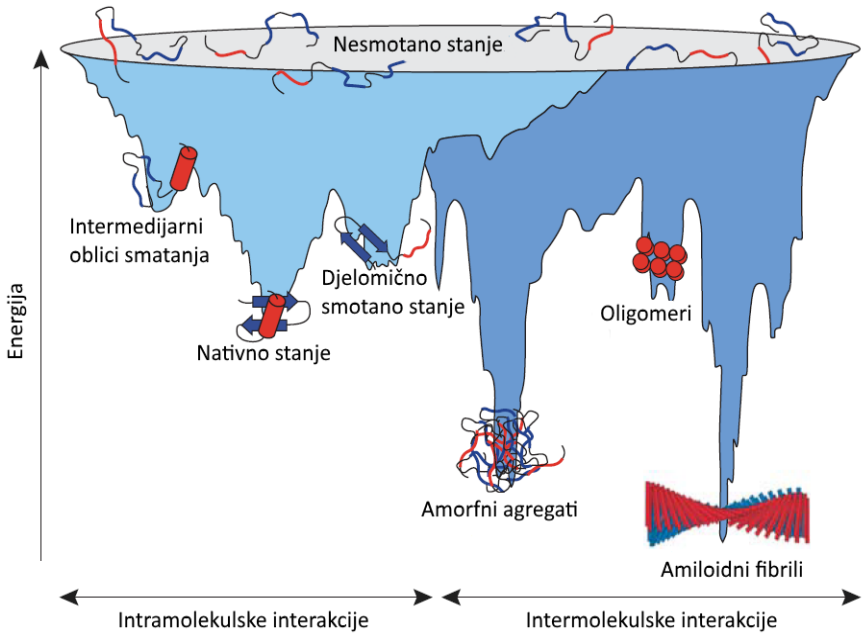
1.7.1. Spontano smatanje proteina

Spontano smatanje proteina potaknuto je privlačnim ili repulzivnim silama koje se javljaju između pojedinih susjednih aminokiselinskih bočnih ogranaka polipeptidnog lanca (Dobson i sur, 1998). Na taj način nastaju favorizirane proteinske konformacije koje mogu voditi prema pravilnom smatanju proteina.

Naime, smatanje proteina se ne odvija od jednom, već prolazi kroz cijeli niz intermedijarnih konformacijskih stanja (Brockwell i Radford 2007) koja mogu biti na dobrom putu nastajanja nativne konformacije ili pak mogu predstavljati kinetički stabilno, krivo smotano stanje iz kojeg se ne može postići nativna struktura (Slika 1.13). Postizanje stabile konformacije rezultat je kooperativnog efekta velikog broja slabih nekovalentnih interakcija (revijalno prikazano u Kim i sur, 2013), a hidrofobni efekt predstavlja glavnu pokretačku silu koja potiče smatanje proteina. On nastaje kao posljedica težnje hidrofobnih skupina da se sakriju duboko u unutrašnjosti trodimenzionalne strukture proteina kako bi izbjegle kontakt s molekulama vode (Dobson i sur, 1998). Vjerojatnost krivog smatanja proteina raste s topološkom kompleksnosti njegovog nativnog stanja (Dobson i sur, 1998). Ukoliko je nativna konformacija postignuta brojnim dalekosežnim interakcijama između različitih domena, koje su u primarnoj strukturi jako daleko, veća je vjerojatnost njegovog krivog smatanja u odnosu na protein jednostavnije topologije (Netzer i Hartl, 1997; Wright i sur, 2005). Agregacija proteina posljedica je njihovog nepravilnog smatanja i izlaganja hidrofobnih regija na njihovoj površini, koje bi u nativnoj strukturi bile sakrivene u srži proteina (Dobson i sur, 1998). Ona može dovesti i do nastanka visoko uređene strukture nazvane amiloidnim fibrilima (Slika 1.13), koje se smatraju izrazito toksičnima za eukariotsku stanicu (Haass i Selkoe, 2007). Danas je poznato na desetke bolesti u ljudi i životinja koje se javljaju kao posljedica nakupljanja amiloidnih fibrila, a neke od njih su: Alzheimerova

bolest, Creutzfeldt–Jacob-ov sindrom, prijenosna spongioformna encefalopatija (TSE) te teleća spongioformna encefalopatija (BSE) (revijalno prikazano u Fink, 1998).

Proteinski agregati su za stanicu toksični zbog toga što ometaju normalan transport proteina, signalnih molekula, raznih drugih makromolekula i organela (u eukariota) te potiču razmatanje i agregaciju staničnih proteina koji inače u citoplazmi ne bi agregirali (revijalno prikazano u Fink, 1998).



Slika 1.13. Energijski profil smatanja i agregacije proteina. Svijetlo plava boja pokazuje skupinu konformacija koje se usmjeravaju prema nativnom stanju intramolekulskim interakcijama, dok tamno plavo obojenje ukazuje na skupinu konformacija koje se uspostavom intermolekulskih interakcija usmjeravaju prema nastanku amorfnih agregata, oligomera ili amiloidnih fibrila. Obje skupine se energijski preklapaju. Do formacije agregata može doći iz intermedijarnih oblika smatanja *de novo* sintetiziranih proteina ili destabilizacijom strukture proteina u nativnom stanju. Agregiranje proteina spriječavaju molekulski šaperoni. Preuzeto i prilagođeno iz Hartl i Hayer-Hartl, 2009.

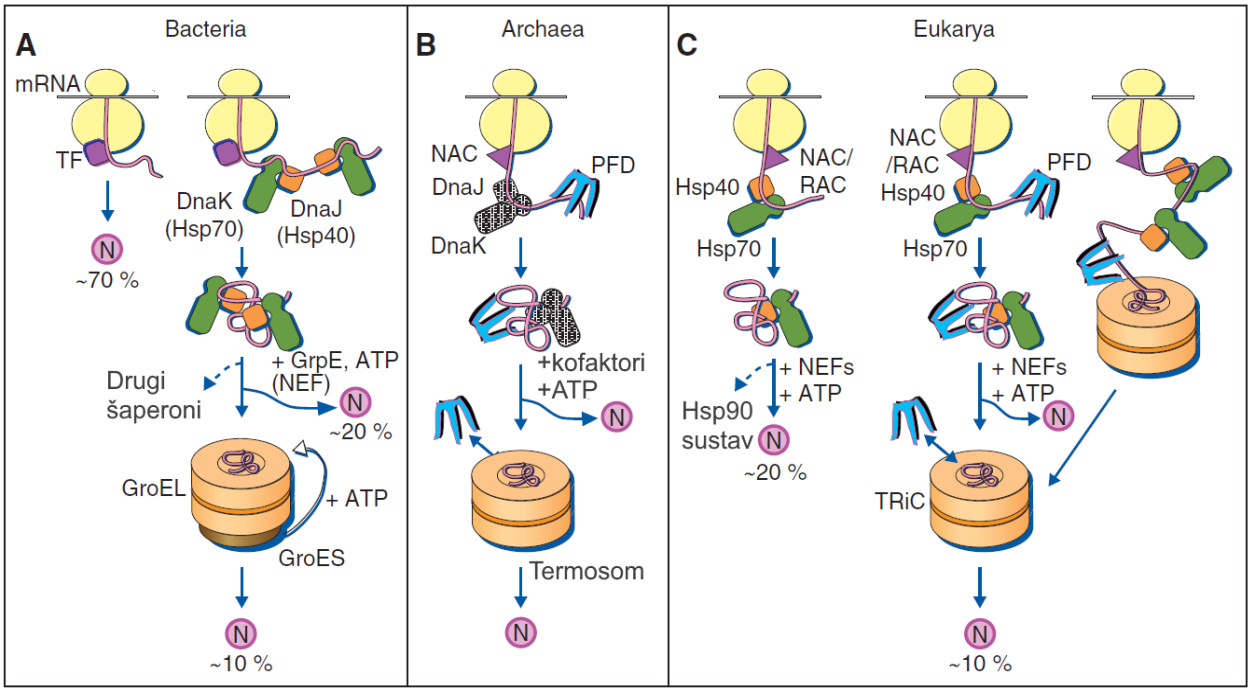
U denaturirajućim uvjetima većina proteina zbog svog razmatanja, neovisno o primarnom slijedu, tvori stabilne agregirane strukture (Dobson, 2003). Agregacija proteina je koncentracijski ovisan proces te je favoriziran u napučenom unutarstaničnom okolišu (Zimmerman i Trach, 1991). Sam proces translacije povećava rizik agregiranja nekih proteina zbog njihove nemogućnosti da samostalno zauzmu svoju nativnu konformaciju. Iz tog je razloga ribosom strukturiran na način da izlazni kanal velike ribosomske podjedinice (Slika 1.1, B) sprječava samostalno smatanje proteina sve dok ne dođu u interakciju s odgovarajućim molekulskim šaperonima (Elcock, 2006) koji će spriječiti njihovo prerano (krivo) smatanje i agregaciju (Slika 1.14).

1.7.2. Smatanje proteina uz pomoć molekulskih šaperona

Molekulski šaperoni su proteini koji interagiraju, stabiliziraju ili pomažu nesmotanom proteinu prilikom postizanja nativne konformacije, ali ne ostaju prisutni u njegovoj konačnoj, funkcionalnoj strukturi (Hartl 1996; Hartl i Hayer-Hartl 2009). Sudjelujući u mnoštvu staničnih funkcija poput: *de novo* smatanja proteina, sastavljanja oligomernih kompleksa, unutarstaničnog transporta proteina i pomoći pri proteolitičkoj razgradnji - šaperoni predstavljaju najvažniji dio stanične mašinerije koja osigurava očuvanje stanične proteostaze (revijalno prikazano u Vabulas i sur, 2010). Budući da je njihova sinteza povećana u uvjetima stresa uzrokovanog nepravilnim smatanjem proteina, do kojeg najčešće dolazi uslijed povišenja temperature, još se nazivaju i proteinima toplinskog stresa (engl. *heat shock proteinima*, Hsp) (Grossman i sur, 1984). Opisani su različiti razredi strukturno nesrodnih šaperona koji se obično klasificiraju prema molekulskoj masi: Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp100 i tzv. mali Hsp proteini (Vabulas i sur, 2009).

Citosolne šaperone možemo podijeliti u četiri glavne skupine: šaperoni asocirani s ribosomima, Hsp70 obitelj šaperona, Hsp90 sustav šaperona i šaperonini (revijalno prikazano u Vabulas i sur, 2010). Šaperoni asocirani s ribosomima sidre se na velikoj ribosomskoj podjedinici, na mjestu izlaska nascentnog polipeptidnog lanca (Slika 1.14, A, B i C) (Kramer i sur, 2009). U ovu skupinu spadaju npr. bakterijski šaperon *Trigger factor* (TF) i eukariotski kompleks asociran s ribosomom (engl. *ribosome associated complex*, RAC). Eukarioti i Arheje mogu dodatno posjedovati i još jedan kompleks udružen s nascentnim lancem (engl. *nascent chain associated complex*, NAC) (Bukau i sur, 2000; Preissler i Deuerling, 2012). Karakteristika ove skupine šaperona je da ostaju vezani za hidrofobne regije proteina sve dok se oni u potpunosti ne smotaju (Agashe i sur. 2004) ili dok se ne prenesu na nizvodne šaperonske sustave (Martinez - Hackert i Hendrickson, 2009).

Sve stanice, osim nekih vrsta Arheja sadrže konstitutivne i stresom inducibilne citosolne šaperone Hsp70 koji se ne vežu direktno na ribosome, poput DnaK bakterija i Hsc70/Hsp70 eukariota (Slika 1.14, A i C) (Chang i sur, 2007). Šaperoni Hsp 70 su poznati po svojoj suradnji sa šaperonima Hsp40, a sudjeluju u ko- i posttranslacijskom smatanju proteina, te ujedno vrše brojne druge funkcije poput prijenosa proteina ili razgradnje terminalno krivo smotanih proteina (revijalno prikazano u Vabulas i sur, 2010).



Slika 1.14. Modeli smatanja de novo sintetiziranih proteina potpomognuti molekularnim šaperonima u bakterija (A), u Arheja (B) i u eukariota (C). Pod (A): nascentni polipeptidni lanci (označeni slovom N) najčešće prvotno interagiraju s TF, a većina malih proteina (~70 %) se može u potpunosti pravilno smotati (u nativnu strukturu) samo pomoću TF. Dulji polipeptidni lanci dodatno interagiraju s DnaK i DnaJ (Hsp70 sustav). Oko 10 % proteina zahtjeva dodatnu pomoć šaperonina GroEL i GroES. Pod (B): nascentni polipeptidni lanci interagiraju s NAC (*nascent chain-associated complex*) i PFD (*prefoldin*) , a samo neke vrste Arheja sadrže DnaK i DnaJ šaperone. Pod (C): NAC (*nascent chain-associated complex)* vjerojatno interagira sa svim nascentnim polipeptidnim lancima, ali njegova uloga u smatanju još uvijek nije u potpunosti razjašnjena. Oko 20 % proteina postiže nativnu strukturu uz pomoć RAC (*ribosome associated complex*) šaperona Hsp70 i Hsp40. Dio tih proteina se mora prebaciti na Hsp90 sustav za konačno smatanje. Približno 10 % proteina se mora ko- ili postranslacijski prebaciti na šaperonin TRiC uz pomoć PFD i Hsp70 koji oboje s njime interagiraju. PFD prepoznaje nascentne lance koje su potencijalni supstrati TRiC-a, te ih doprema do njega. Preuzeto i prilagodeno iz Hartl i Hayer-Hartl, 2009.

Šaperoni Hsp90 sustava djeluju nizvodno od obitelji Hsp70. Karakterizira ih suradnja s brojnim regulatorima i košaperonima (Scheuflee i sur, 2000), a zajedno s njima tvore kompleksnu mašineriju koja pomaže pri finalnom strukturalnom i konformacijskom sazrijevanju velikog broja proteina (Pearl i Prodromou, 2006, Wandingeri sur, 2008).

Šaperonini su veliki proteinski kompleksi sačinjeni od dvije prstenaste strukture koje se rotiraju jedna u odnosu na drugu, a podijeljeni su u dvije grupe (Horwich i aur, 2007). Grupa I, još nazvana Hsp60 obitelj djeluje u bakterijama (šaperon GroEL), mitohondrijima i kloroplastima te funkcionalno surađuje s Hsp10 šaperonima (Slika 1.14, A) (revijalno prikazano u Kim i sur, 2013). Grupa II se u Arheja naziva termosom, a u eukariota TRiC/CCT sustav (revijalno prikazano u Frydman,

2001). Općenito, prstenasta struktura šaperonina djeluje poput kaveza u kojem se nesmotani proteini zadržavaju sve dok ne postignu svoju nativnu konformaciju preko ATP-reguliranih ciklusa smatanja (Slika 1.14, B i C) (revijalno prikazano u Vabulas i sur, 2010).

2. Cilj rada

Cilj ovog diplomskog rada je dobiti bolji uvid u toksičnost mistranslacijskog stresa, čiji utjecaj na stanicu još uvijek nije u potpunosti razjašnjen te proučiti učinke ugradnje Nva na razini proteina. U tu svrhu korišten je bakterijski soj D345A *E. coli* koji posjeduje inaktiviranu deacilacijsku domenu leucil-tRNA-sintetaze, što dovodi do povremene zamjene leucina norvalinom u uvjetima povišene koncentracije norvalina (Lincecum i sur, 2003; Cvetešić i sur, 2012). Naime, istraživanja na navedenom soju su pokazala da bakterijske stanice s norvaliranim proteomom imaju značajno smanjen stanični *fitness* u aerobnim i mikroaerobnim uvjetima rasta (Cvetešić i sur, 2012; Cvetešić i sur, 2016). S obzirom da je Nva manji i manje hidrofoban od Leu, pretpostavlja se da zamjena leucina norvalinom može utjecati na pravilno smatanje proteina, a poznato je da krivo smotani proteini zbog svoje disfunkcionalnosti, agregiranja ili čak stjecanja nove funkcije mogu biti izrazito toksični za stanicu (revijalno prikazano u Mohler i Ibba, 2017). Kako bi se mogli pratiti efekti ugradnje Nva na stabilnosti proteina *in vivo* i *in vitro* odabran je protein EF-Tu kao modelni protein.

EF-Tu je kao modelni protein odabran iz razloga što je on najzastupljaniji stanični protein (Bosh i sur, 1983), što omogućava njegovo jednostavno praćenje i izolaciju. Također, on je esencijalni stanični protein (revijalno prikazano u Kavaliauskas i sur, 2012), zbog čega je zanimljivo pratiti način na koji stanica riješava problem njegove mistranslacije. U svrhu istraživanja utjecaja ugradnje Nva na pravilno smatanje i agregaciju proteina bilo je potrebno razviti najbolji metodološki pristup. Pri tome je optimiziran postupak Western Blot analize, koja daje uvid u agregaciju proteina EF-Tu u citoplazmi bakterijske stanice uzgajane u mistranslatirajućim uvjetima. S druge strane, metode gel-filtracije i limitirane proteolize tripsinom su prilagođene i korištene za analizu stabilnosti mistranslatiranog proteina EF-T u uvjetima *in vitro*. Rezultati ovih eksperimenata ponudit će odgovor na pitanje da li je EF-Tu dobar modelni protein za izučavanje mistranslacijskog stresa te će pomoći pri razumijevanju utjecaja mistranslacije na pravilno smatanje i agregaciju proteina.

3. Materijali

3.1. Standardne kemikalije

Amonijev peroksodisulfat (APS) (*Serva*), akrilamid (*Sigma*), borna kiselina (*Zorka* Šabac), etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) (*Sigma*), *N*-(2-hidroksietil)piperazin-*N*'-2-etansulfonska kiselina (HEPES) (*Sigma*), kalcijev klorid (*Kemika*), magnezijev klorid (*Fluka*), metanol (*Carlo Erba*), natrijev klorid (*Kemika*), natrijev hidroksid (*Kemika*), *N*,*N*,*N*',*N*'-tetrametiletilendiamin (TEMED) (*Sigma*), Tris(hidroksimetil)-aminometan (Tris) (*Sigma*), natrijev hidrogenfosfat (*Kemika*), glicerol (*Kemika*), glicin (*USB Corporation*), glukoza (*Kemika*), imidazol (*Sigma*), kalijev klorid (*Kemika*), kloridna kiselina (*Kemika*), magnezijev sulfat (*Kemika*), β-merkaptoetanol (*Serva*), natrijev dodecilsulfat (SDS) (*Merck*), natrijev hidroksid (*Kemika*), kalijev dihidrogen fosfat (*Sigma*), amonijev klorid (Sigma), ureja (*Kemika*), tioureja (*Sigma*), Tween 20 (*Sigma*).

3.2. Biljezi molekulskih masa

Neobojani biljeg molekulskih masa (engl. *Unstained protein marker*) (*Bio-Rad*), obojani biljeg molekulskih masa (engl. *Prestained protein marker*) (*Bio-Rad*).

3.3. Aminokiseline i nukleotidi

Izoleucin (*Sigma*), leucin (*Sigma*), norvalin (*Sigma*), valin (*Sigma*), GDP (*Sigma*).

3.4. Boje

Coomassie Brilliant Blue R-250 (*CBB*) (*Merck*), *Ponceau S* (*Bio Rad*), *CBB G-250* (*Merck*).

3.5. Enzimi i proteini

Albumin iz goveđeg seruma (engl. *Bovine serum albumin*; BSA) (*New England Biolabs*), albumin iz goveđeg seruma (*New England Biolabs*), DNaza I (*New England Biolabs*), lizozim (*Sigma*), tripsin (*New England Biolabs*), inhibitori proteaza *Complete* (*Roche*).

3.6. Protutijela

Primarno anti-His_6 monoklonalno protutijelo proizvedeno u mišu (*Roche*), sekundarno *Anti-Mouse IgG (Fab Specific)-Peroxidase* protutijelo proizvedeno u kozi (*Sigma-Aldrich*).

3.7. Ostali materijali

Filter papir (*Whatman 3MM*), sterilni filteri (*Filter Bio*), nitrocelulozna membrana (*GE Healthcare*), razvijač filmova (*Sigma*), fiksir za razvijanje filmova (*Kodak*).

3.8. Korišteni sojevi bakterije E. coli

U izradi ovog diplomskog rada korištena su 4 soja bakterije *E. coli* (Tablica 3.1). Mutaciju gena LeuRS mjesno specifičom mutagenezom, kao i dodavanje histidinskog privjeska na C-kraj endogenog proteina EF-Tu u bakterijskom soju MG1655 *E. coli,* postupkom homologne rekombinacije, provela je dr.sc. Nevena Cvetešić.

Tablica 3.1. Sojevi bakterije *E. coli* korišteni u ovom diplomskom radu.

Bakterijski soj	Skraćena oznaka	Karakteristike
MG1655 D345A EF-Tu-C-His_6 *E. coli*	D345A EF-Tu-C-His_6	- endogena mutacija LeuRS gena, Asp345 zamijenjen s Ala, čime se inaktivira deacilacijska domena - histidinski privjesak na C-kraju endogenog proteina EF-TuB
MG1655 EF-Tu-C-His_6 *E. coli*	Wt EF-Tu-C-His_6	- histidinski privjesak na C- kraju endogenog proteina EF-TuB
MG1655 D345A *E. Coli*	D345A	- endogena mutacija LeuRS gena, Asp345 zamijenjen s Ala
MG1655 *E. coli*	Wt	- najsličniji divljem tipu *E. coli*

3.9.Hranjive podloge i mediji za uzgoj bakterije E. coli

3.9.1. M9 minimalni medij

Bakterijske kulture su uzgajane u M9 minimalnom mediju obogaćenom aminokiselinama izoleucin, leucin i valin sastava: 50 mmol dm^{-3} Na_2HPO_4, 25 mmol dm^{-3} KH_2PO_4, 10 mmol dm^{-3} NaCl, 20 mmol dm^{-3} NH_4Cl, 0,1 mmol dm^{-3} $CaCl_2$, 2 mmol dm^{-3} $MgSO_4$, 1 mmol dm^{-3} tiamin, 100 µmol dm^{-3} izoleucin, 100 µmol dm^{-3} leucin, 100 µmol dm^{-3} valin i 10 g dm^{-3} glukoza. Medij je pripremljen otapanjem komercijalno dostupne M9 smjese soli (*Sigma*) sastava: 33,9 g dm^{-3} Na_2HPO_4, 15 g dm^{-3} KH_2PO_4, 5 g dm^{-3} NH_4Cl, 2,5 g dm^{-3} NaCl, u redestiliranoj vodi. Dobivena otopina je strilizirana autoklaviranjem nakon čega su dodane prethodno pripremljene *stock* otopine $MgSO_4$, $CaCl_2$, tiamina i aminokiselina

do potrebne konačne koncentracije. Stock otopine $MgSO_4$ i $CaCl_2$ su prethodno sterilizirane autoklaviranjem, dok su otopine aminokiselina i tiamina sterilizirane filtriranjem.

3.9.2. Kruta hranjiva podloga Luria-Bertani (LB)

Medij za krutu hranjivu podlogu LB sastava: 5 g dm^{-3} kvaščev ekstrakt (*BD Difco*), 10 g dm^{-3} tripton (*BD Difco*), 10 g dm^{-3} NaCl, 15 g dm^{-3} agar (*Sigma*). Medij je prije izlijevanja u sterilne petrijeve zdjelice steriliziran autoklaviranjem. U hranjive podloge nije dodavan antibiotik, obzirom da korišteni bakterijski sojevi ne posjeduju otpornost na niti jedan antibiotik.

4. Metode

4.1. Metode rada s bakterijama in vivo

4.1.1. Priprema prekonoćne kulture bakterijskih stanica

Za uzgoj bakterijskih kultura korišteni su bakterijski sojevi mutanta D345A i divljeg tipa *E. coli* s histidinskim privjeskom na C-kraju proteina EF-Tu (karakteristike korištenih sojeva navedene su u poglavlju 3.8) pohranjeni u glicerolu na -80 °C. Kako bi se dobile pojedinačne bakterijske kolonije, svi sojevi su nasađeni u tri replike na krute LB hranjive podloge bez antibiotika, nakon čega su inkubirani preko noći na 37 °C. Narasle kolonije su pohranjene na 4 °C. Za pripremu prekonoćnih bakterijskih kultura, odabrane pojedinačne bakterijske kolonije su nasađene u odgovarajući volumen tekućeg M9 minimalnog hranjivog medija obogaćenog aminokiselinama Ile, Leu i Val. Uzgajane su preko noći u tresilici pri 37 °C i 240 okretaja u minuti.

4.1.2. Praćenje rasta bakterijskih kultura u mistranslatirajućim uvjetima

U svrhu praćenja utjecaja mistranslacijskog stresa na rast bakterijskih stanica i razlike u ekspresiji endogenog proteina EF-Tu, bakterijske kulture su uzgajane u prisutnosti 300 μmol dm^{-3} ili 1,5 mmol dm^{-3} norvalina i bez njega u 5 ili 20 mL tekućeg minimalnog M9 medija obogaćenog aminokiselinama Ile, Leu i Val (sastav medija opisan je u poglavlju 3.9.1). Prekonoćne kulture su razrijeđene do

OD_{600}= 0,02 u hranjivom mediju, a zatim su uzgajane u sterlinim tikvicama 24 sata pri 37 °C i uz stalno protresanje jačine 250 rpm. Kako bi se pratila vijabilnost bakterijskih stanica, svakih sat vremena ili rjeđe (ovisno o tipu eksperimenta) eksponencijalne faze rasta, izmjerena je apsorbancija pri λ= 600 (tzv. OD_{600} vrijednost). Iz ovisnosti OD_{600} o vremenu uzgoja, dobivene su krivulje rasta koje su zatim 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.

Nakon 24 sata rasta bakterijske stanice su oborene centrifugiranjem pri 5000 × g i 4°C, supernatant je dekantiran, a dobiveni talog pohranjen na -80 °C do analize.

Budući da upotrebljavani bakterijski sojevi ne posjeduju otpornost na niti jedan antibiotik, kontaminacija uzoraka i medija provjerena je istovremenim uzgojem dodatnih kontrolnih uzoraka. Kao kontrolni uzgoji poslužili su: bakterijski sojevi mutanta D345A i divljeg tipa *E.coli* nasađeni u M9 minimalni medij bez dodatka aminokiselina Ile, Leu i Val u prisutnosti 5 mol dm^{-3} Nva te M9 minimalni medij obogaćen aminokiselinama Ile, Leu i Val u kojeg nisu nasađene bakterijske stanice (detaljno prikazano u poglavlju 5.1).

4.2. Metode rada s proteinima

4.2.1. Priprema uzoraka ukupnih proteinskih ekstrakta za SDS-PAGE i Western blot analizu

Topivost mistranslatiranog proteina EF-Tu u citoplazmi bakterijskih stanica te razina njegove ekspresije u mistranslatirajućim uvjetima analizirana je metodom Western Blot. Praćena je njegova pojavnost u topivoj i netopivoj frakciji ukupnih staničnih proteina, izoliranih iz bakterijskih kultura mutanta D345A EF-Tu-C-His_6 i divljeg tipa Wt EF-Tu-C-His_6 *E. coli* uzgajanih u prisutnosti 0, 300 µmol dm^{-3} ili 1,5 mmol dm^{-3} Nva, kao što je opisano u poglavlju 4.1.2.

Tablica 4.1. Puferi korišteni za pripremu uzoraka ukupnih proteinskih ekstrakata za SDS-PAGE i Western blot analizu.

Pufer	Sastav pufera
Nativni pufer	50 mmol dm^{-3} Tris, pH = 8,0 150 mmol dm^{-3} NaCl
Pufer za denaturaciju	25 mmol dm^{-3} Tris, pH = 8,0 6 mol dm^{-3} urea 2 mol dm^{-3} tiourea
4 x SDS pufer za nanošenje uzoraka na gel	62,5 mmol dm^{-3} Tris, pH = 6,8 12,5 mmol dm^{-3} β-merkaptoetanol φ = 6,25 % glicerol 1,25 % (w/v) SDS 0,002 % (w/v) bromfenol plavo

Odmrznuti talozi bakterijskih stanica, pripremljeni iz 5 ili 20 mL bakterijskih kultura, razrijeđeni su i resuspendirani u nativnom puferu za izolaciju topivih proteina (Tablica 4.1) do jednake gustoće bakterijskih stanica svih uzoraka. Gustoća stanica normalizirana je prema vrijednosti OD_{600} izmjerenoj nakon 24 sata rasta. Za lizu stanica i oslobađanje proteina u otopinu korišteno je

enzimsko otvaranje stanica pomoću lizozima te postupak sonikacije. Prije soniciranja, u uzorke je dodana DNaza do masene koncentracije od 3 ng μL^{-1}, inhibitori proteaza *Complete (Roche)* i lizozim do masene koncentracije od 1 mg mL^{-1}. Kako bi se pospješila enzimska liza stanica, uzorci su inkubirani na ledu 30 minuta. Jednaki volumeni svakog uzorka prebačeni su u sterilne epruvete te je proveden postupak soniciranja (korišten je uređaj *High Intensity Ultrasonic Processor, Bioblock Scientific*). Ukoliko su uzorci pripremljeni iz 5 mL bakterijskih kultura sonicirani su u 3 navrata, dva puta po 30 sekundi i jednom po 15 sekundi. Uzorci pripremani iz 20 mL bakterijske kulture sonicirani su u 5 navrata u trajanju od jedne minute. Između svakog navrata soniciranja uzorci su inkubirani na ledu minimalno 1 minutu. Iz dobivenih staničnih lizata pripremljen je uzorak za elekroforezu (SDS uzorak) miješanjem uzorka lizata i 4 × SDS pufera za nanošenje uzoraka na gel (Tablica 4.1).

Stanični lizati su zatim centrifugirani 30 minuta pri 19 000 × g i 4 °C kako bi se topiva frakcija proteina odvojila od netopivih proteinskih agregata. Za netopivu frakciju proteina se očekuje da će prilikom centrifugiranja istaložiti zajedno s neotvorenim bakterijskim stanicama.

Uzorci supernatanta dekantirani su u čiste epruvete, a dobiveni talozi resuspendirani u puferu za denaturaciju agregiranih proteina (Tablica 4.1) u volumenu jednakom volumenu izdvojenog supernatanta. Time je omogućeno očuvanje pravilnog omjera netopivih proteina i početnog broja stanica. Iz dobivenih uzoraka supernatanta i resuspendiranih taloga također su pripremljeni SDS uzorci dodavanjem 4 × SDS pufera za nanošenje uzoraka.

4.2.2. Diskontinuirana SDS-poliakrilamidna gel-elektroforeza (SDS-PAGE)

Karakteristika elektroforetskih tehnika je razdvajanje čestica uzorka na temelju njihove različite pokretljivosti u električnom polju. U SDS-PAG elektroforetskoj tehnici dodaje se detergent natrij-dodecilsulfat (SDS), koji osigurava da se razlika u pokretljivosti temelji samo na veličini čestica tj. njihovoj molekulskoj masi (Laemmli, 1970).

Za razdvajanje proteina u pripremljenim SDS uzorcima korištena je metoda diskontinuirane SDS-poliakrilamidne elektroforeze koju čini sustav od dva dijela: gornjeg gela za sabijanje koji dovodi do akumuliranja molekula na granici dvaju gelova te donjeg gela za razdvajanje u kojem se molekule razdvajaju na temelju njihove veličine. Sastav korištenih gelova te postotak njihove umreženosti prikazan je u Tablici 4.2.

Tablica 4.2. Sastav poliakrilamidnih gelova korištenih za razdvajanje proteina metodom diskontinuirane SDS-poliakrilamidne gel-elektroforeze.

Tip poliakrilamidnog gela	Sastav poliakrilamidnog gela
Gel za sabijanje (4%)	4 % (v/v) akrilamid-bisakrilamid (29:1) 0,125 mol dm^{-3} Tris, pH = 6,8 0,1 % (w/v) SDS
Gel za razdvajanje (9%)	9 % (v/v) akrilamid-bisakrilamid (29:1) 0,375 mol dm^{-3} Tris, pH = 8,8 0,1 % (w/v) SDS
Gel za razdvajanje (15%)	15 % (v/v) akrilamid-bisakrilamid (29:1) 0,375 mol dm^{-3} Tris, pH = 8,8 0,1 % (w/v) SDS

Za izlijevanje SDS-poliakrilamidnih gelova i elektroforezu uzoraka korištena je aparatura za elektroforezu *Mini PROTEAN TETRA (Biorad)*. Polimerizacija poliakrilamidnih gelova potaknuta je dodavanjem amonijevog persulfata (APS-a) i *N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina* (TEMEDA-a) u pripremljenu smjesu netom prije njenog izlijevanja između elektroforetskih stakala. APS je dodan do masene koncentracije od 0,7 μg mL^{-1}, a TEMED do volumnog udjela od 0,05 % (v/v).

SDS uzorci su pripremljeni dodavanjem 4 × SDS pufera za nanošenje na gel sastava navedenog u Tablici 4.1. Denaturacija uzoraka je postignuta njihovom inkubacijom 5 min u termobloku pri temperaturi od 95 °C. Sam postupak elektroforeze se provodio na sobnoj temperaturi u SDS puferu sastava: 14,4 g dm^{-3} glicin, 3,03 g dm^{-3} Tris, 0,1 % (w/v) SDS, pH = 8,3, u trajanju od 15 minuta pri 120 V s ciljem sabijanja uzoraka, a zatim 45 min pri 180 V s ciljem razdvajanja proteina u uzorku. Uzorci su vizualizirani bojanjem gela u otopini boje *CBB R-250* koja se u kiseloj sredini elektrostatskim interakcijama veže za aminoskupine proteina (revijalno prikazano u Balen i sur, 2011). Korištena je otopina boje sastava: 2,5 g dm^{-3} *CBB R-250*, φ = 10 % octena kiselina, φ= 45 % etanol. Gel je bojan inkubiranjem u boji na tresilici 15 minuta, nakon čega je višak boje uklonjen kuhanjem gela u destiliranoj vodi, prethodno zagrijanoj do temperature vrenja.

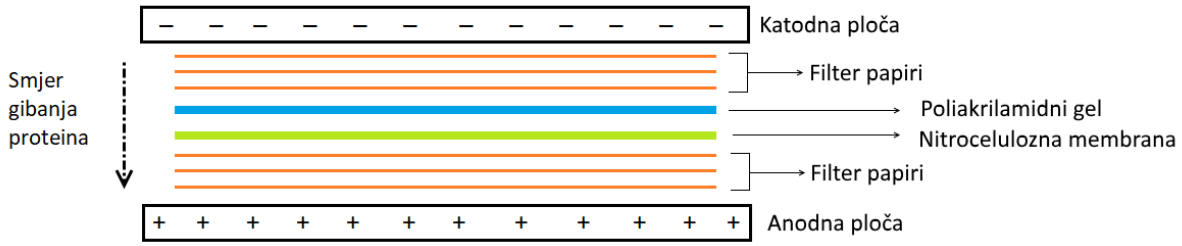
4.2.3. Western Blot analiza

Western blot je tehnika koja omogućuje detekciju specifičnih proteina. Karakterisitika ove tehnike je prijenos proteina, razdvojenih na poliakrilamidnom gelu, iz gela na površinu nekog tankog nosača kako bi bili dostupni za analize različitim protutijelima ili ligandima. Takve analize omogućuju izravne informacije o identitetu i funkcionalnim svojstvima razdvojenih proteina. Prijenos proteina iz gela na membranu postiže se primjenom električnog polja okomitog na ravninu gela. Primjenom napona negativno nabijeni proteini putuju prema anodi tj. iz gela prema membrani (revijalno prikazano u Balen i sur, 2011).

Tablica 4.3. Korišteni puferi i otopine za Western Blot analizu.

Otopine i puferi za WB	Sastav
Pufer za prijenos (Transfer pufer)	50 mmol dm^{-3} Tris, pH=7,5 380 mmol dm^{-3} glicin 0,1 % (w/v) SDS 20 % metanol
TBST pufer	20 mmol dm^{-3} Tris, pH=7,5 150 mmol dm^{-3} NaCl 1 % (v/v) Tween 20
Otopina za blokiranje s 3 % BSA	TBST pufer 3 % (w/v) BSA
Otopina za blokiranje s 5 % mlijekom u prahu	TBST pufer 5 % (w/v) nemasno mlijeko u prahu

U ovom diplomskom radu korišten je polusuhi prijenos (engl. *Semi-dry blotting*) proteina na nitroceluloznu membranu. Prijenos se odvija između dvije pločaste elektrode među kojima je složena konstrukcija tzv. „sendviča“ sastavljena od: filter papira namočenih u transfer pufer, gela - također prethodno namočenog u transfer pufer, nitrocelulozne membrane te još jednog sloja filter papira (Slika 4.1). Prije slaganja u konstrukciju sendviča nitrocelulozna membrana je prvo aktivirana kratkom inkubacijom u redestiliranoj vodi, a zatim je jednu minutu inkubirana u puferu za prijenos (Tablica 4.3).



Slika 4.1. Shematski prikaz „sendvič“ konstrukcije između dvije pločaste elektrode uređaja za polusuhi prijenos proteina iz poliakrilamidnog gela na nitrocelulozu membranu.

Nakon prijenosa proteina, membranu je potrebno isprati u TBST puferu (Tablica 4.3) kako bi se isprali ostatci pufera za prijenos. Ključni korak nakon prijenosa proteina na membranu je blokiranje, čime se spriječava nespecifično vezanje protutijela na memebranu. Kako bi se blokirala, membrana je inkubirana u prethodno profiltriranoj otopini za blokiranje s 3 % BSA (Tablica 4.3) minimalno sat vremena pri sobnoj temperaturi, uz stalno protresanje. Zatim je isprana u 3 navrata u trajanju od 10 minuta u TBST puferu, uz stalno protresanje. Za detekciju proteina EF-Tu korištena su primarna monoklonska anti-His_6 protutijela proizvedena u mišu (*Roche*), razrijeđena u omjeru 1 : 1000 u otopini za blokiranje s 3 % BSA. Membrana je inkubirana u primarnom protutijelu preko noći, uz stalno proteresanje pri temperaturi od 4 °C, nakon čega je ponovno je isprana u 3 navrata po 10 minuta u TBST puferu.

Nakon primarnog protutijela membrana je inkubirana sat vremena, na sobnoj temperaturi, u sekundarnom protutijelu (*Sigma-Aldrich*) razrijeđenom u omjeru 1 : 10000 u otopini za blokiranje s 5 % mlijekom u prahu (Tablica 4.3). Korišteno je sekundarno *anti-mouse* protutijelo u kompleksu s enzimom peroksidazom koji u reakciji s peroksidom omogućuje detekciju proteinskih vrpci. Membrana je dobro isprana od sekundarnog protutijela ispiranjem u tri navrata po 10 minuta u TBST puferu. Za detekciju proteinskih vrpci korišten je komercijalni komplet *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Kit.* Komplet se sastoji od: otopine A koja sadrži luminol i otopine peroksida (otopina B). Vizualizacija je postignuta namakanjem membrane 1 minutu u 0,5 mL smjese otopine A i B (otopine su pomiješane u omjeru 1 : 1). Membrana je ocijeđena te prislonjena na film za western-hibridizacijsku analizu *Fuji Medical X-ray Film (Fujifilm)* u tamnoj komori. Nakon određenog vremena ekspozicije, film je razvijen namakanjem 2 minute u otopini za razvijanje filmova (*Sigma*), potom 2 minute u redestiliranoj vodi i u konačnici 2 minute u fiksiru za razvijanje filmova (*Kodak*).

4.2.4. Pročišćavanje endogenog proteina EF-Tu s histidinskim privjeskom na C-kraju metodom afinitetne kromatografije

4.2.4.1. Priprema uzorka proteinskog ekstrakta za izolaciju endogenog proteina EF-Tu metodom afinitetne kromatografije

Pročišćavanje proteina EF-Tu provođeno je iz proteinskog ekstrakta izoliranog iz jedne do dvije litre bakterijske kulture mutanta D345A EF-Tu-C-His_6 uzgajane 24 sata u M9 minimalnom mediju obogaćenom aminokiselinama Ile, Leu i Val u prisutnosti 300 μmol dm^{-3} i 1,5 mmol dm^{-3} Nva ili bez Nva (detaljno prikazano u poglavlju 4.1.2).

Nakon uzgoja bakterijske stanice su oborene centrifugiranjem, a dobiveni talozi smrznuti na -80 °C. Odmrznuti talozi bakterijskih stanica resuspendirani su u puferu A (sastav pufera je naveden u Tablici 4.4). Prije razbijanja bakterijskih stanica sonikacijom, u staničnu suspenziju je dodana DNaza, inhibitori proteaza i lizozim do konačne masene koncentracije od 1 mg mL^{-1}. Nakon 30 minuta inkubacije na 4 °C, uzorci su sonicirani u 8 navrata po 1 minutu. Između svakog navrata soniciranja uzorci su inkubirani na ledu minimalno 1 minutu. Stanični lizat je odmah centrifugiran 40 minuta pri 19 000 × g i 4 °C. Supernatant je nakon centrifugiranja dekantiran u sterilnu epuvetu te je iz njega, u istom danu, proveden postupak izolacije endogenog proteina EF-Tu metodom afinitene kromatografije. Iz uzoraka supernatanta, taloga i lizata su također pripremljeni i SDS uzorci miješanjem s 4 × SDS puferom za nanošenje uzoraka (Tablica 4.1).

4.2.4.2. Afinitetna kromatografija na Ni-NTA agarozi

Afinitetna kromatografija je metoda izolacije proteina utemeljena na njihovoj reverzibilnoj interakciji sa specifičnim ligandom imobiliziranim na čestice kromatografskog punila (GE Healthcare Life Sciences Handbook).

U ovom diplomskom radu protein EF-Tu je izoliran iz ukupnog proteinskog ekstrakta afinitetnom kromatografijom na Ni^{2+}-NTA agarozi budući da posjeduje histidinski privjesak na C-kraju. Naime, reverzibilne interakcije između polihistidinskog privjeska i metalnog liganda Ni^{2+} vezanog na NTA-agarozu omogućuju zadržavanje obilježenog proteina na kromatografskoj koloni. Elucija željenog proteina postiže se ispiranjem puferom visoke koncentracije imidazola, budući da kompetitivnim vezanjem imidazola na ione Ni^{2+} dolazi do otpuštanja vezanog proteina.

U ovom eksperimentu korišteni su puferi A, B, C i D istog temeljnog sastava, ali različite koncentracije imidazola (Tablica 4.4)*. Rastuće koncentracije imidazola u puferima A - C omogućuju ispiranje nespecifično vezanih proteina s kolone, dok velika koncentracija imidazola u posljednjem ispiranju puferom D omogućuje eluciju željenog proteina s histidinskim privjeskom. Puferi (A, B, C i D) korišteni prilikom pročišćavanja sadrže GDP, budući da EF-Tu bez vezanog nukleotida ne zauzima pravilnu konformaciju (revijalno prikazano u Kavaliauskas i sur, 2012).

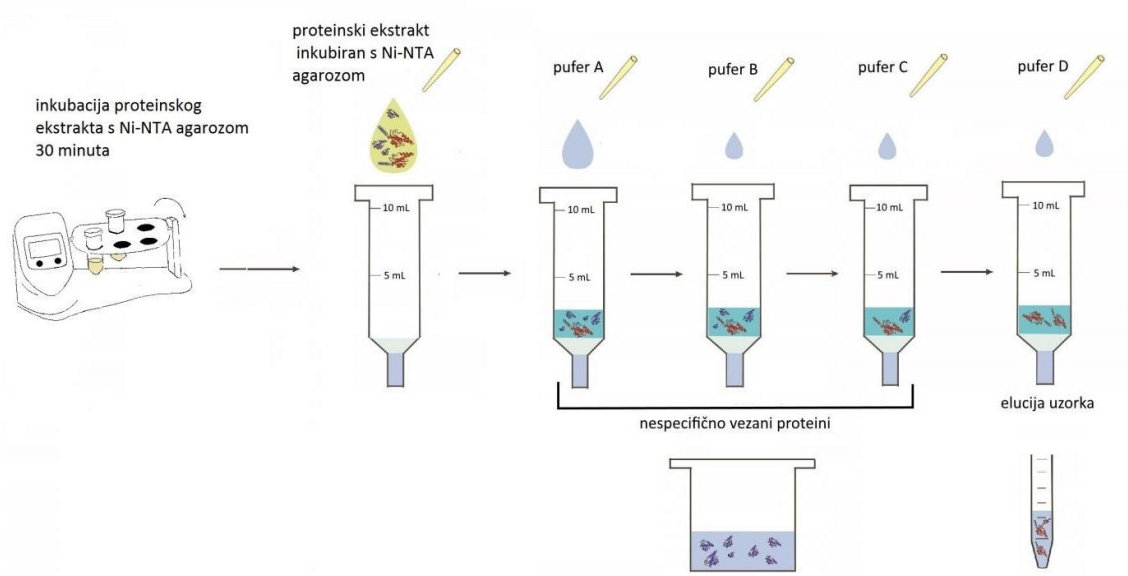
Tablica 4.4. Puferi korišteni za pročišćavanje proteina EF-Tu s histidinskim privjeskom na C-kraju, postupkom afinitetne kromatografije na Ni^{2+}-NTA agarozi i gel-filtracijskom kromatografijom.

Pufer	Sastav pufera
Pufer O	50 mmol dm^{-3} HEPES pH = 7,5 500 mmol dm^{-3} NaCl 10 mmol dm^{-3} $MgCl_2$ 5 mmol dm^{-3} β-merkaptoetanol 100 µmol dm^{-3} GDP
Pufer A	Pufer 0 10 mmol dm^{-3} imidazol
Pufer B	Pufer 0 20 mmol dm^{-3} imidazol
Pufer C	Pufer 0 30 mmol dm^{-3} imidazol
Pufer D	Pufer 0 200 mmol dm^{-3} imidazol
Pufer za gel-filtraciju	50 mmol dm^{-3} HEPES, pH=7,5 10 mmol dm^{-3} $MgCl_2$ 50 mmol dm^{-3} KCl 175 mmol dm^{-3} GDP 5 mmol dm^{-3} β- merkaptoetanol 2% (v/v) glicerol

Ni^{2+}-NTA agaroza (*Qiagen*) je prije postupka pročišćavanja isprana s 10 mL redestilirane vode i uravnotežena u 10 mL pufera A. Korišteno je 1 do 1,5 mL Ni-NTA agaroze, ovisno o broju bakterijskih stanica iz kojih se izolira protein od interesa.

**Postupak pročišćavanja proteina EF-Tu-C-His_6 uhodale su dr. sc. Nevena Cvetešić i dr. sc. Irena Akmačić.*

Ni-NTA agaroza prethodno uravnotežena u puferu A je dodana u uzorak supernatanta dobivenog iz 1 ili 2 litre bakterijskih kultura uzgajanim u mistranslatirajućim (1,5 mmol dm^{-3} ili 300 µmol dm^{-3} Nva) ili nemistranslatirajućim uvjetima (postupak opisan u prethodnom poglavlju). Kako bi se postiglo što bolje vezanje proteina s histidinskim privjeskom, supernatant je inkubiran s Ni^{2+}-NTA agarozom 30 minuta uz stalno miješanje na rotacijskoj miješalici pri 4 °C. Nakon inkubacije, Ni-NTA agaroza je zajedno sa supernatantom prebačena u stupac kolone. Frakcija dobivena propuštanjem pufera s nevezanim proteinima označena je kao FT (*flow-trough*). Kako bi se dodatno uklonili nevezani proteini kolona je isprana s 30 mL pufera A. Nespecifično vezani proteini uklonjeni su ispiranjem s 10 mL pufera B te potom s 10 mL pufera C. Elucija proteina EF-Tu postignuta je nanošenjem tri puta po 3 – 5 mL pufera D (postupak pročišćavanja proteina ilustriran je na Slici 4.2). Prvi volumen pufera D zadržan je na koloni zaustavljanjem protoka u trajanju od 3 minute. Time se postiglo bolje kompetitivno vezanje imidazola na ione nikla i otpuštanje proteina EF-Tu. Sljedeći obrok pufera D je na koloni zadržan jednu minutu, dok je treći obrok samo propušten kroz kolonu.

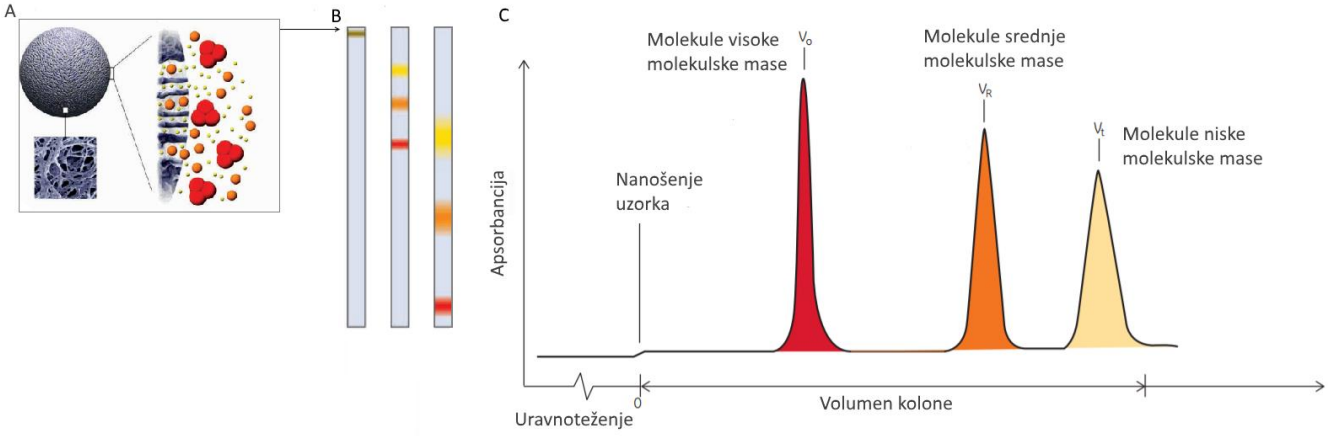


Slika 4.2. Shematski prikaz pročišćavanja proteina afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozi.

Postupak pročišćavanja proteina provođen je u hladnoj sobi pri 4 °C. Svi volumeni ispiranja puferima A, B i C te eluat puferom D, sakupljani su u čiste epruvete. Od njih, kao i od uzoraka supernatanta, lizata i agregirane frakcije proteina, pripremljeni su uzorci za SDS-PAGE analizu. Dobiveni uzorci analizirani su poliakrilamidnom gel elektroforezom kako bi se provjerilo koliko je željenog proteina izgubljeno u pojedinim ispiranjima te kakva je njegova čistoća u eluatu.

4.2.5. Gel-filtracijska kromatografija

Gel-filtracija je poseban tip razdjelne kromatografije kod koje se odjeljivanje temelji na različitoj veličini molekula. Stupac kolone napunjen je česticama inertne tvari koja sadrže pore. Propušta li se kroz stupac otopina koja sadrži makromolekule različitih dimenzija, molekule veće od pora prolazit će kroz prostor između čestica te ih materijal u stupcu neće usporiti. Međutim, molekule manje od pora ulaze u njih te se time usporava njihov izlazak s kolone (GE Healthcare Life Sciences Handbook) (Slika 4.3). Pokazano je da sterički učinak, iako ključan, nije jedni koji utječe na putovanje molekula kroz kolonu. Na njihovo gibanje također utječe oblik molekule tj. njen hidrodinamski radijus te naboj molekule koji dolazi do izražaja tek u slučaju visoko nabijenih malih molekula koje ne ulaze u pore gela iako su dovoljno male (GE Healthcare Life Sciences Handbook).



Slika 4.3. Odjeljivanje triju vrsta molekula različite veličine gel-filtracijskom kromatografijom. (A) Shematski prikaz porozne čestice gela te ulaska manjih molekula u njene pore. (B) Gibanje triju vrsta molekula niz kromatografsku kolonu: crvenom bojom naznačene su najveće molekule u uzorku, narančastom molekule srednje veličine, a žutom bojom najmanje molekule. (C) Prikaz kromatograma dobivenog nakon gel-filtracijske kromatografije. Boje korištene u ovom prikazu označavaju čestice jednake veličine kao i pod (B). Preuzeto i prilagođeno iz GE Healthcare Life Sciences Handbook.

Nakon afinitetne kromatografije izolirani protein EF-Tu je ukoncentriran i preveden u gel-filtracijski pufer čiji je sastav naveden u Tablici 4.4. Dobiveni uzorak je zatim dodatno je pročišćen i analiziran gel-filtracijskom kromatografijom na sustavu za tekućinsku kromatografiju visoke učinkovitosti *Äkta Purifier 10* (*GE Healthcare*). Gel-filtracijska kromatografija se provodila na koloni *Superdex 75 100/30 GL (GE Healthcare)*. Uzorci proteina EF-Tu su prije nanošenja na kolonu centrifugirani 5 minuta pri 5000 × g i 4 °C kako bi se izbjeglo nanošenje moguće prisutnih krutih nečistoća i proteinskih agregata koje bi mogle dovesti do oštećenja kolone. Silazak uzorka s kolone je

praćen spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 280 nm, a volumen sakupljanih frakcija iznosio je 0,5 mL. Njihova čistoća je dodatno provjerena na poliakrilamidnom gelu u prisutnosti SDS-a. Prema dobivenom kromatogramu i rezultatima SDS-PAG elekroforeze odabrane su frakcije za koje se očekuje da sadrže najveću količinu proteina EF-Tu. Te frakcije su sjedinjene i ukoncentrirane prema postupku opisanom u poglavlju 4.2.6.

4.2.6. Koncentriranje proteina ultrafiltracijom

Dobivene pročišćene uzorke proteina EF-Tu je nakon afinitetne i gel-filtracijske kromatografije bilo potrebno ukoncentrirati za daljnju biokemijsku karakterizaciju. Protein je ukoncentriran metodom ultrafiltracije koja se zasniva na filtraciji proteinskog uzorka kroz membranu koja sadrži pore određene veličine. Membrana pod utjecajem centrifugalne sile propušta sve čestice manje od dimenzije pora, dok čestice veće od dimenzija pora zaostaju na njenoj površini. Ultrafiltracija je provedena centrifugiranjem pri 5000 × g i 4 °C. Korišteni su centrikoni *Amicon® Ultra centrifugal filters (Milipore)* s porama kroz koje prolaze čestice manje od 30 ili 50 kDa.

Prilikom ukoncentriravanja proteina EF-Tu izoliranog afinitetnom kromatografijom, protein je odmah preveden u pufer koji je kasnije korišten za gel-filtracijsku kromatografiju (sastav je naveden u Tablici 4.4). Prevođenje u drugi pufer je omogućeno postepenim dodavanjem malog volumena gel-filtracijskog pufera kako se volumen uzorka tokom ultracentrifugiranja smanjivao. Ukoliko je riječ o uzorku proteina EF-Tu dobivenom nakon pročišćavanja afinitetnom kromatografijom, ukoncentriravanje se provodilo do volumena od 500 µL, a u slučaju dodatno pročišćenog uzorka nakon gel-filtracijske kromatografije ukoncentriravanje se provodilo do konačnog volumena od 250 µL.

4.2.7. Limitirana proteoliza tripsinom

Limitirana proteoliza tripsinom (engl. *limited proteolysis*) je metoda koja se temelji na na inkubaciji proteina s relativno malom koncentracijom proteaze u određenom vremenskom intervalu. Naime, proteaza cijepa protein na mjestima prepoznavanja koja se izlažu na njegovoj površini, poput petlji ili drugih fleksibilnih regija. Uzimanjem malog alikvota reakcijske smjese u određenim vremenskim točkama i njihovom analizom SDS-PAG elektroforezom dobiva se obrazac vrpci koje odgovaraju

stabilnim domenama proteina i koje su karakteristične za njegovu određenu konformaciju. Brzina proteolitičke razgradnje može se optimirati promjenom temperature na kojoj se odvija reakcija, sastavom pufera ili pak promjenom razrijeđenja proteaze.

Prilikom limitirane proteolize dodatno pročišćenog proteina EF-Tu korištena je proteaza tripsin (*New England Biolabs*) u razrijeđenju 1 : 200 u odnosu na koncentraciju proteina. Optimiranjem reakcije je utvrđeno da je pri tom razrijeđenju reakciju najbolje provoditi pri 24 °C u puferu u kojem je provedena gel-filtracijska kromatografija (sastav pufera naveden je u Tablici 4.4). Nakon pokretanja reakcije proteolize uzimani su alikvoti reakcijske smjese u minutama: 0 (prije dodavanja proteaze), 1, 5, 20, 40 i 60. Kako bi se proteolitička reakcija zaustavila, uzeti alikvoti su odmah pomiješani s 4 × SDS puferom za nanošenje uzorka i denaturirani kuhanjem 5 minuta pri 95 °C u termobloku.

4.2.8. Određivanje koncentracije proteina

4.2.8.1. Određivanje koncentracije proteina pomoću spektrofotometra NanoDrop 1000

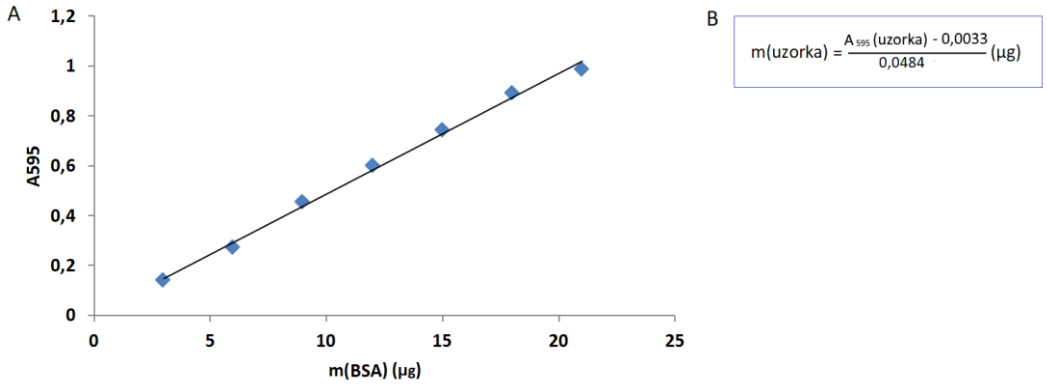
Koncentracija proteina mjerena je na spektrofotometru *NanoDrop 1000* pri valnoj duljini od 280 nm. Za mjerenje koncentracije potrebno je nanijeti 2 µL uzorka na postolje instrumenta te u program spektrofotometra unijeti molarni ekstinkcijski koeficijent i molekulsku masu ispitivanog proteina. Kao slijepa proba za nuliranje instrumenta koristi se pufer u kojem se nalazi protein. Rezultati mjerenja su apsorpcijski spektar i koncentracija uzorka proteina izražena u mg mL^{-1}, izračunata pomoću Beer-Lambertovog zakona prema kojem je apsorbancija uzorka jednaka umnošku molarnog ekstinkcijskog koeficijenta (ε), duljine puta koji svjetlost prelazi (l) i koncentracije uzorka ($A = \varepsilon \times l \times c$). Molarni ekstinkcijski koeficijent proteina EF-Tu iznosi 32900 M^{-1} cm^{-1}, dok je vrijednost molarne mase 43,3 kDa.

4.2.8.2. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

Koncentracija proteina mjerena je i metodom po Bradfordu koja se temelji na vezanju boje *Coomassie Brilliant Blue G-250* na proteine (Bradford, 1976). Slobodna boja postoji u više ionskih oblika, a anionski oblik (plavi) veže se na bazične aminokiselinske bočne ogranke lizina, arginina i

histidina te mu je maksimum apsorpcije pri valnoj duljini od 595 nm. Koncentracija proteina određuje se prema unaprijed pripremljenom baždarnom pravcu nekog referentnog standarda. U ovom diplomskom radu korištena je baždarna krivulja pripremljena mjerenjam apsorbancije seriji uzoraka koji sadrže rastuće i poznate koncentracije proteina BSA (*Sigma*). U grafičkom prikazu je na x-osi prikazana masa BSA, dok je y-osi prikazana apsorbancija uzorka BSA pri 595 nm (Slika 4.4). Prema dobivenoj jednadžbi pravca (Slika 4.4) moguće je unošenjem vrijednosti apsorbancije uzorka pri λ= 595 nm odrediti masu proteina u uzorku. Važno je napomenuti da je prije korištenja ove metode potrebno provjeriti njenu kompatibilnost sa sastavom pufera u kojem se nalazi proteinski uzorak. Naime, pojedini kemijski spojevi mogu na sebe vezati boju te tako dati pogrešnu informaciju o koncentraciji proteina u uzorku.

Korišten je 5 × Bradfordov reagens pripremljen u volumenu od 50 mL miješanjem: 25 mg boje *CBB* G-250, 12,5 mL metanola, 25 mL φ= 83 % H_3PO_4 te redestilirane vode do oznake. Prilikom mjerenja mase proteina, u kiveti je pomiješano 200 µL 5 × Bradfordovog reagensa, nekoliko mikrolitara uzorka proteina ili proteinskog ekstrakta te redestilirane vode do oznake od 1 mL. Na temelju baždarne krivulje i jednadžbe pravca (Slika 4.4) izmjerene vrijednosti apsorbancije uzoraka su preračunate u koncentracije.



Slika 4.4. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu. Pod (A) je prikazana korištena baždarna krivulja Bradfordovog reagensa, pripremljena mjerenjam apsorbancije pri λ= 595 nm seriji uzoraka koji sadrže rastuće i poznate koncentracije proteina BSA. (B) Jednadžba pravca prema kojoj je određivana nepoznata masa proteina uzorka.

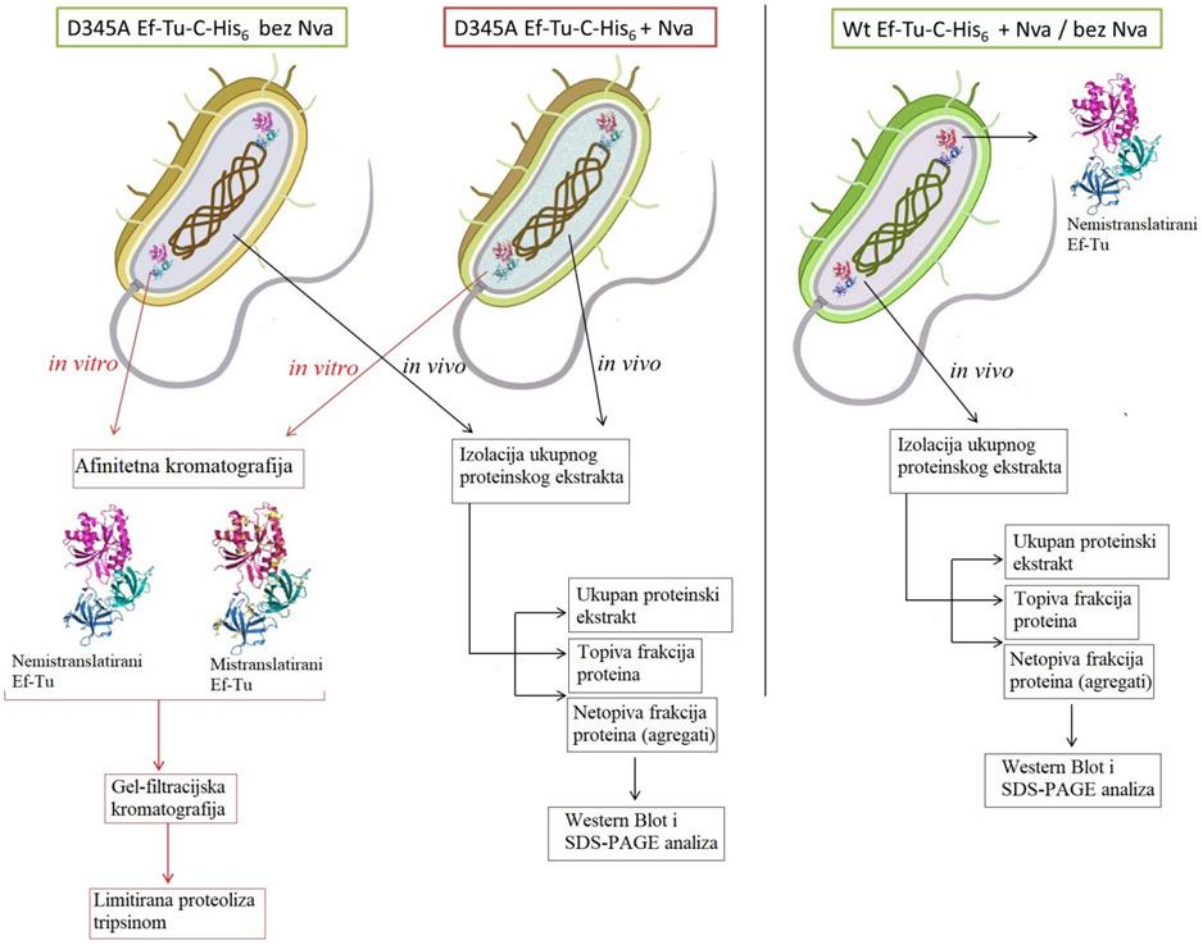
5. Rezultati

5.0. Eksperimentalni pristup dobivanju mistranslatiranog proteina EF-Tu E. coli u svrhu određivanja njegove stabilnosti u uvjetima in vivo i in vitro

Cilj ovog diplomskog rada je istražiti može li se toksičan učinak mistranslacijskog stresa na stanicu pratiti pomoću elongacijskog faktora Tu (EF-Tu) kao modelnog proteina. U tu svrhu korišten je bakterijski soj D345A EF-Tu-C-His_6 *E. coli* koji posjeduje inaktiviranu deacilacijsku domenu leucil-tRNA-sintetaze, što dovodi do povremene ugradnje norvalina umjesto leucina u proteine, u uvjetima povišene koncentracije Nva (Lincecum i sur, 2003; Cvetešić i sur, 2012). Uz inaktiviranu deacilacijsku domenu LeuRS, ovaj bakterijski soj sadrži i histidinski privjesak na C-kraju proteina EF-Tu, koji osigurava njegovu specifičnu detekciju te izolaciju iz ukupnog staničnog proteoma. Ranija istraživanja na soju D345A bakterije *E. coli* su pokazala da bakterijske stanice s norvaliranim proteomom imaju značajno smanjen stanični fitnes u aerobnim i mikroaerobnim uvjetima rasta (Cvetešić i sur, 2012; Cvetešić i sur, 2016). Smatra se da je smanjenje vijabilnosti posljedica nepravilnog smatanja i agregacije norvaliranih proteina (revijalno prikazano u Mohler i Ibba, 2017). Stoga se u ovom diplomskom radu, praćenjem proteina EF-Tu kao modelnog proteina, željela ustvrditi sklonost mistranslatiranih proteina agregaciji *in vivo* i *in vitro*.

Agregacija mistranslatiranog proteina EF-Tu u citoplazmi bakterijskih stanica analizirana je metodom Western Blot (poglavlje 5.3; Slike 5.6 i 5.7). Pri tome se pratila njegova pojavnost u topivoj i netopivoj frakciji ukupnih staničnih proteina, izoliranih iz bakterijskih kultura mutanta D345A EF-Tu-C-His_6 i divljeg tipa Wt EF-Tu-C-His_6 *E. coli* uzgajanih pri različitim koncentracijama norvalina dodanog u medij. Ovako dizajniranim eksperimentom ujedno je metodom Western Blot omogućeno praćenje razine ekspresije proteina EF-Tu u mistranslatirajućim i nemistranslatirajućim uvjetima (poglavlje 5.3; Slike 5.6 i 5.7).

Utjecaj mistranslacije na nativnu strukturu i stabilnost pročišćenog modelnog proteina EF-Tu biokemijski je analizirana metodama gel-filtracijske kromatografije (poglavlje 5.7; Slike 5.16 i 5.17) i limitirane proteolize tripsinom (poglavlje 5.8; Slike 5.18 i 5.19). Naime, gel-filtracijska analiza pružila je uvid u agregaciju i pravilnu konformaciju izoliranog mitranslatiranog proteina EF-Tu u uvjetima *in vitro*, dok se metodom limitirane proteolize tripsinom dobila informacija o stabilnosti njegovih domena. Rezultati ovih eksperimenata dali su odgovor na pitanje da li je protein EF-Tu dobar markerski protein za izučavanje mistranslacijskog stresa.



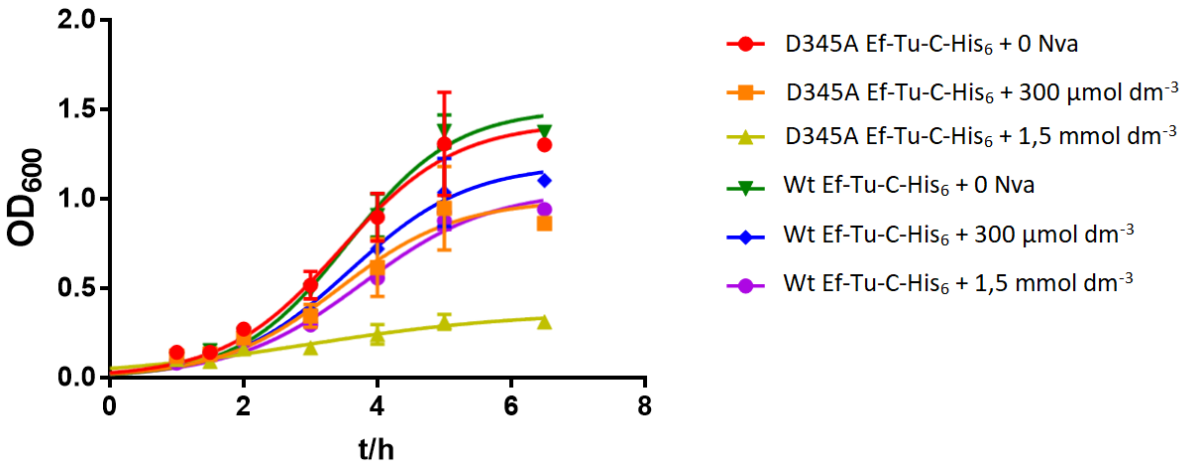
Slika 5.0. Shematski prikaz analize mistranslatiranog proteina EF-Tu iz bakterije *E. coli.* (*PDB ID*: 1B23). Norvalini u strukturi mistranslatiranog proteina EF-Tu su označeni žutom bojom.

5.1. Povišena koncentracija Nva značajno smanjuje vijabilnost bakterijskog soja D345A EF-Tu-C-His$_6$

U ovom diplomskom radu istraživan je učinak ugradnje neproteinogene aminokiseline norvalina na ekspresiju i stabilnost endogenog proteina EF-Tu iz bakterije *E. coli* u uvjetima *in vivo* i *in vitro*. Specifično praćenje proteina EF-Tu omogućeno je ugradnjom histidinskog privjeska na njegov C-kraj postupkom homologne rekombinacije*. Ugradnja Nva na mjesta kodirana za leucin postignuta je uzgojem bakterijskog soja D345A *E. coli*, koji posjeduje inaktiviranu deacilacijsku domenu LeuRS, u prisutnosti egzogeno dodanog Nva (Lincecum i sur, 2003; Cvetešić i sur, 2012). Naime, poznato je da LeuRS u sintetskom aktivnom mjestu loše diskriminira Leu od njemu strukturno sličnog Nva, zbog čega se evolucijski razvila deacilacijska domena koja sprječava akumulaciju Nva-tRNA^{Leu} produkta (Cvetešić i sur, 2012; Cvetešić i sur, 2014; Cvetešić i sur, 2016). Zamjenom Asp345 u Ala unutar CP1 deacilacijske domene LeuRS, onemogućuje se deacilacija produkta Nva-tRNA^{Leu}, što dovodi do povremene ugradnje Nva na leucinska mjesta (Cvetešić i sur, 2016) (detaljno prikazano u poglavlju 1.3.3). Prethodna istraživanja su pokazala da je vijabilnost soja D345A bakterije *E. coli* smanjena u slučaju povišene koncentracije Nva u citoplazmi, a izmjerna IC_{50} vrijednost[1] iznosi 300 µmol dm^{-3} (Cvetešić i sur, 2014).

Učinak povišene koncentracije Nva na rast bakterijskog soja D345A EF-Tu-C-His$_6$ *E. coli* provjeren je uzgojem u M9 minimalnom mediju u prisutnosti različitih koncentracija Nva (postupak opisan u poglavlju 4.1.2). Rast soja mutanta uspoređen je s rastom soja divljeg tipa, koji sadrži funkcionalnu deacilacijsku domenu LeuRS i histidinski privjesak na C-kraju proteina EF-Tu (Wt EF-Tu-C-His$_6$), u istim uvjetima. Spektofotometrijskim praćenjem rasta tekućih bakterijskih kultura pri λ= 600 nm u ovisnosti o vremenu, dobivene su krivulje rasta prikazane na Slici 5.1.

* [1]*Pripremu sojeva D345A EF-Tu-C-His$_6$* i Wt *EF-Tu-C-His$_6$ postupkom homologne rekombinacije te određivanje vrijednosti IC_{50} napravila je dr. sc. Nevena Cvetešić.*



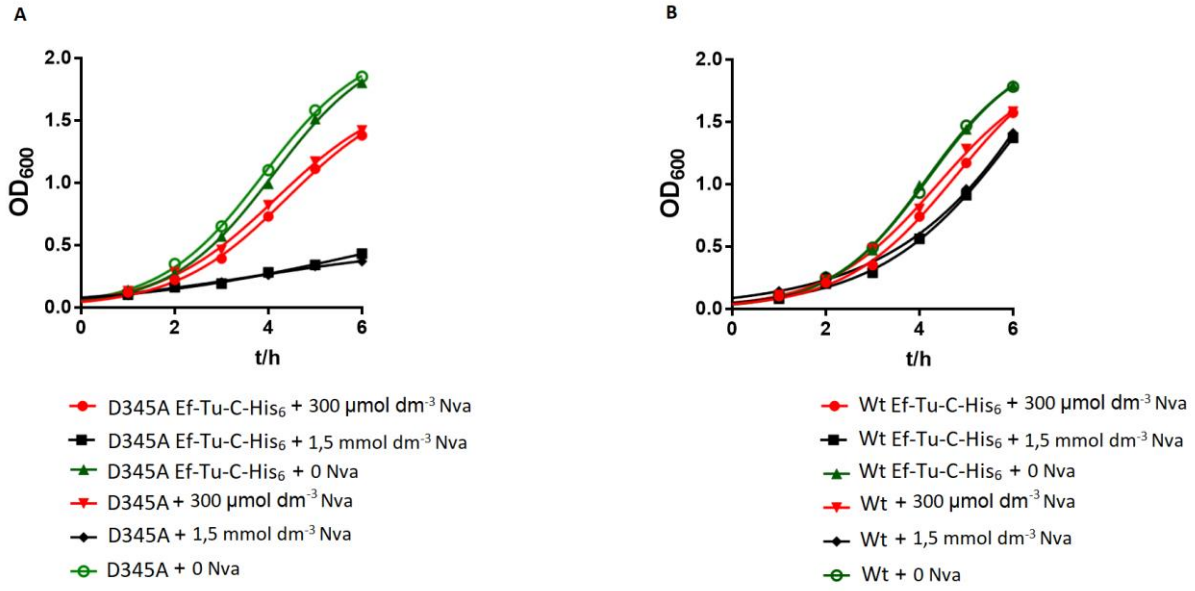
Slika 5.1. Krivulje rasta mutanta D345A EF-Tu-C-His_6 i divljeg tipa Wt EF-Tu-C-His_6 *E. coli* uzgajanih pri različitim koncentracijama Nva (0 , 300 µmol dm^{-3} i 1,5 mmol dm^{-3} Nva).

Krivulje rasta potvrđuju inhibitorni učinak Nva na rast mutanta D345A EF-Tu-C-His_6 *E.coli*, a vidljivo je i da inhibicija raste s povišenjem koncentracije Nva (Slika 5.1). Pri uzgoju mutanta u mediju koji sadrži 300 µmol dm^{-3} Nva uočen je blagi inhibitorni učinak na rast, dok je dodatkom 1,5 mmol dm^{-3} Nva njegov rast gotovo u potpunosti inhibiran. Ukoliko u medij nije dodan Nva, rast mutanta D345A EF-Tu-C-His_6 ne razlikuje se od rasta soja divljeg tipa Wt EF-Tu-C-His_6 (Slika 5.1). Krivulje rasta također prikazuju i blagi inhibitorni učinak Nva na Wt EF-Tu-C-His_6. No, utjecaj Nva na vijabilnost soja divljeg tipa značajno je manji od utjecaja na rast mutanta koji ne posjeduje aktivnu deacilacijsku domenu LeuRS, pa se Nva može ugraditi u novosintetizirane proteine (Lincecum i sur, 2003; Cvetešić i sur, 2012).

Prilikom uzgoja mutanta D345A EF-Tu-C-His_6 i divljeg tipa Wt EF-Tu-C-His_6 bilo je važno odabrati kontrolne uvjete eksperimenta. Naime, oba bakterijska soja ne sadrže niti jedan gen za otpornost na antibiotik (karakteristike sojeva navedene u poglavlju 3.8), koji bi osigurao selektivan uzgoj. Stoga je pri svakom eksperimentu bilo esencijalno provjeriti da nije došlo do zagađenja tekućeg hranjivog medija ili prekonoćne bakterijske kulture. Kao kontrola napravljeni su uzgoji mutanta D345A EF-Tu-C-His_6 i divljeg tipa Wt EF-Tu-C-His_6 u M9 mediju bez dodatka aminokiselina Ile, Leu i Val u prisutnosti 5 mmol dm^{-3} norvalina. U takvim uvjetima mutant ne bi trebao rasti (Biluš, 2016), a u slučaju divljeg tipa značajniji rast se očekuje tek nakon 24 sata. Drugačiji rezultat ukazao bi na moguću kontaminaciju drugom bakterijskom kulturom. Sterilnost samog M9 minimalnog medija također je provjeravana prilikom svakog uzgoja.

Kako bi potvrdili da histidinski privjesak na C-kraju proteina EF-Tu ne utječe na vijabilnost bakterijskih stanica, uspoređen je rast bakterijskih sojeva D345A i Wt *E. coli* koji sadrže dodan His_6

privjesak i onih koji nisu tretirani homolognom rekombinacijom (karakteristike sojeva navedene u poglavlju 3.8). Uzgoji su pripremljeni pri različitim koncentracijama norvalina, a dobivene krivulje rasta prikazane su na Slici 5.2.



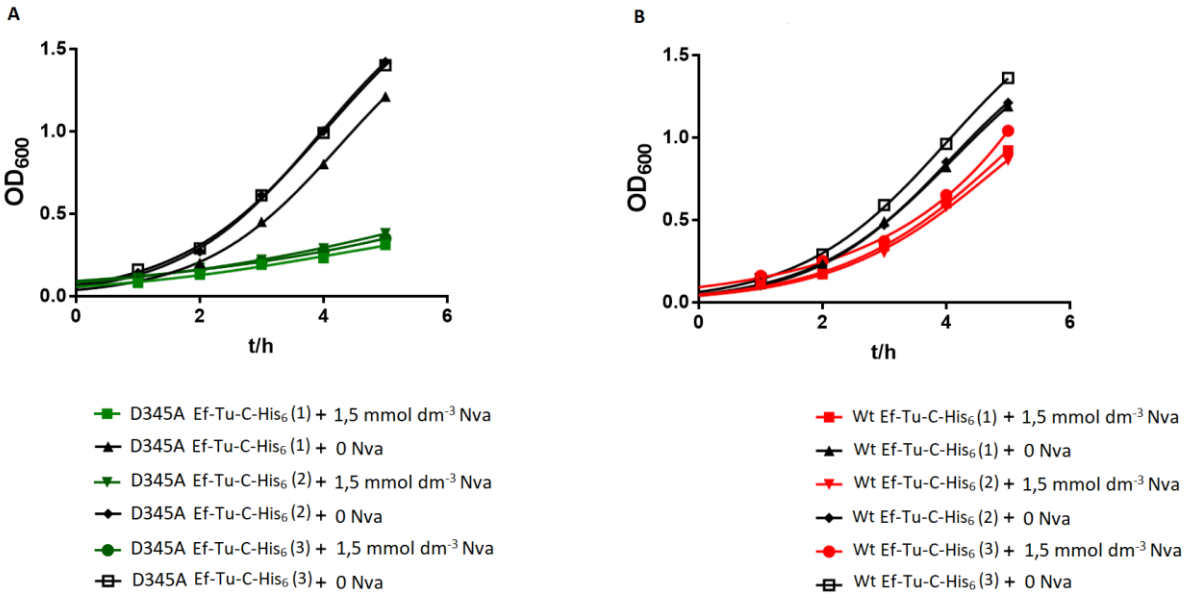
Slika 5.2. Krivulje rasta (A) mutanta D345A EF-Tu-C-His_6 i (B) divljeg tipa Wt EF-Tu-C-His_6 *E. coli* uzgajanih pri različitim koncentracijama Nva (0, 300 µmol dm^{-3} ili 1,5 mmol dm^{-3} norvalina). Rast bakterijskih kultura praćen je kroz 6 sati, pri čemu je njihov turbiditet izmjeren svakih sat vremena.

Preklapanje krivulja rasta sojeva mutanata D345A i D345A EF-Tu-C-His_6 (Slika 5.2, A) pri različitim koncentracijama norvalina ukazuje na jednak utjecaj Nva na njihovu vijabilnost. Naime, u oba slučaja primijećen je blagi učinak na rast u prisutnosti 300 µmol dm^{-3}, te gotovo potpuna inhibicija rasta u prisutnosti 1,5 mmol dm^{-3} Nva. Također, vidljivo je da različite koncentracije Nva imaju jednak utjecaj na rast soja Wt EF-Tu-C-His_6 te divljeg tipa *E. coli* (MG1655) (Slika 5.2, B). Prema tome, možemo zaključiti da histidinski privjesak na C-kraju proteina EF-Tu ne utječe na vijabilnost bakterijskih stanica te da je inhibitorni učinak na rast doista posljedica mistranslacijskog stresa izazvanog povišenom koncentracijom norvalina.

U konačnici je testirana biološka reproducibilnost dobivenih rezultata. Pri čemu je uspoređena vijabilnost i brzina rasta triju bioloških replika sojeva mutanta i divljeg tipa u prisutnosti i bez Nva. Biološke replike su zasebno pripremljene homolognom rekombinacijom kojom je u sojeve divljeg tipa (MG1655) ili mutanta D345A *E. coli* uveden histidinski privjesak na C-kraj proteina EF-Tu*.

** Postupke homologne rekombinacije kojima je u sojeve divljeg tipa E. coli i mutanta D345A E. coli uveden histidinski privjesak na C-kraj proteina EF-Tu provela je dr. sc. Nevena Cvetešić.*

Preklapanje krivulja rasta svih bioloških replika mutanta potvrđuje jednak inhibitorni učinak mistranslacije na njihovu vijabilnost (Slika 5.3, A). S druge strane, dodatak Nva nije značajno utjecao na rast niti jedne bakterijske kulture divljeg tipa (Slika 5.3, B).



Slika 5.3. Krivulje rasta (A) svih bioloških replika mutanta D345A EF-Tu-C-His_6 i (B) divljeg tipa Wt EF-Tu-C-His_6 *E. coli* uzgajanih u prisutnosti 1,5 mmol dm^{-3} i bez norvalina. Rast bakterijskih kultura praćen je 5 sati, pri čemu je njihov turbiditet izmjeren svakih sat vremena.

Rezultati ovih eksperimenata sugeriraju da inhibitorni učinak Nva na rast mutanta D345A EF-Tu-C-His_6 ima biološko značenje te da se javlja kao posljedica toksičnog učinka mistranslacije na stanicu. S obzirom da soj Wt EF-Tu-C-His_6 ima funkcionalnu domenu LeuRS te uspješno sprječava ugradnju Nva u proteine, inhibitorni efekt na njegov rast nije toliko značajan kao u slučaju mutanta.

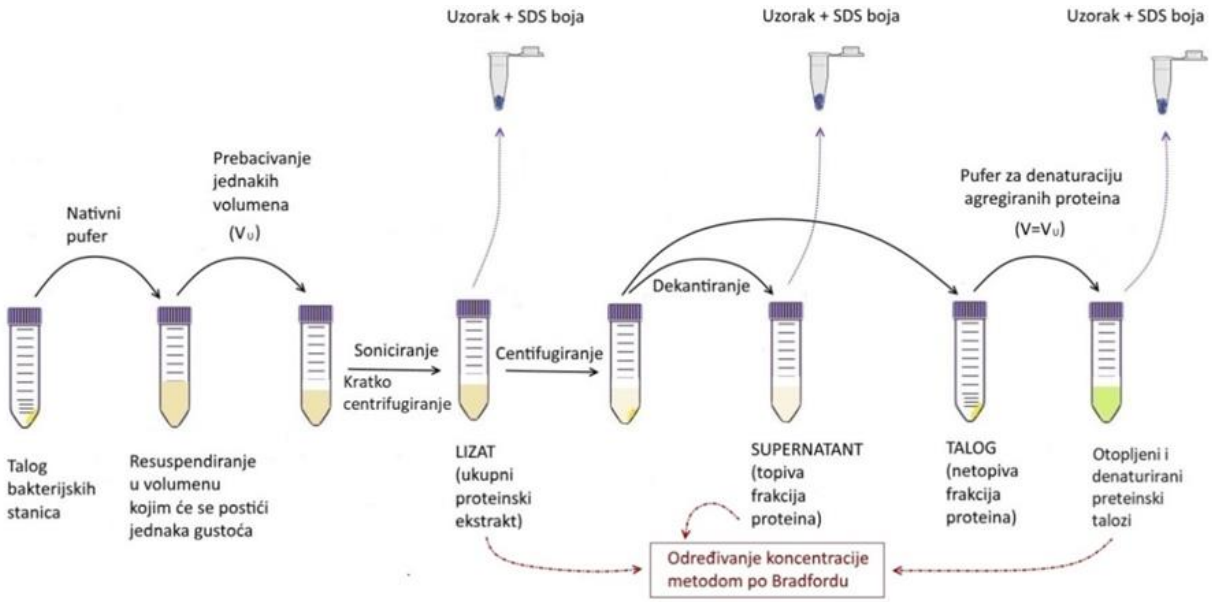
5.2. Optimizacija metode praćenja ekspresije i agregacije proteina EF-Tu u mistranslatirajućim uvjetima

Smatra se da je najvjerojatnija posljedica mistranslacije gubitak funkcije te agregiranje krivo smotanih proteina (Drummond i Wilke, 2009). Stoga je cilj ovog rada bio istražiti je li mistranslatirani protein EF-Tu također sklon agregaciji u bakterijskim stanicama. Kao što je navedeno i u prethodnom poglavlju, ugradnja norvalina na leucinske pozicije postignuta je uzgojem bakterijskog soja D345A *E.*

coli, koji posjeduje inaktiviranu deacilacijsku domenu LeuRS, u prisutnosti egzogeno dodanog norvalina (Lincecum i sur, 2003; Cvetešić i sur, 2012). Histidinski privjesak na C-kraju endogenog proteina EF-Tu omogućio je njegovu specifičnu detekciju anti-His_6 monoklonskim protutijelom metodom Western Blot-a. Kako bi se mogla usporediti topljivost endogenog EF-Tu u mistranslatirajućim uvjetima u odnosu na fiziološke, isti eksperimenti napravljeni su i sa Wt EF-Tu-C-His_6 sojem. Kao što je već navedeno u poglavlju 3.8, soj Wt EF-Tu-C-His_6 ima funkcionalnu deacilacijsku domenu LeuRS koja uspješno sprječava nakupljanje Nva-$tRNA^{Leu}$ i ugradnju Nva u proteine.

Agregacija proteina EF-Tu u mistranslatirajućim uvjetima, praćena je analizom topive i netopive frakcije ukupnih staničnih proteina. Uzorci proteinskog ekstrakta izolirani su iz bakterijskih kultura D345A EF-Tu-C-His_6 i Wt EF-Tu-C-His_6 uzgajanih u prisutnosti različitih koncentracija Nva (detaljno prikazano u poglavlju 4.2.1). Za Western Blot analizu nije bilo dostupno dodatno protutijelo koje bi poslužilo kao kontrola za nanošenje uzoraka (engl. *loading control*) i omogućilo provjeru uniformnosti nanošenja uzoraka na gel. Stoga se u svim eksperimentima na sljedeći način kontroliralo uniformno nanošenja uzoraka na gel: (1) na gel je uvijek nanesena jednaka masa proteina lizata svih uzoraka, pri čemu je njihova koncentracija izmjerena metodom po Bradfordu (detaljno prikazano u poglavlju 4.2.8.2); (2) prilikom svake Western Blot analize napravljena su dva gela s istim načinom nanošenja uzoraka. Jedan gel iskorišten je za bojanjem bojom *CBB*, a drugi za Western Blot.

Za Western Blot analizu topljivosti mistranslatiranog proteina EF-Tu, bilo je nužno prvo optimizirati postupak izolacije ukupnog proteinskog ekstrakta te pripreme uzoraka topive i netopive frakcije proteina. Naime, kako bi se istražilo postoji li povećana sklonost agregaciji u mistranslatirajućim uvjetima, potrebno je dobiti uzorke koji odražavaju stvaran omjer proteina EF-Tu u topivoj i netopivoj frakciji proteina. Optimiziran postupak pripreme uzoraka prikazan je na Slici 5.4.

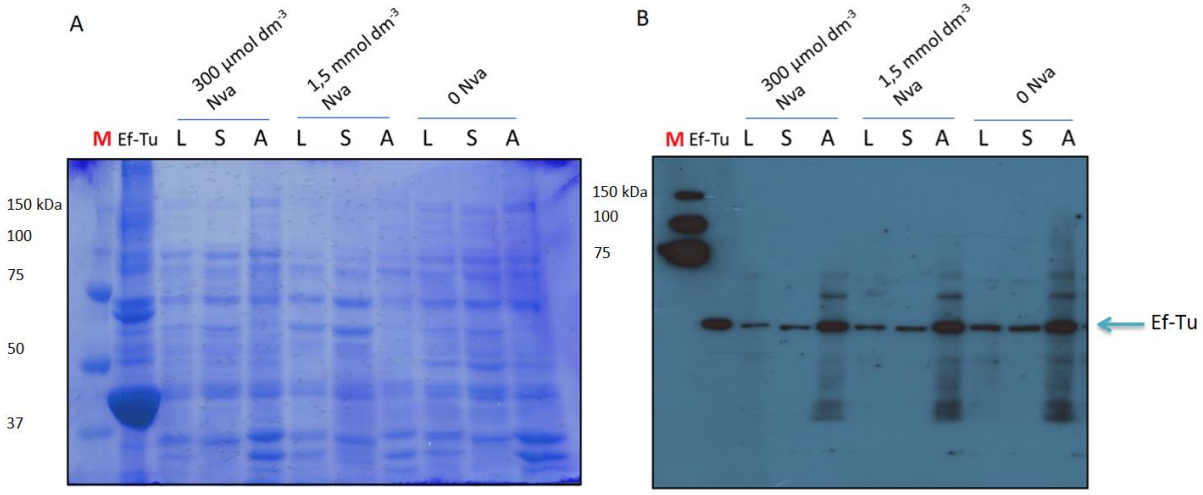


Slika 5.4. Shematski prikaz optimizirane metode dobivanja uzoraka lizata (ukupnog proteinskog ekstrakta), supernatanta (topive frakcije proteina) i taloga (netopljive frakcije proteina) za daljnju SDS-PAGE i Western Blot analizu.

Proteinski ekstrakti izolirani su iz jednakog broja bakterijskih stanica oborenih centrifugiranjem (Slika 5.4). Nakon otvaranja stanica enzimatskom lizom (lizozim) i soniciranjem, neotvorene bakterijske stanice uklonjene su centrifugiranjem. Dobivenom lizatu određena je koncentracija te je uzet alikvot uzorka za analizu SDS-PAG elektroforezom. Lizati su potom centrifugirani kako bi se razdvojila netopiva frakcija proteina i stanični ostatci (talog) od topivih proteina (supernatant). Dobiveni talog proteinskih agregata otopljen je u istom volumenu denaturirajućeg pufera u kojem je pripremljen i lizat bakterijskih stanica. Svim uzorcima izmjerena je koncentracija proteina metodom po Bradfordu, nakon čega su izdvojeni manji volumeni, od kojih su pripremljeni SDS uzorci (detaljno prikazano u poglavlju 4.2.2). Ovim postupkom očuvan je pravilan omjer netopive i topive frakcije proteina te dobiveni rezultati prikazani u slijedećem poglavlju odražavaju pravilan omjer proteina EF-Tu u topivoj i netopivoj proteinskoj frakciji.

Prilikom optimizacije ove metode isprobano je nekoliko postupaka pripreme uzoraka topive i netopive frakcije proteina, a rezultati jednog loše dizajniranog eksperimenta prikazani su na Slici 5.5. U ovom eksperimentu ukupni proteinski ekstrakt je izoliran iz soja Wt EF-Tu-C-His_6, uzgajanog pri različitim koncentracijama Nva. Uzorci lizata, topive i netopive frakcije proteina su pripremljeni iz jednakog broja bakterijskih stanica. Za razliku od konačnog optimiziranog postupka (Slika 5.4), u ovom je slučaju netopiva frakcija proteina otopljena u volumenu znatno manjem od volumena supernatanta, čime je pripremljen koncentriraniji uzorak proteinskih agregata. Također, na gel je nanesena jednaka masa proteina lizata, supernatanta i proteinskih agregata, izmjerena metodom po

Bradfordu. Ovako dizajniranim eksperimentom narušen je omjer proteina EF-Tu koji se nalazi u topivoj i netopivoj frakciji (Slika 5.5, A i B). Na Slici 5.5 pod A je jasno vidljivo da je količina ukupnih proteina u netopivoj frakciji znatno veća nego u lizatu koji bi trebao predstavljati zbroj ukupnih proteina prisutnih u topivoj i netopivoj frakciji. Također, prema rezultatima Western Blot analize prikazanim na Slici 5.5 pod B, vidljivo je da je količina proteina EF-Tu u netopivoj frakciji puno veća od njegove količine u uzorku lizata koji bi i u ovom slučaju trebao predstavljati ukupnu količinu proteina EF-Tu u bakterijskoj stanici (u topivoj i netopivoj frakciji zajedno).



Slika 5.5. Analiza uzoraka proteinskog ekstrakta izoliranih iz divljeg tipa Wt EF-Tu-C-His_6 *E. coli* uzgajanog pri različitim koncentracijama Nva (300 µmol dm^{-3} ili 1,5 mmol dm^{-3} norvalina) te bez norvalina, metodom (A) SDS-PAGE i (B) Western Blot. Na gel je nanesena jednaka masa (12 µg) proteina lizata, topive i netopive frakcije proteina. Ovim načinom nanošenja uzoraka nije očuvan stvarni omjer proteina EF-Tu u topivoj i netopivoj frakciji proteina. M - marker, EF-Tu – kontrolni uzorak proteina EF-Tu*, L - uzorak staničnog lizata, S - topiva frakcija proteina (supernatant), A - netopiva frakcija poteina (proteinski agregati).

**Pročišćavanje kontrolnog uzorka proteina EF-Tu napravila je dr. sc. Nevena Cvetešić.*

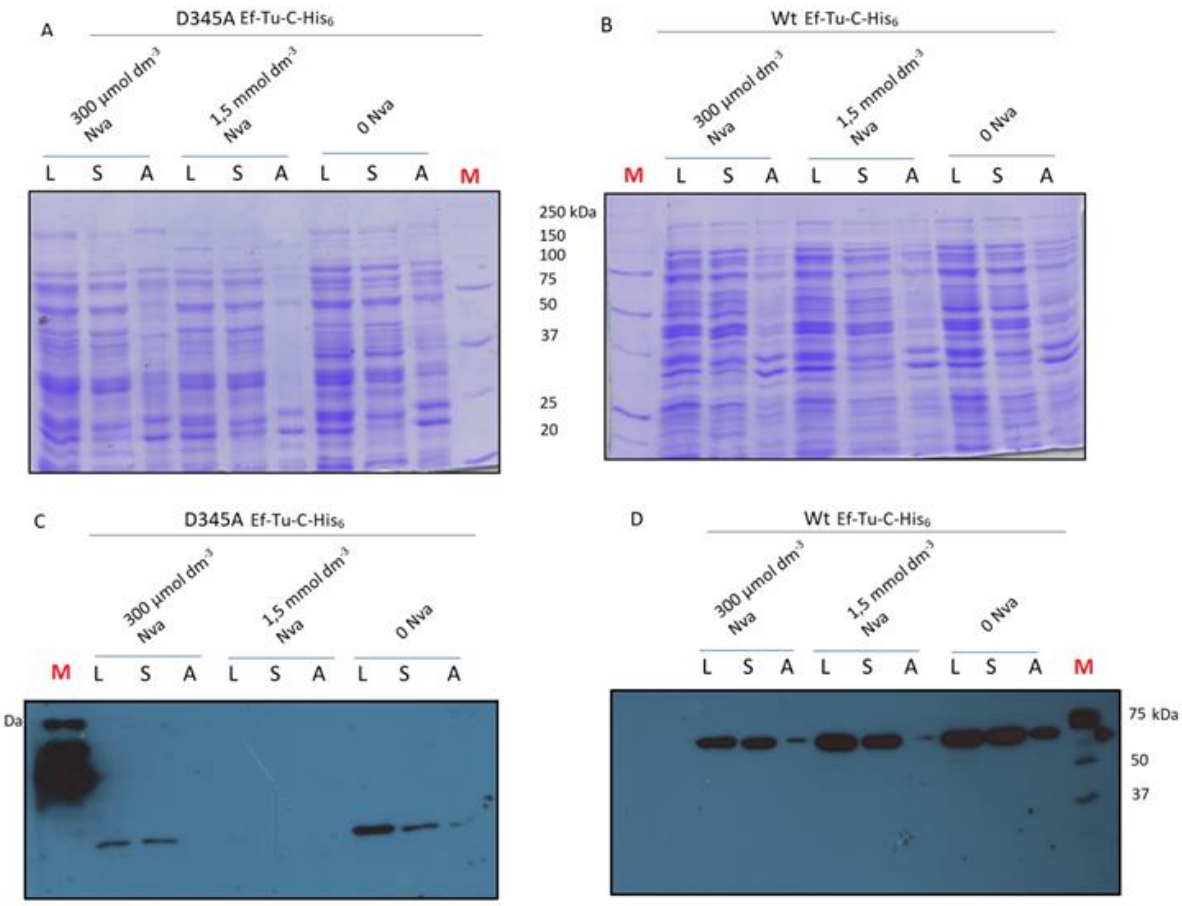
Tako dizajniranim eksperimentom narušen je omjer proteina EF-Tu prisutnog u topivoj i netopivoj frakciji proteina te ne može dati odgovor na pitanje koliko je eksprimiranog proteina EF-Tu završilo u proteinskim agregatima, a koliko je otopljeno u citoplazmi bakterijske stanice.

5.3. Mistranslatirajući uvjeti dovode do smanjene ekspresije proteina EF-TuB obilježenog histidinskim privjeskom

Uz analizu topljivosti endogenog proteina EF-Tu *in vivo,* Western blot metoda je ujedno omogućila usporedbu razlika u ekspresiji proteina EF-Tu u mistranslatirajućim i nemistranslatirajućim uvjetima.

Praćenje razine esencijalnog staničnog proteina kao što je EF-Tu, o kojem ovisi ukupna razina biosinteze proteina u stanici, može dati uvid u potencijalni biološki odgovor bakterijske stanice na mistranslacijski stres izazvan nepravilnim smatanjem i disfunkcionalnosti mistranslatiranih proteina. Budući da je histidinski privjesak homolognom rekombinacijom uveden na C-kraj proteina EF-Tu kojeg kodira gen *tufB*, razina ekspresije gena *tufA* koji kodira za EF-TuA nije moguće pratiti ovako dizajniranim eksperimentom.

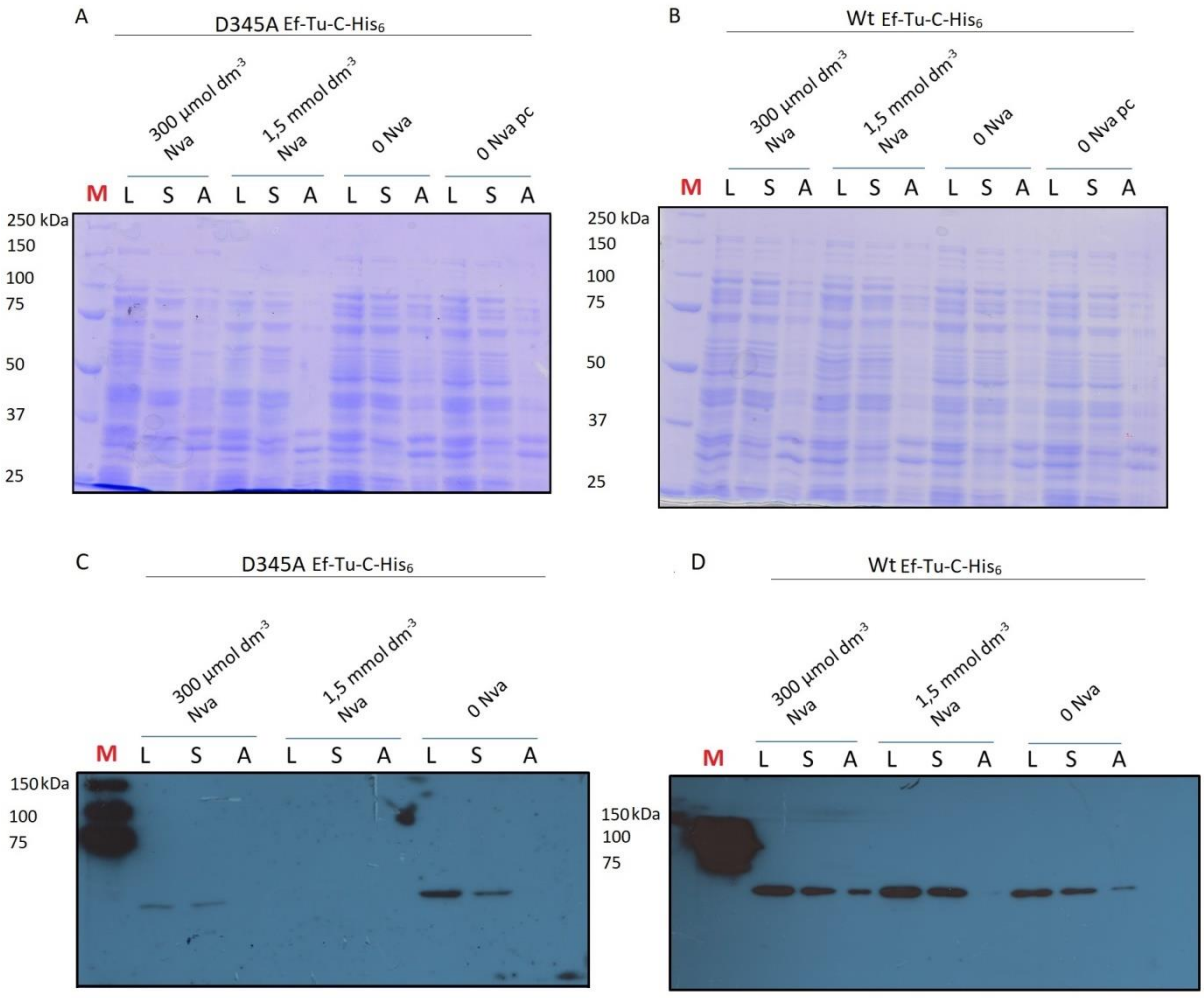
Rezultati Western Blot analize su pokazali da ne dolazi do značajnije agregacije proteina EF-Tu u mistranslatirajućim uvjetima (Slika 5.6, C) u odnosu na nemistranslatirajuće (Slika 5.6, D), budući da njegova količina u netopivoj frakciji proteina ne raste pri većim koncentracijama Nva. Zanimljivo je i da dolazi do smanjenja razine endogenog EF-Tu u mutantu D345A EF-Tu-C-His_6 ovisno o količini eksterno dodanog Nva (Slika 5.6, C). Naime, vidljivo je da se smanjenjem ukupne količine proteina EF-Tu, proporcionalno smanjuje i njegova razina u topivoj i netopivoj frakciji proteina (Slika 5.6, C). S druge strane, ako se razmatra jačina signala proteina EF-Tu u lizatu, supernatantu i talogu u slučaju divljeg tipa Wt EF-Tu-C-His_6, njihov omjer ostaje nepromijenjen pri svim koncentracijama Nva (Slika 5.6, D).



Slika 5.6. SDS-PAGE analiza uzoraka proteinskog ekstrakta izoliranih iz (A) mutanta D345A EF-Tu-C-His_6 i (B) divljeg tipa Wt EF-Tu-C-His_6 *E. coli* uzgajanih 24 sata u prisutnosti (300 µmol dm^{-3} ili 1,5 mmol dm^{-3} norvalina) te bez prisutnosti norvalina. Pod (C) je prikazana Western Blot analiza uzoraka mutanta D345A, a pod (D) divljeg tipa. M - marker, EF-Tu – kontrolni uzorak proteina EF-Tu, L - uzorak staničnog lizata, S - topiva frakcija proteina, A - netopiva frakcija poteina (proteinski agregati).

**Pročišćavanje kontrolnog uzorka proteina EF-Tu napravila je dr. sc. Nevena Cvetešić.*

Kako bi se provjerilo dolazi li do smanjenja razine proteina EF-Tu u mistranslatirajućim uvjetima samo u stacionarnoj fazi ili već i u eksponencijalnoj fazi rasta, eksperiment je ponovljen na uzorcima dobivenim iz bakterijskih kultura uzgajanih 6 sati, pri različitim koncentracijama norvalina. Rezultati prikazani na Slici 5.7 pod C potvrdili su da i u eksponencijalnoj fazi rasta mutanta D345A EF-Tu-C-His_6 dolazi do proporcionalnog opadanja razine proteina EF-Tu prisutnog u topivoj i netopivoj frakciji proteina, ovisno o količini dodanog Nva. S druge strane, u slučaju divljeg tipa razina ekspresije EF-Tu, pri svim koncentracijama Nva, ponovno je ostala nepromijenjena (Slika 5.7, D). Ni nakon 6 sati rasta mutanta D345A EF-Tu-C-His_6 u prisutnosti različitih koncentracija Nva nije primjećena nikakva povećana agregacija proteina EF-Tu *in vivo* (Slika 5.7, C).



Slika 5.7. SDS-PAGE analiza uzoraka proteinskog ekstrakta izoliranih iz (A) mutanta D345A EF-Tu-C-His_6 i (B) divljeg tipa Wt EF-Tu-C-His_6 *E. coli* uzgajanih 6 sati u prisutnosti (300 µmol dm^{-3} ili 1,5 mmol dm^{-3} norvalina) te bez prisutnosti norvalina. Pod (C) je prikazana Western Blot analiza uzoraka mutanta D345A, a pod (D) divljeg tipa. M - marker, EF-Tu – kontrolni uzorak proteina EF-Tu, L - uzorak staničnog lizata, S - topiva frakcija proteina, A - netopiva frakcija poteina (proteinski agregati).

**Pročišćavanje kontrolnog uzorka proteina EF-Tu napravila je dr. sc. Nevena Cvetešić.*

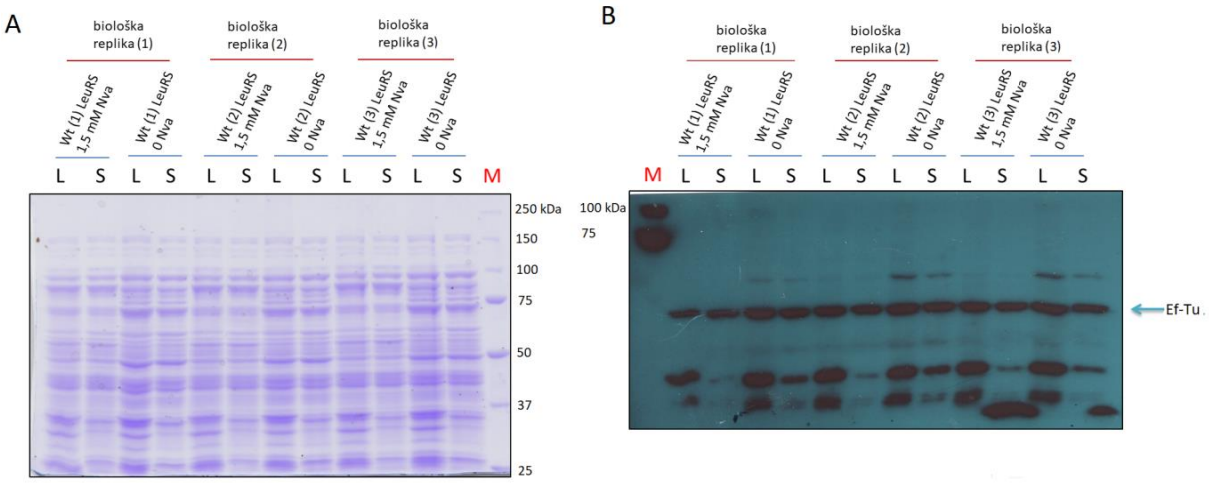
Rezultati SDS-PAGE analize obrasca ekspresije proteina u mutanta D345A uzgajanog 6 i 24 sata pri različitim koncentracijama norvalina bili su kompatibilni (Slike 5.6 i 5.7, A). Također, isti rezultati su dobiveni i prilikom SDS-PAGE analize proteinskih vrpci u slučaju divljeg tipa uzgajanog 6 i 24 sata u istim uvjetima (Slike 5.6 i 5.7, B). Budući da je pokazano da se duljim uzgojem mutanta u mistranslatirajućim uvjetima povećava i razina mistranslacije eksprimiranih proteina (Cvetešić i sur, 2016) za daljnu analizu uvijek je rađen uzgoj bakterijskih kultura u trajanju od 24 sata. Važno je napomenuti da je ovakva usporedba ekspresije proteina metodom SDS-PAGE neprecizna. Za

preciznije proučavanje razlike u ekspresiji proteina bilo bi nužno napraviti analizu uzoraka metodom spektrometrije masa.

5.4. Provjera reproducibilnosti rezultata Western Blot analize

Kako bi se potvrdilo da dobiveni Western Blot rezultati nisu posljedica kontaminacije ili pogreške nastale npr. prilikom postupka homologne rekombinacije, eksperiment je ponovljen na svim biološkim replikama bakterijskih sojeva mutanta D345A EF-Tu-C-His_6 i divljeg tipa Wt EF-Tu-C-His_6. Provjerene su tri biološke replike mutanta D345A i tri biološke replike divljeg tipa kojima je postupkom homologne rekombinacije* na C-kraj proteina EF-Tu umetnut histidinski privjesak.

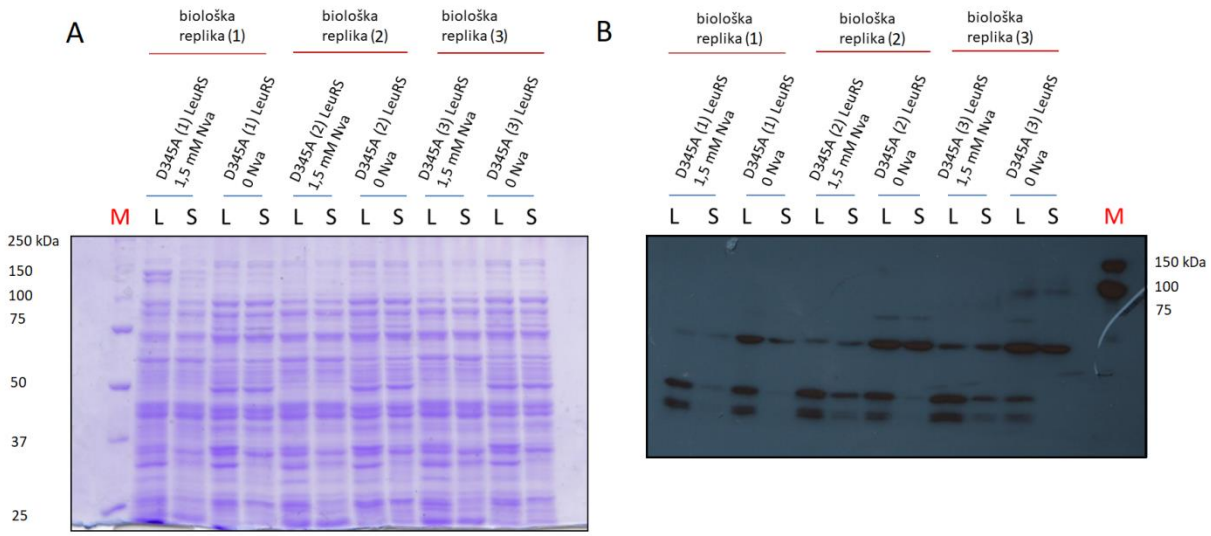
Rezultati prikazani na Slici 5.8 pod B doista potvrđuju da se u slučaju mutanta D345A EF-Tu-C-His_6 uzgajanog u prisutnosti norvalina smanjuje ukupna razina eksprimiranog proteina EF-Tu, dok je kod divljeg tipa u istim uvjetima njegova ekspresija nepromijenjena (Slika 5.9, B).



Slika 5.8. Analiza uzoraka proteinskog ekstrakta izoliranih iz svih bioloških replika divljeg tipa Wt EF-Tu-C-His_6 *E. coli* uzgajanih u prisutnosti 1,5 mmol dm^{-3} norvalina te bez norvalina, metodom (A) SDS-PAGE i (B) Western Blot. U jažicu označenu slovom M nanesen je marker. L - uzorak staničnog lizata, S - topiva frakcija proteina.

Na Slikama 5.8 i 5.9 pod B su također, osim proteina EF-Tu, vidljive i neke dodatne pruge nepoznatog identiteta. S obzirom da je njihov intenzitet prilično jednak u slučaju mutanta i divljeg tipa, smatra se da nije riječ o razgradnim produktima proteina EF-Tu, već o nespecifičnom vezanju protutijela.

** Postupke homologne rekombinacije provela je dr. sc. Nevena Cvetešić.*



Slika 5.9. Analiza uzoraka proteinskog ekstrakta izoliranih iz svih bioloških replika mutanta D345A EF-Tu-C-His_6 *E. coli* uzgajanih u prisutnosti 1,5 mmol dm^{-3} norvalina te bez norvalina, metodom (A) SDS-PAGE i (B) Western Blot. U jažicu označenu slovom M nanesen je marker. L - uzorak staničnog lizata, a S - topiva frakcija proteina.

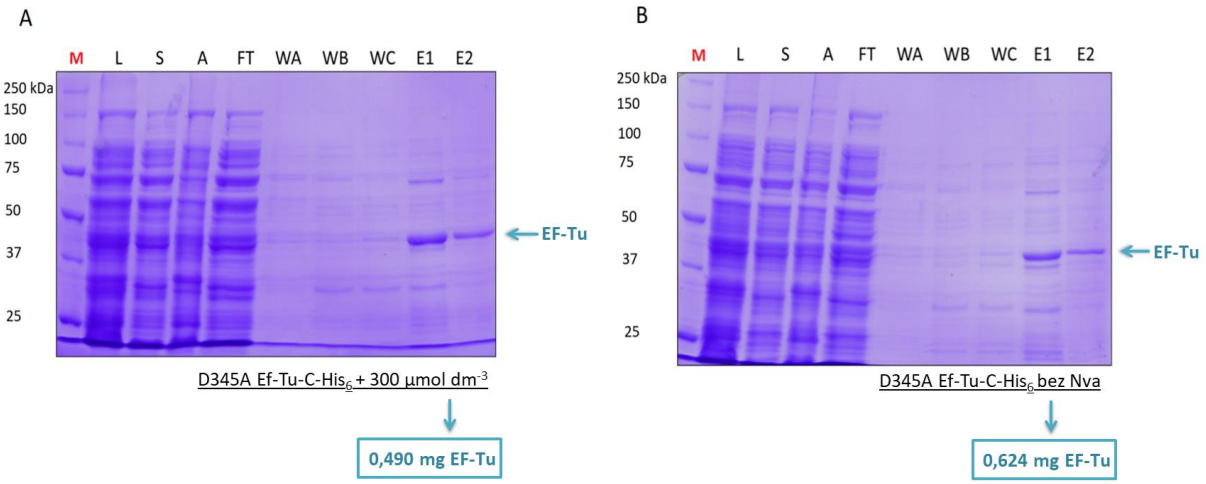
Transkriptomska istraživanja Zavoda za biokemiju provedena na bakterijskim stanicama D345A *E. coli* uzgajanih u mikroaerobnim uvjetima, u kojima prirodno dolazi do prirodnog nakupljanja Nva u citoplazmi, pokazala su smanjenu ekspresiju proteina koji sudjeluju u sintezi histidina (rezultati nisu objavljeni). Stoga je, kako bi se provjerilo da li su dobiveni Western Blot rezultati posljedica nemogućnosti bakterijskih stanica da sintetiziraju histidinski privjesak na C-kraju proteina EF-Tu, napravljen dodatan uzgoj mutanta u prisutnosti 1,5 mmol dm^{-3} Nva i 100 µmol dm^{-3} histidina. Ponovnom izolacijom ukupnih staničnih proteina i Western Blot analizom potvrđeno je smanjenje ekspresije proteina EF-Tu u mutanta D345A EF-Tu-C-His_6 uzgajanog u prisutnosti različitih koncentracija norvalina (rezultati nisu prikazani). Ovime je pokazano da bakterijske stanice nemaju problema sa sintezom histidinskog privjeska, te da su dobiveni rezultati doista posljedica smanjene ekspresije endogenog proteina EF-TuB prilikom uzgoja mutanta D345A u mistranslatirajućim uvjetima.

5.5. Pročišćavanje endogeno eksprimiranog proteina EF-Tu potvrđuje njegovu smanjenu ekspresiju u mistranslatirajućim uvjetima

U svrhu bolje usporedbe razine endogene ekspresije proteina EF-Tu u mistranslatirajućim i nemistranslatirajućim uvjetima napravljena je njegova izolacija afinitetnom kromatografijom iz bakterijskih kultura D345A EF-Tu-C-His_6. Uzgoj mutanta D345A EF-Tu-C-His_6 bez prisutnosti Nva ne

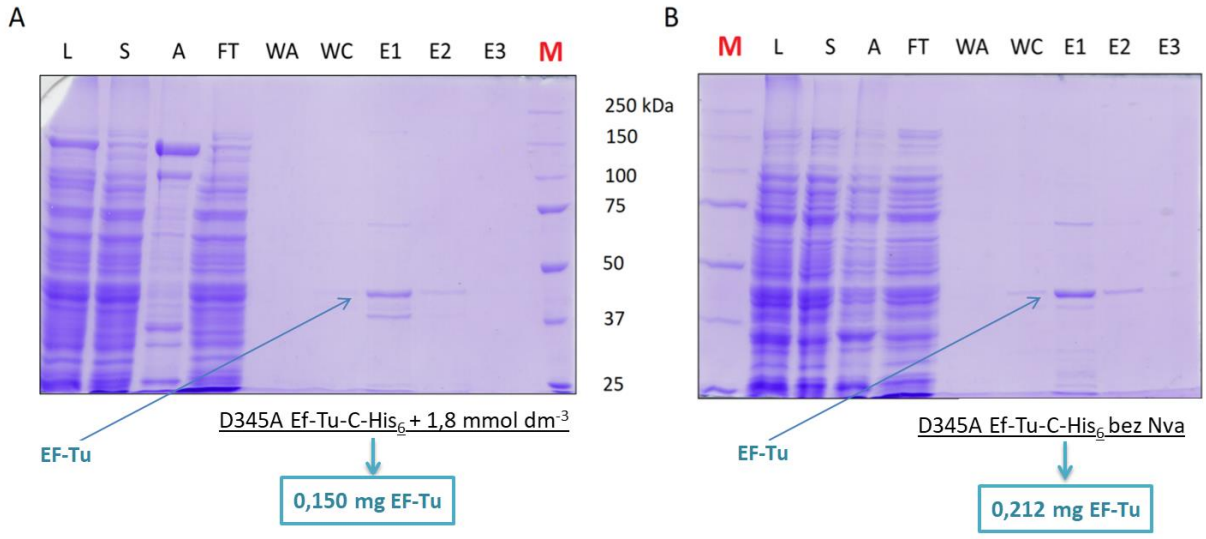
dovodi do mistranslacije proteina (Cvetešić i sur, 2012; Cvetešić i sur, 2016), budući da u aerobnim uvjetima ne dolazi do prirodnog nakupljanja norvalina (Soini i sur, 2008). Paralelna izolacija proteina EF-Tu iz jednakog broja bakterijskih stanica uzgajanih u prisutnosti 300 µmol dm^{-3} i bez Nva te 1,8 mmol dm^{-3} i bez Nva, omogućila je grubu usporedbu razine njegove ekspresije u mistranslatirajućim i nemistranslatirajućim uvjetima. Izolacija endogenog proteina EF-Tu afinitetnom kromatografijom provedena je prema postupku opisanom u poglavlju 4.2.2.

Koncentracija izoliranog proteina EF-Tu određena je metodom po Bradfordu. Na Slici 5.10 prikazana je SDS-PAGE analiza frakcija dobivenih prilikom paralelne izolacije proteina EF-Tu iz jednakog broja bakterijskih stanica mutanta D345A EF-Tu-C-His_6 uzgajanog u prisutnosti 300 µmol dm^{-3} te bez Nva. Izmjerene koncentracije ukazuju na veću razliku u količini izoliranog proteina, nego što je to vidljivo na slikama gela. Naime, iz bakterijske kulture uzgajane u prisutnosti 300 µmol dm^{-3} Nva izolirano je 490,0 µg proteina, a iz kulture uzgajane bez prisutnosti Nva 0,624 mg proteina EF-Tu. Na gelovima je vidljivo da dobiveni uzorci nisu posve čisti te da se u eluatima nalazi dosta proteinskih nečistoća. No, budući da je riječ o izolaciji endogenog proteina, a ne nadeksprimiranog, takav rezultat je u skladu s očekivanjima. Nedosljednosti u rezultatima SDS-PAGE analize i izmjerene koncentracije proteina metodom po Bradfordu mogu biti posljedica toga što elektoforeza u oba slučaja nije provođena jednako dugo ili postupak bojanja/odbojavanja gela nije bio identičan. Također, proteinske nečistoće u dobivenim uzorcima mogu dati krivu predodžbu o količini proteina EF-Tu prilikom mjerenja njegove koncentracije metodom po Bradfordu.



Slika 5.10. SDS-PAGE analiza frakcija dobivenih prilikom pročišćavanja proteina EF-Tu afinitetnom kromatografijom iz bakterijskih stanica mutanta D345A EF-Tu-C-His_6 *E. coli* uzgajanog u prisutnosti (A) 300 µmol dm^{-3} norvalina i (B) bez norvalina. Na gelu su redom prikazani uzorci: M - marker, L – lizat, S - supernatant, A - proteinski agregati, FT - ispiranje, WA - ispiranje puferom A, WB – ispiranje puferom B, WC - ispiranje puferom C, E1 - prvi volumen elucije puferom D, E2 - drugi volumen elucije puferom D. Protein EF-Tu označen je plavom strelicom. Ispod slika gela navedena je masa dobivenog proteina EF-Tu.

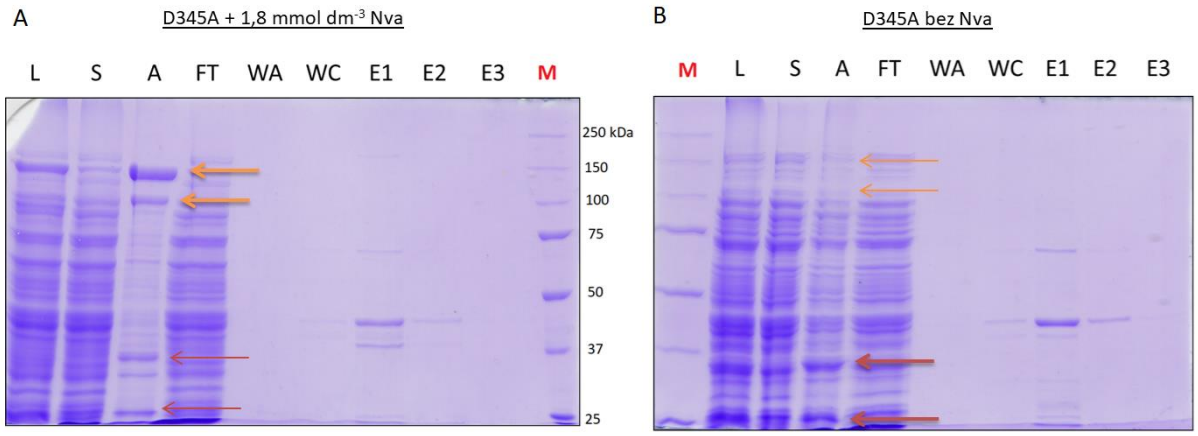
Rezultati paralelne izolacije proteina EF-Tu iz jednakog broja stanica mutanta D345A EF-Tu-C-His_6 uzgajanog u prisutnosti 1,8 mmol dm^{-3} i bez Nva prikazani su na Slici 5.11. Iz bakterijske kulture uzgajane u prisutnosti 1,8 mmol dm^{-3} Nva izolirano je 150,0 µg proteina, a iz kulture uzgajane bez prisutnosti Nva 0,212 mg proteina EF-Tu.



Slika 5.11. SDS-PAGE analiza frakcija dobivenih prilikom pročišćavanja proteina EF-Tu afinitetnom kromatografijom iz bakterijske kulture soja D345A EF-Tu-C-His_6 *E. coli* uzgajanog u prisutnosti (A) 1,8 mmol dm^{-3} norvalina i (B) bez norvalina. Na gelu su redom prikazani uzorci: M - marker, S - supernatant, A – proteinski agregati, FT - ispiranje, WA - ispiranje puferom A, WC - ispiranje puferom C, E1 - prvi volumen elucije puferom D, E2 - drugi volumen elucije puferom D, E3 - treći volumen elucije puferom D. Protein EF-Tu označen je plavom strelicom. Ispod slika gela navedena je masa dobivenog proteina EF-Tu.

U ovom slučaju je na SDS gelovima vidljiva puno veća razlika u količini izoliranog proteina EF-Tu, što je i za očekivati pošto rezultati Western Blot analize soja D345A (prikazani u poglavljima 5.3 i 5.4) pokazuju jako veliku razliku u količini proteina EF-Tu eksprimiranog u prisutnosti 1,5 mmol dm^{-3} Nva i bez Nva. Prilikom analize SDS gelova prikazanim na Slici 5.11 uočena je razlika u intenzitetu proteinskih vrpci između uzoraka agregata, izoliranog iz mutanta uzgajanog u prisutnosti 1,8 mmol dm^{-3} Nva te agregata iz mutanta uzgajanog bez Nva. Najočitije razlike istaknute su strelicama na Slici 5.12. Općenito su u agregiranim frakcijama prisutni isti proteini, no neki od njih se razlikuju po svojoj količini. Proteini koji su u netopivoj frakciji više prisutni u mistranslatirajućim uvjetima označeni su debljim narančastim strelicama (Slika 5.12, A), dok su proteini označeni debljim crvenim strelicama u većoj količini prisutni u nemistranslatirajućim uvjetima (Slika 5.12, B). Identitet označenih proteina nije poznat i nije utvrđen u vidu ovog diplomskog rada. Razlika između ta dva uzorka vidljiva je i u ekspresiji proteina u topivoj frakciji, ali je fokus rada bio na proteine netopive frakcije. Naime, pretpostavka je da su proteini prisutni u većoj količini u proteinskim agregatima u

mistranslatirajućim uvjetima osjetljiviji na ugradnju norvalina. Budući da je njihova ekspresija i dalje visoka u mistranslatirajućim uvjetima takvi bi proteini mogli poslužiti kao dobri modelni proteini za istraživanje utjecaja mistranslacije na stabilnost i smatanje proteina.



Slika 5.12. Razlike u obrascu proteinskih vrpci prisutnim u uzorcima proteinskih agregata izoliranim iz mutanta D345A EF-Tu-C-His_6 *E. coli* uzgajanog u prisutnosti (A) 1,8 mmol dm^{-3} norvalina i (B) bez norvalina. Proteinske vrpce koje su u netopivoj frakciji izoliranoj iz mistranslatiranog uzorka jačeg intenziteta označene su podebeljanim narančastim strelicama, dok su iste proteinske vrpce u nemistranlatiranom uzorku označene tankim narančastim strelicama. Proteinske vrpce jače eksprimirane u nemistranslatiranom uzorku označene su podebljanim crvenim strelicama, a ekvivalentne vrpce u mistranslatiranom uzorku tankim crvenim strelicama.

Ovim eksperimentima uhodana je metoda izolacije proteina EF-Tu afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozi te je ujedno potvrđena smanjena ekspresija proteina EF-TuB u mistranslatirajućim uvjetima.

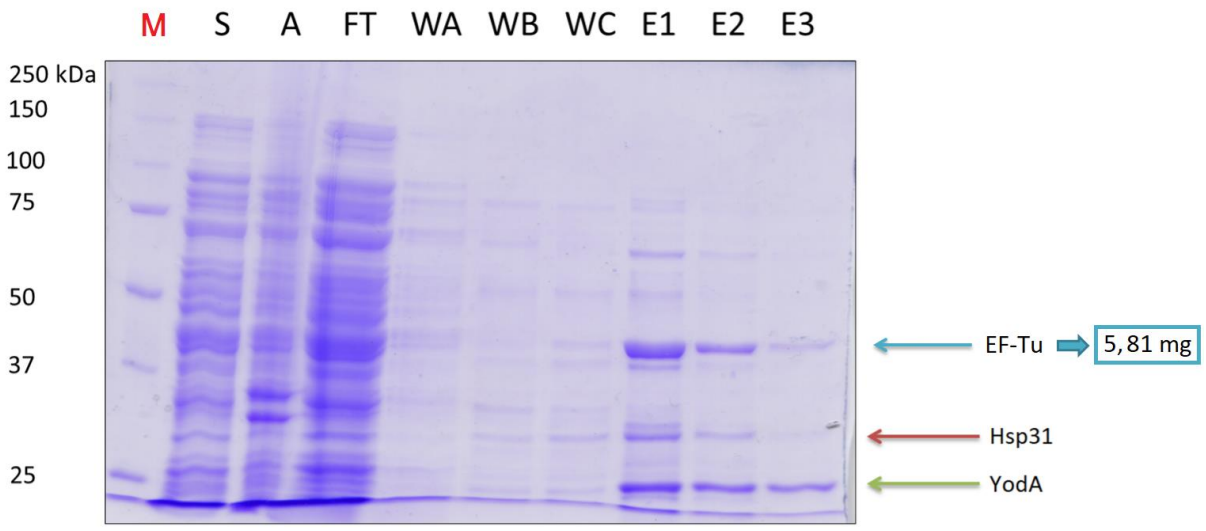
5.6. Preparativno pročišćavanje proteina EF-Tu afinitetnom kromatografijom

Zanimalo nas je okarakterizirati i mistranslatirani EF-Tu, kako bi se dobio uvid u njegova biokemijska svojstva i moguće razlike u stabilnosti i pravilnom smatanju u odnosu na nemistranslatirani. Biokemijska analiza bila je važan korak ovog istraživanja, kako bi se utvrdilo može li EF-Tu biti markerski protein kojim se mogu pratiti efekti mistranslacije u uvjetima *in vitro*. U svrhu biokemijske karakterizacije odabrane su metode gel-filtracijske kromatografije i limitirane proteolize tripsinom.

Protein je izoliran postupkom afinitetne kromatografije na Ni-NTA agarozi (postupak opisan u poglavlju 4.2.4), iz proteinskih ekstrakata bakterijskih kultura mutanta D345A EF-Tu-C-His_6, uzgajanog s ili bez dodanog Nva u M9 medij. Količina proteina EF-Tu u pojedinim frakcijama te njegova čistoća u finalnim eluatima, provjerena je SDS-PAGE analizom (Slike 5.13 i 5.14).

Na Slici 5.13 prikazana je analiza frakcija dobivenih prilikom izolacije endogenog proteina EF-Tu iz mutanta D345A EF-Tu-C-His_6 uzgajanog bez Nva. Najviše proteina EF-Tu nalazi se u eluatima 1 i 2, te su stoga te frakcije sjedinjene i ukoncentrirane. Mjerenjem koncentracije dobivenog uzorka, utvrđeno je da je iz 1 litre bakterijske kulture izolirano 5,81 mg proteina EF-Tu. Na gelu je također vidljiv značajni gubitak željenog proteina prilikom ispiranja kolone puferima A, B i C (na Slici 5.13 frakcije su označene WA, WB i WC). Također, primijećena je kopurifikacija neidentificiranih endogenih proteina molekulske mase ~25 i ~30 kDa (Slika 5.13, kopurificirani proteini označeni su zelenom i crvenom strelicom). S obzirom na prethodne rezultate analize spektrometrijom masa proteinskog ekstrakta iz mutanta D345A uzgajanog u mikroaerobnim uvjetima, koju je provela dr. sc. Nevena Cvetešić (rezultati nisu objavljeni), zaključeno je da bi se moglo raditi o proteinima YodA i Hsp31. YodA je metalovezujući protein veličine 22,3 kDa čija ekspresija raste u uvjetima stresa izazvanim povišenom razinom kadmija ili cinka (David i sur, 2003), dok je Hsp31 šaperon veličine 31,2 kDa, čija je uloga vezanje i pravilno smatanje proteina narušene strukture (Malki i sur, 2005).

Kopurifikacija proteina YodA je najvjerojatnije posljedica njegovog vezanja na ione nikla Ni-NTA agaroze. Pri tome se smanjuje broj slobodnih veznih mjesta Ni^{2+} za EF-Tu što ujedno pridonosi njegovom smanjenom prinosu prilikom izolacije afinitetnom kromatografijom.

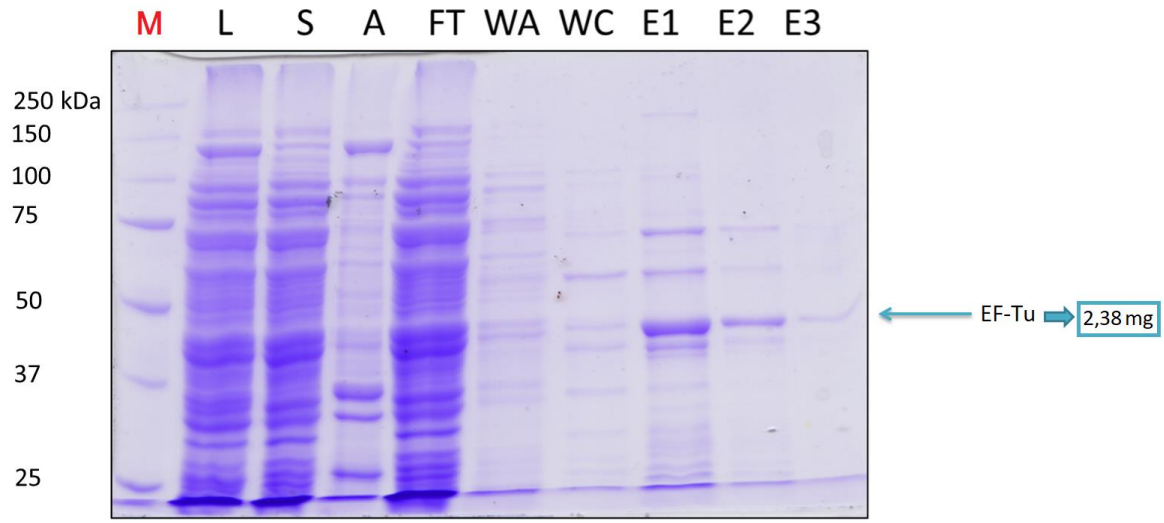


Slika 5.13. SDS-PAGE analiza pročišćavanja endogenog proteina EF-Tu afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozi. Izolacija proteina EF-Tu-C-His_6 provedena je na proteinskom ekstraktu izoliranom iz bakterijske kulture mutanta D345A EF-Tu-C-His_6 *E. coli* uzgajanog bez prisutnosti norvalina. Na gelu su redom prikazani uzorci: M -

marker, S - supernatant, A – proteinski agregati, FT - ispiranje, WA - ispiranje puferom A, WB - ispiranje puferom B, WC - ispiranje puferom C, E1 - prvi volumen elucije puferom D, E2 - drugi volumen elucije puferom D, E3 - treći volumen elucije puferom D. Strelicama su označeni proteini koji se u najvećoj mjeri kopurificiraju s proteinom EF-Tu. Crvenom strelicom označen je šaperon Hsp31, dok je zelenom strelicom označen protein YodA. Protein EF-Tu označen je plavom strelicom.

SDS-PAGE analiza eluata dobivenih prilikom izolacije proteina EF-Tu iz mutanta D345A EF-Tu-C-His_6 uzgajanog u mistranslatirajućim uvjetima prikazana je na Slici 5.14. Na gelu je vidljivo da je najviše proteina EF-Tu prisutno u eluatima 1 i 2, stoga su oni sjedinjeni i ukoncentrirani. U ovom je slučaju iz 2 litre bakterijske kulture izolirano 2,38 mg proteina EF-Tu.

Ponovno je primijećen djelomični gubitak željenog proteina prilikom ispiranja puferima A i C (na Slici 34 frakcije su označene WA i WC). Moguće je da navedene frakcije sadrže nepravilno smotani protein EF-Tu koji zbog neizlaganja histidinskog privjeska ima slabiji afinitet vezanja na Ni-NTA agarozu. Za razliku od izolacije nemistranslatiranog uzorka EF-Tu u ovom slučaju nije primijećena značajna kopurifikacija proteina YodA i Hsp31. No, primijećene su neke druge proteinske nečistoće koje se nisu javljale prilikom izolacije nemistranslatiranog proteina.



Slika 5.14. SDS-PAGE analiza pročišćavanja endogenog proteina EF-Tu afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozi. Izolacija proteina EF-Tu-C-His_6 provedena je na proteinskom ekstraktu izoliranom iz bakterijske kulture mutanta D345A EF-Tu-C-His_6 *E. coli* uzgajanog u prisutnosti 1,5 mmol dm^{-3} Nva. Na gelu su redom prikazani uzorci: M - marker, L – lizat, S - supernatant, A – proteinski agregati, FT - ispiranje, WA - ispiranje puferom A, WC - ispiranje puferom C, E1 - prvi volumen elucije puferom D, E2 - drugi volumen elucije puferom D, E3 - treći volumen elucije puferom D. Protein EF-Tu označen je plavom strelicom.

Masa proteina EF-Tu izoliranog iz bakterijske kulture mutanta uzgajanog u nemistranslatirajućim uvjetima (5,81 mg iz 1 L kulture) značajno je veća od mase proteina izolirane iz bakterijske kulture uzgajane u mistranslatirajućim uvjetima (2,38 mg iz 2 L kulture). Takvi odnosi količine proteina EF-Tu izoliranog iz mutanta uzgajanog u prisutnosti 1,5 mmol dm^{-3} i bez Nva su u skladu s rezultatima Western Blot analize prikazanim u poglavlju 5.3 (Slika 5.6). Prema tome, može se zaključiti da povišena razina norvalina u citoplazmi dovodi do smanjenja razine proteina EF-TuB. Budući da histidinskim privjeskom nije obilježen protein EF-Tu kodiran genom *tufA*, ostaje nepoznato kolika je ukupna ekspresija proteina EF-Tu.

Valja naglasiti da je dobiveni prinos proteina EF-Tu zadovoljavajuć, budući da je riječ o pročišćavanju endogenog, a ne nadeksprimiranog proteina. EF-Tu je najzastupljeniji protein u bakteriji *E. coli* te u fiziološkim uvjetima čini 5 – 10 % ukupnih staničnih poteina (Bosch i sur, 1983), stoga ni ne čudi da se može dobiti u velikoj količini endogenom ekspresijom.

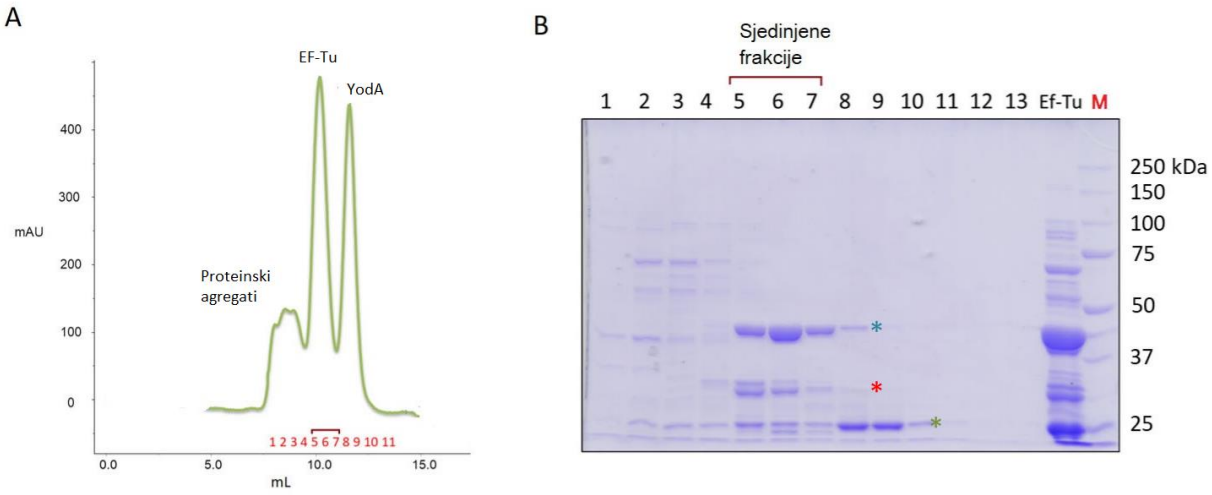
5.7. Mistranslatirani protein nije EF-Tu skloniji agregaciji

S obzirom da je Nva manji, manje hidrofoban od Leu i da ima bočni ogranak koji je ravnolančan, smatra se da bi zamjena leucina norvalinom mogla utjecati na pravilno smatanje proteina. Kako bi se provjerilo dovodi li mistranslacija proteina EF-Tu do njegove destabilizacije i povećane agregacije u uvjetima *in vitro* napravljena je gel-filtracijska analiza uzorka EF-Tu izoliranog iz mutanta D345A EF-Tu-C-His_6 uzgajanog u prisutnosti i bez Nva.

Gel-filtracijska kromatografija je tip razdjelne kromatografije u kojoj se razvajanje molekula temelji na njihovoj razlici u veličini i hidrodinamskom polumjeru (detaljno prikazano u poglavlju 4.2.5). Upravo je iz tog razloga ovom kromatografskom tehnikom moguće detektirati proteinske agregate i nepravilno smotane proteine te ih odvojiti od topive frakcije proteina. S obzirom da su proteinski agregati veliki i ne ulaze u pore kromatografskog punila oni će s kolone sići u praznom volumenu, dok će se ostali proteini uzorka odvojiti na temelju veličine. Ovakva analiza dat će uvid u sklonost mistranslatiranog proteina EF-Tu agregaciji. Gel-filtracijskom kromatografijom je ujedno dobiven dodatno pročišćeni uzorak proteina EF-Tu koji će se podvrgnuti analizi metodom limitirane razgradnje tripsinom.

Na Slici 5.15 prikazan je kromatogram i SDS-PAGE analiza frakcija dobivenih iz bakterijske kulture mutanta uzgajane bez prisutnosti norvalina. S obzirom na dobiveni gel i volumene kolone u

kojima se frakcije eluiraju (Slika 5.15, B), signali (engl. *peak*) kromatograma (Slika 5.15, A) su asignirani pojedinim proteinima. Budući da se prvi *peak* pojavio u praznom volumenu kolone, on odgovara agregiranoj frakciji proteina. Drugi, najveći *peak* odgovara proteinu EF-Tu (Mw= 43,3 kDa), a treći proteinu veličine ~25 kDa. Frakcije koje sadrže najviše proteina EF-Tu (Slika 5.15) su sjedinjene i ukoncentrirane. Masa dobivenog proteina EF-Tu iznosila je 760,0 µg.



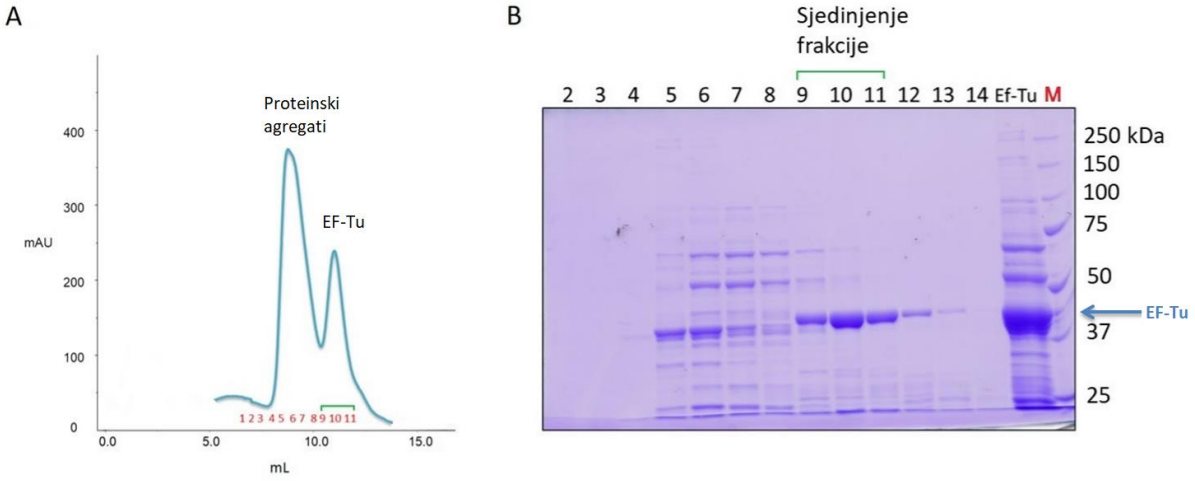
Slika 5.15. Kromatogram i SDS-PAGE analiza frakcija dobivenih gel-filtracijskom kromatografijom proteina EF-Tu. Analizirani uzorak je dobiven izolacijom proteina EF-Tu afinitetnom kromatografijom iz ukupnog proteinskog ekstrakta bakterijske kulture mutanta D345A EF-Tu-C-His_6 *E. coli* uzgajanog bez prisutnosti norvalina. Pod (A) prikazan je kromatogram. Na x-osi prikazane su apsorbancijske jedinice, a na Y-osi volumen pufera koji je sišao s kolone. Crvenim brojkama prikazane su sakupljane frakcije. Pod (B) je prikazana SDS-PAGE analiza sakupljanih frakcija (1-13) koje odgovaraju frakcijama prikazanim pod (A). U jažicu označenu s EF-Tu nanesen je uzorak proteina EF-Tu dobiven afinitetnom kromatografijom, a u jažicu označenu s M nanesen je marker. Označene frakcije 5, 6 i 7 su sjedinjene i ukoncentrirane. Plavom zvjezdicom označen je protein EF-Tu, crvenom Hsp31, a zelenom protein YodA.

Kao što je vidljivo na SDS gelu (Slika 5.15, B) nije dobiven potpuno čisti uzorak proteina EF-Tu, pri čemu su ponovno najizražajnije proteinske nečistoće veličine ~25 i ~30 kDa. Kao i u slučaju analize frakcija i eluata dobivenih afinitetnom kromatografijom (Slika 5.13) pretpostavlja se da je protein molekulske mase ~25 kDa protein YodA, a protein od ~30 kDa Hsp31. Budući da su EF-Tu i protein veličine ~30 kDa bliskih molekulskih masa postoji mogućnost da je njihovo razdvajanje nemoguće provesti na ovom tipu kolone. Kako bi se provjerilo da li je njihova kopurifikacija posljedica interakcije, trebalo bi provesti dvije zasebne gel-filtracije čistog uzorka EF-Tu i čistog uzorka Hsp31 na istom tipu kolone. Time bi se dobila informacija u kojem volumenu kolone se proteini eluiraju. Ukoliko se njihovi *peak*-ovi, nakon preklapanja kromatograma dobivenih prilikom zasebne gel-filtracije ne poklapaju, ali se poklapanje događa kad se u uzorku nalaze skupa, moglo bi se zaključiti

da je riječ o njihovoj interakciji. Da bi protein EF-Tu dobili u većoj čistoći i odvojili ga od proteina YodA i Hsp31 trebalo bi uvesti dodatan korak kromatografije npr. ionsku izmjenu.

Gel-filtracijski kromatogram i SDS-PAGE analiza frakcija dobivenih iz bakterijske kulture mutanta uzgajanog u prisutnosti norvalina prikazana je na Slici 5.16. Na kromatogramu (Slika 5.16, A) je u ovom slučaju vidljiv veći *peak* koji odgovara proteinskim agregatima, izašlim u praznom volumenu kolone. Drugi signal odgovara proteinu EF-Tu. U ovom slučaju nije uočena toliko značajna kopurifikacija proteina molekulske mase ~30 kDa i ~25 kDa (Slika 5.16, B), kao prilikom izolacije nemistranslatiranog proteina EF-Tu (Slika 5.15, B). SDS-PAGE analiza dobivenih frakcija je pokazala da se u frakcijama proteinskih agregata, nalaze uglavnom proteinske nečistoće, a ne protein EF-Tu. Također, u tim je frakcijama primijećen protein molekulske mase ~25 kDa. Naime, postoji mogućnost da je riječ o proteinu YodA, iako se to ne može sa sigurnošću tvrditi bez analize uzorka metodom spektrometrije masa.

Frakcije koje sadrže najviše proteina EF-Tu (Slika 5.16, B) su sjedinjene i ukoncentrirane. Prilikom ukoncentriravanja navedenih frakcija došlo je do pojave bijelog taloga. Brzo taloženje uzorka ukazuje na njegovu nestabilnost i sklonost agregaciji, a može biti posljedica: (a) prevelikog ukoncentriravanja; (b) smrzavanja uzorka na -80 °C nakon afinitetne kromatografije i (c) miješanja frakcije koje sadrži protein EF-Tu mistranslatiran u većoj mjeri i one koja sadrži manje mistranslatirani protein (nestabilniji proteini mogu potaknuti agregaciju proteina koji zasebno ne bi agregirali). Uzorak topivog proteina je odvojen od proteinskog taloga (agregata), pri čemu je agregirana frakcija ponovno otopljena u gel-filtracijskom puferu. Dobivena masa topivog proteina EF-Tu iznosila je 170 µg, dok masu ponovno otopljenog uzorka nije bilo moguće ustvrditi, budući da je prilikom svakog mjerenja koncentracija uvelike varirala. Uzorci su spremljeni za analizu proteolitičkom razgradnjom tripsinom (rezultati prikazani u poglavlju 5.8).



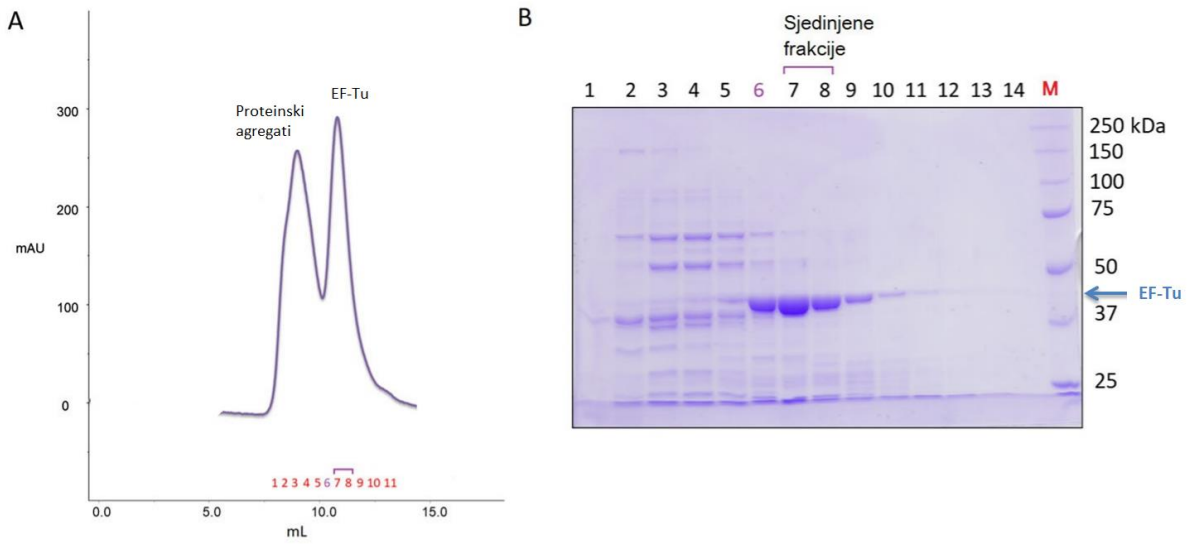
Slika 5.16. Kromatogram i SDS-PAGE analiza frakcija dobivenih gel-filtracijskom kromatografijom proteina EF-Tu. Analizirani uzorak je dobiven izolacijom proteina EF-Tu afinitetnom kromatografijom iz ukupnog

proteinskog ekstrakta bakterijske kulture mutanta D345A EF-Tu-C-His_6 *E. coli* uzgajanog u prisutnosti 1,5 mmol dm^{-3} Nva. Pod (A) prikazan je kromatogram. Na x-osi nalaze se apsorbancijske jedinice, a na Y-osi volumen pufera koji je sišao s kolone. Crvenim brojkama prikazane su sakupljane frakcije. Pod (B) je prikazana SDS-PAGE analiza sakupljanih frakcija (1-13) koje odgovaraju sakupljanim frakcijama prikazanim pod (A). U jažicu označenu s EF-Tu nanesen je uzorak proteina EF-Tu dobiven afinitetnom kromatografijom, a u jažicu označenu s M marker. Označene frakcije 9, 10 i 11 su sjedinjenje i ukoncentrirane.

S obzirom da se na istaloženom uzorku mistranslatiranog proteina EF-Tu ne može provesti kvalitetna analiza limitiranom proteolizom tripsinom, bilo je potrebno ponoviti njegovu izolaciju i spriječiti taloženje. U drugom je slučaju nakon afinitetne kromatografije uzorak pohranjen na 4 °C, čime se nastojala izbjeći njegova dodatna destabilizacija smrzavanjem. Na dobivenom uzorku je sljedeći dan odmah provedena gel-filtracijska kromatografija, a kromatogram i SDS-PAGE analiza sakupljenih frakcija prikazana je na Slici 5.17.

Analizom gela i kromatograma uzorka nemistranslatiranog EF-Tu (Slika 5.15) utvrđeno je da je agregiranih proteina manje nego kod izolacije mistranslatiranog EF-Tu (Slike 5.16 i 5.17). Frakcije u kojima se nalaze proteinski agregati sadrže različite stanične proteine te ni u jednom slučaju nije vidljiva veća količina proteina EF-Tu.

Primijećeno je da se prilikom druge gel-filtracijske analize (Slika 5.17, A) početak signala koji odgovara proteinu EF-Tu, djelomično preklapa sa signalom koji odgovara agregiranoj frakciji proteina. Budući da postoji vjerojatnost da se upravo u toj frakciji proteina EF-Tu (označenoj brojkom 6 na Slici 5.17) nalazi mistranslatiraniji protein, skloniji agregaciji, ta je frakcija zasebno ukoncentrirana i analizirana (poglavlje 5.8, Slika 5.19, A). Dok su preostale dvije frakcije, koje sadrže najveću količinu čistog EF-Tu (označene kao frakcije 7 i 8), sjedinjene i analizirane posebno (poglavlje 5.8, Slika 5.19, B). Masa dobivenog proteina u frakciji 6 iznosila je 120,0 μg, a u sjedinjenim frakcijama 7 i 8 bila je 208,0 μg. Proteolitička razgradnja tripsinom provedena je na oba uzorka isti dan.



Slika 5.17. Kromatogram i SDS-PAGE analiza frakcija dobivenih gel-filtracijskom kromatografijom proteina EF-Tu. Analizirani uzorak je dobiven izolacijom proteina EF-Tu afinitetnom kromatografijom iz ukupnog proteinskog ekstrakta bakterijske kulture mutanta D345A EF-Tu-C-His_6 *E. coli* uzgajanog u prisutnosti 1,5 mmol dm^{-3} Nva. Pod (A) je prikazan kromatogram. Na x-osi nalaze se apsorbancijske jedinice, a na Y-osi volumen pufera koji je sišao s kolone. Crvenim brojkama prikazane su sakupljane frakcije. Pod (B) je prikazana SDS-PAGE analiza sakupljanih frakcija (1-14) koje odgovaraju frakcijama prikazanim pod (A). U jažicu označenu s M nanesen je marker. Ljubičastom linijom označene su frakcije 7 i 8 koje su sjedinjene i ukoncentrirane. Frakcija 6 je ukoncentrirana zasebno.

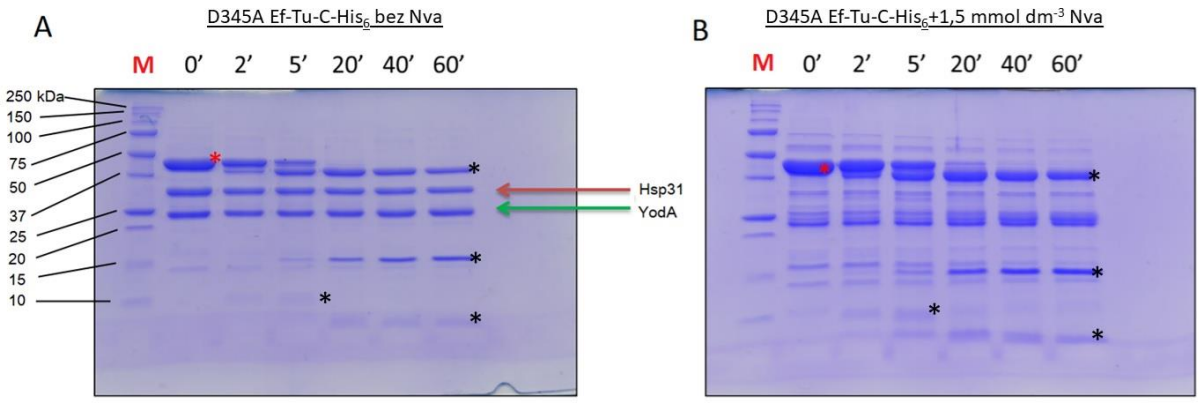
Budući da je usporedbom proteina sadržanih u proteinskim agregatima, koji se eluiraju u praznom volumenu kolone, prilikom analize nativnog i mistranslatiranog EF-Tu (Slike 5.15, 5.16 i 5.17) primijećeno da se u njima uglavnom nalaze proteinske nečistoće, a ne sam protein EF-Tu, takvi rezultati ukazuju da je mistranslatirani uzorak proteina EF-Tu stabilan u uvjetima *in vitro*.

Također, usporedbom signala kromatograma koji odgovaraju agregiranoj frakciji proteina na Slikama 5.16 i 5.17 pod A, vidljivo je da se mistranslatirani uzorak dodatno destabilizira i teži agregaciji ako je između dva koraka pročišćavanje smrznut na -80 °C. U oba slučaja mistranslatirani protein EF-Tu je gel–filtracijskom kromatografijom dobiven u zadovoljavajućoj čistoći i količini (Slika 5.16 i 5.17, B), budući da su pruge koje odgovaraju proteinskim nečistoćama u sakupljenim frakcijama prilično slabog intenziteta.

5.8. Proteinske domene nemistranslatiranog i mistranslatiranog uzorka proteina EF-Tu su jednako stabilne

Limitirana proteoliza tripsinom je biokemijska metoda koja pruža informaciju o potencijalnim promjenama u stabilnosti strukture proteina. U ovim eksperimentima je korištena proteaza tripsin koja hidrolizira polipeptidne lance nakon aminokiselina Arg ili Lys, pri čemu posjeduje veću preferenciju prema Arg (Keil, 1992). Metoda se temelji na inkubiranju proteina, čiju promjenu u stabilnosti/konformaciji želimo pratiti, s relativno malom količinom proteaze. Tripsin pritom preferentno cijepa protein na mjestima prepoznavanja koja se nalaze na površini proteina. Kako proteoliza napreduje, tako se postupno otkrivaju nova mjesta cijepanja. Zatim se SDS-PAG elektroforezom analiziraju produkti proteololitičke razgradnje (detaljno prikazano u poglavlju 4.2.7). Ukoliko se dobiveni obrasci polipeptidnih vrpci (fragmenata) na gelu razlikuju ili ukoliko je pak cijepanje jednog uzorka u odnosu na drugi brže, može se zaključiti da postoji razlika u stabilnosti/konformaciji dvaju proteinskih uzoraka. Kako bi usporedili da li se mistranslatirani protein EF-Tu razlikuje od nemistranslatiranog u stabilnosti i smatanju stabilnih domena paraleno su analizirani.

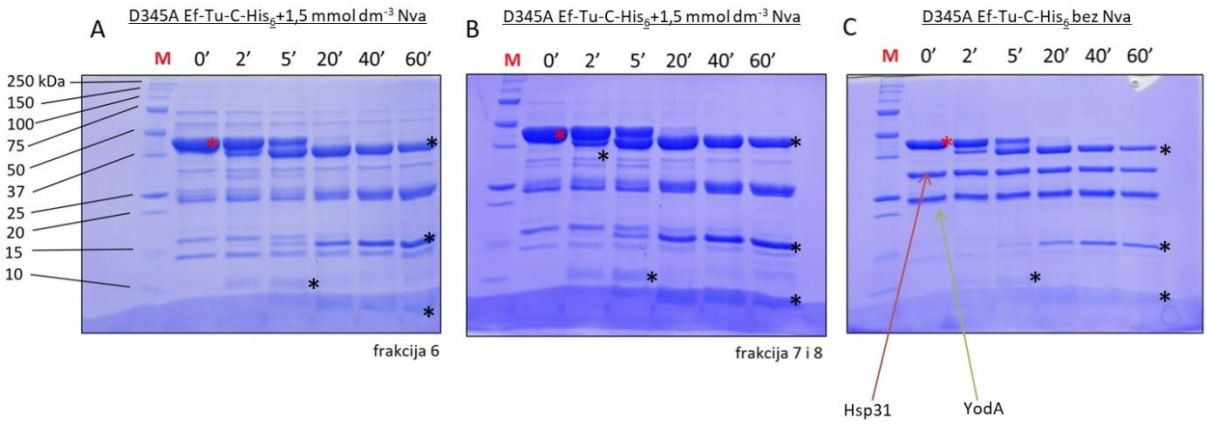
Na Slici 5.18 prikazani su rezultati SDS-PAGE analize fragmenata dobivenih proteolitičkom razgradnjom uzorka nemistranslatiranog (pod A) i mistranslatiranog proteina EF-Tu (pod B). Oba uzorka dobivena su izolacijom proteina EF-Tu afinitetnom (Slike 5.13 i 5.14), a potom i gel filtracijskom kromatografijom (Slike 5.15, 5.16 i 5.17). Kao što je navedeno u prethodnom poglavlju 5.7 prilikom ukoncentriranja mistranslatiranog proteina EF-Tu nakon gel-filtracijske kromatografije, došlo je do njegovog brzog taloženja. Nastali talog ponovno je otopljen u gel-filtracijskom puferu te je njegova stabilnost analizirana odvojeno od mistranslatiranog proteina EF-Tu zaostalog u supernatantu. Zbog premale koncentracije proteina koji se istaložio, njegovi fragmenti dobiveni metodom limitirane proteolize, nisu bili jasno vidljivi na gelu te ih nije bilo moguće interpretirati (rezultati nisu prikazani). SDS-PAGE analiza proteolitičke razgradnje mistranslatiranog proteina zaostalog u supernatantu prikazana je na Slici 5.18 pod B. Fragmenti nastali cijepanjem između stabilnih domena proteina EF-Tu označeni su zvjezdicama. Usporedbom fragmenata nastalih prilikom razgradnje mistranslatiranog uzorka s fragmentima nemistranslatiranog (Slika 5.18, A) vidljivo je da ne postoji razlika u njihovom broju, kao ni u brzini njihovog nastajanja. S obzirom da nije primijećena nikakva razlika u njihovoj razgradnji tripsinom, može se zaključiti da vjerojatno ne postoji značajna razlika u njihovoj stabilnosti.



Slika 5.18. SDS-PAGE analiza produkata ograničene proteolitičke razgradnje tripsinom proteina EF-Tu iz bakterijske kulture soja D345A EF-Tu-C-His_6 *E. coli* uzgajanog (A) bez prisutnosti Nva i (B) u prisutnosti 1,5 mmol dm^{-3} Nva. Na gelu su redom prikazani uzorci dobiveni zaustavljanjem reakcije u 2, 5, 20, 40 i 60 minuti te uzorak bez dodanog tripsina označen brojkom 0. M označava jažicu u koju je nanesen marker. Crvenom strelicom označen je šaperon Hsp31, dok je zelenom strelicom označen protein YodA. Crvena zvjezdica označava nepocijepani protein EF-Tu, dok crne zvjezdice označavaju fragmente proteina EF-Tu dobivene nakon proteolize tripsinom.

Također, važno je napomenuti da postotak mistranslacije dobivenog uzorka ostaje nepoznat. Postoji mogućnost da je provedenim metodama pročišćavanja dobivena frakcija proteina koji je manje mistranslatiran i ujedno stabilniji, a da se EF-Tu koji sadrži veći postotak Nva „izgubio"/istaložio tijekom pročišćavanja. Glavna razlika između uzoraka mistranslatiranog i nemistranslatiranog proteina EF-Tu je njihova čistoća. Naime, u slučaju nemistranslatiranog uzorka na Slici 5.18 pod A jasno su vidljive pruge koje odgovaraju proteinima molekulske mase ~30 i ~25 kDa (pretpostavljam da su to proteini Hsp31 i YodA). U slučaju mistranslatiranog uzorka (Slika 5.18, B) pruga koja odgovara proteinu Hsp31 je puno slabijeg intenziteta, dok je pruga koja odgovara proteinu YodA i dalje prilično intenzivna. U mistranslatiranom uzorku prisutno je puno dodatnih proteinskih nečistoća čiji identitet nije utvrđen. S obzirom da je mistranslatirani uzorak istaložio prilikom ukoncentriravanja (Slika 5.16, A), ponovljena je njegova izolacija afinitetnom, a potom i gel-filtracijskom kromatografijom (Slika 5.17, A). Kako bi se spriječilo ponovno taloženje uzorka, frakcija 6, čiji se signal preklapa sa signalom proteinskih agregata, ukoncentrirana je zasebno. Pretpostavka je da bi ta frakcija mogla sadržavati EF-Tu mistranslatiran u većem postotku. Frakcije 7 i 8, koje sadrže najviše čistog proteina EF-Tu, ukoncentrirane su i analizirane posebno. SDS-PAGE analiza proteolitičke razgradnje navedenih frakcija prikazana je na Slici 5.19 pod A i B. Fragmenti nastali razgradnjom proteina EF-Tu su označeni zvjezdicom. Usporedbom dobivenih fragmenata proteina EF-Tu i brzine njihove razgradnje nije uočena nikakva razlika između frakcije 6 (Slika 5.19, A) i

sjedinjenih frakcija 7 i 8 (Slika 5.19, B). Također, stabilnost mistranslatiranih uzoraka ponovno je jednaka stabilnosti nemistranslatiranog (Slika 5.19, C), u skladu s prethodnim eksperimentom.



Slika 5.19. SDS-PAGE analiza produkata ograničene proteolitičke razgradnje proteina EF-Tu pročišćenog afinitetnom i gel-filtracijskom kromatografijom iz bakterijske kulture D345A EF-Tu-C-His_6 *E. coli* uzgajanog (C) bez prisutnosti Nva i (A i B) u prisutnosti 1,5 mmol dm^{-3} Nva. Pod A je prikazana proteoliza frakcije 6, dok je pod (B) prikazana proteoliza sjedinjenih frakcija 7 i 8. Na gelu su redom prikazani uzorci dobiveni zaustavljanjem reakcije u 2, 5, 20, 40 i 60 minuti te uzorak bez dodane proteaze označen brojkom 0. M označava jažicu u koju je nanesen marker. Crvena zvjezdica označava nepocijepani protein EF-Tu, dok crne zvjezdice označavaju fragmente proteina EF-Tu dobivene nakon proteolize tripsinom.

Dobiveni rezultati ukazuju na jednaku stabilnost i konformaciju proteina EF-Tu izoliranog iz bakterijskih kultura uzgajanih u mistranslatirajućim i nemistranslatirajućim uvjetima. Naime, svaki put je prilikom SDS-PAGE analize uočen jednak obrazac vrpci produkata razgradnje te jednaka brzina razgradnje proteina EF-Tu tripsinom. Ono što se razlikuje je čistoća početnog uzorka. Uzorak proteina EF-Tu izoliranog iz bakterijskih stanica uzgajanih u nemistranslatirajućim uvjetima uvelike je onečišćen proteinima YodA i Hsp31. Mistranslatirani uzorak EF-Tu manje je onečišćen tim proteinima, ali su vidljive neke dodatne proteinske pruge koje nisu vidljive u nemistranslatiranom uzorku (Slika 5.19). Budući da nije provedena analiza spektrometrijom masa ne može se reći da li dodatne pruge odgovaraju nekim degradacijskim fragmentima proteina EF-Tu nastalim prije same proteolitičke razgradnje. Analiza spektrometrijom masa bi ujedno mogla pružiti i uvid u to koliko je leucina zamijenjeno norvalinom u mistranslatiranom uzorku proteina EF-Tu.

Može se zaključiti da je, s obzirom na rezultate limitirane protolize tripsinom, izolirani protein EF-Tu stabilan u mistranslatirajućim uvjetima, te da mistranslacija ne dovodi do značajne promjene njegove konformacije. Takvi rezultati nisu neobični, budući da je kao esencijalni stanični protein EF-Tu nužan za normalnu diobu i život bakterijske stanice. Također, bakterijske stanice su tokom

evolucije razvile mehanizme kojima uklanjaju nepravilno smotane proteine (detaljno prikazano u poglavlju 1.7.2), a ti procesi bi mogli imati značajnu ulogu u eliminaciji mistranslatiranog proteina EF-Tu i osiguravanju zalihe funkcionalnih i stabilnih molekula EF-Tu.

6. Rasprava

6.1.Mistranslacijski stres smanjuje vijabilnost bakterije E. coli

Biosinteza proteina je složen stanični proces čija je precizna kontrola ključna za normalno funkcioniranje svake stanice (Wang i sur, 2016). Neki od najvažnijih sudionika tog vitalnog procesa su enzimi aminoacil-tRNA-sintetaze, koje osiguravaju ispravno prevođenje genetičke informacije preciznim sparivanjem aminokiselina s pripadnim molekulama tRNA u reakciji aminoaciliranja (revijalno prikazano u Mohler i Ibba, 2017; detaljno prikazano u poglavlju 1.3). Točnost reakcije aminoaciliranja osigurava se uz pomoć dva mehanizma: prvi se temelji na raspoznavanju pripadne aminokiseline i tRNA prilikom vezanja u sintetsko aktivno mjesto, dok drugi obuhvaća različite hidrolitičke mehanizme kojima aaRS popravljaju vlastite pogreške ukoliko prvi mehanizam zakaže (revijalno prikazano u Perona i Gruić Sovulj, 2013; detaljno prikazano u poglavlju 1.3.1). Leucil-tRNA-sinetaza (LeuRS) katalizira reakciju kovalentnog povezivanja izoakceptorskih molekula $tRNA^{Leu}$ s aminokiselinom leucinom. Svrstava se u razred IA aaRS čije članove karakterizira zasebno strukturirana domena za hidrolitički popravak nakon prijenosa krive aminokiseline na tRNA (Lincecum i sur, 2003; detaljno prikazano u poglavlju 1.3.2). Zbog strukturne sličnosti leucinu, izoleucin, valin i norvalin (Slika 1.6) često su u literaturi navođeni kao dobri supstrati LeuRS koji ugrožavaju točnost reakcije leuciliranja (Chen i sur, 2000; Tang i Tirrell, 2002; Boniecki i sur, 2008).

Ispitivanjem reakcije aktivacije aminokiselina strukturno sličnih leucinu, pokazano je da neproteinogena aminokiselina norvalin predstavlja najveću prijetnju točnosti leucil-tRNA-sintetaze. Nedavna istraživanja su pokazala da LeuRS prilikom diskriminacije norvalina od leucina griješi frekvencijom od 10^{-2} (Tan i sur, 2013; Cvetešić i sur, 2012). Naime, izoleucin, kojeg se dugo vremena smatralo najvećom prijetnjom, LeuRS u sintetskom aktivnom mjestu razlikuje faktorom diskriminacije od 31 000 (Tablica 6.1), dok faktor diskriminacije* za Nva iznosi samo 116 (Cvetešić i sur, 2012; Cvetešić i sur, 2014).

Tablica 6.1. Kinetički parametri reakcije aktivacije aminokiselina divljim tipom leucil-tRNA-sintetaze. Preuzeto iz Cvetešić, 2015.

Aminokiselina	K_M (mmol dm^{-3})	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($mmol^{-1}$ dm^{-3} s^{-1})	Faktor diskriminacije
Leu	0,05 ± 0,01	66 ± 2	1320	
Nva	4,9 ± 0,4	56 ± 1	11,4	116
Ile	26 ± 7	1,1 ± 0,1	0,042	31429
Val	n.o.	n.o.	0,07	18857

n.o.- nije određeno

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

Kao što je detaljno prikazano u poglavlju 1.5.1, Nva u bakterijskoj stanici nastaje kao nusprodukt biosinteze leucina (Umbrager, 1978), a u mikroaerobnim uvjetima se može akumulirati do milimolarne koncentracije (Soini i sur, 2008). Kinetičkim istraživanjima pokazano je da *E. coli* LeuRS pri milimolarnoj koncentraciji Nva, Nva aktivira i prenosi na $tRNA^{Leu}$.

Ugradnja Nva u proteine bakterije *E. coli* sprječava se hidrolizom nastalog Nva-$tRNA^{Leu}$ produkta u deacilacijskoj domeni CP1 LeuRS (detaljno prikazano u poglavlju 1.3.3; Cvetešić i sur, 2012; Cvetešić i sur, 2013). Istraživanja reakcije deacilacije *E. coli* LeuRS pokazala su da CP1 domena posjeduje povećanu strukturnu specifičnost prema norvalinu. Specifično prepoznavanje i uklanjanje norvalina iz procesa biosinteze proteina ukazuje na činjenicu da on doista predstavlja veliku prijetnju normalnom smatanju i funkcioniranju staničnog proteoma (Cvetešić i sur, 2016).

S ciljem ispitivanja fiziološke uloge deacilacijske domene LeuRS pripremljen je soj D345A *E. coli* kojem je uvedena mutacija D345A u regiji CP1 domene. Naime, zamjenom evolucijski očuvanog aspartata alaninom na poziciji 345 u potpunosti se gubi mogućnost popravka nakon prijenosa krive aminokiseline na $tRNA^{Leu}$ (Lincecum i sur, 2003; Cvetešić i sur, 2012; Cvetešić i sur, 2014). Uzgojem navedenog soja u uvjetima povišene koncentracije Nva uočeno je značajno smanjenje vijabilnosti, pri čemu je određena vrijednost IC_{50} iznosila 300 μmol dm^{-3} (rezultati nisu ovjavljeni). Budući da je takav *in vivo* eksperiment proveden u uvjetima umjetno povišene koncentracije Nva u citoplazmi bakterijskih stanica, on ne odgovara na pitanje u kojim je biološkim uvjetima aktivnost deacilacijske domene LeuRS nužna. Odgovor na to pitanje može se pronaći u dva neovisno provedena istraživanja. Prvo je bilo istraživanje Soinia i suradnika (2008), kada su pokazali da se norvalin u mikroaerobnim uvjetima akumulira do milimolarne koncentracije u stanici *E. coli*. Kasnije je u istraživanju Cvetešić i suradnika pokazano da soj D345A *E. coli* u mikoaerobnim uvjetima ima značajno smanjenu vijabilnost u odnosu na divlji tip koji ima funkcionalnu CP1 deacilacijsku domenu LeuRS (Cvetešić i sur, 2014; Cvetešić i sur, 2016). Rezultati ovih eksperimenata sugeriraju da je deacilacijska domena omogućila prilagodbu bakterije *E. coli* na život u uvjetima smanjene količine kisika te da je evolucijski optimirana za eliminaciju neproteinogene aminokiseline norvalina iz procesa biosinteze proteina (Cvetešić i sur, 2012; Cvetešić i sur, 2014; Cvetešić i sur, 2016).

Smatra se da je smanjenje vijabilnosti bakterijskog soja D345A u prisutnosti norvalina posljedica nestabilnosti i agregiranja mistranslatiranih proteina (detaljno prikazano u slijedećem poglavlju), s obzirom na to da su proteinski agregati izrazito toksični za stanicu (Haass i Selkoe, 2007). Stoga se u ovom diplomskom radu, praćenjem proteina EF-Tu kao modelnog proteina, željelo istražiti postoji li sklonost mistranslatiranih proteina agregaciji u uvjetima *in vivo*. U tu svrhu se metodom Western Blot pratila pojavnost EF-Tu u topivoj i netopivoj frakciji ukupnih staničnih proteina, izoliranih iz bakterijskih kultura mutanata D345A i divljeg tipa *E. coli* uzgajanih u prisutnosti različitih

koncentracija Nva. Specifična detekcija proteina EF-Tu omogućena je uvođenjem histidinskog privjeska na njegov C-kraj (EF-Tu-C-His_6), u sojeve mutanata D345A i divljeg tipa *E. coli,* postupkom homologne rekombinacije (detaljno prikazano u poglavlju 3.8).

Prije nego što je Western Blot metodom analizirana agregacija proteina EF-Tu u mistranslatirajućim uvjetima, provjeren je rast navednih sojeva D345A EF-Tu-C-His_6 i Wt EF-Tu-C-His_6 u prisutnosti različitih koncentracija norvalina. Krivulje rasta prikazane u poglavlju 5.1 (Slika 5.1) potvrdile su rezultate prethodnih istraživanja Zavoda za biokemiju Prirodoslovno matematičkog fakulteta (Cvetešić, 2015; Biluš, 2016). Naime, mutant je uistinu, ovisno o koncentraciji dodanog Nva, pokazivao smanjenu vijabilnost u odnosu na divlji tip. Pri 300 µmol dm^{-3} dodanog Nva uočen je blagi inhibitorni efekt na rast mutanta D345A EF-Tu-C-His_6, dok je u prisutnosti 1,5 mmol dm^{-3} Nva njegov rast bio gotovo u potpunosti inhibiran. Mala promjena u vijabilnosti uočena je i u slučaju divljeg tipa Wt EF-Tu-C-His_6. Budući da tako visoka koncentracija norvalina izaziva narušavanje omjera Nva/Leu u citoplazmi dolazi do staničnog stresa (Apostol i sur, 1997) bez obzira na funkcionalnost CP1 deacilacijske domene. Naime, analizom proteoma izoliranog iz Wt *E. coli* uzgajanog u aerobnim uvjetima u prisutnosti Nva te u mikroaerobnim uvjetima, pokazano je da dolazi do misinkorporacije norvalina na 0,04 – 0,27 % leucinskih pozicija (Cvetešić i sur, 2016). Takva razina mistranslacije je u skladu s procjenom pogreške koja se događa tijekom cjelokupne sinteze proteina (1 pogreška na 3300 sintetiziranih peptidnih veza) (Loftfield i Vanderjagt, 1972). Stoga vjerojatno, usporeniji rast divljeg tipa pri višim koncentracijama Nva nije posljedica mistranslacije, već konstantne kompeticije leucina i norvalina za sintetsko aktivno mjesto LeuRS. Naime, učestale pogreške LeuRS u aminoacilaciji i njihov popravak, dovodi do pretjerane potrošnje energije (molekula ATP-a) te ujedno smanjuje brzinu sinteze Leu-$tRNA^{Leu}$ koje su potrebne za biosintezu proteina. Sve to utječe na brzinu translacije, a samim time i staničnu diobu.

Kako bi se provjerilo ima li histidinski privjesak na C-kraju proteina EF-Tu utjecaja na vijabilnost sojeva D345A EF-Tu-C-His_6 i Wt EF-Tu-C-His_6 uspoređen je njihov rast s rastom sojeva D345A i Wt *E. coli* bez histidinskog privjeska na EF-Tu pri različitim koncentracijama Nva. Preklapanje krivulja rasta mutanta D345A sa i bez histidinskog privjeska na EF-Tu, pri istim koncentracijama norvalina sugerira da histidinski privjesak nema utjecaja na vijabilnost mutanta D345A (Slika 5.2, A). Također, isti je zaključak izveden i u slučaju divljeg tipa Wt EF-Tu-C-His_6 (Slika 5.2, B). Prema tome smanjena vijabilnost soja D345A EF-Tu-C-His_6 pri povišenim koncentracijama norvalina posljedica je toksičnosti mistranslacije na rast bakterijskih stanica.

6.2.Mistranslacija ne uzrokuje agregaciju modelnog proteina EF-TuB, već smanjenje njegove ekspresije

Kao što je navedeno u prethodnom poglavlju 6.1, istraživanja na bakterijskom soju D345A *E. coli* su pokazala da bakterijske stanice s norvaliranim proteomom imaju značajno smanjen stanični *fitness* u aerobnim i mikroaerobnim uvjetima rasta (Cvetešić i sur, 2016). Pretpostavlja se da je smanjena vijabilnost posljedica nestabilnosti mistranslatiranog proteoma, budući da je primijećeno da se Nva može ugraditi na čak 10 % leucinskih pozicija u proteinima, ukoliko *E. coli* ne posjeduje aktivnu deacilacijsku domenu LeuRS (Cvetešić i sur, 2016). S obzirom da je Nva manji i manje hidrofoban od Leu te da posjeduje ravnolančani a ne razgranati bočni ogranak, zamjena leucina norvalinom mogla bi utjecati na pravilno smatanje proteina, a poznato je da krivo smotani proteini zbog svoje nefunkcionalnosti, agregiranja ili čak stjecanja nove funkcije mogu biti izrazito toksični za stanicu (revijalno prikazano u Mohler i Ibba, 2017).

U ovom diplomskom radu praćenjem proteina EF-Tu kao modelnog proteina, željelo se istražiti postoji li sklonost mistranslatiranih proteina agregaciji u uvjetima *in vivo* i *in vitro*. EF-Tu je kao modelni protein izabran iz više razloga: (i) on je esencijalan translacijski protein bez kojeg se u stanici ne može odvijati biosinteza proteina, a samim time ni normalan život stanice (revijalno prikazano u Kavaliauskas i sur, 2012); (ii) ujedno je najzastupljeniji stanični protein, što omogućava njegovo lako praćenje i izolaciju (Bosch i sur, 1983), (iii) od 396 aminokiselina 28 su leucini, što ga u teoriji čini izrazito podložnim mistranslaciji norvalinom ukoliko se inaktivira deacilacijska domena LeuRS *E. coli*; (iv) budući da se sastoji od α- i β- sekundarnih struktura koje se izmjenjuju, analizom spektrometrijom masa frakcije proteina EF-Tu podložnijih agregaciji, mogao bi se dobiti uvid u osjetljivost pojedine sekundarne strukture na mistranslaciju; (v) s obzirom da je nužan za stanično preživljavanje (revijalno prikazano u Kavaliauskas i sur, 2012) zanimljivo je pratiti na koji način stanica rješava problem njegove mistranslacije.

Sklonost mistranslatiranog proteina EF-Tu agregaciji u uvjetima *in vivo* analizirana je metodom Western Blot. Praćena je pojavnost EF-Tu u topivoj i netopivoj frakciji ukupnih staničnih proteina izoliranih iz bakterijskih kultura mutanata D345A EF-Tu-C-His_6 i divljeg tipa Wt EF-Tu-C-His_6 *E. coli* uzgajanih u prisutnosti različitih koncentracija norvalina.

Funkcionalna istraživanja divljeg tipa proteina EF-Tu te konstrukata EF-Tu-C-His_6 i EF-Tu-N-His_6 su pokazala da divlji tip ostvaruje najjače interakcije s Leu-$tRNA^{Leu}$ i Nva-$tRNA^{Leu}$, dok je njihova interakcija s EF-Tu-N-His_6 najslabija (Akmačić, 2012). Budući da u odnosu na divlji tip, EF-Tu-C-His_6 ima nešto slabiji afinitet prema Leu-$tRNA^{Leu}$ i Nva-$tRNA^{Leu}$, ali i dalje može normalno obavljati svoju funkciju (Akmačić, 2012), upravo je on odabran za *in vivo* i *in vitro* eksperimente provedene u ovom

diplomskom radu. Jedan od glavnih nedostataka proteinskog konstrukta EF-Tu-C-His_6 je nemogućnost praćenja njegove prerane terminacije translacije. Naime, anti-His_6 protutijela za Western Blot analizu omogućila su vizualizaciju samo onih molekula EF-Tu koji su potpunosti sintetizirane i na C-kraju sadrže histidinski privjesak. Također, ovako konstruiran eksperiment ne daje uvid u stabilnost i ekspresiju proteina EF-Tu kodiranog genom *tufA*.

Zanimljivo je da ne dolazi do značajnije agregacije proteina EF-Tu u mistranslatirajućim uvjetima (poglavlje 5.3, Slika 5.6, C) u odnosu na fiziološke (Slika 5.6, D), budući da njegova količina u netopivoj frakciji proteina ne raste pri većim koncentracijama Nva. Naime, dobiveni rezultati su pokazali da se u mutanta D345A EF-Tu-C-His_6 ovisno o količini eksterno dodanog Nva samanjuje razina proteina EF-Tu, što je bio iznenadujući rezultat. Također, vidljivo je da se smanjenjem razine EF-Tu u ukupnom staničnom ekstraktu, proporcionalno smanjuje i njegova količina u topivoj i netopivoj frakciji proteina (Slika 5.6, C). S druge strane, u slučaju soja divljeg tipa, koji posjeduje aktivnu deacilacijsku domenu LeuRS, nema razlike u razini eksprimiranog proteina EF-Tu neovisno o prisutnosti Nva (Slika 5.6, D).

Dobiveni rezulati sugeriraju da je smanjenje razine proteina EF-Tu, posljedica biološkog odgovora bakterijske stanice na mistranslacijski stres. Naime, ukoliko mistranslatirani protein EF-Tu, kao najbrojniji i esencijalni stanični protein (Bosh i sur, 1983), ne može dobro izvoditi svoju funkciju i agregira u napučenom mistranslatiranom citoplazmatskom okruženju, postoji mogućnost da stanica aktivira mehanizme kojima će umanjiti vjerojatnost njegovog agregiranja. S obzirom na prethodno provedena istraživanja na stanicama u stresnim uvjetima izazvanima mistranslatirajućim i proteotoksičnim stresom postoji nekoliko mogućih načina kojima bi bakterijska stanica mogla smanjiti razinu dostupnog EF-Tu: (i) ekspresija se smanjuje na razini transkripcije, čime se ujedno smanjuje ukupna biosinteza proteina; (ii) visoki postotak mistranslacije ili mistranslacija strukturno važne leucinske pozicije proteina EF-Tu destabilizira njegovu strukturu i smanjuje funkcionalnost, zbog čega se on nakon translacije aktivno odvodi na proteazu Lon i uklanja iz staničnog proteoma (Bruel i sur, 2012); (iii) fosforilacijom proteina EF-Tu onemogućuje se njegovo otpuštanje s ribosoma i smanjuje ukupna biosinteza proteina (Pereira i sur, 2015).

Smanjenje ekspresije na razini transkripcije možda bi se moglo ostvariti prilikom terminacije transkripcije ili obrade transkribirane mRNA, budući da se EF-TuB kotranskribira s četiri tRNA gena (detaljno prikazano u poglavlju 1.4; Lee i sur, 1981). Upravo se iz tog razloga češće razmišlja o regulaciji ekspresije gena *tufB* na razini translacije (Van der Meide, 1983; Bosh i sur, 1983) ili posttranslacijski.

U prilog drugoj (ii) mogućnosti idu rezultati Bruel i suradnika, koji su pokazali da se proteotoksični stres izazvan inaktivacijom DnaK i TF, ključnih šaperona za *de novo* smatanje proteina

u *E. coli*, može ublažiti povećanom ekspresijom šaperona Hsp33 koji zatim specifično veže EF-Tu te ga usmjerava na razgradnju na proteazi Lon (Bruel i sur, 2012). Na taj se način stanični stres uzrokovan akumulacijom nepravilno smotanih proteina smanjuje sinergističkim djelovanjem Hsp33 šaperona i proteaze Lon, te smanjenjem ukupne biosinteze proteina specifičnom razgradnjom proteina EF-Tu (Bruel i sur, 2012). Iako biološka relevantnost takvog puta u fiziološkim uvjetima, gdje su prisutni svi molekularni šaperoni, još uvijek nije poznata, ovi rezultati sugeriraju postojanje složene mreže šaperona i proteaza, koje sinergističkim djelovanjem s proteinom EF-Tu, smanjuju razinu translacije u odgovoru na visoku razinu nepravilno smotanih i agregiranih proteina. Također, autori predlažu da povećana potražnja stanice za šaperonima uslijed nakupljanja krivo smotanih i agregiranih proteina može preopteretiti stanični kapacitet. Preopterećenje okida stanični signal za snižavanje razine EF-Tu što dovodi do usporavanja translacije i snižavanja opterećenja šaperona (Bruel i sur, 2012). Tu ideju podržavaju nedavna istraživanja na bakteriji *E. coli* (Agashe i sur, 2004; Siller i sur, 2010) i stanicama sisavaca (Meriin i sur, 2012), kojima je pokazano da usporavanje translacije olakšava smatanje *de novo* sintetiziranih proteina. Budući da je brzina translacije ovisna o razini dostupnih elongacijskih faktora, sustavnim odvođenjem i degradacijom EF-Tu smanjuje se njena brzina i time osigurava preciznije smatanje proteina (revijalno prikazano u Browne i Proud, 2002; Agashe i sur, 2004; Bruel i sur, 2012).

Istraživanje Ji i suradnika na kvascu, s deficijentnom deacilacijskom domenom LeuRS, uzgajanog u prisutnosti norvalina pokazalo je značajno povišenje ekspresije šaperonskog sustava Hsp70. To ukazuje da akumulacija nepravilno smotanih mistranslatiranih proteina doista potiče sintezu šaperona koji će omogućiti njihovo pravilnije smatanje ili degradaciju na proteazi (Ji i sur, 2017).

Treći (iii) mehanizam kojim bakterijske stanice smanjuju razinu dostupnog proteina EF-Tu, a samim time i razinu biosinteze proteina, je njegova regulirana modifikacija fosforilacijom čime se onemogućuje njegovo otpuštanje s ribosoma (Pereira i sur, 2015). Kao što je prikazano u poglavlju 1.4.1 primijećeno je da se u uvjetima deprivacije esencijalnih staničnih nutrijenata translacija regulira fosforilacijom proteina, koji posreduju u procesu translacije, poput elongacijskog faktora Tu (Maček i Mijaković, 2011). Naime, uočeno je da se regulacija translacije može postići fosforilacijom manje od 10 % EF-Tu molekula (Soares i sur, 2013). Eksperimenati prikazani u diplomskom radu nisu mogli dati informaciju o mogućoj fosforilaciji proteina EF-Tu. No, s obzirom da postoji cijeli niz znanstvenih istraživanja kojima je pokazano da se fosforilacijom proteina EF-Tu usporava biosinteza proteina (a samim time i translacija proteina EF-Tu), bilo bi zanimljivo provjeriti da li je i u našem slučaju njegova razina regulirana na isti način.

Ukoliko bi stanica koristila jedan od navedenih mehanizama ili pak njihovu kombinaciju to bi ukazivalo na to da se protiv stresa izazvanog mistranslacijom bori smanjenjem sinteze proteina koji sudjeluju u energetski zahtjevnim procesima, poput translacijskih faktora. Ovakva ideja može objasniti i smanjenu vijabilnost bakterijskih stanica (rezultati prikazani u poglavlju 5.1). Naime, smanjenom ekspresijom proteina koji sudjeluju u translaciji smanjuje se i ukupna biosinteza proteina, a samim time i usporava dioba stanica.

Suprotno rezultatima koji ukazuju na smanjenje razine proteina EF-Tu u uvjetima mistranslacijskog stresa (poglavlje 5.3 Slike 5.6 i 5.7), evolucijski eksperiment Kalapis i suradnika na stanicama kvasca uzgajanog u mistranslatirajućim uvjetima sugerira da se stanice na mistranslaciju prilagođavaju postupnim povećanjem biosinteze proteina (Kalapis i sur, 2015). Pri čemu se u prvom koraku povećava razina proteina koji sudjeluju u translaciji te molekularnih šaperona koji pomažu pri pravilnom smatanju i degradaciji nepravilno smotanih proteina (Kalapis i sur, 2015). Ako je ovakav način adaptacije na stresne uvjete izazvane mistranslacijom isti i kod bakterijskih stanica onda je uočena smanjena količina proteina EF-TuB posljedica nestabilnosti proteina EF-TuB obilježenog histidinskim privjeskom. Ovoj ideji u prilog idu tri činjenice: smanjena stabilnost proteinskog konstrukta EF-Tu-C-His_6 u odnosu na divlji tip proteina EF-Tu (Akmačić, 2012), postojanje drugog gena za EF-Tu (*tufA*) (Jaskunas i sur, 1975) koji u ovom eksperimentu nije označen histidinskim privjeskom i čiju ekspresiju nije bilo moguće pratiti, te činjenica da delecija bilo kojeg od dva *tuf* gena ne utječe na rast bakterijske stanice u minimalnom mediju (Zuurmond i sur, 1999).

Naime, postoji mogućnost da u nemistranslatirajućim uvjetima stanica eksprimira podjednaku količinu protein EF-Tu kodiranog genima *tufA* i *tufB*, što je unatoč manjoj stabilnosti obilježenog proteina EF-TuB dovoljno za njezin normalan rast. Dok s druge strane u mistranslatirajućim uvjetima stanica povećava razgradnju nestabilnijeg proteina EF-TuB, budući da je mistranslatirani EF-TuB možda dodatno destabililizan uvedenim histidinskim privjeskom. Prethodna istraživanja pokazuju da bi i sa smanjenjem količine proteina EF-TuB stanice mogle jednako uspješno rasti (Zuurmond i sur, 1999) te da bi takav slučaj svejedno mogao pokazivati preklapanje krivulja rasta bakterija koje sadrže i ne sadrže histidinski privjesak na C-kraju proteina EF-TuB, uzgajanim pri različitim koncentracijama Nva (poglavlje 5.1 Slika 5.2). Time bi Western Blot rezultati pokazivali samo smanjenu razinu proteina EF-TuB, dok bi jednaka razina EF-TuA ostala nezabilježena. Stoga bi, za završnu provjeru razine ekspresije proteina EF-Tu u mistranslatirajućim uvjetima bilo bi nužno napraviti Western Blot analizu s primarnim antitijelima koja prepoznaju protein EF-Tu blizu njegovog N-kraja. Budući da se EF-TuA i EF-TuB razlikuju samo u svojoj C-terminalnoj aminokiselini (Jaskunas i sur, 1975) takva bi protutijela omogućila praćenje ukupnog broja molekula proteina EF-Tu i ujedno njihove prerane terminacije translacije. Ukoliko bi se tako dizajniranim eksperimentom potvrdila

smanjena ekspresija može se pristupiti istraživanju mehanizma kojim bakterija *E. coli* smanjuje razinu njegove ekspresije.

Kako bi se istražilo da li je smanjena razina EF-Tu posljedica njegove povećane razgradnje putem proteaza, kao u slučaju provedenog istraživanja Bruela i suradnika iz 2012, trebalo bi pripremiti soj D345A *E. coli* s inaktiviranom proteazom Lon, te ponoviti njegov uzgoj u mistranslatirajućim uvjetima.

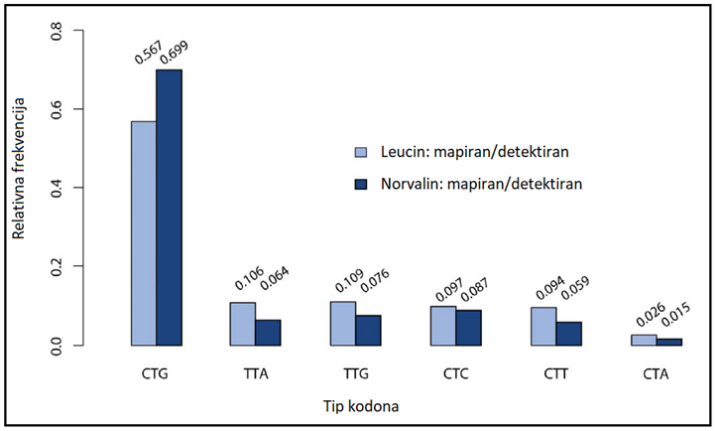
S druge strane analiza fosfoproteoma soja D345A uzgajanog u mistranslatirajućim uvjetima mogala bi dati uvid u njegovu inaktivaciju fosforilacijom, koja dovodi do smanjenja ukupne biosinteze proteina (Maček i Mijaković, 2011). Naime, za potpuni odgovor na pitanje kojim mehanizmom bakterija *E. coli* smanjuje razinu molekula EF-Tu u mistranslatirajućim uvjetima bilo bi nužno provesti sve prethodno navedene analize, kao i analizu regulaciju ekspresije na razini transkripcije. Upravo iz razloga što njegova smanjena razina može biti i posljedica kombinacije nekih ili svih navedenih mehanizama.

Prema dobivenim rezultatima, može se zaključiti da EF-Tu nije dobar markerski protein za izučavanje utjecaja Nva na njegovu stabilnost u uvjetima *in vivo*, budući da stanice vjerojatno posjeduju mehanizme kojima osiguravaju njegovu stabilnost. Stoga je za daljnja istraživanja nužno odabrati neke druge modelne proteine. Naime, ukoliko se daljnjim istraživanjima pristupi na isti eksperimentalni način kao i u ovom diplomskom radu, potrebno je odabrati modelni protein čija stabilnost i funkcionalnost nije nužna za normalan rast bakterijske stanice te čija ekspresija ne varira u različitim stresnim uvjetima.

U konačnici, važno je napomenuti da EF-Tu može poslužiti kao markerski protein za izučavanje biološkog odgovora bakterijske stanice na mistranslacijski stres. Naime, ukoliko se utvrdi mehanizam kojim stanice smanjuju količinu EF-Tu u mistranslatirajućim uvjetima, može se dobiti uvid u adaptaciju bakterijske stanice na stres izazvan mistranslacijom.

6.3.Mistranslatirani protein EF-Tu nije pokazao značajnu promjenu u stabilnosti prilikom analize gel-filtracijskom kromatografijom i limitiranom proteolizom tripsinom

Analizom proteoma izoliranog iz D345A *E. coli* soja uzgajanog u mikroaerobnim uvjetima, metodom spekrometrije masa, uočeno je da se misinkorporacija Nva preferentno događa na CTG leucinskim kodonima, dok je smanjena misinkorporacija uočena u slučaju TTA, TTG i CTT kodona (Cvetešić i sur, 2016). Takav trend misinkorporacije poklapa se sa zastupljenosti leucinskih kodona u genomu *E. coli* (Slika 6.1).



Slika 6.1. Korelacija razine mistranslacije i učestalosti pojedinih kodonskih sekvenci. Svijetlo plavom bojom označena je učestalost pojedine kodonske sekvence leucina, dok je tamno plavom bojom označena učestalost mistranslacije na pojedinim kodonskim sekvencama (Cvetešić i sur, 2016).

S obzirom da je CTG najkorišteniji leucinski kodon nejasno je da li je njegova preferentna misacilacija posljedica statistički većeg broja izoakceptorske $tRNA_{CAG}$ ili drugačije aminoacilacijske kinetike $tRNA_{CAG}$ izoakceptora i LeuRS (Cvetešić i sur, 2016). Razina ekspresije pojedinih izoakceptorski molekula tRNA odgovara zastupljenosti kodona koje dekodiraju (Andersson i Kurland, 1990). Poznato je da brzina translacije ovisi o dostupnosti molekula tRNA, te su zbog toga proteini stresnih odgovora i proteini koji sudjeluju u procesu translacije (koji se ovisno o uvjetima moraju brzo sintetizirati) izgrađeni od statistički najčešće upotrebljavanih kodona. Naime, analizom sekvence gena za EF-Tu utvrđeno je da je 27 od ukupnih 28 leucinskih pozicija kodirano upravo najzastupnjenijim CTG kodonom (Slika 6.2). Prema tome, uzimajući u obzir njegov kodonski sastav i preferentnu mistranslaciju na CTG kodonima, može se zaključiti da u mistranslatirajućim uvjetima postoji velika vjerojatnost misinkorporacije norvalina u molekule proteina EF-Tu. Stoga se nameće pitanje: koliko je nativna konformacija tj. stabilnost jednog od najvažnijih staničnih proteina osjetljiva na mistranslaciju aminokiselinom norvalinom, koja se u stanici prirodno akumulira u uvjetima smanjene koncentracije kisika (Soini i sur, 2008)?

A

```
1   ATG TCT AAA GAA AAG TTT GAA CGT ACA AAA CCG CAC GTT AAC GTC GGT ACT ATC GGC CAC
21  GTT GAC CAT GGT AAA ACA ACG CTG ACC GCT GCA ATC ACT ACC GTA CTG GCT AAA ACC TAC
41  GGC GGT GCT GCT CGC GCA TTC GAC CAG ATC GAT AAC GCG CCG GAA GAA AAA GCT CGT GGT
61  ATC ACC ATC AAC ACT TCT CAC GTT GAA TAC GAC ACC CCG ACC CGT CAC TAC GCA CAC GTA
81  GAC TGC CCG GGG CAC GCC GAC TAT GTT AAA AAC ATG ATC ACC GGT GCT GCT CAG ATG GAC
101 GGC GCG ATC CTG GTA GTT GCT GCG ACT GAC GGC CCG ATG CCG CAG ACT CGT GAG CAC ATC
121 CTG CTG GGT CGT CAG GTA GGC GTT CCG TAC ATC ATC GTG TTC CTG AAC AAA TGC GAC ATG
141 GTT GAT GAC GAA GAG CTG CTG GAA CTG GTT GAA ATG GAA GTT CGT GAA CTT CTG TCT CAG
161 TAC GAT TTC CCG GGC GAC GAC ACT CCG ATC GTT CGT GGT TCT GCT CTG AAA GCG CTG GAA
181 GGC GAC GCA GAG TGG GAA GCG AAA ATC CTG GAA CTG GCT GGC TTC CTG GAT TCT TAC ATT
201 CCG GAA CCA GAG CGT GCT ATT GAC AAG CCG TTC CTG CTG CCG ATC GAA GAC GTA TTC TCC
221 ATC TCC GGT CGT GGT ACC GTT GTT ACC GGT CGT GTA GAA CGC GGT ATC ATC AAA GTT GGT
241 GAA GAA GTT GAA ATC GTT GGT ATC AAA GAG ACT CAG AAG TCT ACC TGT ACT GGC GTT GAA
261 ATG TTC CGC AAA CTG CTG GAC GAA GGC CGT GCT GGT GAG AAC GTA GGT GTT CTG CTG CGT
281 GGT ATC AAA CGT GAA GAA ATC GAA CGT GGT CAG GTA CTG GCT AAG CCG GGC ACC ATC AAG
301 CCG CAC ACC AAG TTC GAA TCT GAA GTG TAC ATT CTG TCC AAA GAT GAA GGC GGC CGT CAT
321 ACT CCG TTC TTC AAA GGC TAC CGT CCG CAG TTC TAC TTC CGT ACT ACT GAC GTG ACT GGT
341 ACC ATC GAA CTG CCG GAA GGC GTA GAG ATG GTA ATG CCG GGC GAC AAC ATC AAA ATG GTT
361 GTT ACC CTG ATC CAC CCG ATC GCG ATG GAC GAC GGT CTG CGT TTC GCA ATC CGT GAA GGC
381 GGC CGT ACC GTT GGC GCG GGC GTT GTA GCA AAA GTT CTG AGC TAA
```

B

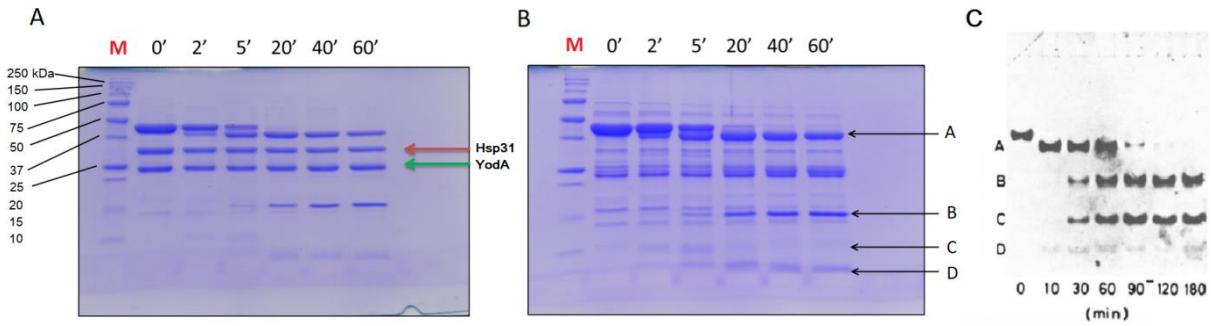
Slika 6.2. Primarna i tercijarna struktura proteina EF-Tu *E.Coli*. Pod (A) je prikazan kodonski slijed gena za protein EF-TuB. Žutom bojom je označeni su CTG kodoni koji kodiraju za aminokiselinu Leu, dok je CTT kodon, koji također kodira za Leu označen crvenim kvadratićem. Pod (B) je prikazana tercijarna struktura proteina EF-Tu *E. coli* (*PDB ID*: 1EFC) (Song i sur, 1999). Domena 1 je označena ljubičastom, domena 2 plavom, a domena 3 tirkiznom bojom. Pozicije aminokiseline leucina označene su žutom bojom.

Stabilnost mistranslatiranog proteina EF-Tu u odnosu na nemistranslatirani uspoređena je gel-filtracijskom kromatografijom te metodom limitirane proteolize tripsinom. Kao što je navedeno u poglavlju 4.2.5 gel-filtracijska kromatografija omogućila je detekciju proteinskih agregata te dodatno pročišćavanje uzorka EF-Tu izoliranog postupkom afinitetne kromatografije. Gel-filtracijski kromatogram i SDS-PAGE analiza frakcija dobivenih iz bakterijske kulture mutanta D345A EF-Tu-C-His_6 uzgajanog u prisutnosti Nva prikazani su u poglavlju 5.7 na Slikama 5.16 i 5.17. Primijećeno je da proteinski agregati, izašli u praznom volumenu kolone sadrže uglavnom proteinske nečistoće i izrazito malo proteina EF-Tu. Ukoliko se usporedi količina proteina EF-Tu prisutnog u proteinskim agregatima prilikom gel-filtracijske analize nemistranslatiranog uzorka (Slika 5.15, B) i mistranslatiranih uzoraka (Slike 5.16 i 5.17, B) ne primjećuje se nikakva značajna razlika. Stoga se može reći da je mistranslatirani protein EF-Tu, dobiven navedenim metodama pročišćavanja, stabilan kao i nemistranslatirani protein u uvjetima *in vitro*.

Također, važno je napomenuti da su za analizu stabilnosti mistranslatiranog uzorka proteina EF-Tu limitiranom proteolizim tripsinom, napravljene dvije zasebne izolacije afinitetnom, a potom i gel-filtracijskom kromatografijom. Naime, ukoncentriravanjem frakcija mistranslatiranog proteina EF-Tu nakon gel-filtracijske kromatografije (Slika 5.16) primijećeno je brzo taloženje dobivenog uzorka. S obzirom da se EF-Tu prilikom gel-filtracijske kromatografije ponašao stabilno, smatra se da je

povećana agregacija posljedica nestabilnosti tako pripremljenog mistranslatiranog uzorka (detaljno prikazano u poglavlju 5.7).

Kao što je prikazano u poglavlju 5.8 limitirana proteoliza tripsinom je pružila uvid u stabilnost proteinskih domena i narušavanja konformacije proteina EF-Tu uslijed mistranslacije. Rezultati dobiveni limitiranom proteolizom mistranslatiranog i nemistranslatiranog proteina EF-Tu (poglavlje 5.8) uspoređeni su s rezultatima Nakamure i suradnika, koji su u svom radu objavljenom 1977. godine prikazali kako bi trebao izgledati obrazac vrpci nastalih nakon tripsinolize stabilnog i pravilno smotanog proteina EF-Tu (Slika 6.3).



Slika 6.3. SDS-PAGE analiza produkata limitirane razgradnje proteina EF-Tu tripsinom. Pod (A) je prikazana proteoliza nemistranslatiranog proteina, a pod (B) mistranslatiranog proteina EF-Tu. Na gelu su redom prikazani uzorci dobiveni zaustavljanjem reakcije u 2, 5, 20, 40 i 60 minuti te uzorak bez dodane proteaza označen brojkom 0. M označava jažicu u koju je nanesen marker. Pod (C) su prikazani rezultati SDS-PAGE analize produkata limitirane razgradnje proteina EF-Tu tripsinom Nakamure i suradnika (1977). Odgovarajući polipeptidni fragmenti označeni su istim slovima.

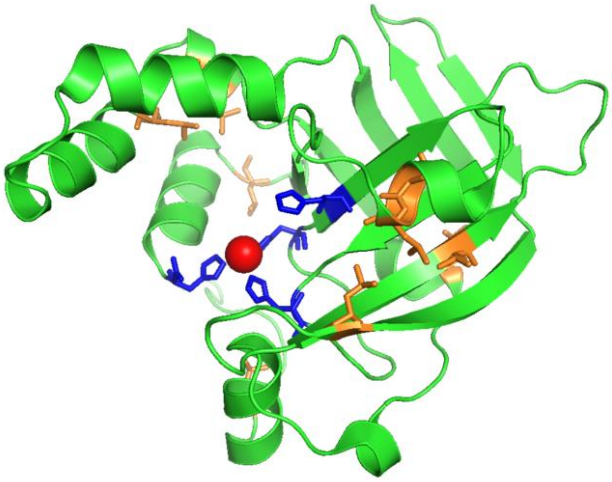
Prema Slici 6.3. je vidljivo da zapravo nema razlike u stabilnosti proteinskih domena mistranslatiranog i nemistranslatiranog proteina EF-Tu. Naime, ne dolazi do brže proteolize mistranslatiranog proteina, kao ni do promjene obrasca polipeptidnih vrpci na poliakrilamidnom gelu. Razlika se očituje samo u čistoći mistranslatiranog u odnosu na nemistranslatirani uzorak. Takvi rezultati ukazuju da je topiva frakcija mistranslatiranog proteina jednako stabilna kao i nativni protein EF-Tu. No, važno je napomenuti da se ovakvom metodom ne mogu pratiti male konformacijske promjene koje uključuju izlaganje manjeg broja hidrofobnih skupina otapalu. Takve promjene ne moraju dovesti do značajne destabilizacije proteina, ali u slučaju njegove povećane koncentracije može doći do agregacije.

Ono što ostaje nepoznato je postotak mistranslatiranosti proteina EF-Tu u topivoj frakciji. Naime, postoji vjerojatnost da je afinitetnom i gel-filtracijskom kromatografijom dobiven protein manjeg postotka mistranslatiranosti i veće stabilnosti, dok je nestabilnija i ujedno mistranslatiranija frakcija izgubljena tokom pročišćavanja ili pak ukonjena adaptivnim staničnim mehanizmima. Kako bi

se ustvrdio postotak mistranslacije dobivenog uzorka bilo bi potrebno provesti analizu spektometrijom masa topive frakcije, dobivene nakon afinitetne i gel filtracijske kromatografije. S druge strane analizom spektrometrije masa agregirane frakcije proteina, koja je zaostala u talogu prilikom pripreme ukupnog proteinskog ekstrakta za afinitetnu kromatografiju, te agregirane frakcije koja je s gel-filtracijske kolone izašla u praznom volumenu, mogao bi se dobiti uvid u postotak mistranslatiranosti proteina EF-Tu potencijalno sklonijeg agregaciji.

SDS-PAGE analiza frakcija dobivenih nakon afinitetne kromatografije proteinskog ekstrakta izoliranog iz D345A EF-Tu-C-His_6 *E. coli* soja uzgajanog u fiziološkim uvjetima pokazala je da dolazi do kopurifikacije proteina molekulske mase ~25 i ~30 kDa za koje pretpostavljam da su metalovezujući protein YodA i šaperon Hsp31 (Slika 5.13) (detaljno prikazano u poglavljima 5.6 i 5.7). S druge strane prilikom pročišćavanja mistranslatiranog uzoraka dolazi do značajno manje kopurifikacije ta dva proteina (Slika 5.14). Analiza strukture proteina YodA (Slika 6.4) i pretraživanje proteinskih interakcija pomoću IntAkt web-programa, koji pruža otvoren izvor informacija i alata za analizu molekulskih interakcija, sugerira da je njegova kopurifikacija posljedica njegovog veznog mjesta za metalne ione, a ne interakcije s proteinom EF-Tu. Naime, kao metalovezujući protein, YodA sadrži vezno mjesto za ione metala građeno od 4 histidinska bočna ogranka (David i sur, 2003), koji onda omogućuju i vezanje na Ni^{2+} ione NTA-agaroze (Slika 5.13). Tome u prilog ide i činjenica da se prilikom gel-filtracijske kromatografije u najvećoj mjeri YodA purificira zasebno, a ne zajedno s proteinom EF-Tu.

S druge strane, također pomoću IntAkt web-programa, potvrđeno je da EF-Tu interagira sa šaperonom Hsp31. Naime, istraživanja su pokazala da Hsp31 omogućuje pravilno smatanje i stabilizaciju proteina EF-Tu u stresnim uvjetima koji dovode do narušavanja strukture proteina (Malki i sur, 2005). Stoga bi se možda moglo pretpostaviti da je njegova kopurifikacija posljedica interakcije s proteinom EF-Tu, no da bi se ta pretpostavka potvrdila potrebno je provesti dodatne analize koje su predložene i detaljno objašnjene u poglavlju 5.7.



Slika 6.4. Trodimenzionalna struktura metalovezujućeg proteina YodA *E. coli*. Plavom bojom su označeni histidinski bočni ogranci koji koordiniraju metalni ion nikla, a narančastom bojom leucinski bočni ogranci. Ion nikla prikazan je crvenom kuglicom (Niedzialkowska i sur, 2016) (*PDB ID*: 4TNN).

Manja kopurifikacija proteina YodA i Hsp31 u slučaju mistranslatiranog uzorka može biti posljedica njihove manje ekspresije u mistranslatirajućim uvjetima ili njihove destabilizacije uslijed mistranslacije (narušavanjem tercijarne strukture proteina YodA onemogućuje se i njegovo vezanje na ione nikla). Važno je napomenuti da kopurifikacija proteina YodA daje krivu sliku o količini ekspresije endogenog proteina EF-Tu u nemistranslatirajućim uvjetima. Budući da se veže na ione nikla zauzima vezna mjesta proteinu EF-Tu, što daje dojam njegove manje ekspresije.

U konačnici je važno istaknuti da je količina proteina EF-Tu izolirana iz mutanta D345A uzgajanog u prisutnosti norvalina afinitetnom kromatografijom, puno manja od njegove količine izolirane iz istog broja bakterijskih stanica mutanta uzgajanog u fiziološkim uvjetima (rezultati prikazani u poglavljima 5.5 i 5.6). Također, takav odnos je očuvan i nakon dodatnog pročišćavanja uzoraka gel-filtracijskom kromatografijom (poglavlje 5.7). Ovime su potvrđeni rezultati Western Blot analize koji ukazuju na smanjenu ekspresiju/akumulaciju proteina EF-TuB obilježenog histidinskim privjeskom u mistranslatirajućim uvjetima (detaljno diskutirano u prethodnom poglavlju).

6.4.Rezultati simulacija molekulske dinamike potvrđuju stabilnost mistranslatiranog proteina EF-Tu

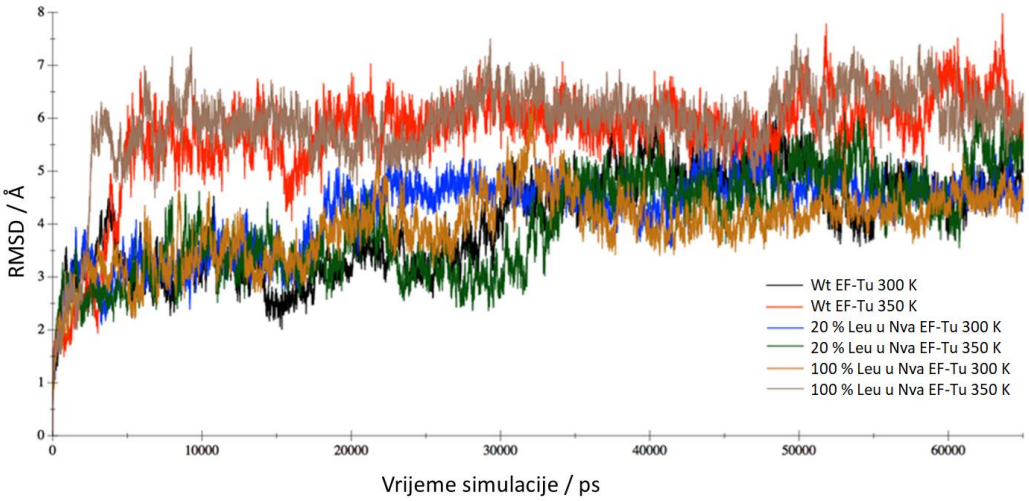
Utjecaj mistranslacije Nva na stabilnost strukture elongacijskog faktora Tu dodatno je provjerena računalnom simulacijom molekulske dinamike (MD)*. Napravljena su tri modela modelnog proteina EF-Tu: divlji tip proteina, EF-Tu kojem je svih 28 leucina zamijenjeno norvalinom te EF-Tu kojem je nasumičnim odabirom 20% leucinskih pozicija zamijenjeno norvalinom (Tablica 8). Prilikom izrade modela koji je 20% mistranslatiran, norvalin je uveden ne leucinske pozicije 36, 121, 176, 265, 312 i 373. Simulacije svih proteinskih modela su provedene pri temperaturama od 37 °C i 77 °C. Stabilnost proteina provjerena je analizom RMSD vrijednosti, očuvanosti sekundarnih struktura te analizom prosječnog broja vodikovih veza i ionskih mostova koji se ostvaruju tijekom simulacije molekulske dinamike.

Tablica 6.2. Modeli proteina EF-Tu korišteni za simulaciju molekulskom dinamikom te temperature pri kojima su MD simulacije provođene.

Model proteina EF-Tu	Temperatura (K)	Temperatura (°C)
Divlji tip EF-Tu	310	37
Divlji tip EF-Tu	350	77
EF-Tu s 20% Leu zamjenjenih s Nva	310	37
EF-Tu s 20% Leu zamjenjenih s Nva	350	77
EF-Tu s 100% Leu zamjenjenih s Nva	310	37
EF-Tu s 100% Leu zamjenjenih s Nva	350	77

RMSD vrijednost (engl. *Root mean square deviation*) je mjera udaljenosti ekvivalentnih atoma dviju struktura, a samim time i mjera njihove sličnosti. U ovom slučaju je RMSD vrijednost izračunata fluktuacijom simuliranih struktura pri različitim temperaturama, u odnosu na početnu strukturu, dobivenu nakon minimizacije energije. Dobivene RMSD vrijednosti za modele simulirane pri 37 °C (Slika 6.5) se ne razlikuju značajno, što govori o očuvanosti strukture bez obzira na uvedeni Nva. Kao što je vidljivo na Slici 6.5 samo divlji tip i model kojem je 100 % leucina zamjenjeno norvalinom nešto značajnije mijenjaju svoju strukturu pri 77 °C. No, ta promjena u RMSD vrijednosti nije toliko velika da bi se moglo govoriti o velikim konformacijskim promjenama izazvanim mistranslacijom. Važno je napomenuti da su simulacije izvođene relativno kratko (65 ns) te da postoji mogućnost da nisu uzorkovane sve konformacijske promjene sustava pri danim temperaturama.

** Simulacije molekulske dinamike provela je dr. sc. Aleksandra Maršavelski.*



Slika 6.5. Grafički prikaz izračunatih RMSD vrijednosti simuliranih struktura triju EF-Tu modela. Simulacije su provedene pri 37°C i 77°C. RMSD vrijednosti izračunate su fluktuacijom simuliranih struktura pri različitim temperaturama u odnosu na početnu strukturu.

Analizom prosječnog broja ionskih mostova je uočeno da dolazi do njihovog porasta s porastom temperature u svim simuliranim modelima. Prema Tablici 6.3 je vidljivo da jača mistranslacija norvalinom dovodi do smanjenja broja vodikovih veza pri 37 °C. Također, u slučaju 100 % mistranslacije pri 77 °C broj prosječnih ionskih veza je za 10 veći, a takvo značajnije povećanje ide u prilog povećanoj stabilnosti uslijed uvođenja norvalina.

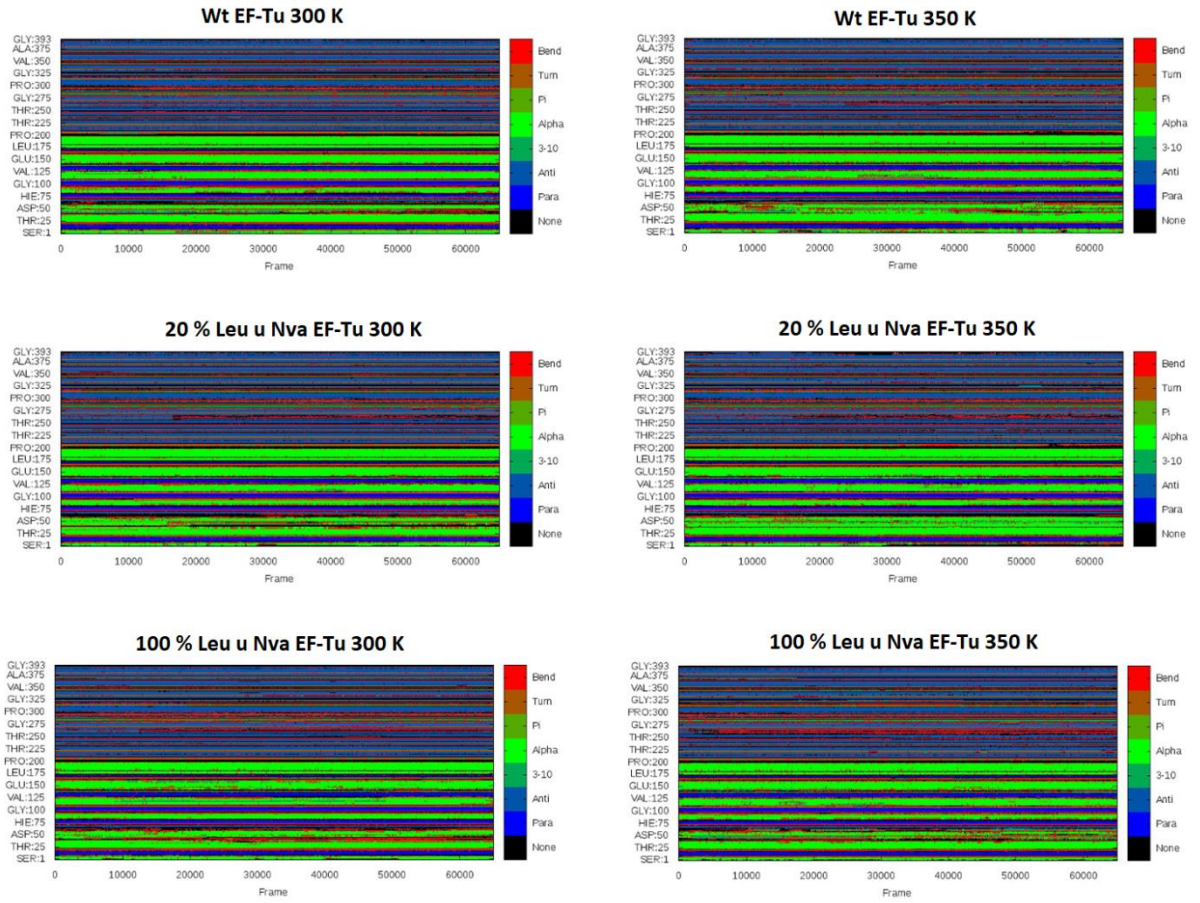
Tablica 6.3. Prosječan broj vodikovih veza i ionskih mostova koji se ostvaruju u proteinu EF-Tu tijekom 65000 ps simulacije molekulske dinamike.

Model proteina EF-Tu i temperatura pri kojoj je izvođena MD	**Prosječan broj vodikovih veza**	**Prosječan broj ionskih mostova**
Divlji tip EF-Tu 37 °C	183	38
Divlji tip EF-Tu 77 °C	185	44
EF-Tu s 20% Leu zamjenjenih s Nva 37 °C	187	40
EF-Tu s 20% Leu zamjenjenih s Nva 77 °C	182	43
EF-Tu s 100% Leu zamjenjenih s Nva 37 °C	181	37
EF-Tu s 100% Leu zamjenjenih s Nva 77 °C	184	47

Analiza očuvanosti sekundarnih struktura (Slika 6.6) tijekom MD simulacije pri 37 °C je pokazala da ne dolazi do značajne promjene u očuvanosti sekundarnih struktura između modela kojem je 20 % i 10 % Leu zamjenjeno Nva i divljeg tipa proteina EF-Tu.

Svi ovi rezultati simulacija ukazuju da zamjena leucina norvalinom ne dovodi do značajne destabilizacije strukture elongacijskog faktora Tu. Međutim, ono što ovim simulacijama nije provjereno je izlaganje manjeg broja hidrofobnih skupina otapalu, koje bi u slučaju povećane koncentracije nepravilno smotanih proteina u citoplazmi, mogle dovesti do agregacije. Nadalje, ne može se sa sigurnošću tvrditi ni da je ponašanje mistranslatiranog proteina EF-Tu na makroskopskoj razini (u citoplazmi) jednako ponašanju na mikroskopskoj razini na kojoj su provedene simulacije. Naime, simuliran je sustav koji se sastoji od jedne molekule EF-Tu u vodenoj otopini simulacijske prizme, stoga njegova interakcija s drugim mistranslatiranim proteinima EF-Tu ovom metodom ostaje neistražena. Simulacija mistranslatiranog proteina EF-Tu okruženog drugim mistranslatiranim EF-Tu molekula zahtjeva izrazito složeni račun i veliku računalnu snagu stoga ga nije moguće prikazati molekulskom dinamikom.

Važno je istaknuti i da su simulacije provođene u polju sila koji ne posjeduje ugrađene parametre za aminokiselinu norvalin, već je on u polje sila uveden modifikacijom parametara za leucin. Takva nedostatnost parametrizacije također može dovesti do potencijalnog akumuliranja pogrešaka tijekom MD simulacije.



Slika 6.6. Grafički prikaz očuvanosti sekundarnih struktura tijekom simulacija molekulske dinamike triju modela proteina EF-Tu . Simulacije su provedene pri temperaturama od 37°C i 77°C.

Može se zaključiti da su rezultati molekulske dinamike potvrdili stabilnost mistranslatiranog proteina EF-Tu, koja je uočena i eksperimentima provedenim u uvjetima *in vivo* i *in vitro*. Takvi rezultati ni ne čude, s obzirom je je EF-Tu jedan od esencijalnih staničnih proteina, čije je održavanje stabilnosti u stanici nužno za njezino preživljenje (revijalno prikazano u Kavaliuskas i sur, 2012). Dobivene rezultate molekulske dinamike, koji ukazuju na stabilnost proteina EF-Tu kojem su sve leucinske pozicije zamijenjene norvalinom, treba dodatno provjeriti eksperimentom. Budući da tokom provođenja *in vitro* i *in vivo* eksperimenata nije određivan postotak mistranslacije molekula EF-Tu, ostaje nepoznato je li potpuno mistranslatiran protein EF-Tu stabilan i u okruženju s drugim mistranslatiranim proteinima. Potpuniju informaciju može dati analiza spekrometrijom masa izoliranih uzoraka i proteinskih agregata.

7. Zaključak

- Potvrđen je inhibitorski učinak norvalina na rast bakterijskog soja D345A EF-Tu-C-His_6 bakterije *E. coli*, koji posjeduje inaktivnu deacilacijsku domenu LeuRS. Povišena koncentracija norvalina u citoplazmi postignuta je umjetno, egzogenim dodatkom Nva u minimalnim medij. U slučaju uzgoja navedenog mutanta u mediju koji sadrži 300 μmol dm^{-3} norvalina uočen je blagi inhibitorni učinak na rast, dok je u slučaju prisutnosti 1,5 mmol dm^{-3} Nva njegov rast gotovo u potpunosti inhibiran. Ukoliko u medij nije dodan norvalin, rast mutanta D345A EF-Tu-C-His_6 ne razlikuje se od rasta divljeg tipa Wt EF-Tu-C-His_6. Dobivene krivulje rasta pokazale su i mali inhibitorni učinak Nva na rast divljeg tipa. No, utjecaj na njegovu vijabilnost značajno je manji od utjecaja na rast mutanta koji ne posjeduje aktivnu deacilacijsku domenu LeuRS.

- Western Blot analizom nije uočena povećana agregacija modelnog proteina EF-Tu u mistranslatirajućim uvjetima u odnosu na nemistranslatirajuće.

- Primijećena je smanjena količina proteina EF-TuB obilježenog histidinskim privjeskom u soju D345A EF-Tu-C-His_6 *E. coli* uzgajanog u prisutnosti Nva. Njegova razina opada s povišenjem koncentracije dodanog norvalina. Suprotno tome, razina EF-TuB ostaje nepromijenjena u slučaju divljeg tipa uzgajanog u prisutnosti istih rastućih koncentracija Nva.

- Nije utvrđeno značenje smanjenja razine proteina EF-Tu niti kako do nje dolazi. Naime, EF-Tu je kodiran s dva gena *tufA* i *tufB* koji se strukturno i funkcionalno ne razlikuju, a budući da u našem eksperimentu protein *EF-TuA* nije obilježen, ne postoji informacija o njegovoj razini u mistranslatirajućim uvjetima. Ukoliko bi se eksperimentalno dokazalo da je i njegova razina u mistranslatirajućim uvjetima smanjena, moglo bi se govoriti o smanjenoj biosintezi proteina kao staničnom odgovoru na mistranslaciju.

- Metodama gel-filtracijske analize i limitirane proteolize tripsinom nije uočena smanjena stabilnost i značajna konformacijska promjena mistranslatiranog proteina EF-Tu u odnosu na nemistranslatirani. Dobiveni uzorak mistranslatiranog proteina EF-Tu nije podvrgnut analizi spektrometrijom masa stoga nije poznat postotak njegove mistranslacije. Postoji mogućnost da je dobiveni uzorak mistranslatian u manjoj mjeri dok je mistranslatiraniji i nestabilniji EF-

Tu izgubljen tijekom pročišćavanja ili pak uklonjen staničnim mehanizmima odmah nakon terminacije translacije.

- Glavni problem ovako dizajniranog eksperimenta je što mistranslacija utječe na sve stanične proteine, a to značajno otežava praćenje pojedinačnih učinaka. Također, budući da je agregacija proteina unutar citoplazme toksična, stanica mora aktivirati određene mehanizme koji će osigurati uklanjanje nestabilnih proteina sklonih agregaciji. Sve to značajno otežava praćenje utjecaja mistranslacije na stabilnost pojedinačnih proteina.

- Računalnim simulacijama molekulske dinamike nije primijećena razlika u konformaciji i stabilnosti proteina EF-Tu kojima je 20% ili 100% leucina zamjenjeno norvalinom u odnosu na divlji tip.

- Prema svim dobivenim rezultatima, može se zaključiti da EF-Tu nije dobar modelni protein za izučavanje utjecaja Nva na njegovu stabilnost *in vivo*, budući da stanice vjerojatno posjeduju mehanizme kojima osiguravaju njegovu stabilnost. S druge strane, on može poslužiti kao dobar markerski protein za izučavanje biološkog odgovora bakterijske stanice na mistranslacijski stres.

8. Literatura

1. Allen, E.H., Glassman, E. & Schweet, R.S. Incorporation of amino acids into ribonucleic acid. I. The role of activating enzymes. *J. Biol. Chem.* **235**, 1061-1067 (1960).

2. Akmačić, I. Kloniranje i izolacija elongacijskog faktora tu iz bakterije *Escherichia coli* te ispitivanje interakcija s aminoaciliranom $tRNA^{Leu}$. Sveučilište u Zagrebu, 2012.

3. Andersson, S.G.E. & Kurland, C.G. Codon preferences in free-living microorganisms. *Microbiol. Rev.* **54**, 198–210 (1990).

4. Anfinsen, C. B. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**, 223–230 (1973).

5. Agashe, V. R., Guha, S., Chang, H. C., Genevaux, P., Hayer-Hartl, M., Stemp, M., Georgopoulos, C., Hartl, F. U., and Barral & J. M. Function of trigger factor and DnaK in multidomain protein folding. Increase in yield at the expense of folding speed. *Cell* **117**, 199–209 (2004).

6. Agris, P.F. Bringing order to translation: the contributions of transfer RNA anticodon-domain modifications. *EMBO Rep.* **9**, 629-635 (2008).

7. Arnez, J.G. & Moras, D. Structural and functional considerations of the aminoacylation reaction. *Trends. Biochem. Sci.* **22,** 211-216 (1997).

8. Asahara, H. & Uhlenbeck, O. C. The tRNA specificity of *Thermus thermophilus* EF-Tu. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99,** 3499–504 (2002).

9. Bacher, J. M., Waas, W. F., Metzgar, D., De Crécy-Lagard, V. & Schimmel, P. Genetic code ambiguity confers a selective advantage on *Acinetobacter baylyi*. *J. Bacteriol.* **189,** 6494–6496 (2007).

10. Balen, B. Pavoković, D. Peharec Štefanić, P. i Krsnik-Rasol, M. Elektroforetske tehnike istraživanja proteina. Hrvatska sveučilišna naklada, Zagreb (2011).

11. Banerjee, R., Chen, S., Dare, K., Gilreath, M., Praetorius-Ibba, M., Raina, M., Reynolds, N.M., Rogers, T., Roy, H., Yadavalli, S. S. & Ibba, M. tRNAs: Cellular barcodes for amino acids. *FEBS Lett.* **584,** 387–395 (2010).

12. Berg, P., Bergmann, F.H., Ofengand, E.J. & Dieckmann, M. The enzymic synthesis of amino acyl derivatives of ribonucleic acid. I. The mechanism of leucyl-, valyl-, isoleucyl- and methionyl ribonucleic acid formation. *J. Biol. Chem*. **236**, 1726-1734 (1960).

13. Biluš, M. Mehanizam diskriminacije prirodnih proteinogenih i neproteinogenih nepripadnih aminokiselina kod aminoacil-trnasintetaza razreda IA. Sveučilište u Zagrebu, (2016).

14. Blank, A., Gallant, J. A., Burgess, R. R. & Loeb, L. A. An RNA polymerase mutant with reduced accuracy of chain elongation. *Biochemistry* **25**, 5920–5928 (1986).

15. Boniecki, M.T., Vu, M.T., Betha, A.K. i Martinis, S.A. CP1-dependent partitioning of pretransfer and post-transfer editing in leucyltRNA synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 19223–19228 (2008).

16. Bosch, L., Kraal, B., Van der Meide, P. H., Duisterwinkel, F. J., Van Noort, J. M. The elongation factor EFTu and its two encoding genes. Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Res. **30**, 91–9126 (1983).

17. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. **72**, 248-54 (1976).

18. Brick, P., Bhat, T. N. & Blow, D. M. Structure of tyrosyl-tRNA synthetase refined at 2.3 A resolution. Interaction of the enzyme with the tyrosyl adenylate intermediate. J. Mol. Biol. **208**, 83–98 (1989).

19. Brockwell, D. J. & Radford, S. E. Intermediates: Ubiquitous species on folding energy landscapes? *Curr. Opin. Struct. Biol.* **17**, 30–37 (2007).

20. Browne, G. J. & Proud, C. G. Regulation of peptide-chain elongation in mammalian cells. *Eur. J. Biochem.* **269**, 5360–5368 (2002).

21. Bukau, B., Deuerling, E., Pfund, C. & Craig, E. A. Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell* 101, 119–22 (2000).

22. Bullwinkle, T., Lazazzera, B. & Ibba, M. Quality Control and Infiltration of Translation by Amino Acids Outside of the Genetic Code. *Annu. Rev. Genet.* **48,** 149–166 (2014).

23. Carter, A. P., Clemons, W. M. J., Brodersen, D. E., Morgan-Warren, R., Wimberly, B. T. & Ramakrishnan, V. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interaction with antibiotics. *Nature* **407**, 340-348 (2000).

24. Cavarelli, J., Eriani, G., Rees, B., Ruff, M.,Boeglin, M., Mitschler, A., Martin, F., Gangloff, J., Thierry, J.T. & Moras, D. The active site of yeast aspartyl-tRNA synthetase: structural and functional aspects of the aminoacylation reaction. *EMBO J.* **13,** 327–37 (1994).

25. Chang, H. C., Tang, Y. C., Hayer-Hartl, M. & Hartl, F. U. Snap-Shot: Molecular chaperones, Part I. *Cell* **128**, 212 (2007).

26. Chen, J. F., Guo, N. N., Li, T., Wang E. D. & Wang Y. L. CP1 domain in *Escherichia coli* leucyl-tRNA synthetase is crucial for its editing function. *Biochemistry* **39,** 6726-6731 (2000).

27. Cusack, S. Aminoacyl-tRNA synthetases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 881–889 (1997).

28. Cusack, S., Yaremchuk, A. i Tukalo, M. The 2 A crystal structure of leucyl-tRNA synthetase and its complex with a leucyl-adenylate analogue. *EMBO J* **19**, 2351 – 2361 (2000).

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

30. Cvetešić, N. Mehanizmi popravka pogreške leucil-trna-sintetaze sprječavaju nekanonsku mistranslaciju proteoma bakterije *Escherichia coli*. Sveučilište u Zagrebu, (2015).

31. Cvetešić, N., Palencia, A., Halasz, I., Cusack, S. & Gruić Sovulj, I. The physiological target for LeuRS translational quality control is norvaline. *EMBO J.* **33,** 1639–1653 (2014).

32. Cvetešić, N., Semanjski, M., Soufi, B., Krug, K. Gruić Sovulj, I. & Maček, B. Proteome-wide measurement of non-canonical bacterial mistranslation by quantitative mass spectrometry of protein modifications. *Sci. Rep.* **6,** 28631 (2016).

33. David, G., Blondeau, K., Schiltz, M., Penel, S. & Lewit-Bentley, A. YodA from Escherichia coli is a Metal-binding, Lipocalin-like Protein. *J. Biol. Chem.* **278,** 43728–43735 (2003).

34. Dobson, C. M. Protein folding and misfolding. *Nature* **426**, 884–890 (2003).

35. Dobson, C. M., Sali, A. & Karplus, M. Protein folding: a perspective from theory and experiment. *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**, 868–93 (1998).

36. Drummond, D. A. & Wilke C. O. The evolutionary consequences of erroneous protein synthesis *Nat. Rev. Genet.* **10**, 715-724 (2009).

37. Eargle, J., Black, A. A., Sethi, A., Trabuco, L. G. & Luthey-Schulten, Z. Dynamics of Recognition between tRNA and Elongation Factor Tu. *J. Mol. Biol.* **377,** 1382–1405 (2008).

38. Elcock, A. H. Molecular simulations of cotranslational protein folding: Fragment stabilities, folding cooperativity, and trapping in the ribosome. *PLoS Comput. Biol.* 2, e98 (2006).

39. Fersht, A.R. & Kaethner, M. M. Mechanism of aminoacylation of tRNA. Proof of the aminoacyl adenylate pathway for the isoleucyl- and tyrosyl-tRNA synthetases from Escherichia coli K12. Biochemistry **15**, 818–823 (1976).

40. Fink, A. L. Protein aggregation: Folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Fold. Des.* **3,** 9–23 (1998).

41. Fluitt, A., Pienaar, E. & Viljoen, H. Ribosome kinetics and aa-tRNA competition determine rate and fidelity of peptide synthesis. *Comput. Biol. Chem*. **31**, 335–346 (2007).

42. Frank, J., Sengupta, J., Gaoa, H., Li, W., Valle, M., Zavialov, A. & Ehrenberg, M. The role of tRNA as a molecular spring in decoding, accommodation, and peptidyl transfer. *FEBS Lett.* **579,** 959–962 (2005).

43. Frydman, J. Folding of newly translated proteins *in vivo*: the role of molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 603–47 (2001).

44. Giege, R., Sissler, M. & Florentz, C. Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity. *Nucleic Acid Res.* **26**, 5017–5035 (1998).

45. Gromadski, K., Wieden, H., and Rodnina, M. Kinetic mechanism of elongation factor Ts-catalyzed nucleotide exchange in elongation factor Tu. *Biochemistry* **41**, 162-169 (2002).

46. Grossman, A. D., Erickson, J. W. & Gross, C. A. The htpR gene product of *E. coli* is a sigma factor for heat-shock promoters. *Cell* **38**, 383–390 (1984).

47. Haass, C. & Selkoe, D. J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: Lessons from the Alzheimer's amyloid b-peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **8**, 101–112 (2007).

48. Hartl, F. U. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**, 571–580 (1996).

49. Hartl, F. U. & Hayer-Hartl, M. Converging concepts of protein folding *in vitro* and *in vivo*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16,** 574–581 (2009).

50. Hartl, F. U., Bracher, A. & Hayer-Hartl, M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* **475,** 324–332 (2011).

51. Henkin, T. M. & Yanofsky, C. Regulation by transcription attenuation in bacteria: How RNA provides instructions for transcription termination/antitermination decisions. *BioEssays* **24,** 700–707 (2002).

52. Hoagland, M. Biochemistry or molecular biology? The discovery of 'soluble RNA'. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 77–80 (1996).

53. Horwich, A. L., Fenton, W. A., Chapman & E., Farr, G. W. Two families of chaperonin: Physiology and mechanism. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **23**, 115–145 (2007).

54. Ibba, M. & Soll, D. Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu. Rev. Biochem*. **69**, 617-650 (2000).

55. Ibba M. & Soll, D. Quality control mechanisms during translation. *Science* **286**, 1893-1897 (1999).

56. Irwin, M. J., Nyborg, J., Reid B. R. & Blow, D. M. The crystal structure of tyrosyl-transfer RNA synthetase at 2–7 A resolution. *J. Mol. Biol.* **105**, 577–586 (1976).

57. Jakubowski, H. & Goldman, E. Editing of Errors in Selection of Amino Acidsfor Protein Synthesis. *Microbiol. Rev.* 56 (3), 412-429 (1992).

58. Ji, Q. Q., Fang, Z. P., Ye, Q., Chi, C. W. & Wang, E. D. Self-protective responses to norvaline-induced stress in a leucyl-tRNA synthetase editing-deficient yeast strain. *Nucleic Acids Res.* **45,** 7367–7381 (2017).

59. Jones, T. E., Alexander, R. W. & Pan, T. Misacylation of specific nonmethionyl tRNAs by a bacterial methionyl-tRNA synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108,** 6933–6938 (2011).

60. Jones, M. D., Petersen, T. E., Nielsen, K. M., Magnusson, S., Sottrup-Jensen, L., Causing, K. & Clark, B. F. *C. Eur. J. Biochem.* **108***,* 507 – 526 (1980).

61. Kalapis, D., Bezerra, A. R., Farkas, Z., Horvath, P., Bódi, Z., Daraba, A., Szamecz, B., Gut, I., Bayes, M., Santos, M. A. S. & Pál, C. Evolution of Robustness to Protein Mistranslation by Accelerated Protein Turnover. *PLoS Biol.* **13,** 1–28 (2015).

62. Karkhanis, V. A., Mascarenhas, A. P. & Martinis, S. A. Amino Acid Toxicities of *Escherichia coli* that are prevented by leucyl-tRNA synthetase amino acid editing. *J. Bacteriol.* **189**, 8765–8768 (2007).

63. Karve, T. M. & Cheema, A. K. Small Changes Huge Impact: The Role of Protein Posttranslational Modifications in Cellular Homeostasis and Disease. *J. Amino Acids* **2011,** 1–13 (2011).

64. Kavaliauskas, D., Nissen, P. & Knudsen, C. R. The busiest of all ribosomal assistants: Elongation factor Tu. *Biochemistry* **51,** 2642–2651 (2012).

65. Keil, B. Specificity of proteolysis. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg, New York (1992).

66. Kim, Y. E., Hipp, M. S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M. & Ulrich Hartl, F. Molecular Chaperone Functions in Protein Folding and Proteostasis. *Annu. Rev. Biochem.* **82,** (2013).

67. Kisumi, M., Sugiura, M. & Chibata, I. Biosynthesis of norvaline, norleucine, and homoisoleucine in Serratia marcescens. *J. Biochem.* **80,** 333–339 (1976).

68. Kjeldgaard, M., Nissen, P., Thirup, S. & Nyborg, J. The crystal structure of elongation factor EF-Tu from Thermus aquaticus in the GTP conformation. *Structure* **1,** 35–50 (1993).

69. Kjeldgaard, M., & Nyborg, J. Refined structure of elongation factor EF-Tu from Escherichia coli, *J. Mol. Biol.* **23**, 721-742 (1992).

70. Krab, I. M. & Parmeggiani, A. Mechanisms of EF-Tu, a pioneer GTPase. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **71**, 513–551 (2002).

71. Kramer, G., Boehringer, D., Ban, N. & Bukau, B. The ribosome as a platform for co-translational processing, folding and targeting of newly synthesized proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 589–597 (2009).

72. LaRiviere, F. J., Wolfson A. D. & Uhlenbeck, O. C. Uniform binding of aminoacyl-tRNAs to elongation factor Tu by thermodynamic compensation. *Science* **294**, 165–168 (2001).

73. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature **227**, 680–685* (1970).

74. Lee, J. S., An, G., Friesen, F. D. & Fiil, N.P. Location of the *tufB* promoter of *Escherichia coli*: cotranscription of tufB with four transfer RNA genes. *Cell* **25**, 251–258 (1981).

75. Lee, J. W., Beebe, K., Nangle, L. A., Jang, J., Longo-Guess, C. M., Cook, S. A., Davisson, M. T., Sundberg, J. P., Schimmel, P. & Ackerman, S. L. Editing-defective tRNA synthetase causes protein misfolding and neurodegeneration. *Nature* **443**, 50–55 (2006).

76. Li, L., Boniecki, M. T., Jaffec, J. D., Imaid, B. S., Peter M. Yaud, P. M., Luthey-Schultena, Z. A. & Martinis, S.A. Naturally occurring aminoacyl-tRNA synthetases editing-domain mutations that cause mistranslation in Mycoplasma parasites. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108,** 9378–9383 (2011).

77. Lincecum, T. L., Tukalo, Jr. M., Yaremchuk, A., Mursinna, R. S., Williams, A. M., Sproat, B. S., Van Den Eynde, W., Link, A., Van Calenbergh, S., Grotli, M., Martinis, S. A. & Cusack, S. Structural and mechanistic basis of pre- and posttransfer editing by leucyl-tRNA synthetase. *Mol. Cell.* **11,** 951-963 (2003).

78. Lindahl, L., Post, L., Zengel, J., Gilbert, S. F., Strycharz, W. A. & Nomura, M. Mapping of ribosomal protein genes by in vitro protein synthesis using DNA fragments of kfus3 transducing phage DNA as templates. *J. Mol. Biol.* **252**, 7365-7383 (1977).

79. Liu, Y., Liao, J., Zhu, B., Wang, E.-D. & Ding, J. Crystal structures of the editing domain of Escherichia coli leucyl-tRNA synthetase and its complexes with Met and Ile reveal a lock-and-key mechanism for amino acid discrimination. *Biochem. J.* **394,** 399–407 (2006).

80. Loftfield, R. B. & Vanderjagt, D. The frequency of errors in protein biosynthesis. *Biochem. J.* **128**, 1353–1356 (1972).

81. Lue, S. W. & Kelley, S. O. An aminoacyl-tRNA synthetase with a defunct editing site. *Biochemistry* **44**, 3010–3016 (2005).

82. Maček, B. & Mijaković, I. Site-specific analysis of bacterial phosphoproteomes. *Proteomics* **11**, 3002–3011 (2011).

83. Martinez-Force, E. & Benitez, T. Effects of varying media, temperature, and growth rates on the intracellular concentrations of yeast amino acids. *Biotechnol. Prog.* ***11***, 386–392 (1995).

84. Martinez-Hackert, E. & Hendrickson, W. A. Promiscuous substrate recognition in folding and assembly activities of the trigger factor chaperone. *Cell* **138**, 923–934 (2009).

85. Meriin, A. B., Mense, M., Colbert, J. D., Liang, F., Bihler, H., Zaarur, N., Rock, K. L. & Sherman, M. Y. A novel approach to recovery of function of mutant proteins by slowing down translation. *J. Biol. Chem.* **287,** 34264–34272 (2012).

86. Miller, D., & Weissbach, H. Factors involved in the transfer of aminoacyl-tRNA to the ribosome, in Molecular Mechanisms in Protein Biosynthesis. Academic Press, New York (1977).

87. Mohler, K. & Ibba, M. Translational fidelity and mistranslation in the cellular response to stress. *Nat. Microbiol.* **2,** 17117 (2017).

88. Nakamura, S., Arai, K., Takahashi, K. & Kaziro, Y. Alignment of the tryptic fragments and location of sulfhydryl groups of the polypeptide chain elongation factor Tu. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **77**, 1418-1424 (1977).

89. Nandi, P. & Sen, G. P. An Antifungal Substance from a Strain of *B. subtilis*. *Nature* **172,** 871-872 (1953).

90. Nelson, D. L. & Cox, M. M. Principles of Biochemistry. W. H. Freeman, New York (2008).

91. Netzer, N., Goodenbour, J. M., David, A., Dittmar, K. A., Jones, R. B., Schneider, J. R., Boone, D., Eves, E. M, Rosner, M. R., Gibbs, J.S., Embry, A., Dolan, B., Das, S., Hickman, H. D., Berglund, P., Bennink, J. R., Yewdell, J. W., Pan, T. Innate immune and chemically triggered oxidative stress modifies translational fidelity. *Nature* **462,** 522–526 (2009).

92. Netzer, W. J. & Hartl, F. U. Recombination of protein domains facilitated by co-translational folding in eukaryotes. *Nature* **388**, 343–349 (1997).

93. Niedzialkowska,E., Gasiorowska, O., Handing, K. B., Majorek, K. A., Przemyslaw, J., Porebski, P.J., Shabalin, I. G., Zasadzinska, E., Cymborowski, M. & Minor, W. Protein purification and crystallization artifacts: The tale usually not told. *Protein Sci.* **25,** 720–733 (2016).

94. Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B. & Steitz, T. A. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* **289**, 920–930 (2000).

95. Nissen, P., Thirup, S., Kjeldgaard, M. & Nyborg, J. The crystal structure of Cys-tRNA(Cys)-EF-Tu-GDPNP reveals general and specific features in the ternary complex and in tRNA. *Structure* **7,** 143–156 (1999).

96. Palencia, A., Crepin T., Vu, M. T., Lincecum, T. L., Martinis, S. A. i Cusac, S. Structural dynamics of the aminoacylation and proofreading functional cycle of bacterial leucyl-tRNA synthetase. *Nature* **19**, 677-684 (2012).

97. Pang, Y. L., Abo, R., Levine, S. S. & Dedon, P. C. Diverse cell stresses induce unique patterns of tRNA up- and down-regulation: tRNA-seq for quantifying changes in tRNA copy number. *Nucleic Acids Res.* 42, e170 (2014).

98. Pape, T., Wintermeyer, W. & Rodnina, M. Induced fit in initial selection and proofreading of aminoacyl-tRNA on the ribosome. *EMBO J.* **18**, 3800–3807 (1999).

99. Parker, J. Errors and alternatives in reading the universal genetic code. *Microbiol. Rev.* **53**, 273–298 (1989).

100. Pearl, L. H. & Prodromou, C. Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu. Rev. Biochem*. **75**, 271–294 (2006).

101. Pereira, S. F. F., Gonzalez, R. L. & Dworkin, J. Protein synthesis during cellular quiescence is inhibited by phosphorylation of a translational elongation factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112,** 3274–3281 (2015).

102. Perona, J.J. & Gruic Sovulj, I. Synthetic and Editing Mechanisms of Aminoacyl-tRNA Synthetases. *Top. Curr. Chem.* **344**, 1-41 (2013).

103. Prashant, K. K. & Simpson, J. Messenger RNA interactions in the decoding center control the rate of translocation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18,** 1300–1302 (2011).

104. Preissler, S. & Deuerling, E. Ribosome-associated chaperones as key players in proteostasis. *Trends. Biochem. Sci.* **37**, 274–283 (2012).

105. Raina, M. & Ibba, M. tRNAs as regulators of biological processes. *Front. Genet*. **5**, 1–14 (2014).

106. Reynolds N. M., Lazazzera B. A. & Ibba, M. Cellular mechanisms that control mistranslation. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 849–856 (2010).

107. Reynolds N. M., Ling, J., Roy, H., Banerjee, R., Repasky, S. E., Hamel, P. & Ibba, M. Cell-specific differences in the requirements for translation quality control. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **107**, 4063–4068 (2010).

108. Ross, W., Vrentas, C. E., Sanchez-Vazquez, P., Gaal, T & Gourse, R. L. The magic spot: A ppGpp binding site on E. coli RNA polymerase responsible for regulation of transcription initiation. *Mol. Cell.* **50**, 420–429 (2013).

109. Ross-Inta, C., Tsai, C. Y. & Giulivi, C. The mitochondrial pool of free amino acids reflects the composition of mitochondrial DNA-encoded proteins: Indication of a posttranslational quality control for protein synthesis. *Biosci. Rep*. **28**, 239–249 (2008).

110. Roy, H., Ling, J. & Ibba, M. Post-transfer editing *in vitro* and *in vivo* by the β subunit of phenylalanyl-tRNA synthetase, *EMBO J*, **23**, 4639-4648 (2004).

111. Santos, M. A. S., Cheesman, C., Costa, V., Moradas-Ferreira, P. & Tuite, M. F. Selective advantages created by codon ambiguity allowed for the evolution of an alternative genetic code in Candida spp. *Mol. Microbiol.* **31,** 937–947 (1999).

112. Scheufler, C., Brinker, A., Bourenkov, G., Pegoraro, S., Moroder, L., Bartunik, H., Hartl, F. U. & Moarefi I. Structure of TPR domain-peptide complexes: Critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell* **101**, 199–210 (2000).

113. Schrader, J., Chapman, S., and Uhlenbeck, O. Tuning the affinity of aminoacyl-tRNA to elongation factor Tu for optimal decoding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 5215-5220 (2011).

114. Siller, E., DeZwaan, D. C., Anderson, J. F., Freeman, B. C. & Barral, J. M. Slowing Bacterial Translation Speed Enhances Eukaryotic Protein Folding Efficiency. *J. Mol. Biol.* **396,** 1310–1318 (2010).

115. Simonetti, A., Marzi, S., Jenner, L., Myasnikov, A., Romby, P., Yusupova, G., Klaholz, B. P. & Yusupov, M. A structural view of translation initiation in bacteria. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 423–436 (2009).

116. Soares, N. C., Spät, P., Krug, K. & Macek, B. Global dynamics of the *Escherichia coli* proteome and phosphoproteome during growth in minimal medium. *J. Proteome Res.* **12**, 2611–2621 (2013).

117. Soini, J., Falschlehner, C., Liedert, C. Bernhardt, J., Vuoristo, J. & Neubauer*, P.* Norvaline is accumulated after a down-shift of oxygen in *Escherichia coli* W3110. *Microb. Cell Fact.* **7,** 30 (2008).

118. Song, H., Parsons, M. R., Rowsell, S., Leonard, G. & Phillips, S. E. Crystal structure of intact elongation factor EF-Tu from Escherichia coli in GDP conformation at 2.05 A resolution. *J. Mol. Biol.* **285,** 1245–1256 (1999).

119. Sprinzl, M., Brock, S., Huang, Y., Milovnik, P., Nanninga, M., Nesper-Brock, M., Rütthard, H. & Szkaradkiewicz, K. Regulation of GTPases in the bacterial translation machinery. *Biol. Chem.* **381,** 367–375 (2000).

120. Srivatsan, A. & Wang J. D. Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**, 100–105 (2008).

121. Stansfield, I., Jones, K. M., Herbert, P., Lewendon, A., Shaw, W. V. & Tuite, M. F. Missense translation errors in Saccharomyces cerevisiae. *J. Mol. Biol.* **282**, 13–24 (1998).

122. Swanson, R., Hoben, P., Sumner-Smith, M., Uemura, H., Watson, L. & Söll, D. Accuracy of in vivo aminoacylation requires proper balance of tRNA and aminoacyl-tRNA synthetase. *Science* **242**, 1548–1551 (1988).

123. Tan, M., Wang, M., Zhou X. L., Yan, W., Eriani, G. & Wang E. D. The Yin and Yang of tRNA: Proper binding of acceptor end determines the catalytic balance of editing and aminoacylation. *Nucleic Acids Res.* **41**, 5513–5523 (2013).

124. Tang, T. & Tirrell, D.A. Attenuation of the editing activity of the *Escherichia coli* leucyl-tRNA synthetase allows incorporation of novel amino acids into proteins in vivo. *Biochemistry* **41,** 10635-10645 (2002).

125. Tukalo, M., Yaremchuk, A., Fukunaga, R., Yokoyama, S. i Cusack, S.The crystal structure of leucyl-tRNA synthetase complexed with $tRNA^{Leu}$ in the post-transfer–editing conformation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 923-930 (2005).

126. Umbarger, H.E. Amino acid biosynthesis and its regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **47**, 532 – 606 (1978).

127. Vabulas, R. M., Raychaudhuri, S., Hayer-Hartl, M. & Hartl, F. U. Protein Folding in the Cytoplasm and the heat shock response. *Cold Spring Harb. Perspect.* Biol. **2**, 1–19 (2010).

128. Van Delft, J. H. M., Paul, J., Bosch, L. & Laboratorium, B. Control of the tRNA-tujB operon in Escherichia coli. **374,** 363–374 (1988).

129. Van Delft, J. H. M., Schmidt, D. S. & Bosch, L. The tRNA-tufB operon transcription termination and processing upstream from tufB. *J. Mol. Biol.* **197**, 647 (1987).

130. Van der Meide, P. H., Vijgenboom, E., Talens, A. & Bosch, L. The Role of EF-Tu in the Expression of tufA and tufB Genes. *Eur. J. Biochem.* **130,** 397–407 (1983).

131. Villa, E., Sengupta, J., Trabuco, L. G., LeBarron, J., Baxter, J. W., Shaikh, T. R., Grassucci, R. A., Nissen, P., Ehrenbergf, M., Schulten, K. & Frank, J. Ribosome-induced changes in elongation factor Tu conformation control GTP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106,** 1063–1068 (2009).

132. Voet, D. & Voet, J. G. Biochemistry. Fourth Edition, John Wiley & Sons, New York (2011).

133. Wandinger, S. K., Richter, K. & Buchner, J. The Hsp90 chaperone machinery. *J. Biol. Chem*. **283**, 18473–18477 (2008).

134. Wiltrout, E., Goodenbour, J. M., Fréchin, M. & Pan, T. Misacylation of tRNA with methionine in Saccharomyces cerevisiae. *Nucleic Acids Res.* **40,** 10494–10506 (2012).

135. Wright, C. F., Teichmann, S. A., Clarke, J. & Dobson, C. M. The importance of sequence diversity in the aggregation and evolution of proteins. *Nature* **438**, 878–881 (2005).

136. Yadavalli, S. S. & Ibba, M. Quality control in aminoacyl-tRNA synthesis, Its role in translational fidelity. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* **86**, 1–43 (2012).

137. Yewdell, J. W. DRiPs solidify: Progress in understanding endogenous MHC class I antigen processing. *Trends. Immunol.* **32**, 548–558 (2011).

138. Zhang, C. M., Perona, J. J., Ryu, K., Francklyn, C., Hou, Y. M. Distinct kinetic mechanisms of the two classes of aminoacyl-tRNA synthetases. *J. Mol. Biol.* **361**, 300-311 (2006).

139. Zimmerman, S. B. & Trach, S. O. Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of Escherichia coli*. J. Mol. Biol.* **222**, 599–620 (1991).

140. Zuo, Y., Wang, Y. & Steitz, T. A. The mechanism of *E. coli* RNA polymerase regulation by ppGpp is suggested by the structure of their complex. *Mol. Cell.* **50**, 430–436 (2013).

141. Zuurmond, A., Rundlof, A., and Kraal, B. Either of the chromosomal tuf genes of *E. coli* K-12 can be deleted without loss of cell viability., Mol. Gen. Genet. **260**, 603-607 (1999).

142. GE Healthcare life sciences Handbooks:
http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/en/GELifeSciences/service-and-support/handbooks/

143. IntAct Molecular Interaction Database
https://www.ebi.ac.uk/intact/

144. UniProt
http://www.uniprot.org/

9. Životopis

Rođena sam u Karlovcu 20. 9. 1993. godine, gdje sam 2012. godine završila Prirodoslovno – matematičku gimnaziju. Iste sam godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala Preddiplomski studij molekularne biologije. Prvostupničku diplomu sam stekla 2015. godine izradom završnog rada: "Uloga tioredoksina u adaptaciji stanice na oksidativni stres", pod vodstvom dr. sc. Ite Gruić Sovulj, izv. prof. te sam iste godine upisala Diplomski studij molekularne biologije. U periodu od studenog 2015. do veljače 2017. godine, zajedno s kolegicom Martom Bošnjaković, volontirala sam na Zavodu za biokemiju, Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, te smo pod vodstvom dr. sc Morane Dulić, doc. izradile rad pod naslovom: "Najmanji analog $tRNA^{Leu}$ koji se može uspješno aminoacilirati leucil-tRNA-sintetazom". Rad je predan na natječaj za Rektorovu nagradu u ak. god 2016./2017, a u srpnju 2017. godine smo primile Rektorovu nagradu u kategoriji individulanog znanstvenog i umjetničkog rada.