

Različite uloge dviju izoleucil-tRNA-sintetaza iz bakterije *Bacillus megaterium* u staničnom odgovoru na stres

Zanki, Vladimir

Doctoral thesis / Disertacija

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:811907>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Vladimir Zanki

**RAZLIČITE ULOGE DVIJU IZOLEUCIL-tRNA-
SINTETAZA IZ BAKTERIJE *Bacillus megaterium* U
STANIČNOM ODGOVORU NA STRES**

DOKTORSKI RAD

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

Zagreb, 2022.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Vladimir Zanki

**DIFFERENT ROLES OF TWO ISOLEUCYL-tRNA
SYNTHETASES FROM *Bacillus megaterium* IN
CELLULAR STRESS RESPONSE**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:
Dr. Ita Gruić Sovulj, Professor

Zagreb, 2022.

Hvala ...

mentorici profesorici Iti Gruić Sovulj, na prilici da izradim ovu disertaciju, te na pomoći i savjetima prilikom izrade i pisanja

svim kolegama na Zavodu za biokemiju

Sadržaj

SAŽETAK	XI
ABSTRACT	XIII
§ 1. UVOD	1
1.1. Svrha i cilj rada	3
§ 2. LITERATURNI PREGLED	5
2.1. Ribosomska biosinteza proteina	5
2.1.1. Transkripcija	5
2.1.2. Translacija.....	8
2.1.3. Regulacija ekspresije gena za aaRS u bakterija	12
2.2. Aminoacil-tRNA-sintetaze i tRNA	15
2.2.1. Osnovna obilježja aminoacil-tRNA-sintetaza i mehanizam aminoacilacije	15
2.2.2. Strukturna obilježja i elementi identiteta molekula tRNA	16
2.3. Izoleucil-tRNA-sintetaza	18
2.3.1. Strukturna i biokemijska obilježja izoleucil-tRNA-sintetaza	18
2.3.2. Rasprostranjenost dva tipa IleRS u bakterija.....	19
2.3.3. Molekula tRNA ^{Ile} i dekodiranje izoleucinskih kodona.....	20
2.3.4. Točnost aminoacilacije i mehanizmi popravka pogreške kod izoleucil-tRNA-sintetaze	22
2.3.5. Mupirocin kao inhibitor enzima IleRS i mehanizam inhibicije.....	26
2.4. Rod <i>Bacillus</i> i bakterija <i>B. megaterium</i>	32
§ 3. MATERIJALI I METODE	34
3.1. Materijali	34
3.1.2. Aminokiseline i nukleotidi	35
3.1.3. Boje.....	35
3.1.4. Markeri veličine	35
3.1.5. Enzimi, proteini i nukleinske kiseline	35
3.1.6. Komercijalni kompleti	36
3.1.7. Kromatografske kolone, punila, membrane i filteri	36
3.1.8. Radioaktivno obilježeni spojevi.....	36
3.1.9. Ostali materijal.....	36
3.1.10. Hranjive podloge i mediji za uzgoj bakterija	36
3.1.11. Bakterijski sojevi.....	37

3.1.12. Plazmidni vektori.....	38
3.2. Metode	39
3.2.1. Bioinformatičke metode.....	39
3.2.2. Metode rada s bakterijama.....	40
3.2.3. Metode rada s DNA.....	43
3.2.4. Metode rada s RNA.....	46
3.2.5. Metode rada s proteinima.....	49
3.2.6. Kinetičke metode.....	53
§ 4. REZULTATI.....	62
4.1. Bioinformatička analiza izoleucil-tRNA-sintetaza	62
4.1.1. Filogenetska analiza bakterijskih <i>IleRS</i>	62
4.1.2. Analiza genomskog okruženja gena <i>ileS</i>	64
4.1.3. Bioinformatička analiza regulatornih regija gena <i>ileS</i> u rodu <i>Bacillus</i>	65
4.2. Proizvodnja <i>B. megaterium</i> izoleucil-tRNA-sintetaza i tRNA^{Ile}	69
4.2.1. Proizvodnja i pročišćavanje divljih tipova enzima <i>IleRS</i>	69
4.2.2. Dizajn deacilacijski inaktivnih varijanti enzima <i>IleRS</i>	71
4.2.3. Prekomjerna ekspresija tRNA ^{Ile} u bakteriji <i>E. coli</i>	72
4.2.4. Prekomjerna ekspresija tRNA ^{Ile} u bakteriji <i>B. megaterium</i>	75
4.2.5. Izolacija native tRNA ^{Ile} iz bakterije <i>B. megaterium</i>	75
4.3. Kinetička karakterizacija sintetskih reakcija <i>IleRS</i>	77
4.3.1. Diskriminacija aminokiselina u reakciji aktivacije.....	77
4.3.2. Prijenos izoleucina na tRNA.....	80
4.3.3. Ukupno aminoaciliranje s enzimima <i>IleRS</i>	81
4.4. Analiza korektivnih reakcija enzima <i>IleRS</i>	82
4.4.1. Popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline.....	82
4.4.2. Popravak pogreške prije prijenosa aminokiseline.....	84
4.5. Inhibicija aktivnosti enzima <i>IleRS</i> mupirocinom.....	86
4.6. Mjerenje brzine translacije u uvjetima <i>in vitro</i>	88
4.7. Mjerenje termičke stabilnosti izoleucil-tRNA-sintetaza.....	90
4.8. Analiza ekspresije gena <i>ileS</i> u bakteriji <i>B. megaterium</i>	91
4.8.1. Analiza ekspresije gena <i>ileS</i> koristeći zeleni fluorescentni protein.....	91
4.8.2. Analiza ekspresije gena <i>ileS</i> koristeći nativni <i>IleRS</i> protein.....	92
4.8.3. Analiza ekspresije proteina <i>IleRS</i> spektrometrijom masa.....	95
4.9. Fenotipska karakterizacija bakterije <i>B. megaterium</i>	97
4.9.1. Dizajn i konstrukcija sojeva s uklonjenim genima za izoleucil-tRNA-sintetaze.....	97
4.9.2. Komplementacija soja Δ <i>ileS2</i> s <i>IleRS2</i>	98

4.9.3. Analiza rasta sojeva bakterije <i>B. megaterium</i>	99
4.9.4. Komplementacija soja $\Delta ileS1$	100
4.10. Prijenos gena <i>ileS2</i> iz bakterije <i>B. megaterium</i> u bakteriju <i>B. subtilis</i>	101
§ 5. RASPRAVA	102
5.1. Rasprostranjenost gena <i>ileS</i> u bakterija	102
5.2. Regulacija ekspresije dvije IleRS u bakteriji <i>B. megaterium</i>	104
5.3. IleRS tipa 1 daje selekcijsku prednost bakteriji <i>B. megaterium</i>	107
5.4. Kompromis između brzine aminoacilacije i mupirocinske rezistencije odražava se na brzinu translacije.....	109
§ 6. ZAKLJUČAK	113
§ 7. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ	114
§ 8. LITERATURNI IZVORI	115
§ 9. PRILOZI	XV
§ 10. ŽIVOTOPIS	XXXIV



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

RAZLIČITE ULOGE DVIJU IZOLEUCIL-tRNA-SINTETAZA IZ BAKTERIJE *Bacillus megaterium* U STANIČNOM ODGOVORU NA STRES

Vladimir Zanki

Zavod za biokemiju, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Izoleucil-tRNA-sintetaza (IleRS) katalizira nastajanje Ile-tRNA^{Ile} za ribosomsku biosintezu proteina. Postoje dva tipa IleRS, pri čemu bakterije mogu koristiti ili IleRS1 ili IleRS2 kao jedini enzim. Mala grupa organizama porodice *Bacillaceae* u genomu sadrži gene za obje IleRS. Rezultati ove disertacije pokazali su da iako IleRS2 omogućuje bakteriji visoku rezistenciju na mupirocin, bakterije roda *Bacillus* koriste isključivo IleRS1 kao glavnu sintetazu, a IleRS2 ponekad kao dodatni protein. U skladu s tim, IleRS1 je konstitutivno eksprimirana, dok je ekspresija IleRS2 inducirana mupirocinom. Između dvije IleRS bakterije *Bacillus megaterium* nema razlike u mehanizmima kojima se osigurava točnost sinteze Ile-tRNA^{Ile}, ali postoji razlika u brzini aminoacilacije. Sporija sinteza Ile-tRNA^{Ile} kod IleRS2 moguće je posljedica značajnije mupirocinske rezistencije u odnosu na IleRS1. Rezultati sugeriraju kako bakterije roda *Bacillus* koriste IleRS1 kao glavnu sintetazu prvenstveno kako bi zadovoljile potrebu za brzom translacijom i staničnom diobom što im osigurava kompetitivnu prednost u okolišu s ostalim bakterijama koje se brzo dijele.

(127 + XXXV stranica, 45 + IV slika, 7 + X tablica, 249 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: *Bacillus megaterium*/ brzina translacije/ izoleucil-tRNA-sintetaza/ mupirocin

Mentor: prof. dr. sc. Ita Gruić Sovulj

Rad prihvaćen: 2. studenog 2022.

Ocjenitelji: prof. dr. sc. Branimir Bertoša
izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće
dr. sc. Goran Šinko, zn. savj.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

DIFFERENT ROLES OF TWO ISOLEUCYL-tRNA SYNTHETASES FROM *Bacillus megaterium* IN CELLULAR STRESS RESPONSE

Vladimir Zanki

Division of Biochemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb, Croatia

Isoleucyl-tRNA synthetase (IleRS) catalyses the formation of Ile-tRNA^{Ile} for ribosomal protein biosynthesis. Two types of IleRS exist, and bacteria can use either IleRS1 or IleRS2 as a sole housekeeping enzyme. However, a small group of organisms within family *Bacillaceae* have both *ileS* genes in their genome. This dissertation unravelled that although IleRS2 provides bacteria with a mupirocin resistance, bacteria of the genus *Bacillus* use exclusively IleRS1 as the main enzyme, and sometimes additionally add IleRS2. Accordingly, IleRS1 is constitutively expressed, while IleRS2 expression is induced by mupirocin. The two IleRSs from *Bacillus megaterium* showed no differences in the mechanisms that ensure the accuracy of Ile-tRNA^{Ile} synthesis, but there is a difference in aminoacylation speed. The slower synthesis of Ile-tRNA^{Ile} by IleRS2 may be a consequence of mupirocin resistance found in IleRS2 compared to IleRS1. The results suggest that bacteria of the genus *Bacillus* use IleRS1 as the main enzyme primarily to satisfy the need for fast translation and cellular division ensuring competitive advantage in the environment with other fast-growing bacteria.

(127 + XXXV pages, 45 + IV figures, 7 + X tables, 249 references, original in Croatian)

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

Keywords: *Bacillus megaterium*/ isoleucyl-tRNA synthetase/ mupirocin/ translation speed

Supervisor: Dr. Ita Gruić Sovulj, Professor

Thesis accepted: November, 2nd, 2022

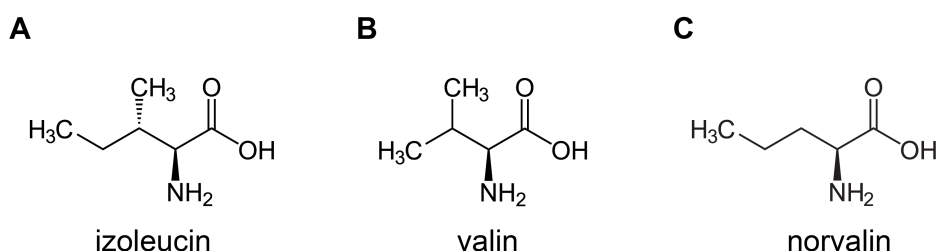
Reviewers: Dr. Branimir Bertoša, Professor
Dr. Ivana Ivančić Baće, Associate Professor
Dr. Goran Šinko, Senior Scientist

§ 1. UVOD

Translacija je fundamentalni proces u kojem stanica sintetizira sve proteine koji su joj potrebni za rast i razvoj. Prvi preduvjet translacije je da ribosom ima na raspolaganju sve potrebne supstrate, od kojih su među najbitnijima aminoacilirane tRNA – molekule tRNA koje na svom 3'-kraju imaju vezanu pripadnu aminokiselinu (aa). Na koji način dolazi do ispravnog povezivanja tRNA i aminokiseline? Ovaj izrazito važan zadatak povjeren je aminoacil-tRNA-sintetazama (aaRS), staničnim enzimima koji mogu „dešifrirati“ genetički kod, tj. mogu jednoznačno prepoznati i povezati isključivo pripadni par aminokiseline i tRNA. AaRS povezuju aminokiselinu s tRNA u reakciji aminoacilacije, koja se kod svih aaRS odvija u sintetskom mjestu enzima i to u dva koraka ^[1]. U prvom koraku dolazi do aktivacije aminokiseline uz utrošak ATP-a, pri čemu nastaje aminoacil-adenilat (aa-AMP) koji ostaje vezan u aktivnom mjestu enzima. U drugom koraku dolazi do prijenosa aminokiseline na tRNA, pri čemu nastaje aminoacilirana tRNA (aa-tRNA) koja potom disocira s enzima.

Međutim, aaRS mogu pogriješiti u prepoznavanju svojih supstrata, a pogreška se može dogoditi ili u krivom prepoznavanju tRNA ili krivom prepoznavanju aminokiseline. Krivo vezana aminokiselina na tRNA može dovesti do ugradnje aminokiseline na pogrešno mjesto u proteinu, što može imati dalekosežne i letalne posljedice za stanicu ^[2, 3]. Stoga je od presudne važnosti da ribosom ima na raspolaganju isključivo ispravne parove aa-tRNA. AaRS u pravilu nemaju problem jednoznačno prepoznati pripadne od nepripadnih tRNA, jer su tRNA velike makromolekule te ostvaruju mnogobrojne interakcije s aaRS ^[4]. Međutim, aminokiseline su puno manje molekule, te često nemaju dovoljno izražene strukturne razlike koje osiguravaju jednoznačno prepoznavanje. Primjerice, izoleucil-tRNA-sintetaza (IleRS) često zamjenjuje nepripadni valin (Val) za pripadni izoleucin (Ile) (slika 1.1), što nije neočekivano jer se valin od izoleucina razlikuje za svega jednu metilensku skupinu ^[5]. Štoviše, IleRS griješi u diskriminaciji valina puno češće (na svakih 150 izoleucina krivo aktivira valin) nego što stanica tolerira razinu greške u translaciji (otprilike 1 pogrešno ugrađena aminokiselina na svakih 3300) ^[6, 7]. IleRS također može aktivirati i neproteinogenu aminokiselinu norvalin (Nva) (slika 1.1) i to sa sličnom učestalošću kao i valin ^[2]. Jednom aktiviranu aminokiselinu, bilo pripadnu bilo nepripadnu, IleRS uspješno prenosi na tRNA^{Ile} ^[6, 8, 9]. Stoga, kako kako bi se spriječila ugradnja

pogrešnih aminokiselina na izoleucinske pozicije u proteinu, IleRS sadrži mehanizme popravka pogreške.



Slika 1.1. Kemijska struktura aminokiseline izoleucin (A), valin (B) i norvalin (C).

Popravak pogreške kod IleRS može se odvijati na dva načina. Prvi način je popravak pogreške prije prijenosa, kojim dolazi do hidrolize pogrešnog aminoacil-adenilata, prije nego se aminoacilna skupina prenese na tRNA. Ovaj tip popravka pogreške odvija se u sintetskom mjestu enzima, a kod IleRS bakterije *Escherichia coli* snažno je stimuliran prisutnošću tRNA (tRNA-ovisan popravak pogreške prije prijenosa) [10-12]. Međutim, radi se o sporednom korektivnom mehanizmu pri čemu je navedeni popravak zastupljen u ukupnom popravku s oko 30 % kod *EcIleRS*. Glavni mehanizam popravka pogreške kod svih okarakteriziranih IleRS je popravak pogreške nakon prijenosa, kojim dolazi do hidrolize pogrešno aminoacilirane tRNA^{Ile}, a odvija se u zasebnoj domeni za popravak pogreške [8,11,12].

Dosadašnja istraživanja ukazala su na postojanje dva strukturno različita tipa IleRS kod bakterija [8, 13]. Prvi tip IleRS (bakterijski tip, tip 1, IleRS1) sadrži specifične strukturne motive i aminokiseline koje nisu prisutne u IleRS tipa 2 (IleRS2). Također, IleRS1 pokazuju značajnu osjetljivost na inhibiciju prirodnim antibiotikom mupirocinom [14-16]. Zanimljivo, bakterijske IleRS2, kao i eukariotske citosolne IleRS, značajno su manje osjetljive na mupirocin, te se bakterijske IleRS2 često nazivaju i eukariotima-slične IleRS [8, 14, 15, 17]. Smatra se da je prisutnost eukariotskog tipa IleRS u nekim bakterijama posljedica horizontalnog prijenosa gena koji je omogućio određenoj skupini bakterija selektivnu prednost pomoću rezistencije na mupirocin [18]. Zanimljivo, bakterije uglavnom koriste IleRS ili tipa 1 ili tipa 2 kao jedinu staničnu IleRS. Međutim, mala grupa bakterija unutar porodice *Bacillaceae* sadrži oba tipa IleRS u genomu [8, 18]. Prisutnost IleRS2 trebala bi bakteriji omogućiti i rezistenciju na mupirocin i zadovoljavanje staničnih potreba za sintezom Ile-tRNA^{Ile}, pa se postavlja pitanje zbog čega je IleRS1 i dalje prisutna u genomu.

Dva paraloga unutar iste stanice mogu biti posljedica i) različite regulacije ekspresije pojedinog gena, ii) različitih svojstava pojedinog enzima ili iii) oboje [19-22]. Uz već spomenutu razliku dva tipa IleRS u osjetljivosti na mupirocin, nedavno je pokazano da neke IleRS2 ne sadrže sporedan korektivni mehanizam popravka pogreške (tRNA-ovisni popravak pogreške prije prijenosa), najvjerojatnije uslijed promjene sintetskog mjesta enzima koje je kompromitiralo dio kontrole sinteze Ile-tRNA^{Ile} nauštrb veće mupirocinske rezistencije [8]. Kontrola sinteze Ile-tRNA^{Ile} je izrazito bitna budući da gubitak glavnog korektivnog mehanizma (popravak pogreške nakon prijenosa) kod IleRS bakterije *Bacillus subtilis* dovodi do nemogućnosti nastanka temperaturno-rezistentnih spora uslijed zastoja u aktivaciji ranih sporulacijskih gena [23]. Stoga je moguće da je prisutnost IleRS tipa 1 kod bakterija koje sadrže i IleRS tipa 2 nužna posljedica kako bi se osigurala ispravna sinteza Ile-tRNA^{Ile}.

1.1. Svrha i cilj rada

Unatoč mnogobrojnim istraživanjima na bakterijskim izoleucil-tRNA-sintetazama, bilo tipa 1 bilo tipa 2, i dalje mnoga pitanja nisu odgovorena. Prvenstveno, nije jasno zbog čega neki organizmi, primjerice bakterije roda *Bacillus*, koji sadrže mupirocin-rezistentnu IleRS (IleRS2), koja nije univerzalno prisutna u bakterijama, ipak zadržavaju i mupirocin-osjetljivu IleRS (IleRS1). Je li glavni razlog postojanja dva bitno različita tipa IleRS unutar istog organizma zbog različite regulacije ili zbog različitih enzimskih svojstava? Također, je li gubitak sporednog mehanizma popravka pogreške zaista povezan s dobivanjem visoke rezistencije na mupirocin? Kao modelni organizam za ovo istraživanje stoga je odabrana bakterija *Bacillus megaterium*, koja sadrži genomsku kopiju oba tipa *ileS*.

Hipoteze ove doktorske disertacije su:

- Dvije izoleucil-tRNA-sintetaze iz bakterije *B. megaterium* pokazuju razlike u afinitetu prema antibiotiku mupirocinu
- Dvije IleRS razlikuju se u mehanizmima popravka pogreške
- Protein IleRS1 glavna je i konstitutivno eksprimirana IleRS u bakteriji *B. megaterium*, dok je ekspresija proteina IleRS2 inducibilno regulirana
- IleRS1 ima važnu ulogu u različitim fiziološkim uvjetima, dok je osnovna uloga proteina IleRS2 zaštita bakterije od djelovanja mupirocina

Specifični ciljevi ove doktorske disertacije su:

1. Bioinformatički analizirati veći broj IleRS i odrediti zastupljenost tipa 1, odnosno tipa 2 IleRS u bakterija
2. Kinetički okarakterizirati oba enzima IleRS iz bakterije *B. megaterium* u sintetskim i korektivnim reakcijama te odrediti konstante inhibicije prema mupirocinu
3. Odrediti ekspresijske profile te načine regulacije obje IleRS
4. Konstruirati sojeve bakterije *B. megaterium* s uklonjenim genima *ileS1*, odnosno *ileS2* iz genoma
5. Fenotipski okarakterizirati sojeve bakterije *B. megaterium* te utvrditi postoje li bitne fenotipske i funkcionalne karakteristike povezane s prisutnošću pojedinog tipa IleRS
6. Konstruirati soj bakterije *B. subtilis* koji sadrži gen *ileS2* iz bakterije *B. megaterium*

Za ostvarivanje cilja 1 koristit će se standardne bioinformatičke i filogenetske metode, a za ostvarivanje cilja 2 metode enzimske kinetike ustaljenog stanja i kinetike jednog katalitičkog kruga koje obuhvaćaju mjerenje aktivacije aminokiseline, ukupno aminoaciliranje, inhibiciju mupirocinom te hidrolitičke popravke u sintetskom i korektivnom mjestu enzima IleRS. Za ostvarivanje cilja 3 koristit će se *western*-hibridizacijska analiza i spektrometrija masa. Cilj 4 ostvarit će se pripremanjem sojeva bakterije *B. megaterium* s uklonjenim genima *ileS1*, odnosno *ileS2* iz genoma, a u svrhu ostvarivanja cilja 5 detaljno će se fenotipski okarakterizirati dobiveni sojevi, što uključuje testiranje sojeva na antibiotik mupirocin i praćenje brzine rasta u bogatom i siromašnom mediju. Za ostvarivanje cilja 6, u genom bakterije *B. subtilis* umjesto nativnog gena *ileS* ugradit će se gen *ileS2* iz bakterije *B. megaterium*.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Ribosomska biosinteza proteina

2.1.1. Transkripcija

Biosinteza proteina temeljni je stanični proces prilikom kojeg stanica izgrađuje svoje proteine, a odvija se na velikim ribonukleoproteinskim kompleksima koji se zovu ribosomi. Unatoč specifičnim razlikama, sve tri domene života dijele iste temeljne korake prilikom biosinteze proteina, koji uključuju i) transkripciju slijeda nukleotida s molekule DNA na molekulu mRNA te ii) translaciju molekule mRNA u protein.

Transkripcija je prvi korak u ekspresiji nekog gena, a uključuje prepisivanje slijeda nukleotida koji kodira određeni protein s molekule DNA u molekulu mRNA (engl. *messenger RNA*). Sve bakterije sintetiziraju mRNA pomoću holoenzima DNA-ovisne RNA-polimeraze, velikog multiproteinskog kompleksa čija katalitička srž sadrži pet podjedinica ($\alpha\beta\beta'\omega$, RNAP) [24, 25]. Srž RNA-polimeraze odgovorna je za sve korake transkripcije, osim za specifično prepoznavanje promotorske regije gena za što je potrebna podjedinica σ [26].

Prvi korak transkripcije je inicijacija, a započinje vezanjem podjedinice σ na srž RNA-polimeraze pri čemu nastaje funkcionalni holoenzim (RNAP σ) te pronalaskom promotorske regije koja se nalazi uzvodno od mjesta početka transkripcije [26]. Genom bakterije *E. coli* kodira za čak sedam različitih podjedinica σ koje su odgovorne za ekspresiju različitih gena kao odgovor na okolišne uvjete [27, 28]. Podjedinica σ direktno je uključena u prepoznavanje ključnih elemenata promotora. Glavni elementi promotora su elementi -35 i -10 razdvojeni s 16-19 nukleotida, uzvodni element (engl. *upstream element*, UP) i produženi element -10 (engl. *extended -10 element*) [29-31]. Navedena 4 elementa osiguravaju specifičnost inicijalnog vezanja RNA-polimeraze na promotorsko mjesto, pri čemu relativna važnost svakog elementa ovisi o pojedinom promotoru.

Podjedinica σ^{70} bakterije *E. coli* prepoznaje većinu promotora uključenih u ekspresiju gena odgovornih za rast i održavanje stanice, pa se stoga često naziva i glavnom staničnom podjedinicom σ (engl. *housekeeping σ factor*) [28]. Međutim, podjedinica σ ne može se samostalno vezati za promotorsku regiju i odmotati DNA, već vezanjem na srž RNA-polimeraze nastaje aktivni oblik holoenzima [24]. Kao dio holoenzima, domena 4 podjedinice σ^{70} prepoznaje izrazito očuvanu konsenzus sekvencu 5' TTGACA 3' unutar

promotorskog elementa -35, pri čemu su baze -35T, -34T i -33G izrazito očuvane budući da se upravo preko ovih baza ostvaruje interakcija velikog utora molekule DNA s podjedinicom σ^{70} [34, 35]. Element -10 drugi je važan dio promotora, a njegovu konsenzus sekvencu 5' TATAAT 3' prepoznaje domena 2 podjedinice σ^{70} . Baze -11A i -7T su izrazito očuvane baze unutar elementa -10, međutim nisu neophodne za brzu inicijaciju transkripcije, ukoliko je element -10 dovoljno bogat bazama AT, dok baza -12A kodirajućeg lanca ostvaruje ključnu interakciju s podjedinicom σ^{70} i inicira nastanak transkripcijskog mjehurića [35, 36]. Baze koje se nalaze između promotorskih elemenata -35 i -10 nisu strogo očuvane, međutim očuvan je broj baza koji u pravilu iznosi 17 [37, 38]. Izrazita sličnost podjedinica σ odgovornih za ekspresiju glavnih staničnih proteina (engl. *housekeeping enzymes*) između različitih vrsta definirala je i očuvane konsenzus sekvence za glavne promotorske elemente među različitim bakterijama, pa tako glavna podjedinica σ u bakteriji *B. subtilis* također prepoznaje konsenzus sekvencu sličnu kao podjedinica σ^{70} bakterije *E. coli* (tablica 2.1) [39].

Tablica 2.1. Usporedba različitih podjedinica σ i njihovih konsenzus sekvenci u bakterija *E. coli*, *B. subtilis* i *Thermus aquaticus*.

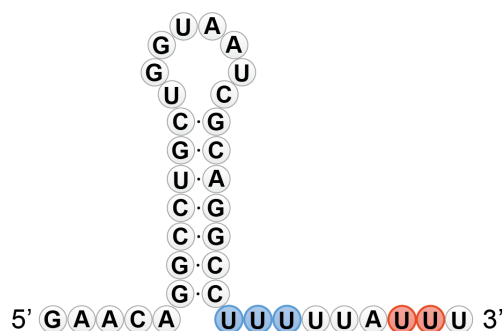
Bakterija	σ	funkcija	promotorski slijed ^a			ref.
			-35	razmak / bp	-10	
<i>E. coli</i>	σ^{70}	opći faktor	TTGACA	17	TATAAT	[40, 41]
	σ^{54}	metabolizam dušika	CTGGCAG	4	TTGCAA	[42]
	σ^{32}	temperaturni stres	CTTGAA	14	CCCCATNT	[43]
	σ^{38}	stacionarna faza	- ^b		CTATACTT	[44]
<i>B. subtilis</i>	σ^A (σ^{43} , σ^{55})	opći faktor	TTGACA	17	TATAAT	[45]
	σ^B (σ^{37})	opći stresni odgovor	GTTTAA	14	GGGTAT	[46]
	σ^H (σ^{30})	rani sporulacijski geni	AGGATTT	14	GAAT	[47]
	σ^E (σ^{29})	sporulacija	KMATATT	14	CATACANT	[48]
<i>T. aquaticus</i>	σ^A	opći faktor	TTGACA	17	TATAAT	[31]

^a N = A/G/T/C, K = G/T, M = A/C

^b σ^{38} ne sadrži elemente -35 već interakciju ostvaruje preko elemenata UP

Nakon što je RNA-polimeraza sintetizirala mRNA veličine 13-15 nukleotida, pri čemu je 7-9 nukleotida sparano s DNA u obliku hibrida DNA:RNA, dolazi do disocijacije podjedinice σ , RNA-polimeraza napušta promotorsko mjesto te započinje druga faza transkripcije: elongacija. Elongacija je izrazito procesivan proces – RNA-polimeraza katalizira neprekinutu sintezu molekula mRNA veličine i nekoliko 1000 baza [49, 50]. Kataliza se odvija u aktivnom mjestu enzima pri čemu dolazi do nukleofilnog napada 3'-OH skupine molekule RNA na α -fosfat nadolazećeg ribonukleozid-trifosfata [51]. Elongacijska faza traje dok RNA-polimeraza ne naiđe na terminacijske signale, a dva glavna načina terminacije transkripcije kod bakterija su Rho-neovisna (ili intrinzična) i Rho-ovisna terminacija transkripcije [52].

Intrinzična terminacija transkripcije uključuje postojanje kanonskog intrinzičnog terminacijskog signala unutar molekule mRNA. Intrinzični terminacijski signal sastoji se od dva bitna elementa: palindromske regije bogate gvaninom i citozinom koji se mogu međusobno sparivati nakon koje slijedi regija bogata uracilima, pri čemu su prva tri uracila izrazito očuvana (slika 2.1) [53]. Stvaranje okosnice bogate parovima baza G:C stabilizira strukturu mRNA, dok hibridna uzvojnica DNA:mRNA stabilizirana pomoću parova baza A:U postaje izrazito nestabilna, što dovodi do terminacije transkripcije i disocijacije RNA-polimeraze [54].



Slika 2.1. Intrinzična terminacija transkripcije kod bakterija. Prikazana je sekvenca molekule mRNA kanonskog terminatora *tR2* iz bakteriofaga λ . Terminacija transkripcije uzrokovana je nastankom izrazito stabilne sekundarne strukture građene prvenstveno od gvanina i citozina, nakon koje slijedi niz uracila. Tri uracila koja su izrazito očuvana u svim do sada okarakteriziranim intrinzičnim terminatorima označena su plavo, dok su mjesta terminacije transkripcije označena crveno. Prilagođeno prema referenci [54].

Za razliku od Rho-neovisne, Rho-ovisna terminacija transkripcije zahtjeva aktivnost posebnog proteina, homoheksamerne helikaze Rho. Protein Rho pokazuje izrazito visok afinitet prema regijama koje su bogate citozinima, sa slabo zastupljenim gvaninima, koje ne tvore sekundarne strukture, pri čemu najveći afinitet pokazuje prema slijedu poli-C unutar mRNA [55]. Protein Rho veže se 80 – 90 nukleotida uzvodno od terminacije transkripcije na posebna

mjesta koja se nazivaju mjesta *rut*, provlačeći mRNA kroz središte svoje strukture dok ne dostigne RNA-polimerazu nakon čega pokida hibridnu uzvojniju DNA:RNA te uzrokuje disocijaciju RNA-polimeraze [56, 57].

2.1.2. Translacija

Translacija je drugi bitan stanični proces, te uključuje prevođenje slijeda nukleotida zapisanog u molekuli mRNA u slijed aminokiselina novosintetiziranog proteina, a odvija se na velikim ribonukleoproteinskim kompleksima, ribosomima. Funkcionalni bakterijski ribosom (70S) građen je od dvije podjedinice: male (30S) i velike (50S) ribosomske podjedinice [58]. Kod bakterija, transkripcija i translacija odvijaju se istovremeno, koordinirano i u istom staničnom odjeljku. Naime, RNA-polimeraza i ribosom ostvaruju fizičke interakcije prilikom transkripcije i translacije, pri čemu je brzina transkripcije pomoću RNA-polimeraze koordinirana s brzinom translacije vodećeg (prvog) ribosoma. Ovaj strukturno definiran, funkcionalan kompleks RNA-polimeraze i ribosoma naziva se ekspresom, te se smatra da međusobna fizička interakcija sprječava transkripcijsko pauziranje i terminaciju [59, 60].

Translacija većine proteine (~90 %) započinje dekodiranjem prvog kodona koji je u pravilu metionin kodiran tripletom AUG. Uz kodon AUG, translacija u bakteriji *E. coli* prirodno može započeti i s kodona GUG (u ~ 8 % proteina), kodona UUG (~ 1 % proteina) te iznimno rijetko s kodona AUU [61]. Također je uočeno da je prva baza start kodona najmanje bitna, dok treća baza pokazuje preferencije prema gvaninu, pri čemu zamjena gvanina u bilo koju drugu bazu smanjuje efikasnost na ~ 2 % efikasnosti kodona AUG. S druge strane, druga baza start kodona je najznačajnija i gotovo uvijek je uracil, pri čemu zamjena uracila u citozin smanjuje efikasnosti inicijacije translacije na ~ 1 % efikasnosti kodona AUG, dok zamjena u bilo koju purinsku bazu smanjuje efikasnost na gotovo nedetektabilnu razinu.

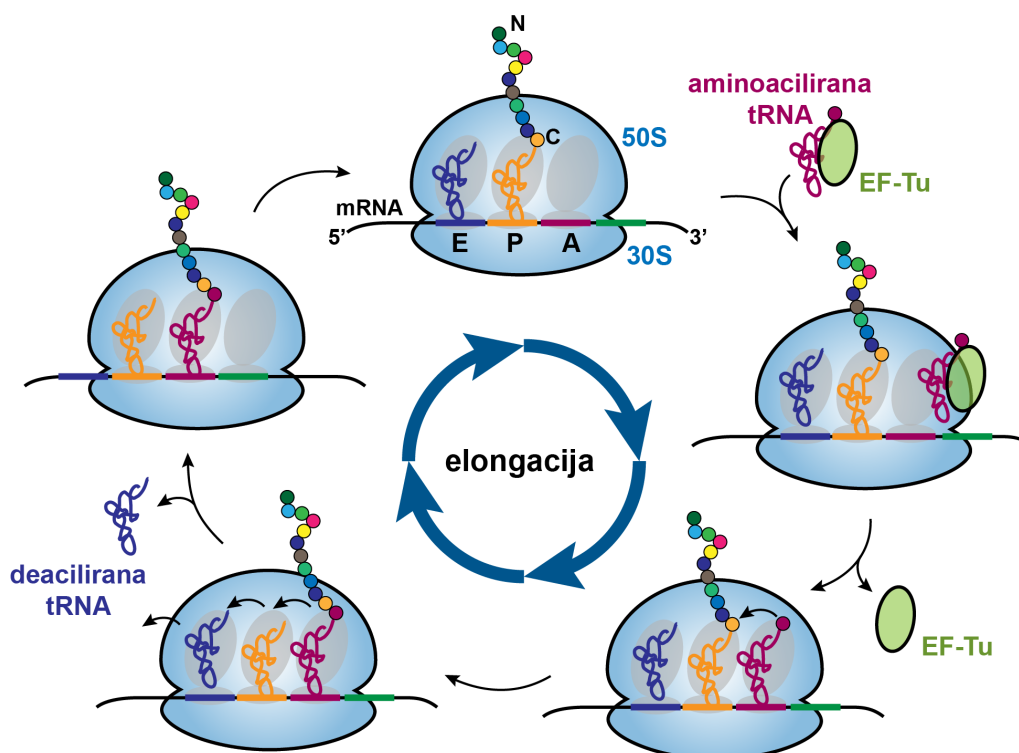
Većina mRNA sadrži netranslatirajuću regiju uzvodno od start kodona (engl. *5' untranslated region*, 5'-UTR) koja sadrži i sekvencu Shine-Dalgarno (SD) [62] s 5-8 purinskih nukleotida komplementarnih 3'-kraju 16S ribosomske RNA (aSD, engl. *anti-Shine-Dalgarno sequence*), a uloga joj je i) učvrstiti interakciju između mRNA i ribosoma te ii) osigurati nastanak stabilnog ribosomskog kompleksa [63, 64]. Van Etten i suradnici pokazali su da je kodon AUG izrazito bitan za inicijaciju translacije mRNA koje ne sadrže regije 5'-UTR. Proučavajući ekspresiju gena *lacZ* pokazali su da mutacija kanonske sekvence SD uzrokuje smanjenje translacije i do 20 puta, a da potpuno uklanjanje regije 5'-UTR dovodi do smanjenja translacije

od svega 2 puta. Nadalje, mutacija kodona AUG u bilo koji drugi prirodni kodon rezultirala je smanjenjem translacije samo u slučaju kada nije bila prisutna regija 5'-UTR [65]. Prisutnost sekvence SD samo je jedan od načina regulacije translacije u prokariota. Primjerice, koljeno Gram-negativnih bakterija *Bacteroidetes* uopće ne koristi sekvencu SD za inicijaciju translacije [66]. Također, mRNA koje ne sadrže 5'-UTR, ili sadrže 5'-UTR, ali ne sadrže sekvencu SD, gotovo su jednako zastupljene kao i kanonske mRNA koje sadrže sekvencu SD unutar regije 5'-UTR [67, 68].

Translaciju, kao i transkripciju, možemo podijeliti u tri faze: inicijacija, elongacija i terminacija. Inicijacijska faza translacije podrazumijeva formiranje inicijacijskog kompleksa (30S IC, engl. *30S initiation complex*) u prisutnosti inicijacijskih faktora pri čemu je mala ribosomska podjedinica 30S uspostavila interakciju s molekulom mRNA te se prvi kodon ispravno dekodirao pomoću fMet-tRNA^{fMet} u mjestu P male ribosomske podjedinice [69]. Vezanjem velike ribosomske podjedinice 50S dolazi do disocijacije inicijacijskih faktora i hidrolize GTP-a čime ireverzibilno nastaje stabilni inicijacijski kompleks 70S.

Potom slijedi elongacijska faza translacije, koja uključuje repetitivne korake dekodiranja kodona, formiranja peptidne veze i translokacije (slika 2.2). Funkcionalni ribosom sadrži tri karakteristična vezna mjesta: aminoacilno mjesto (A, engl. *aminoacyl site*), peptidilno mjesto (P, engl. *peptidyl site*) i izlazno mjesto (E, engl. *exit site*). Molekula fMet-tRNA^{fMet}, koja se vezala u mjesto P prilikom sklapanja ribosoma, jedina je tRNA koja se može vezati u mjesto P, dok se u mjesto A veže aminoacilirana tRNA (aa-tRNA^{aa}) (vidi poglavlje 2.2) čiji antikodon je komplementaran trenutnom kodonu u mjestu A [71]. Dopremanje aa-tRNA^{aa} do mjesta A obavlja elongacijski faktor Tu (EF-Tu). Radi se o GTPazi koja samo u svom GTP-obliku može vezati aa-tRNA. Jednom kada se uspostavila ispravna interakcija između antikodona tRNA i kodona mRNA dolazi do hidrolize GTP-a nakon čega EF-Tu, sada s vezanim GDP-om, otpušta aa-tRNA [72, 73]. Sparivanjem ispravne aa-tRNA^{aa} s mjestom A ribosoma stvoreni su svi preduvjeti za nastanak peptidne veze. Formiranje peptidne veze termodinamski je povoljna reakcija, pri čemu je kataliza vođena prvenstveno kroz entropijski efekt reorganizacijom molekula vode, pozicioniranjem ogranaka rRNA (engl. *ribosomal RNA*) i tRNA (engl. *transfer RNA*) te elektrostatskim odbijanjem [74, 75]. Peptidna veza nastaje u podjedinici 50S nukleofilnim napadom amino skupine aminokiseline vezane na tRNA koja se nalazi u mjestu A na karbonilni ugljikov atom esterske veze peptidil-tRNA u mjestu P čime nastaje tetraedarski međuprodukt [76]. Raspadom tetraedarskog međuprodukta nastaje peptidna veza uz otpuštanje deacilirane

(neaminoacilirane) tRNA, pri čemu se deacilirana tRNA^{fMet} nalazi u mjestu P, dok se polipeptidni lanac nalazi u mjestu A. Potom dolazi do premještanja deacilirane tRNA^{fMet} iz mjesta P u mjesto E te peptidil-tRNA iz mjesta A uz mjesto P, sve unutar velike podjedinice 50S [71]. Zatim uz pomoć elongacijskog faktora G, uz utošak GTP-a, dolazi do translokacije peptidil-tRNA skupa s vezanom mRNA iz mjesta A u mjesto P male ribosomske podjedinice 30S te deacilirane tRNA iz mjesta P uz mjesto E, čime je u potpunosti oslobođeno mjesto A za iduću aminoaciliranu tRNA [77]. Produkt cijele reakcije je polipeptidni lanac produžen za jednu aminokiselinu (slika 2.2). Vezanjem iduće aminoacilirane tRNA u mjesto A dolazi do otpuštanja deacilirane tRNA iz mjesta E te se ciklus elongacije ponavlja. Za razliku od velike većine ostalih kemijskih reakcija koje kataliziraju proteini, nastanak peptidne veze na ribosomu katalizira 23S rRNA u podjedinici 50S ribosoma, stoga je ribosom najveći do sada poznati ribozim [78].



Slika 2.2. Shematski prikaz bakterijske ribosomske translacije. Detaljan opis svakog koraka dan je u glavnom tekstu. Prilagođeno prema referenci [70].

Ciklus elongacije translacije ponavlja se dok ribosom ne naiđe na terminacijske signale. U bakterija, faktori otpuštanja (engl. *release factor*, RF) prepoznaju specifične kodone (UAG, UAA i UGA) u mjestu A ribosoma nakon čega dolazi do hidrolize esterske veze peptidil-tRNA, otpuštanja polipeptidnog lanca u otopinu i disocijacije ribosomskih podjedinica [79-81].

Ispravno dekodiranje svakog tripleta baza (kodona) u molekuli mRNA koje se odvija u mjestu A male ribosomske podjedinice osigurano je ispravnim prepoznavanjem antikodona odgovarajuće molekule tRNA. Prema hipotezi kolebljive baze koju je predložio Francis Crick [82], prve dvije baze kodona uvijek se sparuju s trećom i drugom bazom antikodona (bazama 36 i 35) tvoreći kanonske Watson-Crick interakcije (A:U, G:C). Treća baza kodona može, ali i ne mora, ostvarivati kanonske interakcije s prvom bazom antikodona (baza 34). Zapravo, prva baza antikodona (baza 34) određuje koliko baza unutar kodona molekula tRNA mora razlikovati, dok druga i treća baza određuju specifičnost pojedinog kodona. Baze antikodona često su izrazito modificirane upravo kako bi osigurale, ili pak spriječile nekanonske interakcije te osigurale vjernu biosintezu proteina (vidi poglavlje 2.3.3).

Točnost biosinteze proteina od presudne je važnosti za stanicu. Pogrešno ugrađena aminokiselina može uzrokovati nastanak nefunkcionalnog proteina koji može biti letalan za stanicu ili joj značajno smanjiti preživljenje [2, 83]. Zanimljivo, danas je poznato da mistranslacija, ugradnja pogrešne aminokiseline na određeno mjesto u proteinu, može biti i korisna za stanicu u određenim uvjetima [84]. Iako pogreške u biosintezi proteina, za razliku od pogrešaka u molekuli DNA, nisu nasljedne, stanica ima mnogobrojne kontrolne mehanizme kojima sprječava mistranslaciju. Primjerice, protein EF-Tu će s odgovarajućim afinitetom vezati samo aminoacilirane tRNA, dok ne veže ili veže izrazito slabo neaminoacilirane tRNA [85]. Nadalje, EF-Tu pokazuje različit afinitet prema ispravno i neispravno aminoaciliranom (misaciliranom) tRNA [86, 87]. U konačnici to rezultira smanjenom vjerojatnošću otpuštanja misacilirane tRNA dolaskom do ribosoma (uslijed prejakog afiniteta) ili pak smanjenom vjerojatnošću dopremanja misacilirane tRNA do ribosoma (uslijed preslabog afiniteta). Međutim, navedeno svojstvo nije univerzalno za svaki par aa-tRNA. Primjerice, EF-Tu iz bakterije *E. coli* ne pokazuje razlike u afinitetu između pripadnog para Leu-tRNA^{Leu} i nepripadnog para Nva-tRNA^{Leu} [88], ali i mnogih drugih parova aa-tRNA [86]. Stoga pogrešno aminoacilirana tRNA može dovesti do ugradnje pogrešne aminokiseline unutar proteina. Vežanje ispravne aminokiseline na tRNA stoga predstavlja prvi korak osiguranja točnosti biosinteze proteina, a katalizirano je enzimima aminoacil-tRNA-sintetazama (vidi poglavlje 2.2).

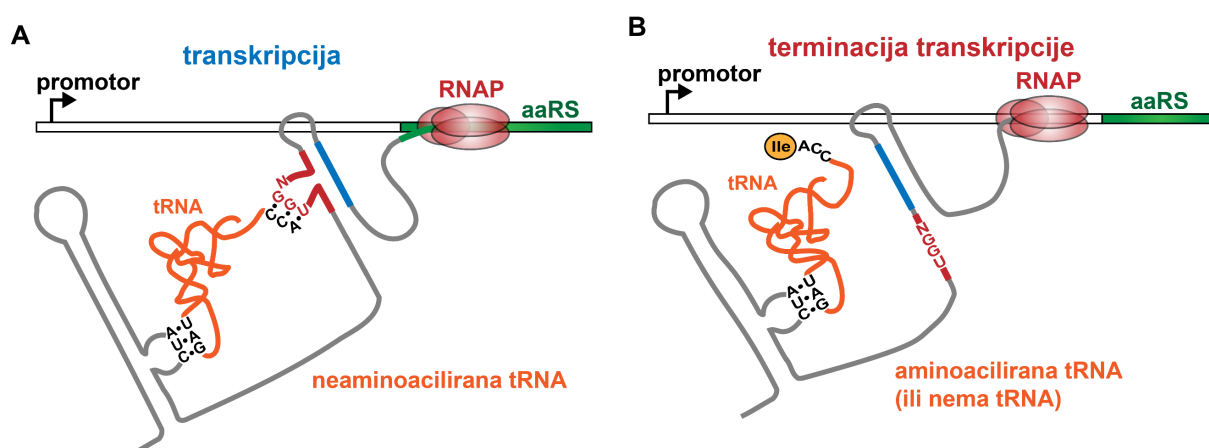
2.1.3. Regulacija ekspresije gena za aaRS u bakterija

Regulacija ekspresije gena temelj je pravilnog i pravovremenog odgovora bakterije na okolišne i stanične uvjete. Iako je svaka stanica ograničena samo na gene koji su kodirani njenom DNA, upravo različita ekspresija tih gena omogućuje stanici život i prilagodbu. Stanični regulatorni mehanizmi osiguravaju ekspresiju isključivo specifičnog gena u odgovarajućim fiziološkim uvjetima, pri čemu je svaki korak ekspresije precizno reguliran, od inicijacije transkripcije do degradacije proteina [89, 90].

Geni za aaRS u pravilu su autoregulirani, iako se molekularni mehanizmi regulacije bitno razlikuju između dva dobro proučena modelna organizma: bakterije *E. coli* i bakterije *B. subtilis*. Primjerice, bakterija *E. coli* regulira ekspresiju vlastitih aaRS na gotovo svim razinama centralne dogme [91-93]. S druge strane, ekspresija gena za aaRS u većini Gram-pozitivnih bakterija regulirana je putem riboprekidača s T-petljom (engl. *T-Box riboswitch*) [94, 95]. Većina riboprekidača regulira ekspresiju gena na razini transkripcijske atenuacije, iako je poznata i regulacija na razini inicijacije translacije (specifično za koljeno *Actinobacteria*) [96]. Osnova mehanizma, neovisno radi li se o transkripcijskoj atenuaciji ili inicijaciji translacije, je da 5'-netranslatirajuća vodeća regija novosintetizirane molekule mRNA koja kodira za određenu aaRS može direktno regulirati ekspresiju nizvodnog gena. Naime, unutar novosintetizirane mRNA nalazi se intrinzični transkripcijski terminator koji može tvoriti dvije petlje: terminatorsku i anti-terminatorsku. Terminatorska petlja konformacijski je stabilnija te direktno dovodi do Rho-neovisne terminacije transkripcije. S druge strane, anti-terminatorska petlja je manje stabilna, a njenim nastankom maskiran je intrinzični transkripcijski terminator, te se neometano nastavlja elongacija transkripcije. Kako je pak regulirano hoće li nastati terminatorska ili anti-terminatorska petlja?

Dva bitna sparivanja baza definiraju specifičnost i aktivnost riboprekidača s T-petljom: i) sparivanje identifikatorske sekvence riboprekidača s antikodonom molekule tRNA i ii) sparivanje anti-terminatorske izbočine riboprekidača s akceptorskom peteljkom molekule tRNA [97, 98]. Prvo sparivanje definira specifičnost riboprekidača prema pripadnoj tRNA, a izrazito podsjeća na sparivanje kodona:antikodona koje se odvija na ribosomu – međutim u ovom slučaju za ispravno sparivanje nije potreban ribosom [99]. Kinetička istraživanja pokazala su da je pogrešno sparivanje baza tolerirano na trećoj, ali i na prvoj poziciji, što je fundamentalna razlika u odnosu na ribosomsko dozvoljenu kolebljivost isključivo treće baze. Međutim, novija izraživanja sugeriraju da i geometrija molekule tRNA, a ne nužno samo

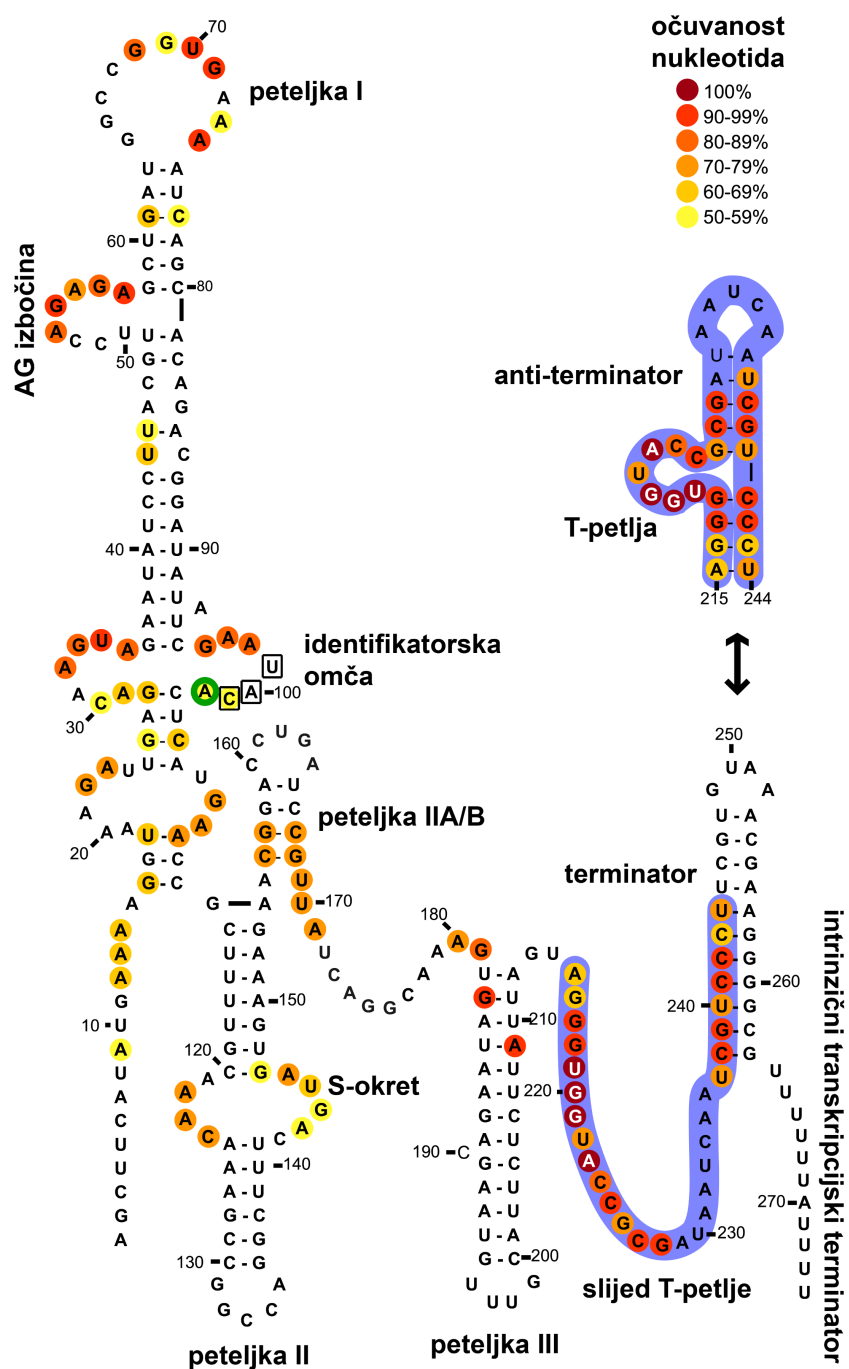
antikodon, značajno doprinosi specifičnosti i aktivnosti riboprekidača [100]. S druge strane, pogrešno sparivanje druge baze, kao i kod ribosomskog dekodiranja, nije tolerirano [97, 101]. Drugo važno bazno sparivanje odvija se između akceptorske peteljke neaminoacilirane tRNA i anti-terminatorske izbočine. Na koji način, stoga, tRNA regulira ekspresiju nizvodnog gena? Ukoliko u stanici postoji značajna količina neaminoacilirane tRNA, znači da je smanjena razina pripadne aaRS te da njenu ekspresiju treba povećati. Neaminoacilirana tRNA može sa svojim 3'-krajem ostvariti interakciju s T-petljom riboprekidača čime stabilizira inače nestabilnu anti-terminatorsku zavojnicu (slika 2.3A, slika 2.4) koja maskira intrinzični transkripcijski terminator te se neometano nastavlja elongacija transkripcije nizvodnog gena. Ukoliko je pak tRNA aminoacilirana pripadnom aminokiselinom, to sugerira da u stanici postoji dovoljna količina pripadne aaRS te nije potrebna njena daljnja ekspresija. Aminoacilirana tRNA, zbog steričke smetnje aminokiseline vezane na 3'-kraju ne može uspostaviti interakciju s T-petljom riboprekidača čime nastaje stabilna terminatorska zavojnica koja izlaže intrinzični transkripcijski terminator i dolazi do terminacije transkripcije (slika 2.3B, slika 2.4).



Slika 2.3. Mehanizam regulacije transkripcije pomoću riboprekidača s T-petljom. Tijekom transkripcije vodećeg slijeda gena za aaRS pomoću RNA-polimeraze, nastala mRNA može stvoriti dvije različite konformacije. Prikazan je model regulacije pomoću tRNA^{Ile}. A) Vezanje neaminoacilirane tRNA i na identifikatorsku sekvencu i na anti-terminatorsku izbočinu (crveno) preko slobodnog 3'-CCA kraja stabilizira anti-terminator (plavo), onemogućuje nastanak terminatorske uzvojnice unutar mRNA vodećeg slijeda te dolazi do transkripcije nizvodnog gena. B) Neaminoacilirana tRNA može ostvariti interakcije samo između antikodona (UAG) i identifikatorske sekvence (AUC) što omogućuje nastanak terminatorske uzvojnice unutar mRNA vodećeg slijeda i terminaciju transkripcije. Preuzeto i prilagođeno prema referenci [98].

Strukturna obilježja svih do sada poznatih riboprekidača s T-petljom su tri peteljke (peteljka I, II i III) koje se nalaze naposredno ispred intrinzičnog transkripcijskog terminatora,

odnosno anti-terminatora (slika 2.4) [97, 98]. Unutar peteljke I nalazi se identifikatorska sekvenca (engl. *specifier sequence*) s tri nukleotida koji odgovaraju kodonima za aminokiselinu koja je pripadni supstrat aaRS čija ekspresija se regulira. Nadalje, u strukturi je moguće uočiti izrazito očuvani 14-nukleotidni slijed poznat i kao T-petlja (engl. *T-Box sequence*), koji je direktno uključen u prepoznavanje 3'-kraja tRNA.



Slika 2.4. Strukturni model riboprekidača s T-petljom gena *tyrS* iz bakterije *B. subtilis*. Plavo su osjenčani nukleotidi koji sudjeluju u formiranju anti-terminatorske strukture. Preuzeto i prilagođeno prema referencama [97, 98].

2.2. Aminoacil-tRNA-sintetaze i tRNA

2.2.1. Osnovna obilježja aminoacil-tRNA-sintetaza i mehanizam aminoacilacije

Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) prva su stepenica u procesu biosinteze proteina. Radi se o skupini esencijalnih, izrazito očuvanih staničnih enzima koji u reakciji aminoacilacije povezuju aminokiselinu s odgovarajućom tRNA. Stoga su upravo aaRS jedini stanični enzimi koji znaju „pročitati“ genetski kod, budući da povezuju informaciju zapisanu u molekuli DNA s informacijom o aminokiselini u polipeptidnom lancu. Dvadeset kanonskih aaRS moguće je podijeliti u dva, strukturno različita razreda: razred I i razred II (tablica 2.2) ^[102].

Tablica 2.2. Podjela aminoacil-tRNA-sintetaza (aaRS) u dva razreda, prema referenci ^[102].

Razred I			Razred II		
Podrazred	aaRS	kvaterna struktura	Podrazred	aaRS	kvaterna struktura
A	MetRS	α, α_2	A	SerRS	α_2
	LeuRS	α		ProRS	α_2
	IleRS	α		ThrRS	α_2
	ValRS	α		GlyRS	α_2
B	CysRS	α, α_2	B	HisRS	α_2
	GlnRS	α		AspRS	α_2
	GluRS	α		AsnRS	α_2
C	TyrRS	α_2	C	LysRS ^a	α_2
	TrpRS	α_2		PheRS	$(\alpha\beta)_2, \alpha$
D	ArgRS	α	C	GlyRS	$(\alpha\beta)_2$
E	LysRS ^a	α		AlaRS	α_2, α

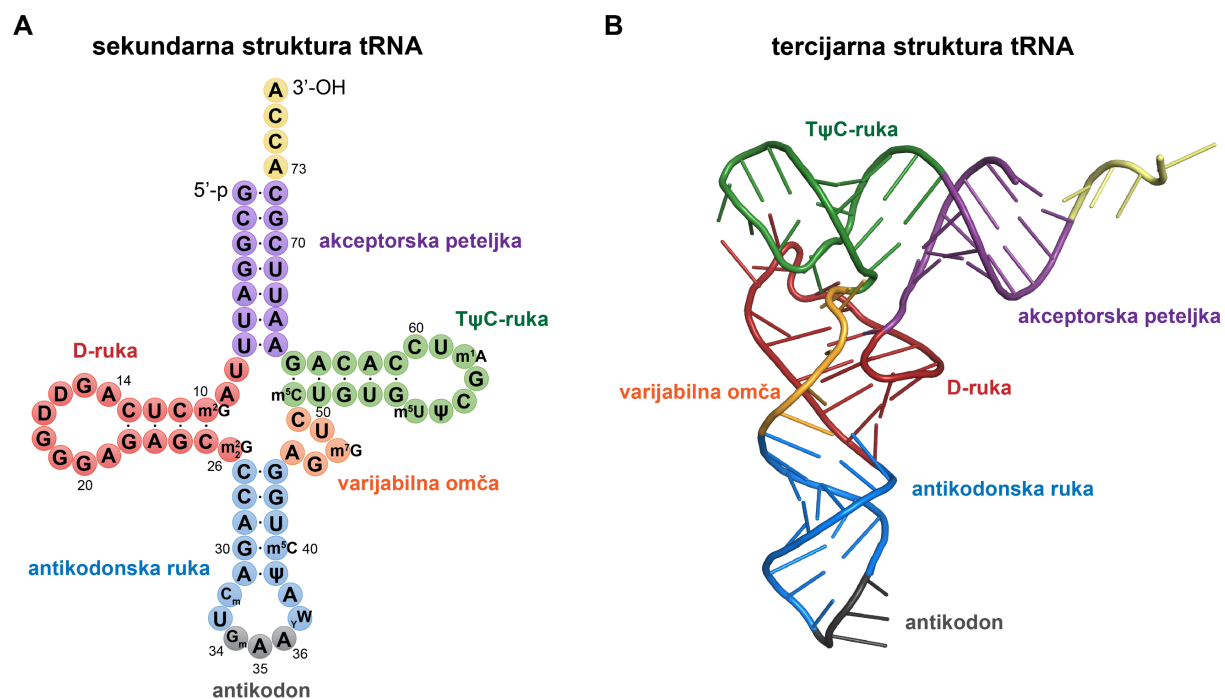
^a LysRS, ovisno o vrsti, može pripadati razredu I ili razredu II

Unatoč strukturnim i mehanističkim razlikama, kod svih aaRS aminoacilacija se odvija u dva koraka: aktivacija i prijenos ^[1, 102]. Aktivacija aminokiseline je prvi korak reakcije u kojem dolazi do preciznog pozicioniranja molekule ATP-a i aminokiseline te nukleofilnog napada atoma kisika α -karboksilne skupine aminokiseline na α -fosfat ATP-a, pri čemu nastaje aminoacil-adenilat (aa-AMP) uz oslobađanje pirofosfata. Osim u slučaju GluRS, GlnRS, ArgRS i LysRS razreda I, za reakciju aktivacije nije potrebna molekula tRNA. Aktivirana aminokiselina potom se u drugom koraku prenosi na molekulu tRNA, nukleofilnim napadom kisika 2'- ili 3'-hidroksilne skupine riboze terminalnog adenzina molekule tRNA na α -ugljikov atom aminoacil-adenilata. Produkt aminoacilacije je aktivirana tRNA koja na svom 3'-kraju

sadrži vezanu pripadnu aminokiselinu (aa-tRNA^{aa}), dok se AMP oslobađa kao izlazna skupina. Ono što ovu reakciju čini termodinamski povoljnom je daljnja hidroliza pirofosfata, te je za sintezu jedne molekule aminoacilirane tRNA potrebno utrošiti dvije visoko energetske fosfodieterske veze.

2.2.2. Strukturna obilježja i elementi identiteta molekula tRNA

Uz aminokiselinu, drugi bitan supstrat aminoacil-tRNA-sintetaza je i molekula tRNA. Postojanje molekule koja bi s jedne strane mogla ostvarivati specifične interakcije s molekulom mRNA i dekodirati kodone, a s druge strane donositi odgovarajuću aminokiselinu do ribosoma pretpostavio je još 50-tih godina 20. stoljeća Francis Crick ^[103]. I zaista, postojanje takvih molekula, danas poznatih kao prijenosne RNA (engl. *transfer RNA*, tRNA) potvrdio je Robert Holley 1965. godine kada je po prvi put određen slijed nukleotida molekule kvaščeve tRNA^{Ala} ^[104]. Budući da sve molekule tRNA moraju na jednak ili barem sličan način ostvarivati interakcije s ribosomom, očekivano je da dijele određene zajedničke karakteristike. Molekule tRNA su jednolančane molekule veličine 73 – 93 ribonukleotida koje sadrže fosforilirani 5'-kraj te hidroksilnu skupinu na 3'-kraju (slika 2.5). Dvodimenzionalna struktura molekula tRNA podsjeća na oblik djeteline, a posljedica je Watson-Crick interakcija između parova baza koji tvore peteljku koja obično završava nesparenim bazama koje tvore omču (slika 2.5A). Sve molekule tRNA na svom 3'-kraju sadrže slijed CCA na koji se veže pripadna aminokiselina ^[105]. Navedeni slijed uglavnom je kodiran genomom (prvenstveno kod bakterija), a ukoliko nije, posttranskripcijskom doradom se nadodaje na 3'-kraj djelovanjem enzima tRNA-nukleotidil-transferaza (prvenstveno kod eukariota i arheja) ^[106]. Jedan od najbitnijih elemenata molekule tRNA svakako je i antikodonska petlja građena od 5 parova baza nakon koje slijedi omča koja sadrži antikodon karakterističan za pojedinu tRNA. U strukturi molekule tRNA moguće je još razaznati i D-ruku, građenu kao peteljku od 3 – 4 para baza nakon koje slijedi omča u kojoj se nalazi modificirana baza dihidrouridin (D). Suprotno od D-ruke u sekundarnoj strukturi nalazi se T ψ C-ruka građena kao peteljka od 5 parova baza i omče s karakterističnim slijedom T ψ C po kojoj je i dobila ime. Varijabilna ruka dio je molekule tRNA između antikodonske domene i T ψ C-ruke, a građena je od 3 – 20 ribonukleotida, te predstavlja element identiteta za neke tRNA ^[107]. Molekule tRNA imaju karakterističnu tercijarnu strukturu u obliku slova L (slika 2.5B), pri čemu se akceptorska peteljka i antikodonska omča nalaze na suprotnim stranama, čime je omogućeno specifično prepoznavanje tRNA od strane pripadne aaRS.



Slika 2.5. Opća struktura kvašćeve tRNA^{Phe}. Glavni dijelovi molekule tRNA su: akceptorska peteljka (ljubičasto), D-ruka (crveno), antiodonska ruka (plavo) s antikodonom (sivo), varijabilna ruka (narančasto), TψC-ruka (zeleno) i CCA-kraj (žuto). A) Sekundarna struktura molekule tRNA^{Phe}. Molekula tRNA^{Phe} sadrži 11 modificiranih nukleotida: 2-metilgvanozin (m²G), 5,6-dihidrouridin (D), N²-dimetilgvanozin (m²₂G), 2'-O-metilцитидин (C_m), 2'-O-metilgvanozin (G_m), vibutozin (ψW), pseudouridin (ψ), 5-metilцитидин (m⁵C), 7-metilgvanozin (m⁷G), 5-metiluridin (m⁵U) i 1-metiladenozin (m¹A). B) Tercijarna struktura molekule tRNA^{Phe} preuzeta je iz baze Protein Data Bank (PDB) (pristupni broj 1EHZ) [108].

Zbog degeneriranosti genetičkog koda, za svaku proteinogenu aminokiselinu postoji skupina molekula tRNA koji se nazivaju izoakceptori. Izoakceptori su uvijek specifični za istu aminokiselinu, iako se, uz antikodon, mogu međusobno razlikovati i u primarnoj sekvenci, strukturi i posttranskripcijskim modifikacijama [109, 110]. Sve izoakceptore prepoznaje uvijek ista aaRS te na njih veže istu odgovarajuću aminokiselinu. Iako su sve tRNA dosta slične molekule, što je jedan od preduvjeta prepoznavanja od strane elongacijskih faktora i ribosoma, ipak sadrže određene strukturne elemente po kojima se međusobno razlikuju, prvenstveno kako bi svaka tRNA bila ispravno prepoznata od strane samo jedne aaRS. Strukturni elementi nazivaju se elementi identiteta, a dijele se na pozitivne elemente identiteta, koji osiguravaju prepoznavanje samo pripadnog para aaRS:tRNA, te negativne elemente identiteta, koji sprječavaju prepoznavanje aaRS i nepripadnih tRNA [111]. Molekule tRNA koje prepoznaju samo jedan kodon, primjerice tRNA^{Met}, kao element identiteta sadrže i nukleotide antikodona [112, 113]. Zbog dozvoljene kolebljivosti baza prilikom translacije (vidi poglavlje 2.1.2), molekule tRNA koje

prepoznaju više kodona također mogu kao element identiteta imati antikodon, pri čemu je druga baza antikodona gotovo uvijek glavni element identiteta. Jasno je da, primjerice, molekule tRNA^{Leu} i tRNA^{Ser} ne mogu imati antikodon kao element identiteta, budući da je leucin, kao i serin, kodiran s čak šest antikodona iz dvije kodonske grupe. Glavni pozitivni element identiteta u tom slučaju je tercijarna struktura i dužina varijabilne ruke, uz diskriminatorne baze kao negativne elemente identiteta [114, 115]. Uz antikodon i varijabilnu ruku, najveći broj elemenata identiteta nalazi se unutar akceptorske peteljke, pri čemu je baza 73 diskriminatorna baza.

2.3. Izoleucil-tRNA-sintetaza

2.3.1. Strukturna i biokemijska obilježja izoleucil-tRNA-sintetaza

Izoleucil-tRNA-sintetaza (IleRS) monomerni je enzim odgovoran za sintezu Ile-tRNA^{Ile} u sve tri domene života [102, 116]. Sintetsko mjesto enzima građeno je od peterolancane paralelne β-ploče povezane α-zavojnica i sadrži dva izrazito očuvana motiva (HIGH i KMSKS) koji sudjeluju u vezanju molekule ATP-a [117, 118]. IleRS veže akceptorsku peteljku molekule tRNA preko malog utora, dok se 3'-kraj tRNA potom veže u sintetsko mjesto. Antikodonsku domenu molekule tRNA^{Ile} veže C-kraj IleRS koji je ujedno i odgovoran za diskriminaciju ostalih tRNA. Sintetsko mjesto razlomljeno je na dva dijela umetanjem domene CP1 (engl. *connective peptide 1*) koja sadrži dodatno katalitičko mjesto za hidrolizu misacilirane tRNA.

Na temelju strukturnih i filogenetskih analiza, IleRS iz sve tri domene života moguće je podijeliti u dvije skupine: bakterijski tip (tip 1 IleRS) i eukariotski tip (tip 2 IleRS) [8, 13, 119]. Bakterijskom tipu pripadaju IleRS iz bakterija, ali i eukariotske mitohondrijske i kloroplastne IleRS. Glavna strukturna karakteristika bakterijskog tipa IleRS je motiv od 4 cisteina na C-kraju proteina čija je uloga koordinacija iona Zn²⁺ [120]. Kinetičke analize su pokazale da je navedeni motiv ključan za aminoacilacijsku aktivnost enzima, dok uklanjanje motiva nije imalo utjecaj na aktivaciju (sintezu izoleucil-adenilata) [120]. Eukariotski tip IleRS obuhvaća eukariotske citosolne IleRS, a karakteriziran je nedostatkom navedenog cink-veznog motiva. Dva tipa IleRS pokazuju 30 % identičnosti na aminokiselinskoj razini, te otprilike 50 – 60 % sličnosti [121]. Nadalje, dva tipa IleRS razlikuju se i prema osjetljivosti na antibiotik mupirocin, pri čemu su bakterijske IleRS značajno osjetljivije na djelovanje mupirocina od eukariotskih IleRS (detaljno opisano u poglavlju 2.3.5.2). Međutim, neke IleRS iz bakterija pokazuju osobine koje su karakteristične za eukariotski tip IleRS, kao što su nedostatak cink-veznog motiva i visoka mupirocinska rezistencija. Dodatno, u filogenetskim analizama navedene IleRS grupiraju se s

eukariotskim, a ne bakterijskim tipom IleRS. Navedeni tip bakterijskih IleRS nazvan je eukariotima-slične IleRS, a smatra se da je prisutnost eukariotskog tipa IleRS (IleRS tipa 2) kod nekih bakterijskih vrsta najvjerojatnije posljedica horizontalnog prijenosa gena [18, 122].

Nedavno provedeno istraživanje na velikom broju bakterijskih, arhejskih i eukariotskih IleRS pokazalo je da se navedena dva tipa IleRS razlikuju i prema očuvanosti bitnih aminokiselinskih bočnih ogranaka unutar sintetskog mjesta enzima [8]. Primjerice, izrazito očuvani Y59 kod *E. coli* (IleRS tipa 1) prisutan je kod arhejskih, ali ne i kod eukariotskih i bakterijskih IleRS2, kao i očuvani slijed ₅₇₂SSL₅₇₄ (*E. coli* numeracija) koji je prisutan samo kod bakterijskih IleRS. Eukariotske IleRS tipa 2 umjesto izoleucina sadrže tirozin unutar HIGH motiva, dok kod bakterijskih IleRS tipa 2 navedena pozicija nije strogo očuvana. IleRS tipa 2 sadrže i dodatne motive koji nisu pronađeni kod tipa 1, primjerice motiv ₅₄₁HYPFE₅₄₅ [13].

2.3.2. Rasprostranjenost dva tipa IleRS u bakterija

Bakterije u pravilu sadrže samo jedan tip gena *ileS* u genomu. Primjerice, Gram-negativna bakterija *E. coli* sadrži *ileS1* kao dio operona od 5 gena, pri čemu je *ileS1* drugi gen unutar operona [123, 124]. Neke bakterije sadrže gen *ileS1* kao samostalnu transkripcijsku jedinicu, a ne kao dio operona, kao primjerice Gram-pozitivna bakterija *Staphylococcus aureus* [125, 126]. Međutim, kod nekih kliničkih izolata bakterije *S. aureus*, uz genomski *ileS1* pronađena je i mupirocin-rezistentna IleRS2, ali u tom slučaju se gen *ileS2* nalazi na plazmidu, a ne u genomu [127]. Plazmidna kopija gena *ileS2* pronađena je nedavno i kod bakterije *Staphylococcus argenteus*, najvjerojatnije kao posljedica horizontalnog prijenosa plazmida iz bakterije *S. aureus* [128]. Stjecanje dodatnog gena izrazito je poželjno budući da pruža bakteriji značajnu selektivnu prednost u okolišu s mupirocinom. Prisutnost mupirocin-rezistentne IleRS u bakterija izvorno je objašnjena upravo horizontalnim prijenosom gena *ileS2* iz eukariota natrag u bakterije [13, 18], iako novija istraživanja sugeriraju da su oba gena, *ileS1* i *ileS2*, jednako stari te su se razdvojili prije odvajanja bakterija od arheja [8]. Neke bakterije kao jedini gen sadrže upravo *ileS2*, kao primjerice bakterija *S. griseus* [8], međutim detaljne analize genomskog okruženja nisu napravljene.

Uz izuzetak mupirocin-producirajuće Gram-negativne bakterije *Pseudomonas fluorescens*, prisutnost oba tipa gena *ileS* unutar istog genoma izrazito je rijetka. Za sada je poznato da bakterije *Bacillus anthracis*, *B. cereus* i *Oceanobacillus iheyensis* sadrže dva tipa gena *ileS* u genomu, međutim regulacija ekspresije navedenih gena nije poznata [18]. Zbog čega

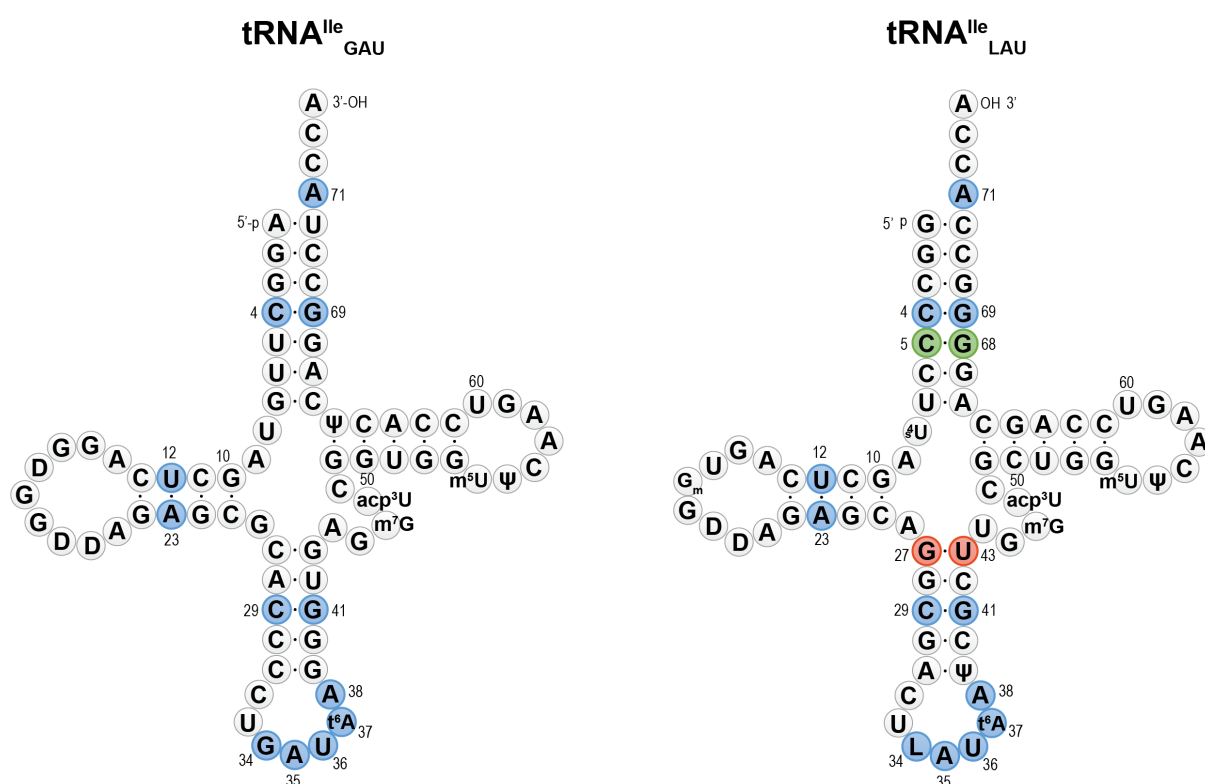
bakterije ne preferiraju imati oba tipa *ileS* unutar genoma, već se gen *ileS2*, ako postoji, nalazi na plazmidu? Postoji li možda određena korelacija između bakterijskih vrsta/rodova i tipa *ileS* kojeg sadrže? Do sada nije provedena sustavna analiza koja bi odgovorila na ovo pitanje.

2.3.3. Molekula tRNA^{Ile} i dekodiranje izoleucinskih kodona

Uz izoleucin, glavni supstrat enzima IleRS je i molekula tRNA^{Ile}. Bakterijski genomi kodiraju dva različita izoakceptora molekule tRNA^{Ile}: GAU i CAU (slika 2.6). Izoakceptor tRNA^{Ile}_{GAU} glavni je izoakceptor te dekodira dva izoleucinska kodona (AUU, AUC), dok je izoakceptor tRNA^{Ile}_{CAU} sporedni te dekodira kodon AUA. Dekodiranje dva izoleucinska kodona pomoću glavnog izoakceptora omogućeno je kolebljivim sparivanjem (tkz. *wooble* sparivanje) pri čemu je dozvoljeno sparivanje G:U, izrazito čest par baza u molekuli RNA. Međutim, budući da se U može spariti i s A i s G na trećoj poziciji kodona, postavlja se pitanje kako je osigurano da sporedni izoakceptor dekodira isključivo izoleucinski kodon AUA, a istovremeno ne dekodira metioninski kodon AUG. Potencijalni problem riješen je posttranskripcijskom modifikacijom citozina koji se kod izoakceptora tRNA^{Ile}_{CAU} modificira u lizidin (k²C34, L) pomoću enzima Tils (engl. *tRNA^{Ile} lysidine synthetase*) [129]. Budući da se L može spariti samo s A, a ne i s G, ribosom će dekodirati AUA kodon pomoću tRNA^{Ile}_{LAU} kao izoleucin. Međutim, ribosom pomoću tRNA^{Met}_{CAU} također može dekodirati kodon AUA kao metionin, a ovaj problem spriječen je modifikacijom ac⁴C34 tRNA^{Met} pomoću enzima TmcA, kako bi se osiguralo jednoznačno prepoznavanje samo AUG kodona [130]. Očekivano, pozitivni elementi identiteta za enzim Tils ujedno su negativni elementi identiteta enzima TmcA i obrnuto, čime je potencijalni problem krivog dekodiranja kodona elegantno riješen [131].

Posttranskripcijske modifikacije molekule tRNA^{Ile} nisu važne samo kako bi se osiguralo ispravno dekodiranje izoleucinskih kodona, već je pokazano da neke modifikacije mogu utjecati i na samu brzinu aminoacilacije. Primjerice, hipermodifikacija prvog susjednog nukleotida antikodona (t⁶A37, N⁶-treonil-karbamoil-adenozin, slika 2.6) molekule tRNA^{Ile} ključna je za aminoacilaciju. Detaljna kinetička analiza na tRNA^{Ile}_{GAU} iz bakterije *E. coli* pokazala je da uklanjanje navedene modifikacije ili zamjena baze A37 u bilo koju drugu bazu dovodi do pada brzine aminoacilacije i do 400 puta, pri čemu je efekt primarno na vrijednosti k_{cat} [132, 133]. Za sporedni izoakceptor tRNA^{Ile}_{LAU} pokazano je da je *in vitro* transkript s modifikacijom t⁶A37 gotovo jednako dobar supstrat enzimu IleRS (k_{cat}/K_m je veći za 3,9 puta u odnosu na nativnu tRNA^{Ile}_{LAU}), pri čemu nije uočena promjena u brzini katalize, ali je transkript

pokazao i do 5 puta manju vrijednost K_m u odnosu na nativnu tRNA^{Ile} [134]. Uz modificiranu bazu A37, baza A38 također je pozitivni element identiteta molekule tRNA^{Ile}, kao i svi nukleotidi antikodona (unatoč činjenici da se baza 34 antikodona razlikuje kod dva izoakceptora tRNA^{Ile}) (slika 2.6). Dodatno, pozitivni elementi identiteta su i parovi baza C4:G69, U12:A23 i C29:G41, pri čemu su podcrtani nukleotidi važniji nego njihovi pripadni parovi [133]. Glavni negativni element identiteta izoakceptora tRNA^{Ile}_{LAU} je par baza G27:U43 koji sprječava interakciju tRNA^{Ile} s enzimom TmcA.



Slika 2.6. Sekundarna struktura izoakceptora tRNA^{Ile} iz bakterije *E. coli* s prikazanim modificiranim nukleotidima. Glavni (GAU) izoakceptor odgovoran je za dekodiranje kodona AUC i AUU, dok je sporedni (LAU) izoakceptor odgovoran za dekodiranje kodona AUA. Pozitivni elementi identiteta koji omogućuju ispravno prepoznavanje tRNA^{Ile} i IleRS označeni su plavo. Zeleno su označeni pozitivni elementi identiteta koji osiguravaju prepoznavanje izoakceptora tRNA^{Ile}_{LAU} od strane enzima Tils (skupa s 4C:69G parom baza), dok su crveno označeni negativni elementi identiteta koji sprječavaju interakciju tRNA^{Ile} i enzima TmcA (odgovornog za prepoznavanje tRNA^{Met}). Modificirani nukleotidi: 4-tiouridin (^sU), 2'-O-metilgvanozin (G_m), dihidrouridin (D), N⁶-treonilkarbamoiladenozin (t⁶A), pseudouridin (ψ), metilgvanozin (m⁷G), 3-(3-amino-3-karboksipropil)uridin (acp³U), 5-metiluridin (m⁵U). Prilagođeno prema referencama [133, 135].

Zanimljivo je da uloga modifikacije t⁶A37 nije isključivo vezana za brzinu aminoacilacije. Modifikacija t⁶A37 izrazito je očuvana te je jedna od rijetkih modifikacija

prisutnih u sve tri domene života, a nalazi se u gotovo svim tRNA koje dekodiraju kodon ANN, te se smatra da ima ulogu u sprječavanju pomaka okvira čitanja i ispravnom sparivanju baza kodona i antikodona [136, 137]. Modifikacija t⁶A37 potpomaže otvorenu konformaciju antikodonske petlje, pri čemu sterički sprječava Watson-Crick-ovo sparivanje sa susjednim bazama (prvenstveno bazom 33), što je izrazito bitno prilikom dekodiranja kodona na ribosomu [138]. Ukoliko se na položaju 37 nalazi gvanin, on je također često modificiran (m¹G), a uloga mu je također u održavanju ispravnog okvira čitanja [139,140].

2.3.4. Točnost aminoacilacije i mehanizmi popravka pogreške kod izoleucil-tRNA-sintetaze

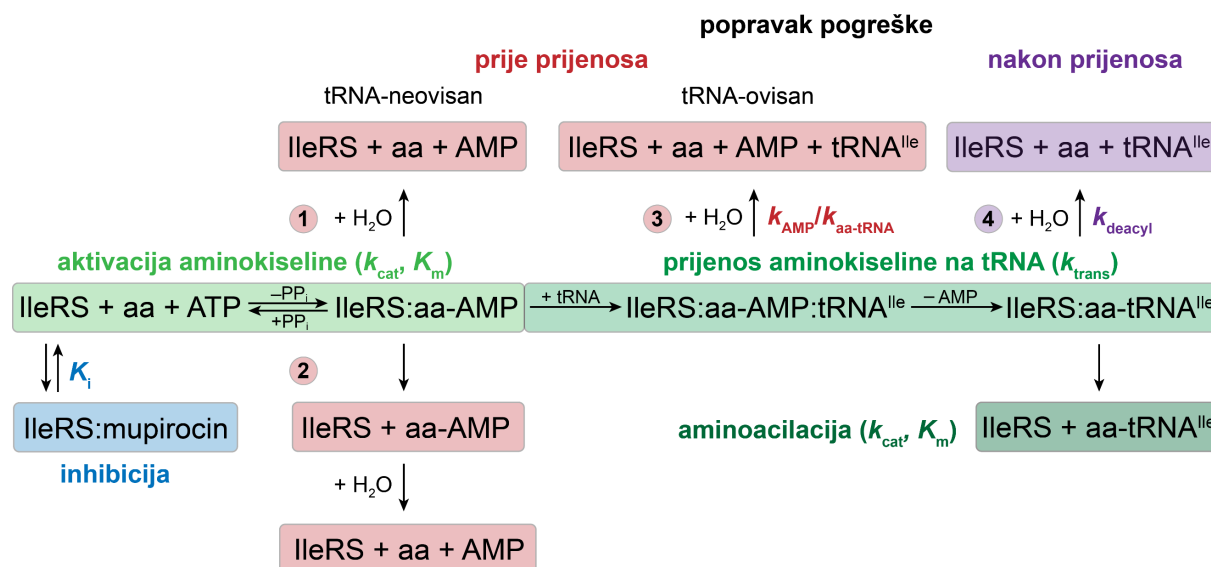
Preduvjet za ispravnu biosintezu proteina je da ribosom ima na raspolaganju samo ispravno aminoacilirane tRNA. Eksperimentalno određena tolerabilna razina pogreške u translaciji u bakteriji *E. coli* iznosi 1 pogrešno ugrađena aminokiselina na svakih 3300 [7]. Elongacijski faktor Tu (EF-Tu) u nekim slučajevima pruža dodatni mehanizam kontrole kvalitete, budući da može diskriminirati određene aminoacilirane od misaciliranih tRNA i na taj način spriječiti dolazak misaciliranih tRNA do ribosoma. Međutim, kako navedeno svojstvo nije univerzalno pravilo za svaki par aminokiseline i tRNA^{aa}, otpuštanje misacilirane tRNA sa sintetaze potencijalno dovodi do inkorporacije nepripadne aminokiseline na pogrešno mjesto u proteinu što može biti toksično za stanicu [2, 3].

Ispravna sinteza Ile-tRNA^{Ile} podrazumijeva da IleRS može jednoznačno prepoznati i vezati samo pripadni izoleucin na tRNA^{Ile}. IleRS u pravilu nema problem diskriminirati nepripadne tRNA u korist pripadne tRNA^{Ile}. Konstanta disocijacije (K_d) između IleRS i tRNA^{Ile} pri fiziološkom pH u pravilu se kreće od 0,1 do 1 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ (ovisno o eksperimentalnim uvjetima), a relativno visok K_d (u odnosu na, primjerice, enzime koji vežu DNA) je potreban kako bi se tRNA brzo otpustila s enzima za potrebe biosinteze proteina [4, 102, 141]. Jednoznačno prepoznavanje pripadne tRNA^{Ile} zapravo i nije neočekivano jer su i IleRS (~ 100 kDa) i tRNA^{Ile} (~ 25 kDa) velike makromolekule te je moguće uspostaviti mnogobrojne specifične interakcije, što se odražava i na K_d prema nepripadnim tRNA koji je u pravilu 10 – 10⁴ puta manji u odnosu na K_d za tRNA^{Ile} [141]. Međutim, IleRS ima problem diskriminirati aminokiseline koje su strukturno slične izoleucinu, pogotovo ako zbog svoje male veličine (~ 110 Da) nemaju specifičnu funkcionalnu skupinu koja bi osigurala jednoznačno prepoznavanje. Glavna prijatnja IleRS je proteinogena aminokiselina valin, koja se aktivira svega 150 puta lošije nego pripadni izoleucin, što znači da će na svakih 150 aktiviranih izoleucina biti aktiviran jedan valin [6, 8].

Budući da je pokazano da korak prijenosa nije diskriminatoran kod IleRS [6, 8, 9], aktivacija nepripadne aminokiseline znači i njeno prenošenje na tRNA^{Ile} te potencijalno otpuštanje pogrešno aminoacilirane (misacilirane) tRNA u otopinu te potencijalno inkorporaciju nepripadne aminokiseline na neka izoleucinska mjesta u proteinu. IleRS također jednako efikasno aktivira i neproteinogenu aminokiselinu norvalin, koja se od izoleucina također razlikuje za jednu metilensku skupinu i to sa sličnim diskriminacijskim faktorom [2]. Budući da je razina pogreške IleRS (1 u 150) veća od dozvoljene tolerabilne razine pogreške u translaciji (1 na 3300), IleRS sadrži nekoliko mehanizama kojima spriječava nastanak misaciliranih tRNA (slika 2.7), a to su: i) popravak pogreške prije prijenosa koji se odvija u sintetskom mjestu enzima, a kojim se hidrolizira pogrešni aminoacil-adenilat i ii) popravak pogreške nakon prijenosa koji se odvija u zasebnoj domeni za popravak pogreške, a kojim se hidrolizira misacilirana tRNA [1].

2.3.4.1. Popravak pogreške prije prijenosa

Popravak pogreške prije prijenosa odvija se u sintetskom mjestu enzima kada nastane nepripadni aminoacil-adenilata, a prije nego se aminokiselina prenese na tRNA. Iako je rasprava o lokaciji ovog tipa popravka dugo bila zastupljena u polju, novija istraživanja jednoznačno su potvrdila da se popravak pogreške prije prijenosa zaista odvija u sintetskom mjestu enzima [6]. Kod *EcIleRS* uočeno je da prisutnost tRNA^{Ile} značajno stimulira ovaj tip popravka pogreške. Naime, u odsutnosti tRNA (tRNA-neovisan popravak pogreške prije prijenosa), popravak pogreške zastupljen je u ukupnom popravku pogreške s oko 3 %, dok u prisutnosti tRNA (tRNA-ovisan popravak pogreške prije prijenosa) doprinosi ukupnom popravku pogreške čak do 30 % (slika 2.7). Međutim, tRNA-ovisan popravak pogreške nije univerzalno svojstvo svih IleRS. Naime, osim kod *EcIleRS* (tip 1 IleRS), navedeni popravak pogreške pronađen je do sada samo kod citosolne IleRS iz kvasca *S. cerevisiae* (*ScIleRS2*) [8]. Zanimljivo, kod IleRS iz bakterije *S. griseus* (*SgIleRS2*) nije uočeno postojanje tRNA-ovisnog popravka pogreške prije prijenosa. Budući da je pokazano da navedeni popravak pogreške nije nužan za preživljenje bakterije *E. coli* prilikom rasta u minimalnom mediju u prisutnosti visoke koncentracije valina [8], i dalje ostaje otvoreno pitanje koja je, prvenstveno biološka uloga tRNA-ovisnog popravka pogreške prije prijenosa. Također, zbog čega neke IleRS posjeduju, a neke ne posjeduju navedeni popravak pogreške te postoji li korelacija između tRNA-ovisnog popravka pogreške prije prijenosa i tipa IleRS?



Slika 2.7. Reakcijska shema aminoacilacije enzima IleRS s prikazanim mehanizmima popravka pogreške enzima i inhibicijom mupirocinom. Zeleno je označena aminoacilacija, koja uključuje aktivaciju aminokiseline i prijenos aminokiseline na tRNA^{Ile}, te disocijaciju aminoacilirane tRNA^{Ile} za pripadni supstrat enzima IleRS, izoleucin. U slučaju nepripadnog supstrata, IleRS može koristiti popravak pogreške prije prijena (crveno), koji uključuje enzimsku hidrolizu nepripadnog aminoacil-adenilata (1), potpomognutu disocijaciju nepripadnog aminoacil-adenilata (2) ili enzimsku hidrolizu nepripadnog aminoacil-adenilata u prisutnosti tRNA (3), odnosno popravak pogreške nakon prijena (ljubičasto) koji hidrolizira misaciliranu tRNA^{Ile}. Mupirocin je kompetitivni inhibitor enzima IleRS [8]. Kinetičke konstante koje su određene u sklopu ovog rada naznačene su pored odgovarajućih reakcija.

Kao važan aminokiselinski ogranak bitan za tRNA-ovisan popravak pogreške prije prijena kod *EcIleRS* okarakteriziran je tirozin na poziciji 59 [10], pri čemu je supstitucija navedenog tirozina u treonin dokinula tRNA-ovisnu stimulaciju popravka pogreške prije prijena. Zanimljivo, supstitucijom treonina u fenilalanin enzim je i dalje zadržao značajnu aktivnost tRNA-ovisnog popravka pogreške prije prijena. Analiza sravnjenja proteinskih sekvenci IleRS u skladu je s kinetičkim eksperimentima u kojima je pokazano da *SgIleRS* (koja sadrži treonin umjesto tirozina) nema tRNA-ovisan popravak pogreške prije prijena, dok primjerice *ScIleRS* (koja sadrži fenilalanin) sadrži navedeni popravak pogreške (slika 2.8) [8]. Međutim, *EcLeuRS* također na navedenoj poziciji sadrži tirozin, dok *EcValRS* sadrži asparagin, pri čemu oba enzima ne posjeduju tRNA-ovisan popravak pogreške prije prijena [6, 142].

Treći mehanizam popravak pogreške prije prijena je selektivno otpuštanje nepripadnog aminoacil-adenilata u otopinu, uz zadržavanje pripadnog izoleucil-adenilata u aktivnom mjestu enzima (slika 2.7). Navedeni popravak pogreške nije svojstvo enzima

EcIleRS, barem ne prema valil-adenilatu [6], dok je kod enzima *ScIleRS* uočena određena aktivnost selektivnog otpuštanja valil-adenilata u otopinu [8].

			tRNA-ovisan popravak pogreške prije prijenosa
<i>E. coli</i> ValRS	40	PPPNV* T G S L H M G H A F 54	–
<i>E. coli</i> LeuRS	41	L - P Y P S G R L H M G H V R 54	–
<i>E. coli</i> IleRS1	56	G P P Y A N G S I H I G H S V 70	+
<i>P. fluorescens</i> IleRS1	56	G P P Y A N G T I H I G H A L 70	nije određeno
<i>S. cerevisiae</i> IleRS1	92	G P P Y A N G E L H L G H A L 106	nije određeno
<i>P. fluorescens</i> IleRS2	46	G P P F A T G L P H Y G H I L 60	nije određeno
<i>S. cerevisiae</i> IleRS2	45	G P P F A T G T P H Y G H I L 59	+
<i>S. griseus</i> IleRS2	50	G P P T A N G M P G A H H I E 64	–

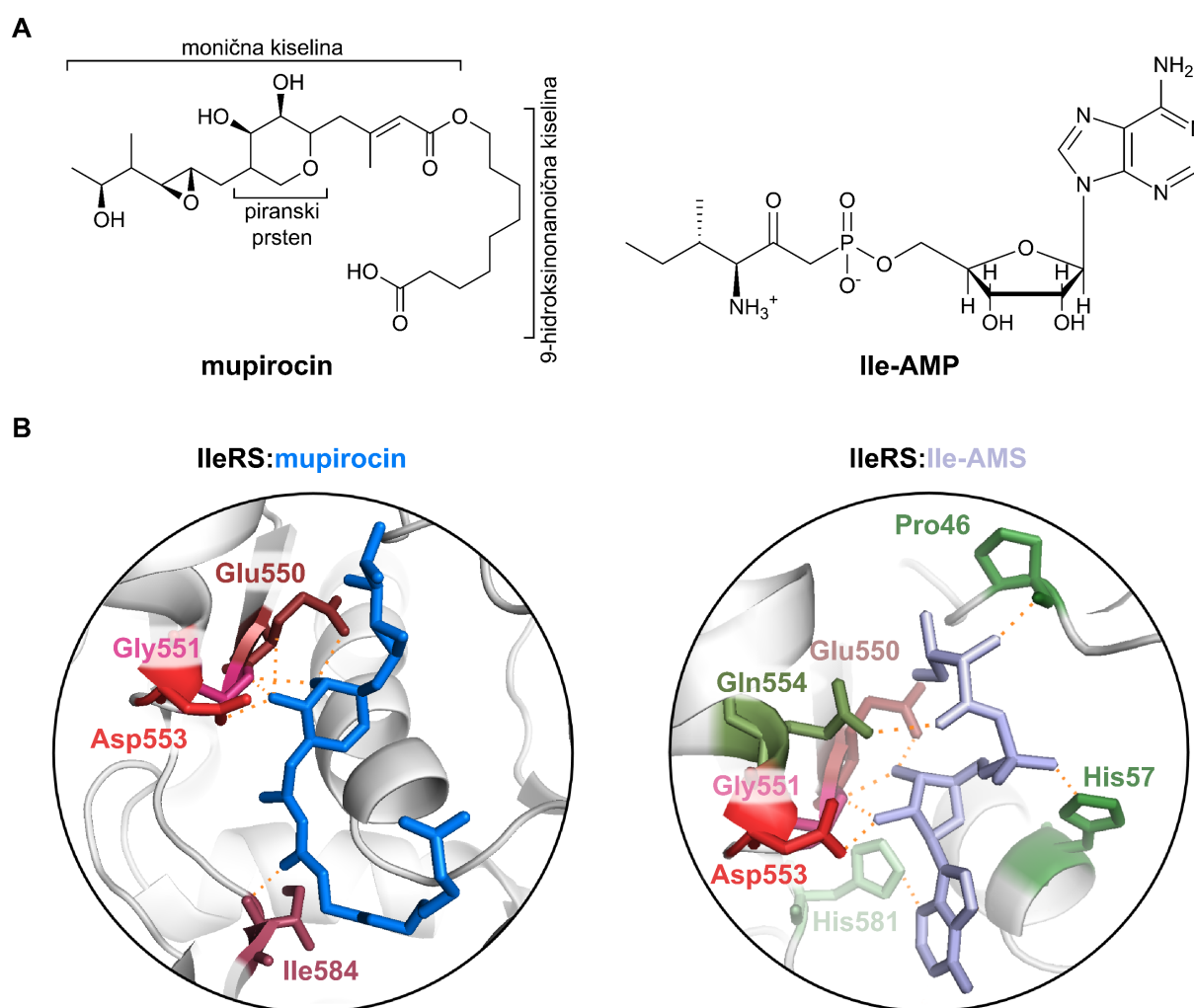
Slika 2.8. Korelacija očuvanog tirozina unutar katalitičke domene aaRS i tRNA-ovisnog popravka pogreške prije prijenosa. Svrnjenje je preuzeto iz literature [8], uz dodatak mitohondrijske *S. cerevisiae* IleRS1, *P. fluorescens* IleRS1 i IleRS2 te *E. coli* ValRS. Očuvani tirozin (Y) označen je zvjezdicom (*). Podaci tRNA-ovisnog popravka pogreške prije prijenosa preuzeti su iz literature [6, 8, 10, 142].

2.3.4.2. Popravak pogreške nakon prijenosa

Glavni mehanizam kojim IleRS osigurava ispravnu sintezu Ile-tRNA^{Ile} je popravak pogreške nakon prijenosa, a uloga mu je hidroliza misacilirane tRNA^{Ile} (slika 2.7). Brojni eksperimenti nedvosmisleno su potvrdili da je domena za popravak pogreške zaista odgovorna za hidrolizu misacilirane tRNA. Izolirana domena za popravak pogreške enzima IleRS uspješno je deacilirala Val-tRNA^{Ile}, dok istovremeno nije pokazivala deacilacijsku aktivnost prema Ile-tRNA^{Ile}. Mutagene i kinetičke analize pokazale su da je za deacilacijsku aktivnost *EcIleRS* najzaslužniji aspartat na poziciji 342 [6, 143]. Navedeni bočni ogranak očuvan je u svim analiziranim IleRS, te je izrazito očuvan u evolucijski srodnim ValRS i LeuRS. Supstitucija D342A u potpunosti dokida deacilacijsku aktivnost IleRS prema Val-tRNA^{Ile} [8, 12], ali i aktivnost ValRS i LeuRS prema njihovim supstratima [6]. Međutim, primijećeno je da unatoč navedenoj mutaciji, *EcIleRS* i dalje posjeduje određenu deacilacijsku aktivnost prema Nva-tRNA^{Ile}, koja je u potpunosti ugašena tek uvođenjem dodatne mutacije T243R [2]. Nedavno istraživanje pokazalo je da se kod *EcIleRS* popravak pogreške nakon prijenosa odvija dijelom mehanizmom *in trans* – disocirana misacilirana tRNA ponovno se veže na enzim na način da se 3'-kraj misacilirane tRNA smješta u aktivno mjesto domene za popravak pogreške gdje dolazi do hidrolize, suprotno do sada uvriježenom mišljenju da IleRS dominantno koristi mehanizam popravka pogreške *in cis* [144].

2.3.5. Mupirocin kao inhibitor enzima IleRS i mehanizam inhibicije

Zbog svoje nemjerljive važnosti u biosintezi proteina, aaRS su česta meta mnogih antibiotika [145]. Glavna prijetnja enzima IleRS u sintezi Ile-tRNA^{Ile} je prirodni antibiotik mupirocin (slika 2.9A), kojeg proizvodi soj bakterije *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 10586 [146]. Mupirocin je izrazito jaki inhibitor IleRS tipa I (mupirocin-osjetljive IleRS), a ispoljava svoje djelovanje na način da se veže u sintetsko, aktivno mjesto enzima inhibirajući sintezu izoleucil-adenilata te posljedično biosintezu proteina (slika 2.9B). Bakterija *P. fluorescens*, koja prirodno sadrži bakterijski tip IleRS u genomu (IleRS1), štiti se od djelovanja mupirocina ekspimirajući IleRS



Slika 2.9. Vezanje mupirocina i izoleucil-adenilata unutar sintetskog mjesta IleRS. A) Kemijska struktura mupirocina (lijevo) i izoleucil-adenilata (Ile-AMP, desno). B) Kristalna struktura IleRS iz bakterije *Thermus thermophilus* (IleRS tipa 2) s vezanim mupirocinom (lijevo) i nehidrolizabilnim analogom Ile-AMP-a (Ile-AMS, desno). Isti bočni ogranci (Glu550, Gly551 i Asp553) ostvaruju interakciju s hidroksilnim skupinama na piranskom prstenu mupirocina (lijevo) te s ribozom Ile-AMS-a (desno). Bočni ogranci koji ostvaruju interakcije specifično s Ile-AMS-om označeni su zeleno. Struktura je preuzeta iz baze PDB (pristupni brojevi 1JZS i 1JZQ).

tipa 2 izrazito rezistentnu na djelovanje mupirocina [15]. *PflleRS2* nalazi se unutar genomskog operona odgovornog za biosintezu mupirocina, a ovakva organizacija *IleRS* pronađena je za sada jedino kod soja NCIMB 10586 bakterije *P. fluorescens* [147, 148].

2.3.5.1. Mehanizmi inhibicije enzimske aktivnosti

Inhibitori su spojevi koji vezanjem na enzim smanjuju ili pak potpuno dokidaju enzimsku aktivnost. Budući da je mupirocin kompetitivni inhibitor *IleRS*, fokus će u ovom radu biti na kompetitivnim inhibitorima [149, 150]. Stupanj inhibicije opisuje ravnotežna konstanta disocijacije kompleksa enzim:inhibitor (K_d), koja se kod analize inhibitora često naziva konstanta inhibicije (K_i). U slučaju kompetitivne inhibicije, konstanta inhibicije određena je omjerom konstanti brzina nestanka (k_{-3}) i nastanka (k_3) kompleksa enzim:inhibitor prema jednadžbi 2.1. Kod analize klasičnih kompetitivnih inhibitora i) konstanta inhibicije znatno je veća od ukupne koncentracije korištenog enzima i ii) brzina uspostavljanja ravnoteže između enzima, inhibitora i kompleksa enzim:inhibitor znatno je brža u odnosu na brzinu katalize. U tim uvjetima vrijede postavke ustaljenog stanja te je konstantu inhibicije moguće izračunati koristeći model kompetitivne inhibicije. Međutim, neki inhibitori se vežu za enzim s izrazito visokim afinitetom te je udio slobodnog inhibitora značajno smanjen uslijed nastanka kompleksa enzim:inhibitor. U tim uvjetima pretpostavke ustaljenog stanja više ne vrijede, budući da se koncentracija slobodnog inhibitora više ne može aproksimirati koncentracijom ukupnog inhibitora (analogno aproksimaciji koncentracije slobodnog supstrata s ukupnom koncentracijom supstrata). Inhibitori koji uzrokuju ovakav tip inhibicije nazivaju se jako-vezujući inhibitori (engl. *tight-binding inhibitors*) [150, 151]. I kod klasičnih inhibitora i kod jako-vezujućih inhibitora pretpostavljeno je postojanje brze ravnoteže između inhibitora, enzima i kompleksa enzim:inhibitor. Ovaj tip inhibitora u literaturi je poznati još i kao *fast-on/fast-off* inhibitori, kako bi se istaknula činjenica da su konstante brzine nastanka kompleksa (k_3 , u ovom radu označena i kao k_{on} , engl. *constant on-rate*) i konstanta brzine nestanka kompleksa (k_{-3} , u ovom radu označena i kao k_{off} , engl. *constant off-rate*) brže od brzine katalize (k_{cat}).

$$K_i = \frac{k_{-3} (k_{off})}{k_3 (k_{on})} \quad (2.1)$$

Budući da je konstanta K_i određena omjerom konstanti brzina reakcija k_{off} i k_{on} , dva osnovna načina koja mogu dovesti do niske vrijednosti K_i (odnosno visokog afiniteta) su i)

visoka vrijednosti k_{on} ili ii) niska vrijednosti k_{off} . Drugim riječima, visok afinitet prema inhibitoru prvenstveno je vođen velikom brzinom asocijacije kompleksa enzim:inhibitor ili sporom brzinom disocijacije inhibitora s enzima. Kako je brzina asocijacije limitirana brzinom difuzije, niska vrijednost K_i u pravilu je posljedica spore brzine disocijacije kompleksa.

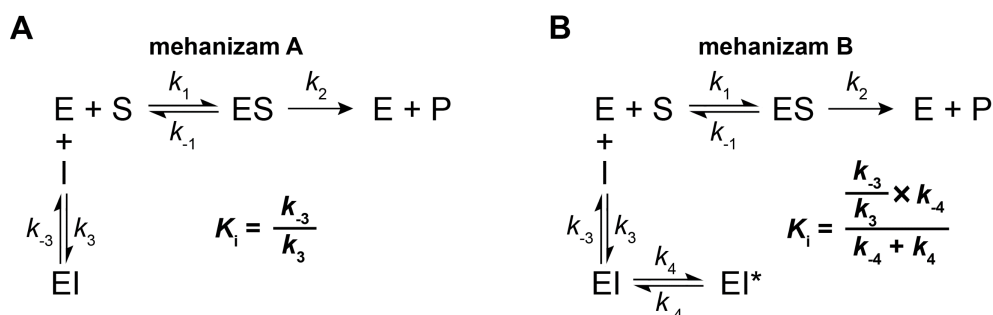
Do sada je izvedeno nekoliko jednadžbi i opisano nekoliko eksperimentalnih uvjeta pomoću kojih je moguće odrediti konstantu inhibicije za jako-vezujući inhibitor ^[150, 152]. U slučaju kompetitivnog jako-vezujućeg inhibitora situacija je značajno pojednostavljena, budući da je povećanjem koncentracije supstrata moguće povećati prividnu (opaženu) konstantu inhibicije ($K_{i, \text{app}}$, engl. *apparent inhibition constant*) ^[150, 153, 154]. Pravu konstantu inhibicije (K_i) potom je moguće odrediti prema jednadžbi 2.2 uzimajući u obzir korištene koncentracije supstrata i pripadne vrijednosti K_m . Bitno je napomenuti da svaki inhibitor čija koncentracija u reakcijskoj smjesi odgovara koncentraciji korištenog enzima (neovisno o pravoj konstanti inhibicije) prati mehanizam inhibicije jako-vezujućih inhibitora, te se postavke ustaljenog stanja ne mogu primijeniti, jer se troše inhibitor i enzim te dolazi do vremenskog usporavanja inhibicije.

$$K_{i, \text{app}} = K_i \times \left(1 + \frac{[S]}{K_m} \right) \quad (2.2)$$

Posebna skupina inhibitora su sporo-vezujući inhibitori (engl. *slow-binding, time-dependent* ili *slow-onset inhibitors*), nazvani kako bi se istaknula činjenica da se vezanje, koje podrazumijeva uspostavljanje ravnoteže između enzima, inhibitora i kompleksa enzim:inhibitor, odvija na vremenskoj skali koja je usporediva s brzinom katalize u ustaljenom stanju. Postoje dva glavna slučaja koja mogu dovesti do sporo-vezujuće inhibicije: i) zbog sporog uspostavljanja ravnoteže između inhibitora, enzima i kompleksa enzim:inhibitor (mehanizam A) ili ii) zbog spore konformacijske promjene strukture enzima koja nastaje nakon vezanja inhibitora (mehanizam B) (slika 2.10) ^[155, 156].

Mehanizam A podrazumijeva da kompleks enzim:inhibitor nastaje u jednom sporom koraku, pri čemu su vrijednosti $k_3 \times [I]$ i k_{-3} puno manje u odnosu na brzine nastanka i nestanka kompleksa enzim:supstrat ($k_1 \times [S]$ i k_{-1}) te brzinu katalize (k_2) (slika 2.10A). U pravilu je glavni faktor koji utječe na ukupnu konstantu inhibicije brzina disocijacije kompleksa (k_{-3}), pri čemu brzina nastanka kompleksa (k_3) može biti brza ili spora. U slučaju da inhibitor potpada pod

mehanizam A, konstanta inhibicije (K_i) predstavlja ravnotežnu konstantu disocijacije kompleksa enzim:inhibitor, a određena je prema jednadžbi 2.1.

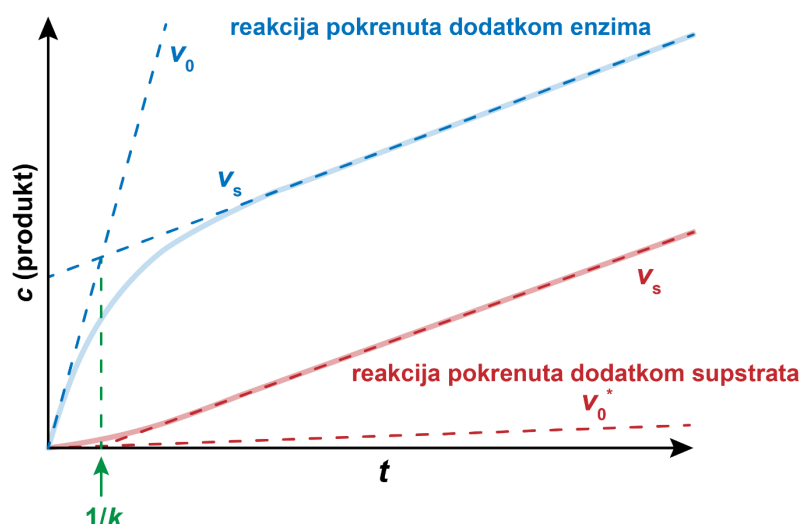


Slika 2.10. Prikaz mehanizma inhibicije sporo-vezujućeg inhibitora. A) Mehanizam A: spora inhibicija posljedica je sporog uspostavljanja ravnoteže između enzima (E), inhibitora (I) i kompleksa enzim:inhibitor (EI). B) Mehanizam B: ravnoteža između E, I i kompleksa EI se brzo uspostavlja, nakon čega slijedi spora promjena konformacije enzima u kompleks EI*. k_3 i k_{-3} su brzine nastajanja, odnosno nestajanja kompleksa EI, dok su k_4 u k_{-4} brzine nastajanja, odnosno nestajanja kompleksa EI*. K_i je ravnotežna konstanta inhibicije.

Uspostavljanje ravnoteže između inhibitora i enzima može biti izrazito brzo, međutim ako nakon vezanja slijedi spora promjena konformacije enzima, tada govorimo o mehanizmu B (slika 2.10B). U tom slučaju ravnotežna konstanta nastanka kompleksa enzim:inhibitor također je određena omjerom konstanti brzina k_{-3}/k_3 , uz pretpostavku da su svi ti koraci značajno brži u odnosu na k_4 i k_{-4} . Zbog izrazito spore promjene konformacije enzima koja slijedi nakon vezanja, konstanta inhibicije (K_i) za reakciju određena je kao na slici 2.10B.

Glavna karakteristika sporo-vezujućih inhibitora, neovisno potpadaju li pod mehanizam A ili mehanizam B, je nastanak produkta u vremenu u prisutnosti inhibitora koji nije linearan. Također je bitno napomenuti da zbog same prirode sporo-vezujućih inhibitora, krivulja nastanka produkta u vremenu bitno se razlikuje ovisno o tome je li reakcija pokrenuta dodatkom enzima ili je enzim predinkubiran s inhibitorom, a reakcija je pokrenuta dodatkom supstrata (slika 2.11). U slučaju kada se reakcija pokreće dodatkom enzima, krivulja nastanka produkta u vremenu u prisutnosti inhibitora odražava sporo nastajanje ravnoteže između enzima, inhibitora i kompleksa enzim:inhibitor, te je opisana jednadžbom 2.3, pri čemu je v_0 inicijalna brzina, v_s brzina ustaljenog stanja, k opaženi koeficijent reakcije prvog reda za uspostavljanje ravnoteže između enzima, inhibitora i kompleksa enzim:inhibitor, c koncentracija nastalog produkta, a t je vrijeme.

$$c = v_s \times t + \frac{(v_0 - v_s) \times (1 - e^{-k \times t})}{k} \quad (2.3)$$



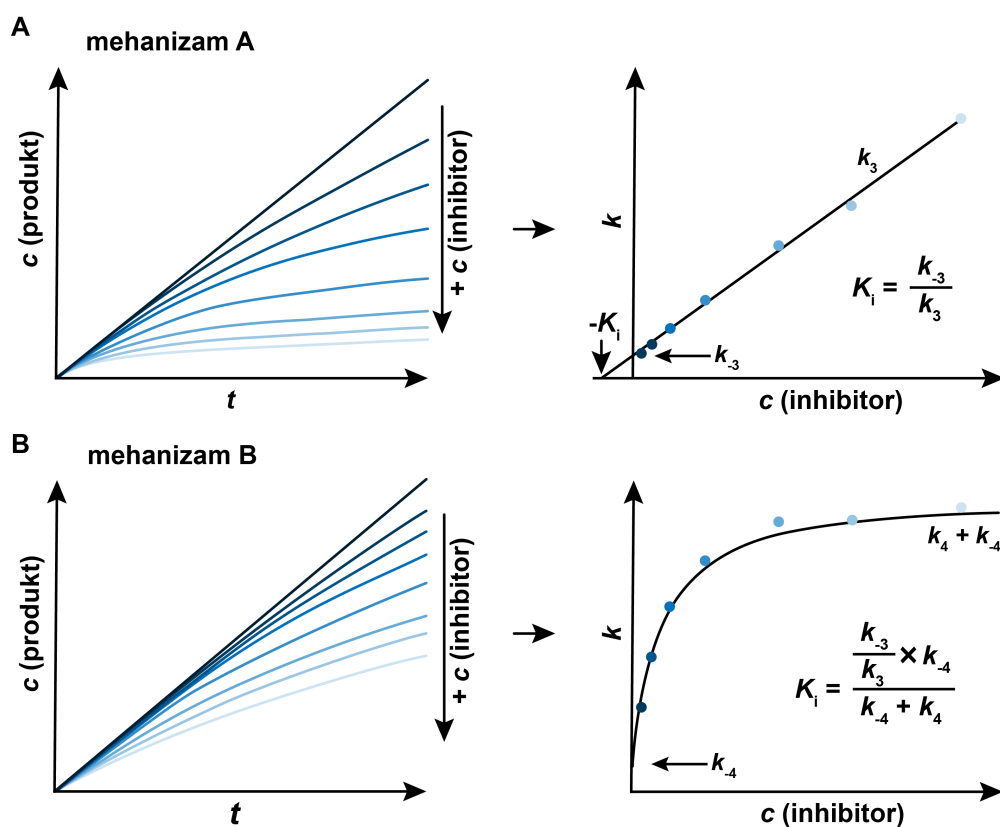
Slika 2.11. Krivulja nastanka produkta u vremenu za sporo-vezujući inhibitor. Reakcije su pokrenute dodatkom enzima (svjetlo plava krivulja) ili dodatkom supstrata uz predinkubaciju enzima i inhibitora (svjetlo crvena krivulja). Tamno plave i tamno crvene iscrtkane linije predstavljaju inicijalnu brzinu (v_0 , v_0^*) i brzinu ustaljenog stanja (v_s) nakon uspostavljanja ravnoteže između enzima, inhibitora i kompleksa enzim:inhibitor. Zeleno je označen opaženi koeficijent reakcije prvog reda, k . Prilagođeno prema referenci ^[157].

Ovisnost opaženog koeficijenta k o koncentraciji inhibitora također daje uvid u mehanizam inhibicije. Ukoliko se inhibitor veže za enzim mehanizmom A, ovisnost opaženog koeficijenta reakcije prvog reda k o koncentraciji korištenog inhibitora je linearna, te je brzine nastanka (k_3) i brzine nestanka (k_{-3}) kompleksa EI moguće odrediti prema jednadžbi 2.4 (slika 2.12A). Prividna konstanta inhibicije ($K_{i, \text{app}}$) određuje se potom prema jednadžbi 2.1, dok se prava konstanta inhibicije određuje uzimajući u obzir korištene koncentracije supstrata i pripadne vrijednosti K_m prema jednadžbi 2.2. Ukoliko se inhibitor veže za enzim mehanizmom B, ovisnost opaženog koeficijenta k o koncentraciji korištenog inhibitora je nelinearna (slika 2.12B).

$$k = k_{-3} + k_3 \times [I] \quad (2.4)$$

Konačno, poseban slučaj su inhibitori koji imaju izrazito jaki afinitet prema enzimu, a pokazuju vremensku ovisnost inhibicije. Takvi inhibitori nazivaju se jaki, sporo-vezujući inhibitori (engl. *tight, slow-binding inhibitors*). Za jake, sporo-vezujuće inhibitore koji potpadaju pod mehanizam A (slika 2.12A) izvedena je integrirana jednadžba koja uzima u obzir trošenje koncentracije slobodnog enzima i inhibitora ^[155], iako se i u ovom slučaju može

primijeniti povećana koncentracija supstrata kako bi se povećala prividna konstanta inhibicije, odnosno smanjila inhibicija enzima.



Slika 2.12. Krivulje nastanka produkta u vremenu i određivanje vrijednosti K_i za sporo-vezujući inhibitor. Reakcije su pokrenute dodatkom enzima. A) Inhibitor se veže na enzim mehanizmom A, te se inicijalna brzina reakcije (v_0) ne mijenja s porastom koncentracije inhibitora. Konstante brzine nastanka (k_3) i nestanka (k_{-3}) kompleksa enzim:inhibitor određuju se iz linearne ovisnosti koeficijenta k o koncentraciji korištenog inhibitora. B) Inhibitor se veže na enzim mehanizmom B te uzrokuje konformacijsku promjenu enzima uslijed vezanja. Inicijalna brzina reakcije mijenja se s porastom koncentracije inhibitora, a ovisnost koeficijenta k o koncentraciji korištenog inhibitora je nelinearna. Prilagođeno prema referenci [158].

2.3.5.2. Mupirocin – kompetitivni inhibitor enzima IleRS

Konstante inhibicije mupirocinom određene su za IleRS iz različitih organizama. Prva istraživanja pokazala su da je *E. coli* IleRS (tip 1) snažno inhibirana mupirocinom, i u reakciji aktivacije ($K_i = 6 \text{ nmol dm}^{-3}$) i u reakciji aminoacilacije ($K_i = 2,5 \text{ nmol dm}^{-3}$) [14]. Yanagisawa i Kawakami okarakterizirali su mupirocin-osjetljivu IleRS iz bakterije *P. fluorescens*, te pokazali da mupirocin inhibira ukupnu aminoacilaciju i prema izoleucinu ($K_i = 10,5 \text{ nmol dm}^{-3}$) i prema ATP-u ($K_i = 15 \text{ nmol dm}^{-3}$) [15]. Navedeno istraživanje jedno je od rijetkih u kojima je mupirocin okarakteriziran i prema ATP-u, koji je u gotovo svim drugim istraživanjima zanemaren, iako je

jednako bitan supstrat kao i izoleucin. Pope i suradnici su prilikom karakterizacije IleRS tipa 1 iz bakterije *Staphylococcus aureus* odredili do sada najmanju publiciranu konstantu inhibicije, $K_i = 23 \text{ pmol dm}^{-3}$ [16]. Zanimljivo, SaIleRS1, koja ima izrazito jaki afinitet prema mupirocinu, pokazala je i vremensku ovisnost inhibicije karakterističnu za jake, sporo-vezujuće inhibitore. SaIleRS1 pokazuje vremensku ovisnost inhibicije i u prisutnosti prirodnih i polu-sintetskih analoga mupirocina, dok u prisutnosti analoga aktivacijskih intermedijera vremenska ovisnost inhibicije nije uočena [159].

S druge strane, IleRS tipa 2 pokazale su se značajnije rezistentnim na mupirocin, bilo da se radi o bakterijskom ili eukariotskom tipu. Korištenjem ukupnog staničnog ekstrakta iz bakterije *P. fluorescens* pokazano je da konstanta inhibicije u ukupnoj aminoacilaciji iznosi $K_i = 14,5 \text{ mmol dm}^{-3}$, a slični podaci dobiveni su i korištenjem pročišćenog enzima PflIleRS2 ($K_i > 5 \text{ mmol dm}^{-3}$) [15, 17]. Najviša do sada izmjerena konstanta inhibicije, izuzev PflIleRS2, određena je za IleRS iz bakterije *Streptomyces griseus* u reakciji aktivacije ($K_i = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$), koja je u razini PflIleRS2 [8]. Ekstrakt jetre štakora također je pokazao rezistenciju ($K_i = 20 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$), kao i pročišćeni enzim iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u ukupnoj aminoacilaciji ($K_i = 15 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$) [14]. Nedavno je okarakterizirana mupirocinska inhibicija za ScIleRS u reakciji aktivacije, pri čemu je dobiven sličan rezultat ($K_i = 8,6 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$) [8]. Korištenjem mikrotermoforeze određene su konstante disocijacije mupirocina prema humanoj citosolnoj IleRS ($K_d = 32 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$) te citosolnoj IleRS gljivice *Candida albicans* ($K_d = 112 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$) [160], a rezultati dodatno potvrđuju da je eukariotski tip enzima IleRS značajno manje inhibiran mupirocinom u odnosu na bakterijski tip. Što se tiče samog mehanizma inhibicije, u svim navedenim eksperimentima nije komentirana vremenska ovisnost nastanka produkta u prisutnosti mupirocina, koja ili nije uočena i nije svojstvo IleRS tipa 2 ili su je autori zanemarili.

2.4. Rod *Bacillus* i bakterija *B. megaterium*

Taksonomski, rod *Bacillus* pripada bakterijskom koljenu *Firmicutes*, razred *Bacilli*, red *Bacillales*, porodica *Bacillaceae*. Radi se o velikom bakterijskom rodu s ukupno više od 250 poznatih vrsta. Glavna morfološka karakteristika bakterija ovog roda je uglavnom izduženi ili blago zaobljeni štapićasti oblik po kojem su i dobile ime, a posljedica je građe stanične stijenke koja sadrži murein (peptidoglikan), organsku makromolekulu koja stanici daje oblik i čvrstoću [161]. S obzirom na prisutnost gustog peptidoglikanskog sloja, gotovo sve vrste su Gram-pozitivne. Stanice se pojavljuju pojedinačno, u parovima, lancima ili pak dugim

filamentima. Veličinom stanice ovog roda dosta variraju, od svega 0,6 μm kod bakterije *B. pumilus* pa do čak 5 μm kod bakterije *B. megaterium*, što je ujedno jedna od najvećih bakterija. Većina vrsta je nepatogena za čovjeka, uz dobro poznate izuzetke kao što su *B. anthracis* (uzročnik antraksa) i *B. cereus* (uzročnik kvarenja hrane). Glavni predstavnik roda je bakterija *B. subtilis*, aerobna, Gram-pozitivna, sporulirajuća bakterija.

Prema novoj klasifikaciji iz 2020. godine ^[162], bakterija *B. megaterium* preimenovana je u *Priestia megaterium* te je glavni predstavnik novog roda *Priestia*. Novostvoreni rod *Priestia* sadrži 7 predstavnika: *P. megaterium*, *P. abyssalis*, *P. aryabhatai*, *P. endophyticus*, *P. filamentosus*, *P. flexus* i *P. koreensis*. Sve vrste su aerobne, štapičaste, s mogućnošću formiranja endospora, Gram-pozitivne (osim *P. koreensis* koja je Gram-negativna) s optimalnom temperaturom uzgoja od 28 – 37 °C. U sklopu ove doktorske disertacije zadržani su stari nazivi vrsta i pripadnost rodu *Bacillus*, prvenstveno zbog lakše i jednostavnije usporedbe s rezultatima prethodnih istraživanja.

Bakterija *B. megaterium* izrazito je dobro okarakterizirana bakterija, genom bakterije je sekvenciran i dostupan u javnim bazama podataka. Većina sojeva sadrži barem jedan plazmid, u pravilu više od 4 ^[163], dok soj korišten u sklopu ove doktorske disertacije (soj DSM 32) sadrži 6 plazmida ^[164, 165]. Bakterija je izvrstan organizam za proizvodnju rekombinantnih proteina, prvenstveno zbog nedostatka alkalnih proteaza i stabilne replikacije plazmida. Za potrebe ekspresije proteina razvijeni su sustavi bazirani na T7-RNA-polimerazi i promotoru T7 ^[166], analogno kao i za bakteriju *E. coli*, te sustav ekspresije preko promotora P_{xylA} koji je reguliran ksilozom (analogno kao i regulacija promotora *lac* pomoću alolaktoze kod bakterije *E. coli*) ^[166, 167]. Uz ekspresiju unutarstaničnih proteina, bakterija *B. megaterium* izvrstan je izbor i za ekspresiju izvanstaničnih proteina ^[168]. Za industrijske potrebe možda najznačajnija upotreba bakterije *B. megaterium* je u proizvodnji vitamina B₁₂, a zbog svoje veličine izvrstan je modelni organizam za proučavanje stanične diobe i sporulacije.

§ 3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Standardne kemikalije

Agar (*Sigma*), agaroz (Sigma), akrilamid (*Sigma*), amonijev acetat ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) (*Kemika*), amonijev klorid (NH_4Cl) (*Kemika*), amonijev peroksodisulfat (APS) (*Sigma*), amonijev sulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) (*Kemika*), ampicilin (*Sigma*), 1,4-bis(2-(4-metil-5-fenil)oksazolil)benzen (POPOP) (*Calbiochem*), borna kiselina (*Zorka Šabac*), cinkov klorid (ZnCl_2) (*Sigma*), 2,5-difeniloksazol (PPO) (*Merck*), dikalijev hidrogenfosfat (K_2HPO_4) (*Kemika*), dimetilsulfoksid (DMSO) (*Sigma*), dinatrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4) (*Kemika*), ditiotreit (DTT) (*Sigma*), etanol (*Kemika*), etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) (*Sigma*), etilen glikol (*Fluka*), fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF) (*Sigma*), fenol (*Kemika*), glicerol (*Kemika*), heksadeciltrimetil-amonijev bromid (CTAB) (*Sigma*), fosforna kiselina (H_3PO_4) (*T.T.T.*), glicin (*Sigma*), D-(+)-glukoza (*Sigma*), goveđi ekstrakt (*BioLife*), N-(2-hidroksietil)piperazin-N'-2-etansulfonska kiselina (Hepes) (*USB Corporation*), imidazol (*Sigma*), izoamilni alkohol (*Sigma*), izopropanol (*Kemika*), izopropil- β -tiogalaktozid (IPTG) (*Sigma*), kalcijev klorid (CaCl_2) (*Kemika*), kalijev acetat (CH_3COOK) (*Kemika*), kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4) (*Kemika*), kalijev sulfat (K_2SO_4) (*Zorka Šabac*), kanamicin (*Sigma*), karbenicilin (*Sigma*), kazein hidrolizat (*Torlak*), kloramfenikol (*Sigma*), kloroform (*Kemika*), klorovodična kiselina (HCl) (*Kemika*), kobaltov klorid (CoCl_2) (*Sigma*), D-(+)-ksiloza (*CarlRoth*), kvašćev ekstrakt (*BD Difco*), magnezijev acetat ($(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$) (*Sigma*), magnezijev klorid (MgCl_2) (*Fluka*), magnezijev sulfat (MgSO_4) (*Kemika*), maleinska kiselina (*Sigma*), manganov klorid (MnCl_2) (*Merck*), metanol (*Kemika*), β -merkaptetanol (*Serva*), N,N'-metilenbisakrilamid (*Merck*), molibden ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$) (*Kemika*), 3-(N-morfolino)propansulfonska kiselina (MOPS) (*Fluka*), mravlja kiselina (*Sigma*), mupirocin (*AppliChem*), natrijev acetat (CH_3COONa) (*Kemika*), natrijev dihidrogenfosfat (NaH_2PO_4) (*Kemika*), natrijev dodecilsulfat (SDS) (*Merck*), natrijev hidroksid (NaOH) (*Kemika*), natrijev klorid (NaCl) (*Kemika*), natrijev perjodat (NaIO_4) (*Sigma*), natrijev pirofosfat ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) (*Sigma*), octena kiselina (CH_3COOH) (*Kemika*), pepton (*Sigma*), polietilenglikol 4000 (PEG₄₀₀₀) (*Sigma*), polietilenglikol 8000 (PEG₈₀₀₀) (*Sigma*), polivinil piroidon (PVP-40) (*Sigma*), saharoz (Fluka), streptomycin (*Sigma*), tetraciklin (*Sigma*), tetraetil amonijev klorid (TEA) (*Sigma*), N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED)

(Sigma), trifluorooctena kiselina (TFA) (Sigma), triklorooctena kiselina (TCA) (Kemika), toluen (T.T.T.), tripton (BD Difco), tris(hidroksimetil)-aminometan (Tris) (Sigma), Tween-20 (Sigma), urea (Kemika).

3.1.2. Aminokiseline i nukleotidi

Adenzin-trifosfat (ATP) (Sigma), dNTP (smjesa dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Sigma), L-izoleucin (2S,3S) (Sigma), D-izoleucin (2R,3R) (CarboSynth), L-valin (Sigma), D-valin (Sigma), L-norvalin (Sigma), L-prolin (Merck), L-triptofan (Sigma), L-treonin (Merck), L-fenilalanin (Sigma), L-histidin (Sigma), L-metionin (Sigma).

3.1.3. Boje

Bromfenol plavo (Serva), Coomassie Brilliant Blue R-250 (Merck), Coomassie Brilliant Blue G-250 (Merck), etidijev bromid (Boehringer Mannheim), GelRed (Biotium), ksilencijanolfosforofosfat (XCFF) (Serva), Ponceau S (Sigma), toluidinsko modriilo (Sigma).

3.1.4. Markeri veličine

1 kb DNA marker (NEB), 1 kb DNA marker (Thermo), Precision Plus Protein Standards (Bio-rad).

3.1.5. Enzimi, proteini i nukleinske kiseline

Albumin iz goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumin*, BSA) (NEB), alkalna fosfataza iz škampa (engl. *shrimp alkaline phosphatase*, rSAP) (NEB), DNaza I (Sigma), DpnI (NEB), inhibitor RNase (*Murine RNase inhibitor*, NEB), lizozim (Sigma), nukleaza P1 (Sigma), Phusion-DNA-polimeraza s pripadnim puferom (Thermo), Pfu-DNA-polimeraza s pripadnim puferom (Thermo), Q5-DNA-polimeraza s pripadnim puferom (NEB), restrikcijske endonukleaze s pripadnim puferima (NEB), ribonukleaza A iz goveđe gušterače (RNaza A) (USB Corporation), T4-DNA-ligaza (Takara), T4-DNA-ligaza (Thermo), T4-polinukleotid-kinaza (PNK) (Thermo), Taq-DNA-polimeraza s pripadnim puferom (Thermo), termostabilna anorganska pirofosfataza (engl. *thermostable inorganic pyrophosphatase*, TIPP) (NEB).

Primarna antitijela anti-His₆ iz miša (kataloški broj: 11922416001, Sigma), anti-GFP iz miša (kataloški broj: 11814460001, Sigma), sekundarno antitijelo anti-mišje iz kože konjugirano s peroksidazom iz hrena (kataloški broj: A9917, Sigma). Antitijela su pripremljena prema uputama proizvođača otapanjem u redestiliranoj vodi i pohranjena na -20 °C.

3.1.6. Komercijalni kompleti

QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) za izolaciju plazmida, *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) za pročišćavanje DNA, *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) za izolaciju DNA iz agaroznih gelova, *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare) za detekciju signala u *western*-analizi, *PURExpress* sustav (NEB) za translaciju *in vitro*.

3.1.7. Kromatografske kolone, punila, membrane i filteri

Celulozna membrana za dijalizu (D9277 i D9777) (*Sigma*), centrikoni *Amicon Ultra centrifugal filters* (*Milipore*), filter papir *Whatman 3MM* (*GE Healthcare*), filter papir za prijenos proteina na membranu (*Bio-Rad*), fotografski film *Carestream biomax XAR* (*Kodak*), gel-filtracijske kolone *Micro Bio-Spin 30* (*Bio-Rad*), kapilare za određivanje temperature mekšanja proteina (*Premium, Nanotemper*), membrane za dijalizu (*Slide-A-Lyzer Mini Dialysis Devices*, 69550, *Thermo*), Ni-NTA agarozna (*Qiagen*), nitrocelulozna membrana (*HybondC Extra, Amersham Biosciences*), PD-10 gel-filtracijska kolona (*GE Healthcare*), pločice od polietilenimin-celuloze za tankoslojnu kromatografiju (*Macherey Nagel*), sterilni filteri s promjerom pora 0,2 μm (*Lab-ex*), streptavidin sefaroza *High Performance* (*GE Healthcare*), *Ultrafree-MC* kolonica veličine pora 0,45 μm (*Milipore*).

3.1.8. Radioaktivno obilježeni spojevi

α -[^{32}P]-ATP (3000 Ci mmol^{-1} , 10 mCi mL^{-1} , *Perkin Elmer*), [^{32}P]-pirofosfat ([^{32}P]-PP_i) (*Perkin Elmer*), L-[U- ^{14}C]-izoleucin (*Perkin Elmer*), L-[^{35}S]-metionin (1175 Ci mmol^{-1} , 10,25 mCi mL^{-1} , *EasyTag*TM, kataloški broj: NEG709A, *Perkin Elmer*).

3.1.9. Ostali materijal

Mikrotitarske pločice (*Kisker*), mlijeko u prahu (*Dukat*), *GBX developer and replenisher* (*Kodak*), *GBX fixer and replenisher* (*Kodak*), zaslon s fosforom premazom (*Amersham Biosciences*).

3.1.10. Hranjive podloge i mediji za uzgoj bakterija

Tekuća hranjiva podloga Luria-Broth (LB) za uzgoj bakterije *E. coli*: kvašćev ekstrakt ($\gamma = 5 \text{ g dm}^{-3}$), tripton ($\gamma = 10 \text{ g dm}^{-3}$), NaCl ($\gamma = 10 \text{ g dm}^{-3}$). Bakterije *B. megaterium* i *B. subtilis* rutinski su uzgajane u mediju LB sa smanjenom količinom soli, γ (NaCl) = 5 g dm^{-3} . Za pripremu krutih hranjivih podloga dodan je agar ($\gamma = 15 \text{ g dm}^{-3}$).

Za selekciju sojeva bakterije *E. coli* korišteni su sljedeći antibiotici do konačnih masenih koncentracija: ampicilin ($\gamma = 50 \mu\text{g mL}^{-1}$ za selekciju soja NEBStable, odnosno $\gamma = 100 \mu\text{g mL}^{-1}$ za selekciju ostalih sojeva), kanamicin ($\gamma = 30 \mu\text{g mL}^{-1}$), karbenicilin ($\gamma = 50 - 100 \mu\text{g mL}^{-1}$), kloramfenikol ($\gamma = 34 \mu\text{g mL}^{-1}$), streptomycin ($\gamma = 50 \mu\text{g mL}^{-1}$). Za selekciju sojeva bakterije *B. megaterium* transformiranih odgovarajućim plazmidima korišteni su antibiotici do konačne masene koncentracije: tetraciklin ($\gamma = 10 \mu\text{g mL}^{-1}$), kloramfenikol ($\gamma = 4,5 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Svi antibiotici pripremljeni su kao minimalno 1000 puta koncentrirana otopina u odnosu na konačne koncentracije. Mupirocin je pripremljen u koncentraciji $c = 250 \text{ mmol dm}^{-3}$ otapanjem u puferu c (Hepes-KOH, pH 7,5) = 1 mol dm^{-3} , a dalje je razrijeđivan u vodi.

Minimalni medij za uzgoj bakterije *B. megaterium* (modificiran prema mediju A5 [167]): KH_2PO_4 ($\gamma = 3,52 \text{ g dm}^{-3}$), Na_2HPO_4 ($\gamma = 5,80 \text{ g dm}^{-3}$), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($\gamma = 2 \text{ g dm}^{-3}$), MgSO_4 ($c = 1,2 \text{ mmol dm}^{-3}$), MnCl_2 ($c = 200 \mu\text{mol dm}^{-3}$), CaCl_2 ($c = 360 \mu\text{mol dm}^{-3}$), FeSO_4 ($c = 9 \mu\text{mol dm}^{-3}$), CoCl_2 ($c = 10 \mu\text{mol dm}^{-3}$), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ ($c = 2 \mu\text{mol dm}^{-3}$), glukoza ($\gamma = 5 \text{ g dm}^{-3}$).

3.1.11. Bakterijski sojevi

***Bacillus megaterium* DSM-32 (DSMZ)**: soj bakterije *B. megaterium* korišten u disertaciji. Genom soja dostupan je u javnoj bazi podataka NCBI pod pristupnim brojem CP009920.1.

***Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* 168 DSM-402 (*trpC2*) (DSMZ)**: soj bakterije *B. subtilis* najčešće korišten u istraživanjima. Genom soja dostupan je u javnoj bazi podataka NCBI pod pristupnim brojem NC_000964.3.

***E. coli* BL21(DE3)** ($F^- \text{ompT hsdS}_B (r_B^- m_B^-) \text{gal dcm}$ (DE3)) (Novagen): soj bakterije *E. coli* korišten za prekomjernu ekspresiju gena ukloniranih u vektore pod inducibilnim promotorom T7 [169]. Gen za T7-RNA-polimerazu ugrađen je kao lizogen u bakterijski genom, a sam gen je pod kontrolom inducibilnog promotora *lacUV5*. Ekspresija proteina inducirana je dodatkom IPTG-a. Soj je deficijentan za proteaze Lon i OmpT čime je utišana proteazna aktivnost.

***E. coli* DH10B** ($F^- \text{mcrA } \Delta(\text{mrr-hsdRMS-mcrBC}) \phi 80\text{lacZ}\Delta\text{M15 } \Delta\text{lacX74 } \text{recA1 } \text{endA1 } \text{araD139 } \Delta(\text{ara-leu})7697 \text{galU galK } \lambda^- \text{rpsL(Str}^R) \text{nupG}$) (Thermo): visoko kompetentni soj bakterije *E. coli* pogodan za transformaciju i stabilno umnažanje velikih konstrukata DNA. Stanice su rezistentne na streptomycin.

***E. coli* NEBStable** ($F^+ \text{proA}^+ \text{B}^+ \text{lacI}^q \Delta(\text{lacZ})\text{M15 } \text{zsf}::\text{Tn10(Tet}^R) \Delta(\text{ara-leu}) 7697 \text{araD139 } \text{fhuA } \Delta\text{lacX74 } \text{galK16 } \text{galE15 } \text{e14- } \Phi 80\text{dlacZ}\Delta\text{M15 } \text{recA1 } \text{relA1 } \text{endA1 } \text{nupG } \text{rpsL (Str}^R) \text{rph}$)

spoT1 $\Delta(mrr\text{-}hsdRMS\text{-}mcrBC)$ (NEB): soj bakterije *E. coli* pogodan za transformaciju i izolaciju nestabilnih plazmida, kao i plazmida koji sadrže repetitivne dijelove. Stanice su rezistentne na tetraciklin i streptomycin.

***E. coli* XL10-GOLD** ($Tet^r\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB\text{-}hsdSMR\text{-}mrr)173 \text{endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI}^q\text{ZDM15 Tn10 (Tet}^r\text{) Amy Cam}^r\text{)]}$) (Agilent): soj bakterije *E. coli* pogodan za transformaciju velikih konstrukata DNA i ligacijskih smjesa. Stanice su deficitantne za sve poznate restriksijske sustave, te sadrže mutacije u genima *endA* i *recA* što uvelike doprinosi stabilnosti plazmida. Stanice su rezistentne na tetraciklin i kloramfenikol.

3.1.12. Plazmidni vektori

Δ pET3a (Novagen): derivat plazmida pET3a korišten za prekomjernu ekspresiju gena pod kontrolom inducibilnog promotora T7. Plazmid je niskog broja kopija te nosi gen za rezistenciju na ampicilin. U ovom radu je korišten za kloniranje i prekomjernu ekspresiju molekula tRNA^{Ile} u bakteriji *E. coli*.

pET28b (Novagen): plazmid serije pET, niskog broja kopija te nosi gen za rezistenciju na kanamicin. Plazmid omogućuje prekomjernu ekspresiju rekombinantnih proteina u bakteriji *E. coli* s ili bez His₆ privjeska (na N- i/ili C-kraju) pomoću inducibilnog promotora T7.

pMGBm19: plazmidni vektor niskog broja kopija (~3) ^[170] korišten za ekspresiju proteina u bakteriji *B. megaterium*. Vektor sadrži visoko-kopijsko ishodište replikacije *ColE1* za umnažanje u bakteriji *E. coli* i gen za rezistenciju na ampicilin, te nisko-kopijsko ishodište replikacije *pBM100* za umnažanje u bakteriji *B. megaterium* i gen za rezistenciju na kloramfenikol. Ishodište replikacije *pBM100* omogućuje plazmidu replikaciju mehanizmom kotrljajućeg kruga (engl. *rolling circle replicon*). Također, plazmid kodira za ksilozni represor te sadrži ksilozni promotor ispred višestrukog mjesta za kloniranje, čime je omogućeno kloniranje gena i indukcija ekspresije proteina dodatkom ksiloze ^[166].

pT7_RNAP: plazmidni vektor pMGBm19 s ugrađenim genom za T7-RNA-polimerazu pod inducibilni ksilozni promotor ^[166].

pMMEc4: plazmid pBAD33 s ugrađenim genom za ksilozni represor iz bakterije *B. megaterium* pod kontrolom inducibilnog arabinoznog promotora. Plazmid sadrži ishodište replikacije *p15A* za umnažanje u bakteriji *E. coli* i gen za rezistenciju na kloramfenikol. Zbog ishodišta replikacije *p15A*, plazmid se može umnažati u bakteriji *E. coli* paralelno s plazmidom pMGBm19 (ishodište replikacije *ColE1*). Plazmid se ne može umnažati u bakteriji *B.*

megaterium, a korišten je kako bi se utišala inače jaka bazalna ekspresija s ksiloznog promotora u bakteriji *E. coli* [171].

pP_{T7}: plazmidni vektor s promotorom T7 i optimiziranim mjestom za vezanje ribosoma ispred višestrukog mjesta za kloniranje. Plazmid sadrži ishodište replikacije *pBC16* skupa s genom *repU* koji omogućuje replikaciju plazmida u bakteriji *B. megaterium* i gen za rezistenciju na tetraciklin, te ishodište replikacije *ColE1* za umnažanje u bakteriji *E. coli* i gen za rezistenciju na ampicilin. Ishodište replikacije *pBC16* pripada različitoj kompatibilnoj grupi u odnosu na ishodište replikacije *pBM100*, stoga se plazmidi pT7-RNAP i pP_{T7} mogu paralelno umnažati u istoj bakteriji [166].

pP_{T7}_GFP: plazmidni vektor pP_{T7} s ugrađenim kodirajućim slijedom za zeleni fluorescentni protein pod inducibilnim promotorom T7 [166].

pUCTV2: plazmidni vektor visokog broja kopija sadrži ishodište replikacije *ColE1* za umnažanje u bakteriji *E. coli* i gen za rezistenciju na ampicilin. Također sadrži gen za rezistenciju na tetraciklin i temperaturno osjetljivo ishodište replikacije (*ori^{ts}*) za umnažanje u bakteriji *B. megaterium* koje omogućuje stabilnu replikaciju plazmida na sniženoj temperaturi (30 °C), dok je replikacija plazmida onemogućena na povišenoj temperaturi (42 °C) [172]. Plazmidni vektor je korišten za ciljanu deleciju gena *ileS1* i *ileS2* u genomu bakterije *B. megaterium*.

Svi plazmidni vektori osim ΔpET3a i pET28b dobiveni su na poklon od dr. sc. Rebekke Biedendieck, Tehničko sveučilište Braunschweig, Njemačka.

3.2. Metode

3.2.1. Bioinformatičke metode

3.2.1.1. Analiza bakterijskog genoma

Nukleotidne sekvence bakterijskih genoma preuzete su iz javne baze podataka NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), a proteinske sekvence, u pravilu, iz baze podataka *UniProt*. Predikcija promotorskih elemenata napravljena je korištenjem računalnih alata *BacPP* [173] (u obzir su uzeti sljedovi koji su pokazali vjerojatnost da sadrže vezna mjesta za inicijacijski transkripcijski faktor iznad 99 %), *FruitFly* [174] i *PePPER* [175], a za analizu je korištena regija uzvodno od start kodona gena *ileS* pa do idućeg uzvodnog gena. Predikcija veznih mjesta za transkripcijske faktore napravljena je korištenjem alata *BProm* [176]. Konsenzus sekvence napravljene su na temelju višestrukog sravnjenja pomoću alata *WebLogo* [177]. Predikcija

Rho-neovisnih transkripcijskih terminatora napravljena je korištenjem računalnih alata *ARNold* [178] i *PePPER* [175], a za analizu je korištena regija nizvodno od stop kodona gena *ileS*, pa do prvog idućeg nizvodnog gena. Predikcija operonske regulacije gena *ileS* napravljena je korištenjem alata *FgeneSB* [176], pri čemu je analizirana regija uključivala otprilike 5 kb uzvodno od start kodona te 5 kb nizvodno od stop kodona (ukupna veličina otprilike 13 kb). Analiza genomskog okruženja gena *ileS* uključivala je otprilike 10 – 15 kb uzvodno od start kodona te nizvodno od stop kodona (otprilike 25 – 35 kb). Predikcija sekundarnih struktura molekula RNA napravljena je korištenjem računalnog alata *RNAfold* sa standardnim postavkama [179].

3.2.1.2. *Sravnjenje nukleotidnih i proteinskih sekvenci*

Višestruko sravnjenje nukleotidnih i proteinskih sekvenci napravljeno je korištenjem alata *MUSCLE* [180] preko računalnog servera *EBI-EMBL* [181], sa standardnim postavkama. Analiza sravnjenih sekvenci napravljena je korištenjem alata *JalView* [182].

3.2.1.3. *Filogenetska analiza*

Proteinske sekvence IleRS preuzete su iz baze podataka *UniProtKB*, pri čemu su korištene anotirane sekvence iz baze *Swiss-Prot* kad god je bilo moguće. Kao upit za pretraživanje baze korištene su proteinske sekvence IleRS iz bakterija *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces griseus* i *E. coli*. Nakon višestrukog sravnjenja proteinskih sekvenci (vidi poglavlje 3.2.1.2) regije koje su loše sravnjenje uklonjene su alatom *trimAL* [183] koristeći metodu *automated 1* preko računalnog servera *Phylemon2* [184]. Filogenetsko stablo napravljeno je korištenjem računalnog alata *RAxML* [185] preko servera *CIPRES* [186], sa standardnim postavkama. Kao supstitucijski model korišten je model *JTT*, kao model brzine heterogenosti korišten je model *gamma*. Ukupno je napravljeno 1000 iteracija. Vizualizacija filogenetskog stabla napravljena je u računalnom programu *FigTree*.

3.2.2. *Metode rada s bakterijama*

Pri radu su poštovane upute iz laboratorijskog priručnika *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [187], odnosno upute proizvođača priložene kemikalijama i kompletima.

3.2.2.1. *Uzgoj i pohrana bakterijskih kultura*

Bakterije *E. coli* soja BL21 (DE3), XL10-GOLD i DH10B, bez plazmida ili transformirane plazmidima pET, rutinski su uzgajane u mediju LB na 37 °C protresanjem brzinom od 250

okretaja u minuti (engl. *revolutions per minute*, rpm) za potrebe izolacije plazmida i pripreme prekonoćnih zasićenih bakterijskih kultura. Bakterije *E. coli* soja NEBStable rutinski su uzgajane na 30 °C brzinom protresanja od 250 rpm. Bakterija *B. megaterium* rutinski je uzgajana na 30 °C. Prekonoćne kulture su pripremljene u volumenima od 5 – 50 mL i uzgajane uz 100 – 150 rpm tijekom 12 – 15 h kako bakterijska kultura ne bi ušla u stacionarnu fazu ($OD_{578} > 1$). Bakterija *B. subtilis* rutinski je uzgajana na 30 – 37 °C. Za pripremu glicerolskih bakterijskih kultura, prekonoćna kultura je ohlađena na ledu i pomiješana s ledeno hladnim sterilnim glicerolom (finalni udio glicerola $\varphi = 25\%$) i pohranjena na -80 °C.

3.2.2.2. Transformacija bakterije *E. coli*

Elektrokompetentne i kemijski kompetentne stanice *E. coli* napravljene su kako je opisano u literaturi [187, 188]. Transformacija bakterijskih stanica provedena je dodavanjem 0,1 – 10 ng plazmidne DNA ili 1 – 5 μ L ligacijske smjese u 50 μ L bakterijskih stanica [187, 188].

3.2.2.3. Priprema i transformacija protoplasta bakterije *B. megaterium*

Priprema i transformacija protoplasta bakterije *B. megaterium* napravljena je prema publiciranom protokolu [188, 189]. Protoplasti su uvijek nakon pripreme testirani na vijabilnost i kompetenciju, a potrošeni su unutar 2 mjeseca. Za transformaciju protoplasta korišteno je 5 μ g plazmidne DNA. Nakon transformacije, narasle kolonije su morfološki analizirane mikroskopom pri ukupnom povećanju 1000 puta, te su oni klonovi koji su pokazali karakterističnu štapičastu morfologiju bakterije *B. megaterium* korišteni za inokulaciju prekonoćne tekuće kulture.

3.2.2.4. Delecija gena u genomu bakterije *B. megaterium* homolognom rekombinacijom

Delecija gena *ileS1*, odnosno *ileS2* iz genoma bakterije *B. megaterium* napravljena je korištenjem plazmidnog vektora pUCTV2 koji ima temperaturno osjetljivo ishodište replikacije prema publiciranom protokolu [189]. Vektor pUCTV2 može se stabilno umnažati na permisivnoj temperaturi (30 °C), a ne može se umnažati na nepermisivnoj temperaturi (42 °C). Za deleciju gena *ileS1* korišten je rekombinantni plazmidni vektor pUCTV2_ Δ ileS1, dok je za deleciju gena *ileS2* korišten rekombinantni plazmidni vektor pUCTV2_ Δ ileS2. Rekombinantni vektori sadrže otprilike 1 kb sekvence uzvodno od start kodona, odnosno nizvodno od stop kodona ciljanog gena. Rekombinantni plazmidi transformirani su u divlji tip bakterije *B. megaterium*,

a bakterije su nakon oporavka nasadene na kruti hranjivi medij s tetraciklinom ($\gamma = 10 \mu\text{g mL}^{-1}$) i uzgajane na $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Idući dan, bakterije su s ploče prenesene na svježi kruti hranjivi medij LB s tetraciklinom ($\gamma = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$) metodom *replica plating* i uzgajane na $42 \text{ }^\circ\text{C}$. Pri povišenoj temperaturi plazmidni vektor pUCTV2 se ne može replicirati, te ukoliko bakterije nisu ugradile plazmid u genom, ne mogu preživjeti u prisutnosti antibiotika. Nakon 24 h inkubacije na $42 \text{ }^\circ\text{C}$ u prisutnosti tetraciklina ($\gamma = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$), nekoliko bakterijskih kolonija je korišteno za inokulaciju 5 mL svježeg tekućeg hranjivog medija LB i uzgajano bez prisutnosti antibiotika na $42 \text{ }^\circ\text{C}$ uz 150 rpm. Idući dan, alikvot tekuće kulture je nasaden na krute hranjive podloge LB s (γ (tetraciklin) = $1 \mu\text{g mL}^{-1}$) i bez antibiotika i uzgajan preko noći na $30 \text{ }^\circ\text{C}$, a ostatak tekuće kulture je razrijeđen 1000 puta u svježem mediju LB i nastavljen uzgajati na $42 \text{ }^\circ\text{C}$ bez antibiotika. Postupak je ponavljan svakih 12 sati tijekom 3 – 7 dana dok bakterije nisu izgubile plazmid. Dodatno, gubitak plazmida pUCTV2_Δ*ileS1* postignut je dodatkom mupirocina ($c = 1 \mu\text{mol dm}^{-3}$) u tekući hranjivi medij prilikom uzgoja na $42 \text{ }^\circ\text{C}$. Kolonije koje su narasle na krutim hranjivim podlogama bez antibiotika, a nisu narasle u prisutnosti tetraciklina (γ (tetraciklin) = $1 \mu\text{g mL}^{-1}$) su izgradile plazmid iz genoma i izgubile rezistenciju na tetraciklin. Izgradnja plazmida iz genoma može rezultirati ili genotipom divljeg tipa bakterije (označeno kao *WTΔ*ileS1**, odnosno *WTΔ*ileS2**) ili sojem kojem je uklonjen *ileS* gen (označeno kao *Δ*ileS1**, odnosno *Δ*ileS2**), a vjerojatnost za oba slučaja je 50 %.

3.2.2.5. Zamjena gena u genomu bakterije *B. subtilis* homolognom rekombinacijom

Zamjena gena *ileS* u bakteriji *B. subtilis* s genom *bmileS2* iz bakterije *B. megaterium* napravljena je transformacijom prirodno kompetentnih stanica *B. subtilis* pročišćenim PCR produktom BS_P_ *bmileS2*_T (prilog tablica 9.3). Priprema prirodno kompetentnih stanica bakterije *B. subtilis* napravljena je prema publiciranom protokolu ^[190]. Transformacija je napravljena dodatkom pročišćenog PCR produkta ($m = 1 - 2 \mu\text{g}$) u 500 μL stanica, nakon čega su stanice uzgajane na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ uz 250 rpm 2 h. Za homolognu rekombinaciju gena *bmileS2* u genom bakterije *B. subtilis*, uz DNA dodan je i mupirocin ($c = 100 \text{ nmol dm}^{-3}$). Stanice su nakon oporavka nasadene na kruti hranjivi medij LB uz dodatak mupirocina ($c = 5 \mu\text{mol dm}^{-3}$) te inkubirane preko noći na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ kako bi se selektirale samo one bakterije koje su uspješno ugradile gen *bmileS2* u genom bakterije *B. subtilis*. Ovim postupkom dobivene su najmanje tri biološke replike, a klonovi su provjereni na isti način kao i klonovi bakterije *B. megaterium*, morfološki te sekvenciranjem genomskog lokusa.

3.2.2.6. Praćenje krivulja rasta bakterija

Prekonoćna bakterijska kultura, inokulirana iz pojedinačne bakterijske kolonije, razrijeđena je na $OD_{600} < 0,01$ (optička gustoća bakterijske kulture pri $\lambda = 600 \text{ nm} < 0,01$) u odgovarajućem mediju i uzgajana na $30 \text{ }^\circ\text{C}$ uz brzinu protresanja od 200 rpm . Rast bakterija praćen je mjerenjem optičke gustoće pri $\lambda = 600 \text{ nm}$ svakih 30 minuta tijekom minimalno 12 h korištenjem uređaja Ultrospec 10 (*GE Healthcare*). Podaci su utočnjeni u eksponencijalnu jednadžbu diobe stanica (3.1), pri čemu y_0 predstavlja vrijednost OD_{600} u točki $t = 0$, t je vrijeme, a k je koeficijent brzine rasta bakterija, bifaznu jednadžbu (*GraphPad*) ili logističku jednadžbu diobe stanica [191, 144]. Vrijeme diobe stanica izračunato je iz omjera $\ln 2$ i koeficijenta brzine rasta bakterija.

$$OD_{600} = y_0 \times e^{k \times t} \quad (3.1)$$

3.2.3. Metode rada s DNA

3.2.3.1. Izolacija genomske DNA

Genomska DNA izolirana je iz bakterija i poslužila je kao kalup u lančanoj reakciji polimerazom. Izolacija genomske DNA napravljena je prema publiciranom protokolu [192]. Nakon izolacije, genomska DNA čuvana je u vodi na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Ukoliko bakterijska kultura sadrži i plazmid, ovom metodom uz genomsku DNA izolirana je i plazmidna DNA.

3.2.3.2. Lančana reakcija polimerazom

Lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) metoda je za *in vitro* umnažanje specifičnog slijeda DNA [193]. U osnovi, metoda se temelji na ponavljajućim ciklusima denaturacije, sljepljivanja početnica i amplifikacije DNA koristeći termostabilne DNA-polimeraze, a u radu je korištena za specifično umnažanje gena i regulatornih regija. Za optimizaciju uvjeta PCR-a, provjeru ispravne ugradnje inserta u vektor, te za potrebe PCR-a na bakterijskim kolonijama korištena je *Taq*-DNA-polimeraza, dok su za potrebe kloniranja korištene DNA-polimeraze visoke vjernosti koje sadrže 3'-5' egzonukleaznu aktivnost. Reakcijska smjesa sadržavala je genomsku ($\gamma = 1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$), plazmidnu DNA ($\gamma = 0,02 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) ili ligacijsku smjesu (otprilike $1 - 10 \text{ ng}$ željenog ligiranog produkta), odgovarajuće početnice i dNTP-ove u ukupnom volumenu od $25 - 100 \text{ } \mu\text{L}$, prema uputama proizvođača. Reakcije su provođene u uređaju T100 Thermal cycler (*Bio-Rad*) kroz $30 - 35$ ciklusa korištenjem uvjeta prema uputama proizvođača pojedine DNA-polimeraze. Iznimno, kada je korišten PCR na

bakterijskim kolonijama inicijalna denaturacija je iznosila 10 minuta. Popis početnica korištenih u reakciji kao i kombinacije početnica i reakcijski uvjeti za pojedini PCR produkt navedeni su u prilogu (tablica 9.1, 9.2, 9.3).

3.2.3.3. Lančana reakcija polimerazom metodom produljenja preklapajućih regija

Za konstrukciju rekombinantnih plazmida pUCTV2_Δ*ileS1* i pUCTV2_Δ*ileS2* korištena je lančana reakcija polimerazom metodom produljenja preklapajućih regija (engl. *overlap extension polymerase chain reaction*, OE-PCR). Prvo je napravljena PCR reakcija za umnažanje uzvodne (promotorske, početnice BM1_ko_pro_F i BM1_ko_pro_R za gen *ileS1*, odnosno BM2_ko_pro_F i BM2_ko_pro_R za gen *ileS2*) i nizvodne (terminatorske, početnice BM1_ko_ter_F i BM1_ko_ter_R za gen *ileS1*, odnosno BM2_ko_ter_F i BM2_ko_ter_R za gen *ileS2*) regije svakog gena, u ukupnom volumenu od 25 μL, a sadržavala je genomsku DNA ($\gamma = 0,5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$), odgovarajuće početnice ($c = 0,5 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$), dNTP-ove ($c = 0,2 \text{ mmol dm}^{-3}$) i Q5-DNA-polimerazu ($0,02 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$) u pripadnom puferu (NEB). Reakcije su napravljene prema uputama proizvođača uz 40 sekundi produljenja, a korištene početnice navedene su u prilogu (tablica 9.2, tablica 9.3). PCR produkti su nakon pročišćavanja kompletom *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) korišteni kao kalup u sljedećoj PCR reakciji. Reakcijska smjesa, napravljena u ukupnom volumenu od 25 μL, sadržavala je PCR produkt prve reakcije koji odgovara promotorskoj i terminatorskoj regiji ($c = 0,5 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$), dNTP-ove ($c = 0,2 \text{ mmol dm}^{-3}$), Q5-DNA-polimerazu ($0,02 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$) i pripadni pufer (NEB). Reakcije su provedene kroz 3 ciklusa denaturacije (10 sekundi na 98 °C), sparivanja početnica (30 sekundi na 66 °C) i produljena (40 sekundi na 72 °C). Nakon 3 ciklusa linearnog umnažanja, u reakcijsku smjesu su dodane „vanjske“ početnice ($c = 0,5 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$, početnice BM1_ko_pro_R i BM1_ko_ter_F za gen *ileS1*, odnosno BM2_ko_pro_R i BM2_ko_ter_F za gen *ileS2*) te je nastavljeno eksponencijalno umnažanje kroz 30 ciklusa denaturacije, sparivanja početnica (30 sekundi na 72 °C) i produljenja (1,5 minuta na 72 °C). Dobiveni PCR produkti su ugrađeni u plazmidni vektor pUCTV2, a dobiveni plazmidni vektori kemijski su transformirani u NEBStable soj bakterije *E. coli* i uzgajani na 30 °C.

3.2.3.4. Ciljana mutageneza plazmida

Ciljana mutageneza korištena je za uvođenje točkastih mutacija u plazmidne vektore s ciljem uvođenja ili uklanjanja mjesta za restrikijski enzim, odnosno za zamjenu aminokiselina u

aktivnom mjestu enzima. Reakcijska smjesa, napravljena u ukupnom volumenu od 50 μL , sadržavala je pufer za *Pfu*-DNA-polimerazu, dNTP-ove ($c = 200 \mu\text{mol dm}^{-3}$), odgovarajuće početnice ($c = 0,2 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$), *Pfu*-DNA-polimerazu ($0,04 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$) i plazmidnu DNA ($\gamma = 0,4 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$). Reakcije su provođene u uređaju T100 Thermal cycler (*Bio-Rad*) kroz 18 ciklusa denaturacije (30 sekundi na $95 \text{ }^\circ\text{C}$), sparivanja početnica (30 sekundi na $60 \text{ }^\circ\text{C}$) i produljenja (12 minuta na $72 \text{ }^\circ\text{C}$), uz 3 minute inicijalne denaturacije na $95 \text{ }^\circ\text{C}$ i 10 minuta završnog produljenja na $72 \text{ }^\circ\text{C}$. Početnice korištene prilikom ciljne mutageneze, kao i opisi mutiranih proteina, navedeni su u prilogu (tablica 9.4, tablica 9.5). Tretman s *DpnI* napravljen je dodatkom 20 U enzima *DpnI* u 20 μL reakcijske smjese nakon PCR-a i inkubiran 2 h na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ kako bi se selektivno uklonio ishodišni, metilirani kalup. Po 1 – 5 μL reakcije tretirane enzimom *DpnI* korišteno je za transformaciju kemijski kompetentnih stanica.

3.2.3.5. Određivanje koncentracije nukleinskih kiselina

Koncentracija nukleinskih kiselina određena je mjerenjem apsorbancije na $\lambda = 260 \text{ nm}$ na spektrofotometru *NanoDrop 1000*, pri čemu $A_{260} = 1$ odgovara približno $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dvolančane DNA, odnosno $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ jednolančane RNA. Prilikom određivanja molarne koncentracije molekule tRNA^{Ile}, korištena je teoretski izračunata molarna masa molekule tRNA^{Ile} koja iznosi $25\,035,4 \text{ g mol}^{-1}$, prema jednadžbi 3.2, pri čemu je c molarna koncentracija molekule tRNA^{Ile}, γ masena koncentracija molekule tRNA^{Ile}, a M molarna masa molekule tRNA^{Ile}.

$$c = \frac{\gamma}{M} \quad (3.2)$$

3.2.3.6. Hibridizacija i fosforilacija oligonukleotida

Rekombinantni plazmidni vektor za nadekspresiju tRNA^{Ile} ($\Delta\text{pET3a_tRNA}^{\text{Ile}}$) napravljen je povezivanjem komplementarno sparenih sintetskih oligonukleotida (*BM_tRNAIleGAT_F*, *BM_tRNAIleGAT_R*, prilog tablica 9.2) i porezanog vektora ΔpET3a . Reakcijska smjesa za fosforilaciju sintetskih oligonukleotida sadržavala je pufer za T4-ligazu (*Thermo*), svaki oligonukleotid ($c = 10 \mu\text{mol dm}^{-3}$) te T4-polinukleotid-kinazu (5 U) u ukupnom volumenu od 10 μL . Fosforilacija se odvijala 30 minuta na $37 \text{ }^\circ\text{C}$, nakon čega su početnice denaturirane inkubacijom 5 minuta na $95 \text{ }^\circ\text{C}$, a hibridizacija početnica je napravljena sporim hlađenjem do sobne temperature (brzina hlađenja $1 \text{ }^\circ\text{C/min}$). Oligonukleotid nakon hibridizacije sadrži stršeće krajeve koji odgovaraju razgradnji s restrikcijским enzimima *BamHI* i *SalI*, a preko istih enzima je ugrađen u plazmidni vektor ΔpET3a .

3.2.3.7. Restriksijska razgradnja i ligacija molekula DNA

Razgradnja DNA rutinski je napravljena u volumenu od 20 – 50 μL korištenjem 0,5 – 2 μg DNA, 10 – 40 U restriksijskog enzima u odgovarajućem puferu (*NEB*). Za defosforilaciju plazmidnog vektora u reakcijsku smjesu je po potrebi dodana alkalna fosfataza (1 U, *NEB*) uz inkubaciju od 0,5 – 1 h na 37 °C. Ligacija vektora i inserta rutinski je rađena u volumenu od 20 μL , a sadržavala je porezani i pročišćeni vektor (50 – 100 ng), porezani i pročišćeni insert u molarnom omjeru 1:1 do 10:1 u korist inserta, pufer za T4-ligazu, 1 – 5 U T4-ligaze te po potrebi PEG₄₀₀₀ (konačno do $\varphi = 5\%$). U slučaju ligacije više inserata bez prisutnosti vektora, u reakciju je dodano 50 – 150 fmol svakog inserta. Korištene kombinacije vektora, PCR produkata i restriksijskih enzima te opisi i uloga finalnih konstrukata navedeni su u prilogu (tablica 9.6).

3.2.3.8. Analiza nukleotidnih sljedova nakon sekvenciranja

Svi rekombinantni plazmidi i odgovarajući PCR produkti su sekvencirani korištenjem servisa za sekvenciranje tvrtke *Macrogen*. Za sekvenciranje su korištene početnice koje se vežu na kalup otprilike 50 nukleotida uzvodno od željene sekvence. Rezultati sekvenciranja analizirani su u programu *SnapGene*. Cjelogenomsko sekvenciranje genoma divljeg tipa bakterije *B. megaterium*, kao i sojeva *$\Delta ileS1$* i *WT $\Delta ileS1$* , napravljeno je metodom *Illumina* sekvenciranja (*paired-ends*) korištenjem servisa tvrtke *Macrogen*.

3.2.4. Metode rada s RNA

3.2.4.1. Prekomjerna ekspresija i izolacija tRNA^{lle} iz bakterije *Escherichia coli*

Za prekomjernu ekspresiju tRNA^{lle} u bakteriji *E. coli*, 0,5 L medija LB inokulirano je s 5 mL prekonocne zasićene predkulture. Ekspresija molekula tRNA^{lle} inducirana je dodatkom IPTG-a ($c = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$) pri $\text{OD}_{600} \sim 0,5$. Izolacija ukupne tRNA, s nadeksprimiranom tRNA^{lle}, napravljena je prema publiciranom protokolu [188]. Nakon izolacije, talog tRNA otopljen je u puferu Tris-HCl ($c = 125 - 250 \text{ mmol dm}^{-3}$, pH 8,5 – 9,0) i inkubiran 2 h na 37 °C s ciljem deacilacije tRNA. Reakcija deacilacije zaustavljena je zakiseljavanjem otopine dodatkom octene kiseline do pH približno 5,0, nakon čega je tRNA dijalizirana prema otopini c (Hepes-KOH, pH 7,5) = 10 mmol dm^{-3} [194]. tRNA je uvijek prije upotrebe renaturirana zagrijavanjem 3 minute na 80 °C, nakon čega je dodan magnezijev klorid predgrijan na 80 °C do konačne koncentracije $c = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$, te je tRNA ostavljena da se sporo hladi do sobne temperature (otprilike 1,5 – 2 h).

3.2.4.2. Izolacija ukupne nativne tRNA iz bakterije *Bacillus megaterium*

Kultura bakterije *B. megaterium* uzgajana je u mediju LB do srednje eksponencijalne faze rasta, nakon čega je ohlađena na ledu te istaložena centrifugiranjem 15 minuta na $5000 \times g$ pri 4°C . Supernatant je uklonjen, a talog je resuspendiran u puferu za lizu sastava Tris-HCl, pH 7,5 ($c = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$), EDTA ($c = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$), lizozim ($\gamma = 2 \text{ mg mL}^{-1}$) i inkubiran 30 minuta na 37°C , nakon čega je dodan jednak volumen vrućeg fenola zasićenog vodom (zagrijan na 65°C). Smjesa je blago vorteksirana i inkubirana 30 minuta na 65°C , potom ohlađena na 4°C te su slojevi odvojeni centrifugiranjem 15 minuta na $5\,000 \times g$ pri 4°C , nakon čega je vodeni sloj ekstrahirani jednakim volumenom fenol-kloroforma. Prvi organski sloj je reekstrahirani dodatkom pufera za lizu, te su konačno svi vodeni slojevi, koji sadrže nukleinske kiseline, spojeni i precipitirani dodatkom natrijeva acetata i etanola.

Talog nukleinskih kiselina nakon precipitacije resuspendiran je u vrućem (zagrijan na 65°C) puferu sastava Tris-HCl, pH 8 ($c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$), CTAB (2 % w/v), EDTA ($c = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$), PVP-40 (2,5 % w/v), NaCl ($c = 2 \text{ mol dm}^{-3}$), β -merkaptoetanol (2 % v/v) [195]. Smjesa je kratko vorteksirana i inkubirana do 1 h na 65°C uz povremeno miješanje. Potom je u smjesu dodan jednak volumen kloroform-izoamilnog alkohola (24:1 v/v), kratko promiješano te su slojevi odvojeni centrifugiranjem 5 minuta na $5\,000 \times g$ pri 4°C . Vodeni sloj je ponovno ekstrahirani dodatkom kloroform-izoamilnog alkohola, a nakon centrifugiranja vodeni sloj je precipitiran dodatkom natrijevog acetata i etanola.

Genomska DNA je potom uklonjena standardnim tretmanom pomoću otopine PEG/NaCl, nakon čega je ukupna tRNA deacilirana i konačno dijalizirana [188]. Specifični nativni izoakceptor tRNA^{Ile}_{GAU} je potom pročišćen afinitetnom kromatografijom pomoću biotiniziranog komplementarnog oligonukleotida (opisano u poglavlju 3.2.4.3).

3.2.4.3. Afinitetno pročišćavanje nativnog izoakceptora tRNA^{Ile}_{GAU}

Pročišćavanje specifičnog nativnog izoakceptora tRNA^{Ile}_{GAU} iz ukupne tRNA dobivene iz bakterije *B. megaterium* (vidi poglavlje 3.2.4.2) napravljeno je kromatografijom uz imobilizirani oligonukleotid komplementaran dijelu slijeda željenog izoakceptora. Metoda se temelji na hibridizaciji biotiniziranog oligonukleotida i specifičnog izoakceptora denaturacijom i postepenim hlađenjem, nakon čega se hibridizirani kompleks nanosi na kolonu prethodno napunjenu sefrozom s vezanim streptavidinom [8, 192, 196]. Uslijed ostvarivanja izuzeto jake interakcije između biotina i streptavidina, hibridizirani kompleks oligonukleotida i specifičnog

izoakceptora ostaje vezan na koloni, dok se ostali izoakceptori ispiru. Elucija specifičnog izoakceptora postignuta je zagrijavanjem kolone čime se dokidaju vodikove veze između biotiniziranog oligonukleotida i specifičnog izoakceptora koji se potom eluira s kolone brzim centrifugiranjem. Korišteni biotinizirani oligonukleotid (prilog tablica 9.1) komplementaran je dijelu molekule tRNA^{Ile} od D-ruke do antikodona. Pročišćavanje nativnog izoakceptora tRNA^{Ile}_{GAU} iz ukupne tRNA bakterije *B. megaterium* napravljeno je prema publiciranom protokolu [8, 192, 196]. Za optimizaciju uvjeta korištena su dva hibridizacijska pufera: pufer s TEA ($c(\text{Tris-HCl}) = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$, pH 7,5, $c(\text{TEA}) = 0,9 \text{ mol dm}^{-3}$, $c(\text{EDTA}) = 0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$) uz temperaturu hibridizacije od 42 °C i pufer s NaCl ($c(\text{Tris-HCl}) = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$, pH 7,5, $c(\text{NaCl}) = 0,9 \text{ mol dm}^{-3}$, $c(\text{EDTA}) = 0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$) uz temperaturu hibridizacije od 65 °C.

3.2.4.4. Priprema oksidirane tRNA^{Ile}

Oksidirana tRNA^{Ile} (tRNA^{Ile}_{ox}), koja ne sadrži vicinalne diole na terminalnom adenzinu, te nije supstrat u reakciji prijenosa aminokiseline, korištena je kako bi se ispitao utjecaj tRNA na kinetičke parametre u reakciji aktivacije. Oksidirana tRNA^{Ile} (tRNA^{Ile}_{ox}) pripremljena je prema publiciranom protokolu [12], nakon čega je dijalizirana prema otopini Hepes-KOH ($c = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$, pH 7,5). tRNA^{Ile} smatrana je uspješno oksidiranom ukoliko joj je akceptorska aktivnost, mjerena korištenjem [¹⁴C]-Ile, iznosila < 4 %.

3.2.4.5. Obilježavanje tRNA^{Ile} radioaktivnim izotopom [³²P]

U većini enzimskih testova korištena je radioaktivno obilježena [³²P]-tRNA^{Ile}. Obilježavanje se temelji na ugradnji radioaktivnog biljega [³²P] između posljednja dva nukleotida u molekuli tRNA korištenjem tRNA-nukleotidil-transferaze [9, 197, 198]. Budući da sve molekule tRNA sadrže na svom 3'-kraju slijed CCA na koji se veže pripadna aminokiselina, inkubacijom tRNA^{Ile} s tRNA-nukleotidil-transferazom u prisutnosti visoke koncentracije natrijevog pirofosfata dolazi do otklanjanja terminalnog adenozina uslijed pirofosforolize. Dodatkom anorganske pirofosfataze, koja hidrolizira pirofosfat na ortofosfat, dolazi do pomicanja ravnoteže i ugradnje α -[³²P]-ATP-a u molekulu tRNA^{Ile}. Konačan produkt reakcije je tRNA^{Ile} obilježena s [³²P] između nukleotida C75 i A76. Obilježavanje tRNA^{Ile} napravljeno je kako je opisano prema publiciranom protokolu [188].

3.2.4.6. Priprema aminoacilirane, odnosno misacilirane tRNA^{Ile}

Reakcija preparativne aminoacilacije, odnosno misacilacije tRNA^{Ile} odvijala se 45 minuta na 30 °C u standardnom aminoacilacijskom puferu, pri čemu je koncentracija enzima iznosila $c = 5 \mu\text{mol dm}^{-3}$, dok je koncentracija [³²P]-tRNA^{Ile} iznosila $c = 25 \mu\text{mol dm}^{-3}$. Koncentracije aminokiselina iznosile su $c(\text{L-Ile}) = 2 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{L-Val}) = 4 \text{ mmol dm}^{-3}$ i $c(\text{L-Nva}) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$. Kako bi se spriječila hidroliza misacilirane tRNA, korišten je dvostruki mutant s utišanim popravkom pogreške nakon prijenosa. Budući da je primijećeno kako se enzim kopurificira sa znatnom količinom izoleucil-adenilata, enzim je dodatno pročišćen od izoleucil-adenilata (vidi poglavlje 3.2.5.4). Aminoacilirana, odnosno misacilirana tRNA^{Ile} konačno je dijalizirana preko noći prema otopini natrijevog acetata ($c = 5 - 10 \text{ mmol dm}^{-3}$, pH 4,5) i spremljena na -20 °C. Aminoacilirana, odnosno misacilirana tRNA^{Ile} je uvijek prije korištenja renaturirana inkubacijom 3 minute na 80 °C u natrijevom acetatu ($c = 2 \text{ mmol dm}^{-3}$, pH 4,5), nakon čega je dodan zagrijani MgCl₂ na 80 °C (finalno $c = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$), a tRNA je ostavljena da se sporo hladi do sobne temperature.

3.2.5. Metode rada s proteinima

3.2.5.1. Prekomjerna ekspresija rekombinantnih proteina

Ekspresija proteina u bakteriji *E. coli* napravljena je dodatkom IPTG-a (konačne množinske koncentracije $c = 250 \mu\text{mol dm}^{-3}$) pri OD₆₀₀ 0,5 – 0,6, uz prethodni dodatak ZnCl₂ (konačne koncentracije $c = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$) pri OD₆₀₀ 0,1 – 0,2. Prekomjerna ekspresija proteina odvijala se uz 200 rpm tijekom 4 h na 30 °C za protein IleRS1, odnosno tijekom 15 h na 15 °C za protein IleRS2. Ekspresija mutiranih varijanti proteina napravljena je na isti način kao i za odgovarajući divlji tip enzima.

Ekspresija proteina u bakteriji *B. megaterium* napravljena je dodatkom ksiloze (konačne masene koncentracije $\gamma = 5 \text{ g dm}^{-3}$) pri OD₅₇₈ = 0,3 – 0,4. Prekomjerna ekspresija proteina IleRS1 i IleRS2 odvijala se uz 200 rpm, tijekom 3 h na 30 °C [188].

3.2.5.2. Izolacija ukupnih proteina

Izolacija proteina iz bakterije *E. coli* za potrebe afinitetnog pročišćavanja na Ni-NTA agarozu napravljena je resuspendiranjem taloga dobivenog iz 0,5 L bakterijske kulture nakon indukcije u 5 mL pufera za lizu ($c(\text{Hepes-KOH, pH 7,5}) = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{NaCl}) = 500 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{MgCl}_2) = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{imidazol}) = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\beta\text{-merkaptioetanol}) = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$)

uz dodatak inhibitora serinskih proteaza (PMSF) ($c = 0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$), lizozima ($\gamma = 20 - 100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) i DNaze I ($\gamma = 3 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$). Resuspendirani talog soniciran je na ledu korištenjem sonikatora *High Intensity Ultrasonic Processor (Bioblock Scientific)* 10 puta po 45 sekundi uz 1 minutu pauze između soniciranja. Suspenzija je nakon soniciranja centrifugirana 1 h na $10\,000 \times g$ pri $4 \text{ }^\circ\text{C}$, nakon čega je supernatant (topljiva frakcija proteina) profiltriran kroz celulozni filter (pore $0,22 \text{ } \mu\text{m}$) te korišten za afinitetno pročišćavanje na Ni-NTA agarozu.

Izolacija proteina iz bakterije *B. megaterium* za potrebe pročišćavanja na Ni-NTA agarozu napravljena je na način opisan gore, uz povećanu koncentraciju lizozima ($\gamma = 2 - 5 \text{ mg mL}^{-1}$) u puferu za lizu. Resuspendirani talog dodatno je inkubiran 30 minuta na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ uz 1000 rpm kako bi se pospješila liza stanica, a suspenzija nije dodatno sonicirana.

Izolacija ukupnih staničnih proteina za potrebe *western*-hibridizacijske analize napravljena je resuspendiranjem taloga bakterije *B. megaterium* u puferu sastava Tris-HCl ($c = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$, pH 7,5), NaCl ($c = 150 \text{ mmol dm}^{-3}$), MgCl_2 ($c = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$), β -merkaptetanol ($c = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$), glicerol ($\varphi = 10 \%$), PMSF ($c = 0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$), lizozim ($\gamma = 2 \text{ mg mL}^{-1}$), DNaza I ($\gamma = 100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) uz inkubaciju od 30 – 60 minuta na ledu i povremenu blagu sonikaciju.

3.2.5.3. Pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu

Afinitetna kromatografija korištena je za pročišćavanje proteina s His₆ privjeskom iz ukupnog staničnog proteoma pomoću Ni-NTA agaroze. Metoda se temelji na interakciji imidazolnih prstenova susjednih histidinskih bočnih ogranaka u His₆ privjesku proteina od interesa s dva slobodna koordinacijska mjesta iona Ni^{2+} , dok ostala četiri koordinacijska mjesta zauzima nitrilotriocetna kiselina. Postepenim povećavanjem koncentracije imidazola dolazi do ispiranja proteina koji su se nespecifično vezali za smolu, dok se željeni protein konačno eluira dodatkom visoke koncentracije imidazola. Za kromatografsko pročišćavanje proteina korišteni su puferi A, B, C i D, koji temeljno imaju isti sastav: Hepes-KOH ($c = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$, pH 7,5), NaCl ($c = 500 \text{ mmol dm}^{-3}$), MgCl_2 ($c = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$), β -merkaptetanol ($c = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$), a razlikuju se po rastućoj koncentraciji imidazola: c (imidazol, titriran s HCl do pH 7,5) = 10, 20, 30 odnosno 200 mmol dm^{-3} . Količina stacionarne faze iznosila je 1 mL za pročišćavanje proteina IleRS1, odnosno 0,5 mL za pročišćavanje proteina IleRS2, sve iz 0,5 L bakterijske kulture. Pročišćavanje proteina napravljeno je prema publiciranom protokolu [188]. Uspješnost pročišćavanja provjerena je SDS poliakrilamidnom gel-elektroforezom [188], nakon čega je

protein ili preveden u pufer za skladištenje (c (Hepes-KOH, pH 7,5) = 20 mmol dm⁻³, c (NaCl) = 50 mmol dm⁻³, c (β-merkaptetanol) = 5 mmol dm⁻³, φ (glicerol) = 10 %) korištenjem PD-10 gel-filtracijskih kolonica ili dodatno pročišćen od aminoacil-adenilata (vidi poglavlje 3.2.5.4).

3.2.5.4. Pročišćavanje enzima od aminoacil-adenilata

Nakon pročišćavanja i ukoncentriranja, enzimima je određen udio kontaminacije izoleucinom, odnosno izoleucil-adenilatom kako je opisano u poglavlju 3.2.6.6. Enzimi koji su korišteni u eksperimentima koji zahtjevaju koncentracije enzima znatno iznad koncentracije korištenog supstrata dodatno su pročišćeni od izoleucil-adenilata. Nakon elucije proteina s Ni-NTA agaroze puferom D, proteini su prevedeni u pufer za pirofosforolizu (c (Hepes-KOH, pH 7,5) = 25 mmol dm⁻³, c (NaCl) = 500 mmol dm⁻³, c (MgCl₂) = 4 mmol dm⁻³, c (NaPP_i) = 2 mmol dm⁻³, c (imidazol) = 10 mmol dm⁻³, c (β-merkaptetanol) = 10 mmol dm⁻³) korištenjem PD-10 gel-filtracijskih kolona, nakon čega su razrijeđeni do konačne koncentracije $\gamma = 1$ mg mL⁻¹. Pirofosforoliza se odvijala 30 minuta na 30 °C, nakon čega je reakcija ohlađena na ledu i nanesa na Ni-NTA kromatografsku kolonu prethodno ekvilibriranu u istom puferu. Kolona je potom isprana s 15 CV (engl. *column volume*) pufera za pirofosforolizu, nakon čega je isprana s 15 CV pufera sastava c (Hepes-KOH, pH 7,5) = 25 mmol dm⁻³, c (NaCl) = 500 mmol dm⁻³, c (imidazol) = 10 mmol dm⁻³, c (β-merkaptetanol) = 10 mmol dm⁻³. Konačno, protein je eluiran s kolone dodatkom istog pufera uz dodatak imidazola ($c = 200$ mmol dm⁻³) nakon čega je preveden u pufer za skladištenje i ukoncentriran do koncentracije približno $\gamma = 20$ mg mL⁻¹. Nakon pročišćavanja, svim proteinima određen je udio kontaminacije izoleucinom, odnosno izoleucil-adenilatom, te je provjerena aktivnost pročišćenog enzima u reakciji aminoacilacije.

3.2.5.5. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija ukupnih proteina u proteinskom ekstraktu za potrebe *western*-analize određivana je metodom po Bradfordu [194, 199], dok je koncentracija pročišćenih proteina određivana spektrofotometrijskim mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini $\lambda = 280$ nm na uređaju NanoDrop 1000 (*Thermo Scientific*). Molekulske mase proteina i molarni apsorpcijski koeficijenti određeni su pomoću programa *ExPASy protParam* [200]. Dobivene vrijednosti za IleRS1 iznose: relativna molekulska masa $M_r = 107\,410$, molarni apsorpcijski koeficijent $\varepsilon = 172,12$ mol⁻¹ dm³ cm⁻¹, dok za IleRS2 iznose: relativna molekulska masa $M_r = 119\,930$, molarni apsorpcijski koeficijent $\varepsilon = 184,04$ mol⁻¹ dm³ cm⁻¹. Vrijednosti za mutante su istovjetne vrijednostima za divlji tip odgovarajućeg enzima.

3.2.5.6. Western-hibridizacijska analiza

Specifična detekcija proteina od interesa napravljena je korištenjem primarnih antitijela koja se vežu na sam protein (u ovom slučaju protein GFP) ili privjesak fuzioniran na protein (u ovom slučaju His₆ privjesak). Za SDS-poliakrilamidnu elektroforezu korišteno je 10 – 80 µg ukupnih staničnih proteina (mjereno metodom po Bradfordu), odnosno 10 – 100 ng pročišćenog proteina. Nakon provedene SDS-poliakrilamidne gel elektroforeze, gel je inkubiran minimalno 15 minuta u puferu za prijenos (γ (Tris) = 3,03 g dm⁻³, γ (glicin) = 14,4 g dm⁻³, φ (etanol) = 20 %) u slučaju prijenosa proteina GFP, dok je za prijenos proteina IleRS umjesto etanola korišten metanol (φ = 20 %) uz dodatak SDS-a (γ = 1 g dm⁻³). Polusuhi prijenos napravljen je pomoću uređaja 2117 Multiphor II (LKB), a trajao je 1 – 2 h na sobnoj temperaturi uz konstantnu jakost električnog polja vrijednosti 0,8 mA/cm². Nakon prijenosa, membrana je pobojana otopinom boje Ponceau S (1 g dm⁻³ boje otopljene u octenoj kiselini (φ = 5 %)) kako bi se potvrdio uspješan prijenos proteina na membranu, nakon čega je višak boje uklonjen ispiranjem membrane u puferu TBST (c (Tris-HCl) = 25 mmol dm⁻³, pH 7,5, c (NaCl) = 150 mmol dm⁻³, φ (Tween-20) = 0,1 %). Membrana je potom inkubirana u puferu za blokiranje (nemasno mlijeko u prahu (γ = 50 g dm⁻³) otopljeno u puferu TBST) 1 h na sobnoj temperaturi (ili preko noći na 4 °C) kako bi se membrana zasitila proteinima iz mlijeka. Membrana je potom isprana minimalno 3 puta po 5 minuta puferom TBST, nakon čega je inkubirana 1 h na sobnoj temperaturi uz miješanje u otopini odgovarajućih primarnih antitijela, razrijeđena 500 – 1000 puta u puferu za blokiranje. Nakon inkubacije, membrana je isprana minimalno 3 puta po 5 minuta puferom TBST, nakon čega je inkubirana u otopini sekundarnih antitijela, razrijeđena 10 000 – 30 000 puta u puferu za blokiranje, 1 h na sobnoj temperaturi uz miješanje. Konačno, membrana je isprana minimalno 5 puta po 5 minuta puferom TBST, nakon čega je na membranu nanesa svježe pripremljena detekcijska otopina komercijalnog kompleta *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent*. Nakon inkubacije od 2 – 5 minuta, višak detekcijske otopine je uklonjen, a membrana je omotana prozirnom folijom.

Detekcija signala napravljena je na fotografskom filmu u tamnoj komori. Vremena ekspozicije varirana su od nekoliko sekundi do sat vremena, nakon čega je fotografski film inkubiran u otopini razvijача (*Kodak*) do pojave jasnih pruga, ispran vodom te fiksiran u otopini fiksira (*Kodak*) te konačno ispran vodom. Također, signali su detektirani i korištenjem uređaja ChemiDoc MP (*Bio-Rad*) te kvantificirani pomoću programa Image Lab (*Bio-Rad*).

3.2.5.7. Termička denaturacija proteina

Termička denaturacija proteina korištena je za određivanje parametara temperature mekšanja proteina (T_m), tj. temperature pri kojoj je 50 % proteina denaturirano. Određivanje temperature mekšanja napravljeno je korištenjem metode nanoDSF pomoću uređaja Prometheus NT.48 (*Nanotemper*). Metoda se temelji na mjerenju promjene intenziteta fluorescencije triptofana ili omjera emisije triptofana na 330 nm i 350 nm uslijed zagrijavanja proteinskog uzorka. Povećanjem temperature dolazi do denaturacije proteina uslijed čega dolazi do promjene u apsorpcijskom spektru triptofana, budući da apsorpcijski spektar ovisi o mikrookolini u kojoj se triptofan nalazi. Mjerenja su napravljena s proteinskim uzorkom konačne koncentracije $\gamma = 1 \text{ mg mL}^{-1}$, u temperaturnom gradijentu od 20 do 95 °C, uz brzinu zagrijavanja od 3 °C/minuti. Temperatura mekšanja (T_m) određena je iz omjera promjene fluorescencije na 350 nm i 330 nm u ovisnosti o temperaturi pomoću programa PR.Stability Analysis (*Nanotemper*).

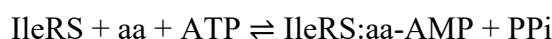
3.2.6. Kinetičke metode

Sve reakcije napravljene su na 30 °C u mikrotitarskim pločicama, u ukupnom volumenu od 16 – 20 μL , a pokrenute su dodatkom supstrata u predgrijanu reakcijsku smjesu (ako nije drugačije navedeno). Koncentracija enzima prilagođena je u ovisnosti o koeficijentu brzine pojedine reakcije kako bi se reakcija mogla pratiti u vremenskom intervalu koji omogućuje akumulaciju produkta u uvjetima ustaljenog stanja. Enzim je pripremljen razrjeđivanjem u puferu sastava Hepes-KOH ($c = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$, pH 7,5), BSA ($\gamma = 1 \text{ mg mL}^{-1}$), te je dodavan kao 1/10 volumena ukupne reakcijske smjese ili je razrjeđivan u puferu sastava Hepes-KOH ($c = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$, pH 7,5), BSA ($\gamma = 0,4 \text{ mg mL}^{-1}$), te je dodavan kao $\frac{1}{4}$ volumena ukupne reakcijske smjese. Za određivanje kinetičkih parametara za supstrate, korišten je raspon koncentracija supstrata koji odgovara otprilike $0,1 - 10 \times K_m$. Za detalje vidi referencu [201].

Reakcijske smjese koje su sadržavale [^{32}P]-tRNA^{Ile} dodatno su tretirane otopinom nukleaze P1 ($c(\text{NaOAc}) = 300 \text{ mmol dm}^{-3}$, pH 5,0, $c(\text{ZnCl}_2) = 150 \mu\text{mol dm}^{-3}$, nukleaza P1 $\geq 0,01 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$) [144]. Razdvajanje produkta (aa-2'-[^{32}P]-AMP koji predstavlja aminoaciliranu tRNA) od reaktanta ([^{32}P]-AMP koji predstavlja neaminoaciliranu tRNA) napravljeno je tankoslojnom kromatografijom razvijanjem polietileniminske pločice u puferu sastava $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ($c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$) i CH_3COOH ($\varphi = 5 \%$). Kvantifikacija signala napravljena je prema publiciranom protokolu [144, 188].

3.2.6.1. Aktivacija aminokiselina mjerena metodom izmjene pirofosfata

Aktivacija aminokiseline mjerena je metodom izmjene pirofosfata s ciljem dobivanja kinetičkih parametara (K_m i k_{cat}) za pojedini supstrat u uvjetima ustaljenog stanja [202, 203]. Produkt reakcije aktivacije je aminoacil-adenilat i pirofosfat (reakcijska shema 3.1). Nastali pirofosfat potom se u reakciji pirofosforolize ugrađuje u ATP. Budući da je pirofosforoliza izrazito brza reakcija, dok je aktivacija aminokiseline spora, mjerenjem brzine pirofosforolize mjeri se posredno aktivacija aminokiseline. Pirofosforoliza je potaknuta dodatkom visoke koncentracije pirofosfata ($c = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$), dok se kao biljeg u reakciji koristi radioaktivno obilježeni [^{32}P]-PPi, pri čemu se kao produkt reakcije detektira [^{32}P]-ATP.



Reakcijska shema 3.1. Reakcija aktivacije aminokiseline i izmjene pirofosfata

Reakcijska smjesa sadržava je Hepes-KOH ($c = 55 \text{ mmol dm}^{-3}$, pH 7,5), MgCl_2 ($c = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$), DTT ($c = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$), [^{32}P]-PPi ($c = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$, specifična aktivnost 0,2 – 0,4 mCi mmol^{-3}), BSA te ATP, aminokiselinu i enzim. Utjecaj tRNA^{Ile} na kinetičke parametre ispitan je korištenjem oksidirane renaturirane tRNA^{Ile}_{ox} ($c = 10 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$). Razdvajanje produkata ([^{32}P]-ATP i [^{32}P]-P_i) od reaktanata ([^{32}P]-PPi) te kvantifikacija signala napravljeno je prema publiciranom protokolu [188, 194]. U slučaju lošijeg razdvajanja, signali [^{32}P]-P_i i [^{32}P]-ATP su kvantificirani zajedno. Početna brzina reakcije dobivena je linearnom regresijom na vremenskim tijekovima nastanka [^{32}P]-ATP pri svakoj korištenoj koncentraciji supstrata prema jednadžbi 3.3, pri čemu je v_0 početna brzina, t je vrijeme, a b je koncentracija [^{32}P]-ATP u točki $t = 0$. Iz ovisnosti početne brzine reakcije (v_0) o koncentraciji korištenog supstrata [S], nelinearnom regresijom određeni su kinetički parametri K_m i k_{cat} prema jednadžbama 3.4 i 3.5.

$$c \text{ ([}^{32}\text{P]}\text{-ATP)} = v_0 \times t + b \quad (3.3)$$

$$v_0 = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_m + [S]} \quad (3.4)$$

$$k_{cat} = \frac{V_{\max}}{[E_0]} \quad (3.5)$$

Michaelisovu konstantu (K_m) možemo ugrubo promatrati kao ukupnu konstantu disocijacije Michaelisovog kompleksa enzim:supstrat (ES). Bitno je napomenuti da K_m nije (iako može biti dobra aproksimacija u određenim uvjetima) ravnotežna konstanta disocijacije (K_d), budući da K_m uključuje i kemijski korak nakon nastanka Michaelisovog kompleksa ES, ali i sve daljnje korake u reakcijskom mehanizmu. Katalitička konstanta k_{cat} predstavlja prometni (obrtni) broj enzima, te nam govori koliko molekula supstrata enzim može prevesti u molekule produkta, po molekuli enzima u jedinici vremena, u uvjetima kada je enzim u potpunosti zasićen supstratom. Konstanta k_{cat} predstavlja donju granicu koeficijenta brzine prvog reda svih individualnih koraka u reakcijskom mehanizmu nakon vezanja supstrata – drugim riječima, svi individualni koraci u reakcijskom mehanizmu moraju biti brži (ili jednaki) izmjerenoj k_{cat} vrijednosti, dok nam vrijednost K_m govori isključivo pri kojoj koncentraciji supstrata brzina reakcije odgovara polovici maksimalne brzine. Omjer k_{cat}/K_m najčešće se interpretira kao specifičnost enzima – mjera kojom se određuje koliko enzim preferira jedan supstrat u odnosu na drugi, odnosno kao katalitička efikasnost enzima – mjera koliko efikasno enzim prevodi supstrat u produkt, a predstavlja donju granicu koeficijenta reakcije drugog reda za vezanje enzima i supstrata.

3.2.6.2. Inhibicija enzimske aktivnosti u reakciji aktivacije

Mupirocin je kompetitivni inhibitor IleRS te se veže u sintetsko, aktivno mjesto enzima inhibirajući sintezu izoleucil-adenilata i neposredno Ile-tRNA^{Ile}. Stoga je inhibicija enzimske aktivnosti određena u reakciji aktivacije, u standardnom aktivacijskom puferu uz dodatak mupirocina. Za određivanje konstante inhibicije (K_i) mupirocina za enzim IleRS1, enzim je bio prisutan u koncentraciji $c = 5 \text{ nmol dm}^{-3}$, uz $c(\text{ATP}) = 24 \text{ mmol dm}^{-3}$ ($60 \times K_m(\text{ATP})$), $c(\text{izoleucin}) = 120 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ ($60 \times K_m(\text{Ile})$), $c(\text{MgCl}_2) = 30 \text{ mmol dm}^{-3}$, dok je koncentracija mupirocina varirana od $c = 40$ do $c = 160 \text{ nmol dm}^{-3}$. Reakcije su započete dodatkom enzima u reakcijsku smjesu. Koncentracija nastalog [³²P]-ATP u vremenu utočnjena je u jednadžbu za sporo-vezujuću inhibiciju (jednadžba 2.3, poglavlje 2.3.5.1) te su nelinearnom regresijom određeni parametri početne brzine (v_0), brzine ustaljenog stanja (v_s) i opaženi koeficijent reakcije prvog reda (k). Konstante brzine reakcije (k_{on} i k_{off}) dobivene su koristeći ovisnost opaženog koeficijenta brzine reakcije prvog reda (k) o koncentraciji korištenog inhibitora [I], linearnom regresijom prema jednadžbi 2.4, nakon čega je prividna konstanta inhibicije ($K_{i, app}$) određena prema jednadžbi 2.1, a konstanta kompetitivne inhibicije (K_i) prema jednadžbi 2.2 (poglavlje 2.3.5.1).

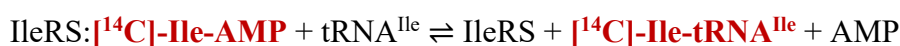
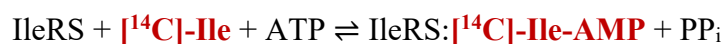
Prilikom određivanja K_i za enzim IleRS2, koncentracija jednog supstrata je varirana od $0,2 \times K_m$ do $10 \times K_m$, dok je drugi supstrat bio prisutan u koncentraciji približno $20 \times K_m$, uz variranje koncentracije mupirocina od $1 \times K_i$ do $20 \times K_i$. Koncentracija nastalog $[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ i početna brzina reakcije određena je kako je opisano u poglavlju 3.2.6.1. Iz ovisnosti početne brzine reakcije o koncentraciji korištenog supstrata pri različitim koncentracijama inhibitora, nelinearnom regresijom prema jednadžbama 3.6 i 3.7 određeni su kinetički parametri K_m , k_{cat} i K_i , pri čemu je K_i ravnotežna konstanta inhibicije, a $K_{m, \text{app}}$ je prividni K_m određen u prisutnosti inhibitora [I].

$$v_0 = \frac{V_{\text{max}} \times [\text{S}]}{K_{m, \text{app}} + [\text{S}]} \quad (3.6)$$

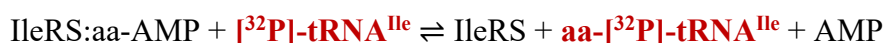
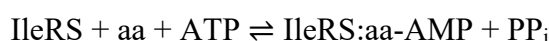
$$K_{m, \text{app}} = K_m \times \left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_i}\right) \quad (3.7)$$

3.2.6.3. Ukupno aminoaciliranje

Ukupno aminoaciliranje obuhvaća aktivaciju aminokiseline, prijenos aktivirane aminokiseline na tRNA i, konačno, disocijaciju aa-tRNA. U sklopu ove doktorske disertacije metoda je korištena za određivanje opaženog koeficijenta brzine aminoacilacije (k_{obs}), kao i za određivanje kinetičkih parametara (K_m i k_{cat}) za pojedini supstrat. Kao radioaktivni biljeg korišten je $[^{14}\text{C}]\text{-izoleucin}$ (reakcijska shema 3.2) ili $[^{32}\text{P}]\text{-tRNA}^{\text{Ile}}$ (reakcijska shema 3.3). Glavna prednost korištenja $[^{32}\text{P}]\text{-tRNA}^{\text{Ile}}$ u odnosu na $[^{14}\text{C}]\text{-aminokiselinu}$ je korištenje aminokiseline koje nisu komercijalno dostupne s $[^{14}\text{C}]$ izotopom, kao i korištenje visokih koncentracija izoleucina prilikom određivanja kinetičkih parametara.



Reakcijska shema 3.2. Reakcija ukupnog aminoaciliranja uz $[^{14}\text{C}]\text{-izoleucin}$



Reakcijska shema 3.3. Reakcija ukupnog aminoaciliranja uz $[^{32}\text{P}]\text{-tRNA}^{\text{Ile}}$

Reakcijska smjesa sadržavala je Hepes-KOH ($c = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$, pH 7,5), MgCl_2 ($c = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$), DTT ($c = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$), ATP ($c = 4 \text{ mmol dm}^{-3}$), NH_4Cl ($c = 150 \text{ mmol dm}^{-3}$), Ile ($c = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$), $[^{32}\text{P}]\text{-tRNA}^{\text{Ile}}$ ($c = 10 - 40 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$), TIPP ($0,008 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$), BSA te enzim IleRS. Reakcije koje su napravljene korištenjem $[^{14}\text{C}]\text{-izoleucina}$ sadržavale su c ($[^{14}\text{C}]\text{-izoleucin}$) = $50 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$, uz specifičnu aktivnost $100 \text{ } \mu\text{Ci } \mu\text{mol}^{-1}$. Reakcije su pokrenute dodatkom enzima, a zaustavljene su nanošenjem $7 - 9 \text{ } \mu\text{L}$ reakcijske smjese na filter papir *Whatman 3MM* i uranjanjem u hladnu ($4 \text{ } ^\circ\text{C}$) trikloroctenu kiselinu ($\gamma = 100 \text{ g dm}^{-3}$). Koncentracija produkta ($[^{14}\text{C}]\text{-Ile-tRNA}^{\text{Ile}}$) određena je kako je opisano u referenci ^[188].

Koncentracija nastale aa- $[^{32}\text{P}]\text{-tRNA}^{\text{Ile}}$ određena je kako je opisano na slici 9.2A (prilog). Kinetički parametri za supstrate (K_m i k_{cat}) određeni su kao i kod aktivacije (jednadžbe 3.4 i 3.5, poglavlje 3.2.6.1). Opaženi koeficijent brzine reakcije (k_{obs}) određen je omjerom nagiba pravca nastanka aa-tRNA^{Ile} u vremenu i ukupne koncentracije korištenog enzima.

3.2.6.4. Određivanje akceptorske aktivnosti tRNA

Akceptorska aktivnost tRNA^{Ile} predstavlja maksimalnu količinu (udio) tRNA^{Ile} koju je moguće aminoacilirati pripadnom aminokiselinom. Zbog toga prilikom određivanja akceptorske aktivnosti tRNA, reakcija sadrži relativno malu koncentraciju tRNA^{Ile} ($c = 1 - 2 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$), povećanu koncentraciju enzima IleRS ($c = 5 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$), te se prati na dužim vremenima kako bi se osiguralo da je u potpunosti tRNA^{Ile} aminoacilirana. Akceptorska aktivnosti tRNA^{Ile} određena je korištenjem $[^{14}\text{C}]\text{-izoleucina}$, odnosno $[^{32}\text{P}]\text{-tRNA}^{\text{Ile}}$, korištenjem istih reakcijskih uvjeta kao i za odgovarajuće reakcije aminoacilacije (poglavlje 3.2.6.3).

3.2.6.5. Prijenos aktivirane aminokiseline na tRNA

Izolirani korak prijenosa aminokiseline na tRNA^{Ile} mjereno je korištenjem instrumenta RQF-3 (*KinTek Corp.*) miješanjem kompleksa IleRS:aa-AMP, stvorenog *in situ*, s renaturiranom $[^{32}\text{P}]\text{-tRNA}^{\text{Ile}}$. Kompleks IleRS:aa-AMP stvoren je inkubacijom enzima ($c = 20 - 40 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$) s izoleucinom ($c = 4 \text{ mmol dm}^{-3}$) i ATP-om ($c = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$) u puferu za prijenos sastava Hepes-KOH ($c = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$, pH 7,5), NH_4Cl ($c = 150 \text{ mmol dm}^{-3}$), MgCl_2 ($c = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$), DTT ($c = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$), BSA ($\gamma = 0,01 \text{ mg mL}^{-1}$) i TIPP ($0,008 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$) tijekom 10 minuta na $30 \text{ } ^\circ\text{C}$. $[^{32}\text{P}]\text{-tRNA}^{\text{Ile}}$ je renaturirana standardnim postupkom, a nakon hlađenja dodan je pufer za prijenos. Reakcija je pokrenuta miješanjem jednakog volumena kompleksa IleRS:aa-AMP ($c = 20 - 40 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$) s renaturiranom $[^{32}\text{P}]\text{-tRNA}^{\text{Ile}}$ ($c = 2 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$), a

zaustavljena je u određenim vremenskim intervalima dodatkom natrijevog acetata ($c = 3 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 4,5) te sakupljena u mikroepruvetu u koju je prethodno dodan SDS (konačna koncentracija $\sim 0,1\%$ (w/v)). Opaženi koeficijent brzine prijenosa aminokiseline na tRNA (k_{trans}) određen je nelinearnom regresijom prema jednadžbi 3.8, pri čemu je y udio aminoacilirane tRNA, y_0 je udio aminoacilirane tRNA u točki $t = 0$, A je razlika minimalnog i maksimalnog udjela aminoacilirane tRNA, a t je vrijeme.

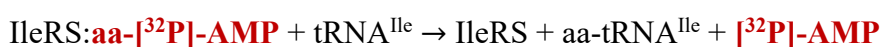
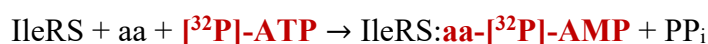
$$y = y_0 + A \times (1 - e^{-k_{\text{trans}} \times t}) \quad (3.8)$$

3.2.6.6. Određivanje udjela kontaminacije enzima izoleucinom

Reakcijska smjesa pripremljena je u standardnom puferu za aminoacilaciju, bez dodatka aminokiseline, a sadržavala je visoku koncentraciju enzima IleRS ($c = 5 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$) i nisku koncentraciju $[^{32}\text{P}]\text{-tRNA}^{\text{Ile}}$ ($c = 1 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$). Udio kontaminacije enzima izoleucinom i/ili izoleucil-adenilatom određen je iz omjera koncentracije korištenog enzima i koncentracije nastale Ile- $[^{32}\text{P}]\text{-tRNA}^{\text{Ile}}$.

3.2.6.7. Paralelno praćenje nastanka ATP-a i aminoacilirane ili misacilirane tRNA

IleRS utroši jednu molekulu ATP-a prilikom aktivacije izoleucina i sinteze Ile-tRNA^{Ile}. Međutim, u slučaju korištenja nepripadne aminokiseline, također dolazi do utroška ATP-a uslijed aktivacije, međutim zbog aktivnog popravka pogreške ne dolazi do akumulacije aa-tRNA^{Ile}, usprkos opetovanim ciklusima aktivacije i prijenosa na tRNA. Stoga, povećani utrošak ATP-a, odnosno nastanka AMP-a u prisutnosti nepripadne aminokiseline u odnosu na reakciju s pripadnom aminokiselinom znak je popravka pogreške. Ako se u reakciji koristi divlji tip enzima, mjeri se ukupni popravak pogreške, a ako se koristi enzim s utišanim popravkom pogreške nakon prijenosa mjeri se popravak pogreške prije prijenosa. Za praćenje nastanka AMP-a korišten je $[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ obilježen na α -atomu fosfora koji omogućuje direktno praćenje nastanka aa-AMP-a (produkt aktivacije aminokiseline) i AMP-a (produkt hidrolize aa-AMP-a ili prijenosa aminokiseline na tRNA) (reakcijska shema 3.4) ^[10, 203].



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

Za praćenje nastanka AMP-a u reakcijsku smjesu dodan je u tragovima [α - ^{32}P]-ATP, dok je za praćenje nastanka misacilirane ili aminoacilirane tRNA dodana u tragovima [^{32}P]-tRNA^{Ile}. Reakcijska smjesa sadržavala je Hepes-KOH ($c = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$, pH 7,5), MgCl_2 ($c = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$), DTT ($c = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$), TIPP ($0,004 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$), BSA te enzim. U odnosu na reakciju aminoacilacije, koncentracija ATP-a je smanjena ($c(\text{ATP}) = 200 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$) kako bi se osigurao bolji omjer signala produkta u odnosu na pozadinski signal, dok je koncentracija tRNA povećana kako bi reakcija duže vremena bila u ustaljenom stanju ($c(\text{tRNA}) = 60 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$). Koncentracije aminokiselina iznosile su $c(\text{Ile}) = 2 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{Val}) = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{Nva}) = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$. Reakcije u kojima je praćeno nastajanje [^{32}P]-AMP zaustavljene su miješanjem $1,5 \text{ } \mu\text{L}$ reakcijske smjese s $3 \text{ } \mu\text{L}$ mravlje kiseline ($c = 1,5 \text{ mol dm}^{-3}$). Razdvajanje produkta od reaktanta napravljeno je u puferu sastava $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ($c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$) i CH_3COOH ($\varphi = 5 \%$). Koncentracija nastalog [^{32}P]-AMP-a određena je kako je opisano na slici 9.2B (prilog). Reakcije u kojima je praćeno nastajanje aa- ^{32}P -tRNA^{Ile} tretirane su kako je opisano u poglavlju 3.2.6 i 3.2.6.3.

3.2.6.8. Deacilacija u uvjetima jednog obrtaja enzima

Deacilacija u uvjetima jednog obrtaja enzima korištena je za određivanje opaženog koeficijenta brzine deacilacije (k_{deacyl}), odnosno hidrolize aa-tRNA^{Ile}, tj. kako bi se ispitala sposobnost enzima u popravku pogreške nakon prijenosa aminokiseline na tRNA. Reakcijska smjesa sadržavala je Hepes-KOH ($c = 150 \text{ mmol dm}^{-3}$, pH 7,5), MgCl_2 ($c = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$), DTT ($c = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$), NH_4Cl ($c = 150 \text{ mmol dm}^{-3}$), BSA ($\gamma = 0,01 \text{ mg mL}^{-1}$), enzim ($c = 10 - 20 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$) i aminoaciliranu, odnosno misaciliranu, renaturiranu aa- ^{32}P -tRNA^{Ile} ($c = 200 - 400 \text{ nmol dm}^{-3}$). Koncentracija enzima uvijek je podešena da bude barem 20 puta iznad koncentracije korištene tRNA kako bi se osigurali uvjeti jednog katalitičkog obrtaja enzima, te da bude barem 10 puta iznad K_d za vezanje tRNA^{Ile} i IleRS ($K_d \sim 1 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$). Zbog velike koncentracije enzima u eksperimentu, svi enzimi korišteni u deacilacijskim eksperimentima prethodno su dodatno pročišćeni od izoleucina i izoleucil-adenilata (vidi poglavlje 3.2.5.4). Reakcije su pokrenute miješanjem jednakog volumena enzima i tRNA. Opaženi koeficijent brzine hidrolize aa-tRNA^{Ile} (k_{deacy}) određen je nelinearnom regresijom prema jednadžbi 3.9, pri čemu je y udio aminoacilirane tRNA, y_0 je udio aminoacilirane tRNA u točki $t = 0$, A je razlika minimalnog i maksimalnog udjela deacilirane tRNA, a t je vrijeme.

$$y = y_0 + A \times e^{-k_{\text{deacyl}} \times t} \quad (3.9)$$

3.2.6.9. Translacija u uvjetima *in vitro*

Za potrebe translacije *in vitro* korišten je komercijalno dostupan komplet PURExpress (NEB). Navedeni sustav sadrži sve komponente potrebne za translaciju *in vitro*, kao što su ribosom, svih 20 aminokiselina i aminoacil-tRNA-sintetaza, ukupnu tRNA, sve potrebne inicijacijske i elongacijske faktore, ostale supstrate, izvore energije (ATP, GTP, kreatin-fosfat) i T7-RNA-polimerazu [204-206]. Svi navedeni enzimi pročišćeni su iz bakterije *E. coli*. Za potrebe ove doktorske disertacije naručen je modificirani komplet koji ne sadrži *EcIleRS* te ne sadrži izoleucin.

Reakcijska smjesa za translaciju *in vitro* pripremljena je prema uputama proizvođača u ukupnom volumenu od 20 μL , a sadržavala je otopinu A, otopinu B, ukupnu tRNA, sve aminokiseline osim izoleucina te sve aminoacil-tRNA-sintetaze, osim izoleucil-tRNA-sintetaze iz bakterije *E. coli*. Koncentracija izoleucina iznosila je $c = 300 \mu\text{mol dm}^{-3}$, dok je koncentracija *B. megaterium* IleRS varirana od $c = 4 \text{ nmol dm}^{-3}$ do $c = 400 \text{ nmol dm}^{-3}$. Enzim je pripremljen razrjeđivanjem u puferu sastava Hepes-KOH ($c = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$, pH 7,5), BSA ($\gamma = 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$), te je uvijek dodavan kao 1/50 volumena ukupne reakcijske smjese, pa je s enzimom dodana i otopina Hepes-KOH i BSA; c (Hepes-KOH, pH 7,5) = $0,4 \text{ mmol dm}^{-3}$, γ (BSA) = $0,002 \text{ mg mL}^{-1}$. U reakciju je dodan i inhibitor RNAza (*Murine RNase inhibitor*, NEB) (20 U) te radioaktivni [^{35}S]-metionin. Koncentracija [^{35}S]-metionina u reakciji je iznosila $c = 300,7 \mu\text{mol dm}^{-3}$, uz specifičnu aktivnost $0,82 \text{ mCi mL}^{-1}$. Koncentracija ostalih aminokiselina iznosila je $c = 300 \mu\text{mol dm}^{-3}$, dok koncentracija pojedine tRNA iznosi $c = 1 - 5 \mu\text{mol dm}^{-3}$. Kontrolne reakcije pripremljene su prema uputama proizvođača koristeći *EcIleRS*, dok negativna kontrola nije sadržavala IleRS. Kao modelni protein za translaciju *in vitro* korištena je dihidrofolat reduktaza (DHFR) iz bakterije *E. coli*, molarne mase $M = 17\,998 \text{ g mol}^{-1}$, koja sadrži ukupno 5 metionina. Reakcija translacije *in vitro* pripremljena je na ledu, a započeta je dodatkom plazmida (finalno $\gamma = 10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) i podizanjem temperature na $37 \text{ }^\circ\text{C}$. U određenim vremenskim intervalima, reakcija je zaustavljena miješanjem $1 \mu\text{L}$ alikvota reakcijske smjese s $19 \mu\text{L}$ otopine natrijevog hidroksida ($c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$). Smjesa je inkubirana 10 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se deacilirala sva tRNA, uključujući i [^{35}S]-Met-tRNA^{Met}, kako bi količina radioaktivnosti na filter papiriću odgovarala isključivo količini [^{35}S]-metionina ugrađenog u protein. Alikvot zaustavljene reakcije nanesen je na filter papirić i tri puta ispran s hladnom trikloroocetenom kiselinom (dva puta s $\gamma = 100 \text{ g dm}^{-3}$, jednom s $\gamma = 50 \text{ g dm}^{-3}$), te konačno hladnim etanolom ($\varphi = 96 \%$). Posušeni filter papirići uronjeni su u $2,5 \text{ mL}$ scintilacijske

otopine, te je količina radioaktiviteta izmjerena na uređaju Tri-Carb 2900TR (*PerkinElmer*) (za detalje vidi ^[188]).

Množina [³⁵S]-metionina na filter papiriću određena je preko baždarnog dijagrama ovisnosti broja otkucaja po minuti i poznatih množina [³⁵S]-metionina. Množina nastalog proteina DHFR određena je dijeljenjem množine [³⁵S]-metionina s brojem metionina u proteinu DHFR, dok je masena koncentracija nastale DHFR određena iz volumena reakcijske smjese nanosene na filter papirić i umnoška množine i molarne mase DHFR.

§ 4. REZULTATI

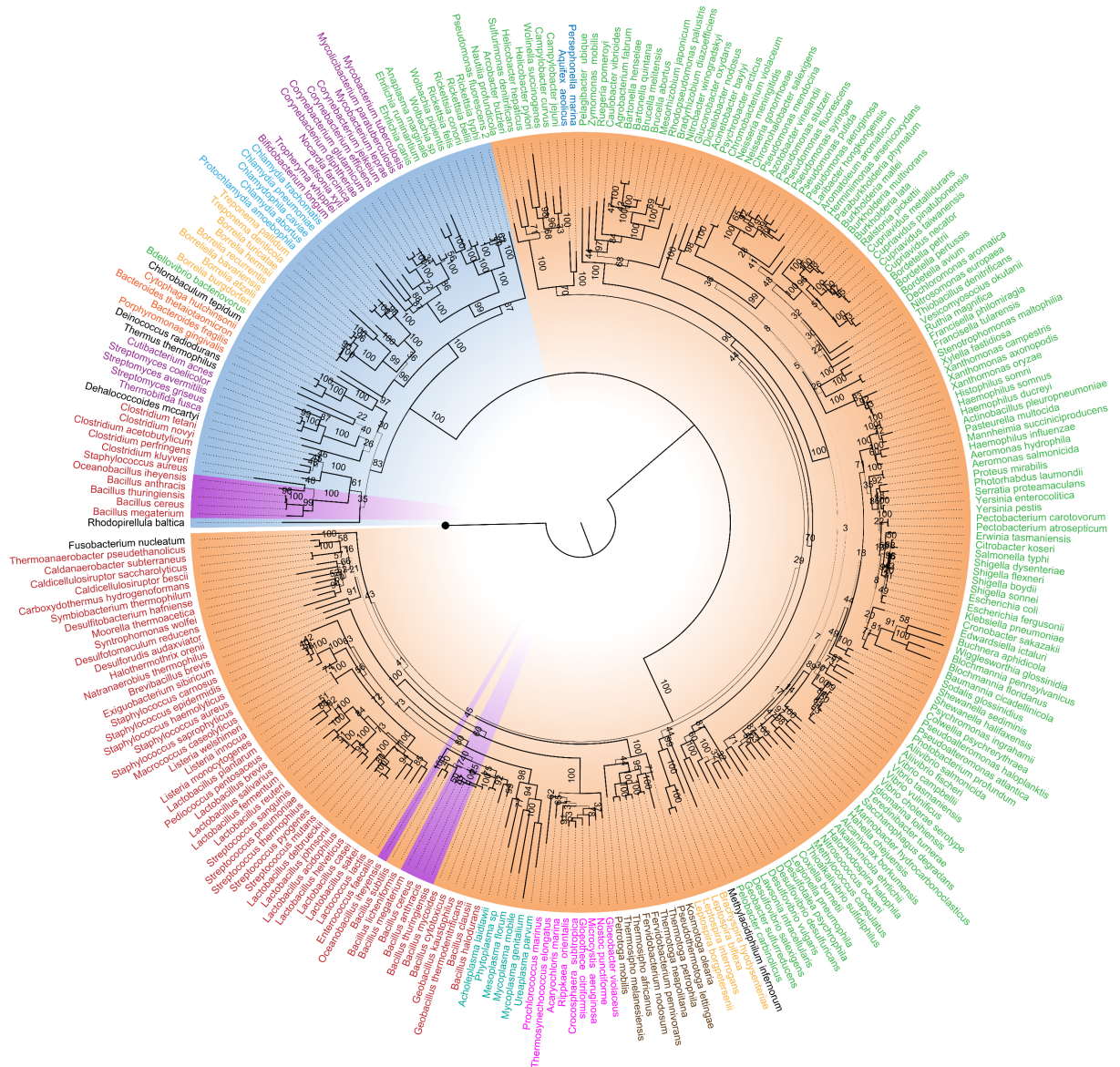
4.1. Bioinformatička analiza izoleucil-tRNA-sintetaza

4.1.1. Filogenetska analiza bakterijskih IleRS

Kako bi se bolje istražila prethodno uočena mala grupa organizama unutar porodice *Bacillaceae* koji sadrže dva tipa gena *ileS* unutar istog genoma, u sklopu ove disertacije napravljena je bioinformatička analiza isključivo bakterijskih IleRS. U skladu s prethodnim analizama [8], bakterijske IleRS pokazuju značajne razlike u primarnoj sekvenci (slika 4.1) na temelju kojih je sve IleRS moguće grupirati u dva tipa: bakterijski tip IleRS (IleRS1), koji sadrži očuvani motiv od 4 cisteina na C-kraju (detaljno opisano u poglavlju 2.3.1) i eukariotima-sličan tip IleRS (IleRS2). Filogenetskom analizom uočeno je da bakterije u pravilu u genomu imaju samo jedan tip IleRS (slika 4.2). Zanimljivo, vrste koljena *Proteobacteria* uglavnom sadrže IleRS1, a IleRS2 je ograničen samo na razred *Rickettsia*, dok je kod koljena *Firmicutes* prisutnost isključivo IleRS2 ograničena na rod *Clostridia*. Koljeno *Spirochaetes* ima predstavnike koji sadrže ili IleRS1 ili IleRS2, a tip IleRS ograničen je na razini porodice (slika 4.2). Izuzetak od pravila po kojem organizam ima ili tip 1 ili tip 2 IleRS je bakterija *Pseudomonas fluorescens* koja sadrži oba tipa *ileS* u genomu te klinički izolat bakterije *Staphylococcus aureus* (vidi poglavlje 2.3.2). Nadalje, izuzetak su i pojedine vrste porodice *Bacillaceae*, predominantno zastupljene unutar roda *Bacillus* (slika 4.2).

konsenzus IleRS1	GPPYANG		SSL	C RC	C RC	
<i>B. megaterium</i> IleRS1	55 GPPYANG	534 HQAVLEE	563 NSSL S	886 KCERCW	LCTRCA	911
<i>B. subtilis</i> IleRS1	55 GPPYANG	534 HQAVLEE	563 NSSL S	887 MCERSR	LSLRNA	912
<i>S. aureus</i> IleRS1	55 GPPYANG	535 HRGVLET	564 NSS IT	885 KCERCW	LCPRCQ	910
<i>E. coli</i> IleRS1	56 GPPYANG	541 HSSVVDV	571 MSSLM	900 KCPRCW	ICGRCV	925
<i>P. fluorescens</i> IleRS1	56 GPPYANG	545 WHVLRGS	577 HSSLL	905 KCARCW	ICGRCV	930
<i>B. megaterium</i> IleRS2	45 GPPTANG	528 YHYPFEN	559 YSLMA	946 ELVQEG	AVAKFE	993
<i>S. aureus</i> IleRS2	40 GPPTANG	523 HHYPFDN	554 YSLLV	940 ELIREG	SIKTNK	987
<i>P. fluorescens</i> IleRS2	46 GPPFATG	527 RHYPFEN	558 YTMMV	939 SLKREG	ILVHHE	986
<i>S. griseus</i> IleRS2	50 GPPTANG	538 WGYPYQN	569 YTLMA	960 ELRRAG	ALTEHA	1008
konsenzus IleRS2		HYPFE				

Slika 4.1. Dio sravnjenja aminokiselinskih sekvenci bakterijskih IleRS. Konsenzus sekvence napravljene su na temelju 278 sekvenci. Izrazito očuvani motivi karakteristični za IleRS1, odnosno IleRS2 su podcrtani. Pristupni brojevi proteina IleRS dostupni su u tablici 9.7 (prilog).



Genomski tip *ileS*
ileS1 *ileS2* *ileS1* i *ileS2*

Bakterijska koljena
Aquificae *Actinobacteria* *Bacteroidetes* *Chlamydiae* *Cyanobacteria* *Firmicutes*
Proteobacteria *Spirochaetes* *Tenericutes* *Thermotogae* ostala koljena

Slika 4.2. Filogenetsko stablo bakterijskih izoleucil-tRNA-sintetaza. Filogenetsko stablo napravljeno je korištenjem metode *Maximum Likelihood* pomoću alata *RAXML*. Ukupno je analizirano 278 proteinskih sekvenci, a stablo predstavlja konsenzus stablo na temelju 1000 iteracija, pri čemu brojevi pored čvorova odgovaraju postotku reproducibilnosti čvorova u replikama. Kružić označava gen za valil-tRNA-sintetazu iz bakterije *E. coli*, a korišten je u sravnjenju kako bi se stablo moglo ukorijeniti. Bakterijske vrste su obojane prema koljenu. Narančasto su osjenčane vrste koje u genomu sadrže samo gen *ileS1*, plavo su osjenčane vrste koje u genomu sadrže samo gen *ileS2*, dok su ljubičasto osjenčane vrste koje u genomu sadrže i gen *ileS1* i gen *ileS2*. Pristupni brojevi proteina *IleRS* dostupni su u tablici 9.7 (prilog).

Detaljna analiza je pokazala da sve analizirane vrste roda *Bacillus* u genomu uvijek sadrže *ileS1*, dok neke vrste dodatno sadrže i *ileS2* (slika 4.2, osjenčano ljubičasto). Razlog zbog kojeg je prisutnost gena *ileS2* poželjna je jasan – bakterija postaje rezistentna na antibiotik mupirocin te dobiva selekcijsku prednost u okolišu koji sadrži mupirocin ili sadrži bakteriju *P. fluorescens* koja proizvodi mupirocin. Nejasno je zbog čega bakterija onda nije izgubila gen *ileS1*, koji nije univerzalno prisutan u bakterijama (slika 4.2), a očito je neophodan za bakterije roda *Bacillus*.

4.1.2. Analiza genomskog okruženja gena *ileS*

Kao što je opisano u prethodnom poglavlju, postojanje dva bitno različita tipa IleRS unutar roda *Bacillus* ukazuje na potrebu bakterija za obje IleRS. Budući da je poznato da se gen *ileS* pojavljuje i kao dio operona i kao samostalna transkripcijska jedinica (vidi poglavlje 2.3.2), napravljena je analiza genomskog okruženja gena *ileS* za vrste roda *Bacillus*, ali i za odabrane predstavnike drugih bakterijskih koljena. Unutar roda *Bacillus* gen *ileS1* uvijek se nalazi na točno definiranom mjestu u genomu, okružen operonom koji sadrži gen *divIVA* (esencijalni gen uključen u diobu stanice ^[207]) i operonom koji sadrži gen *lspA* (gen koji kodira za lipoproteinsku signalnu peptidazu ^[208, 209]), te se nalazi u istoj orijentaciji kao i susjedni geni (slika 4.3). U blizini gena *ileS1* nalaze se i geni uključeni u staničnu diobu i sporulaciju (*ftsA*, *ftsZ*) ^[210, 211], kao i podjedinice σ^E i σ^G uključene u proces sporulacije ^[212] (između gena *ftsZ* i *pgeF*, nije prikazano). Predikcija regulacije gena *ileS1* kod bakterija roda *Bacillus* sugerira da je pod kontrolom vlastitog promotora te nije dio operona, za razliku od gena *ileS1* bakterije *E. coli* (slika 4.3) ^[123, 124]. Vrste koje imaju isključivo gen *ileS2*, kao primjerice vrste roda *Streptomyces*, također sadrže gen *ileS2* unutar definiranog mjesta u genomu slično kao i vrste roda *Bacillus*, međutim tu se gen *ileS2* nalazi u suprotnoj orijentaciji u odnosu na susjedne gene (slika 4.3).

Nedavno provedena detaljna filogenetska analiza pokazala je da je rod *Bacillus* izrazito heterogeni rod, te je predloženo da rod *Bacillus* sadrži samo dvije grupe: grupa *Subtilis* i grupa *Cereus*, dok su ostale vrste pridružene novostvorenim rodovima ^[162, 213]. U skladu s novom taksonomskom podjelom, svi analizirani predstavnici grupe *Cereus* sadrže gen *ileS2*, dok svi analizirani predstavnici grupe *Subtilis* ne sadrže gen *ileS2* (prilog tablica 9.8). Dodatno, gen *ileS2* pojavljuje se unutar definiranog mjesta u genomu samo kod grupe *Cereus* (slika 4.3), dok kod ostalih vrsta roda *Bacillus* koje sadrže gen *ileS2* nije uočena značajna očuvanost unutar definiranog mjesta u genomu. Gen *ileS2* stoga je najvjerojatnije ušao u zajedničkog pretka

grupe *Cereus*, dok je prisutnost gena *ileS2* u ostalim vrstama roda *Bacillus* i dalje najbolje objašnjena horizontalnim prijenosom gena nakon razdvajanja vrsta od zajedničkog pretka zbog njegove raspršenosti unutar genoma.

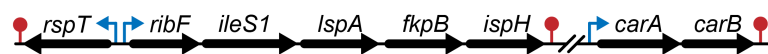
Bacillus ileS1 konsenzus



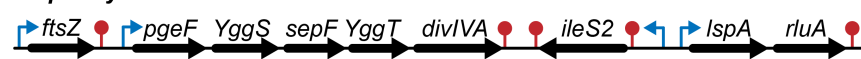
Bacillus ileS2 konsenzus (*B. cereus* grupa)



Escherichia coli ileS



Streptomyces konsenzus



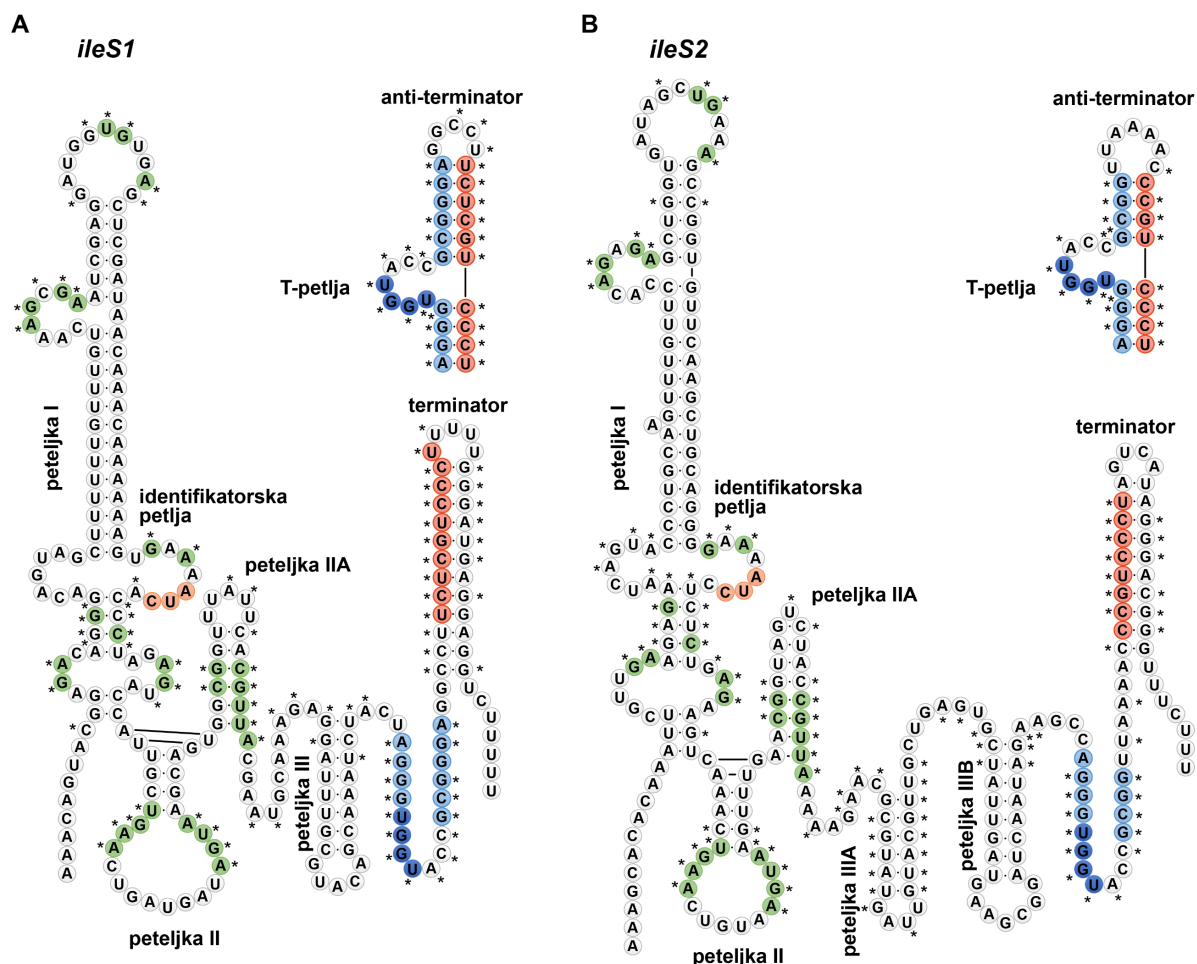
▶ promotor T transkripcijski terminator — transkripcijska jedinica / operon

Slika 4.3. Analiza genomskog okruženja gena *ileS* u bakterija. Konsenzus sekvenca predstavlja najzastupljeniji raspored gena unutar analiziranih vrsta, dok zastupljenost i raspored pojedinog gena/operona unutar pojedine vrste/grupe može odstupati. Pristupni brojevi analiziranih genoma dostupni su u prilogu (tablica 9.8).

4.1.3. Bioinformatička analiza regulatornih regija gena *ileS* u rodu *Bacillus*

Poznato je da je ekspresija gena *ileS*, ali i gena za druge aaRS, u Gram-pozitivnim bakterijama regulirana putem sustava riboprekidača (vidi poglavlje 2.1.3). Kako bi se istražila regulacija dvije IleRS unutar roda *Bacillus*, analizirane su uzvodne regije gena *ileS* (otprilike 400 nukleotida uzvodno od start kodona 122 gena *ileS*) iz vrsta roda *Bacillus*. U svim analiziranim sekvencama uočeni su očuvani elementi karakteristični za mehanizam regulacije genske ekspresije pomoću riboprekidača s T-petljom (engl. *T-Box riboswitch*) (slika 4.4) sugerirajući da je ekspresija oba gena (dodatno) regulirana aminoacilacijskim stanjem tRNA. Karakteristični element riboprekidača s T-petljom je slijed anti-antikodona (kodona) u identifikatorskoj ruci koji ostvaruje interakciju s antikodonom odgovarajuće tRNA. Posebno je zanimljivo uočiti da se kod svih analiziranih vrsta roda *Bacillus* interakcija uspostavlja preko glavnog izoakceptora molekule tRNA^{Ile}, tRNA^{Ile}_{GAU} (slika 4.4). Ostali bitni, izrazito očuvani, elementi riboprekidača uključuju T-petlju koja sadrži potpuno očuvani slijed 5' NGGT 3' koji sudjeluje u vezanju 3'-kraja neaminoacilirane tRNA^{Ile} (slika 4.4), kao i izrazito očuvani slijed koji može tvoriti terminatorsku, odnosno anti-terminatorsku uzvojniciu ovisno o tome je li tRNA^{Ile} koja ostvaruje interakciju s identifikatorskom rukom aminoacilirana ili ne.

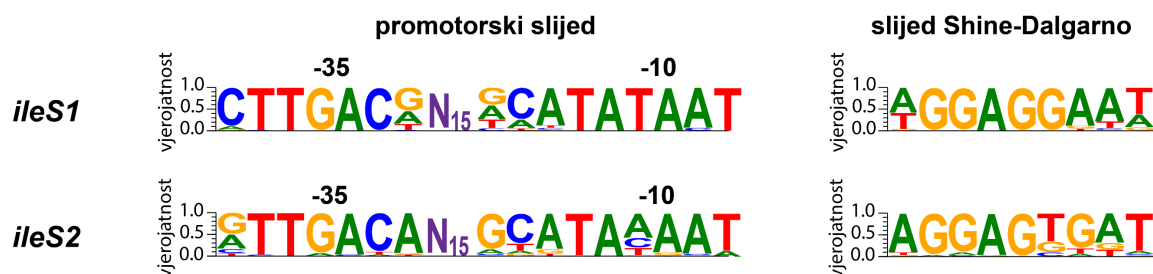
U sklopu ove doktorske disertacije kao modelni organizam korištena je bakterija *B. megaterium*, stoga je napravljena predikcija sekundarne strukture riboprekidača za oba gena *ileS* iz navedene bakterije. Posebno zanimljivo je uočiti da riboprekidač gena *ileS2* sadrži dvije peteljke (peteljka IIIA i IIIB) između peteljke IIA i T-petlje koje nisu uočene kod riboprekidača gena *ileS1* (peteljka III) (slika 4.4). Na temelju višestrukog sravnjenja nije uočena očuvanost



Slika 4.4. Predikcija sekundarnih struktura riboprekidača s T-petljom regulatornih regija gena *ileS1* i *ileS2* iz bakterije *B. megaterium*. 92 sekvence uzvodno od gena *ileS1* (A) i 32 sekvence uzvodno od gena *ileS2* (B) iz bakterija roda *Bacillus* sravnjenje su bioinformatičkim alatom *MUSCLE*. Predikcija lokalnih sekundarnih struktura napravljena je korištenjem alata *RNAfold* na temelju višestrukog sravnjenja. Konačna predikcija riboprekidača gena *ileS1* i *ileS2* iz bakterije *B. megaterium* napravljena je kombinacijom rezultata višestrukog sravnjenja i lokalnih struktura, kao i prema dostupnim literaturnim podacima^[97, 98]. Narančasto su označena tri nukleotida identifikatorske petlje uključena u vezanje antikodona akceptorske tRNA^{Ile}_{GAU}. Svjetlo plavo je označena regija koja sadrži T-petlju, dok su tamno plavo označeni nukleotidi uključeni u vezanje 3'-NCCA kraja neaminoacilirane tRNA^{Ile}_{GAU}. Crveno su označeni nukleotidi uključeni u stvaranje terminatorske, odnosno anti-terminatorske omče. Zvezdicom (*) su označeni nukleotidi koji su očuvani (> 90 % očuvanosti) unutar riboprekidača gena *ileS1*, odnosno gena *ileS2*, dok su zeleno označeni očuvani zajednički nukleotidi (do peteljke III) između riboprekidača gena *ileS1* i *ileS2*. Pristupni brojevi analiziranih genoma dostupni su u prilogu (tablica 9.8).

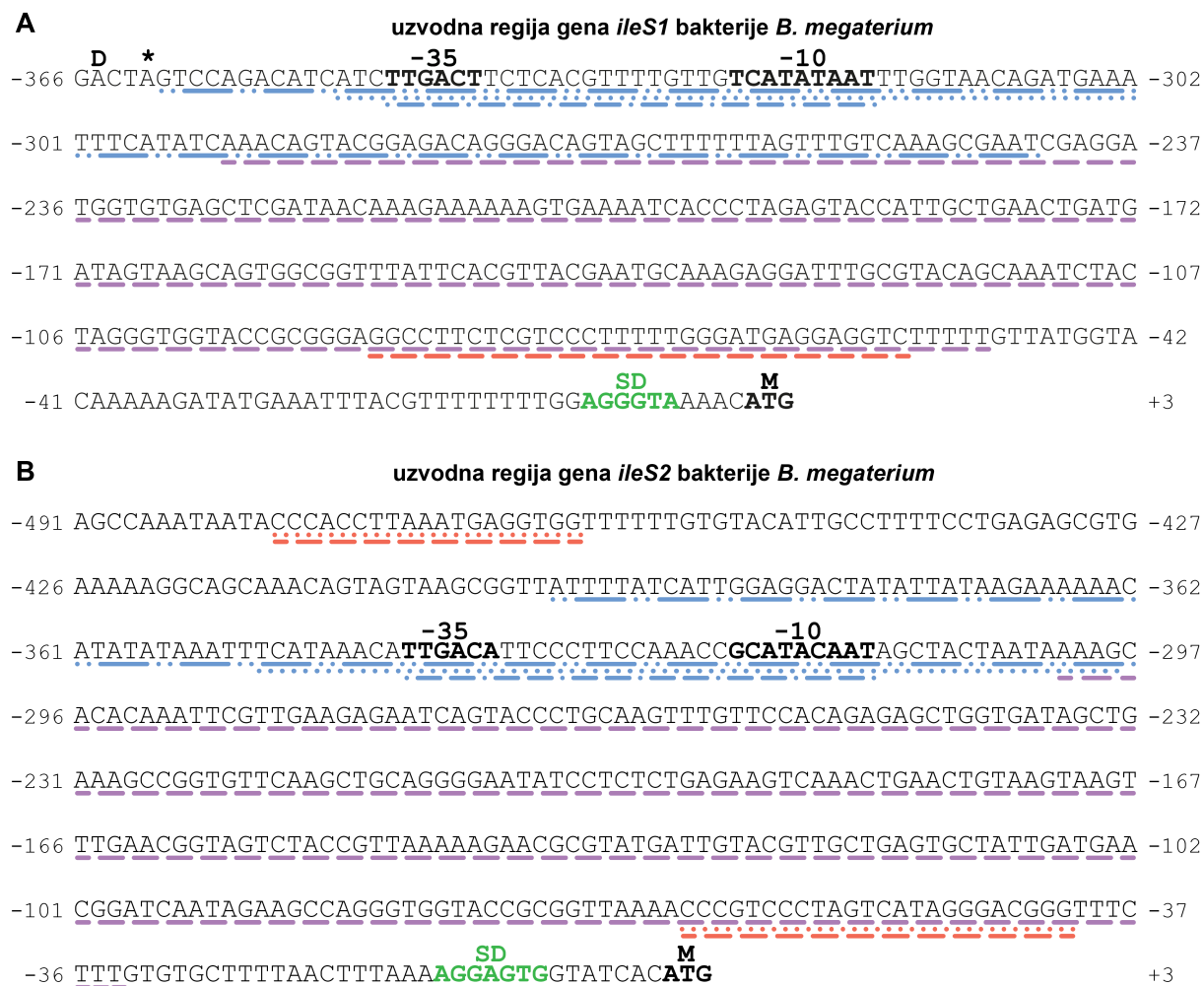
zajedničkih nukleotida između peteljke III i peteljki IIIA i IIIB. Peteljka IIIA izrazito je očuvana unutar svih analiziranih sekvenci (slika 4.4B, označeno *), te moguće predstavlja bitan strukturni element karakterističan samo za riboprekidače gena *ileS2*.

Budući da je glavni regulatorni element koji određuje aktivnost transkripcije gena u pravilu promotor, analizirane su regije uzvodno od početka riboprekidača. Konsenzus sekvenca promotora gena *ileS1* odgovara sekvenci koju prepoznaju opći transkripcijski faktori, prvenstveno σ^{70} (slika 4.5A), dok konsenzus sekvenca promotora gena *ileS2* pokazuje male razlike u odnosu na kanonski konsenzus, sugerirajući da geni *ileS2* možda nisu konstitutivno eksprimirani pri normalnim uvjetima rasta. Za razliku od promotora, slijed Shine-Dalgarno, očekivano, pokazuje visoku razinu očuvanosti između ova dva gena (slika 4.5B).



Slika 4.5. Konsenzus sekvence promotora i slijeda Shine-Dalgarno gena *ileS1* i *ileS2* u bakterija roda *Bacillus*. Veličina slova odgovara relativnoj zastupljenosti pojedinog nukleotida u slijedu. Konsenzus sekvence napravljene su na temelju višestrukog sravnjenja korištenjem 90 sekvenci uzvodno od gena *ileS1* i 32 sekvence uzvodno od gena *ileS2* pomoću alata *WebLogo*. N₁₅ označava prosječan razmak od 15 nukleotida između sljedova -35 i -10. Pristupni brojevi analiziranih genoma dostupni su u prilogu (tablica 9.8).

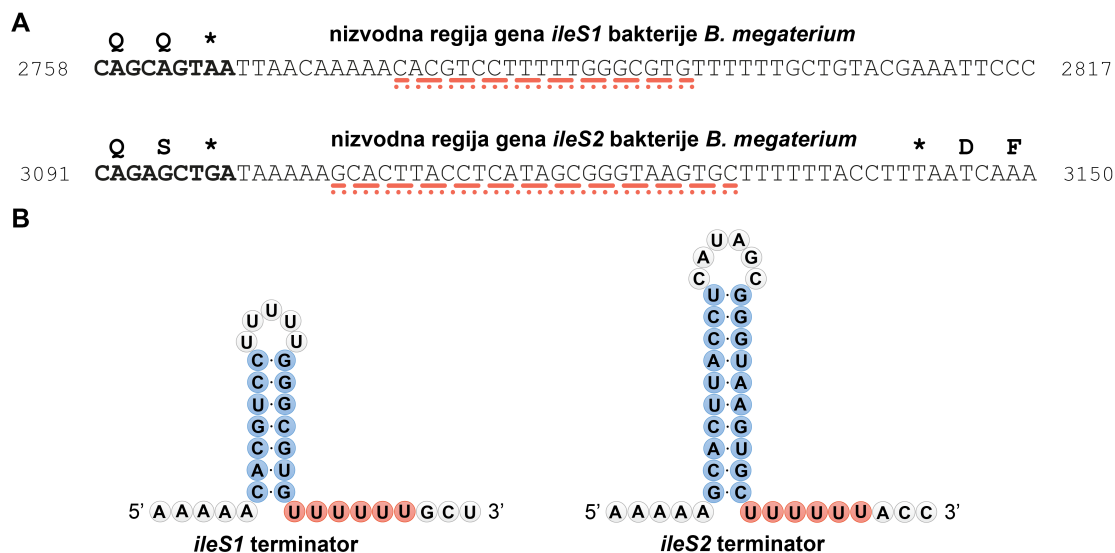
Kako bi se dodatno potvrdilo da li očuvani sljedovi uzvodno od gena *ileS1* i *ileS2* iz bakterija roda *Bacillus* zaista odgovaraju promotorskim sljedovima, regije uzvodno od gena *ileS1* i *ileS2* iz bakterije *B. megaterium* dodatno su analizirane bioinformatičkim alatima za predikciju promotora. Očekivano, kod oba gena različiti bioinformatički alati pretpostavili su postojanje promotorskih elemenata (slika 4.6). Dodatno, korištenjem alata *Softberry* napravljena je predikcija veznih mjesta za transkripcijske faktore, a dobiveni rezultati u potpunosti se poklapaju s rezultatima dobivenim višestrukim sravnjenjem (slika 4.5). Tako su za promotorski slijed gena *ileS1* kao najizgledniji kandidat za transkripcijski faktor predloženi primarni transkripcijski faktori RpoD16 i RpoD19 (σ^{70}). S druge strane, kao najizgledniji kandidat za transkripcijski faktor promotorskog slijeda gena *ileS2* predložen je LexA, transkripcijski represor uključen u popravak DNA uslijed aktivacije staničnog SOS odgovora.



Slika 4.6. Bioinformatička analiza uzvodne regije gena *ileS1* i *ileS2* iz bakterije *B. megaterium*. Regije uzvodno od gena *ileS1* (A) i *ileS2* (B) analizirane su bioinformatičkim alatima za predikciju promotora *BacPP* (•• — ••), *PePPER* (• — — •) i *FruitFly* (••••) te su mjesta koja sadrže promotorske sljedove označena plavim linijama, te bioinformatičkim alatima za predikciju transkripcijskih terminatora *ARNold* (••••) i *PePPER* (— —) te su mjesta koja sadrže terminatorske sljedove označena crvenim linijama. Predikcija -35 i -10 promotorske regije napravljena je korištenjem alata *SoftBerry*, te je označena masno. Ljubičastim linijama (— —) je označena pretpostavljena regija riboprekidača. Start kodoni su otisnuti masno uz navedeni prvi metionin. Prikazan je i dio sekvence gena *divIVA* (uzvodno od gena *ileS1*) uz označene aminokiseline i stop kodon (označen zvjezdicom, *). Sekvenca Shine-Dalgarno (SD) označena je zeleno. Brojevi odgovaraju pozicijama uzvodno od start kodona gena *ileS*, pri čemu je adenin start kodona otvorenog okvira čitanja numeriran s +1.

Identifikacija promotorskih sljedova uzvodno od gena *ileS1* i *ileS2* kod bakterije *B. megaterium* sugerira da transkripcija oba gena započinje neposredno ispred riboprekidača. Uzvodno od promotora gena *ileS2* identificiran je i Rho-neovisni transkripcijski terminator (slika 4.6B). S druge strane, terminacija gena *divIVA* (prvi gen uzvodno od gena *ileS1*) moguće je regulirana Rho-ovisnom terminacijom transkripcije (slika 4.6A).

Nizvodno od oba gena pronađeni su Rho-neovisni transkripcijski terminatori (slika 4.7), ukazujući da gen *ileS2*, a najvjerojatnije ni gen *ileS1*, nisu dio operonske strukture te su samostalne transkripcijske jedinice u bakteriji *B. megaterium*.



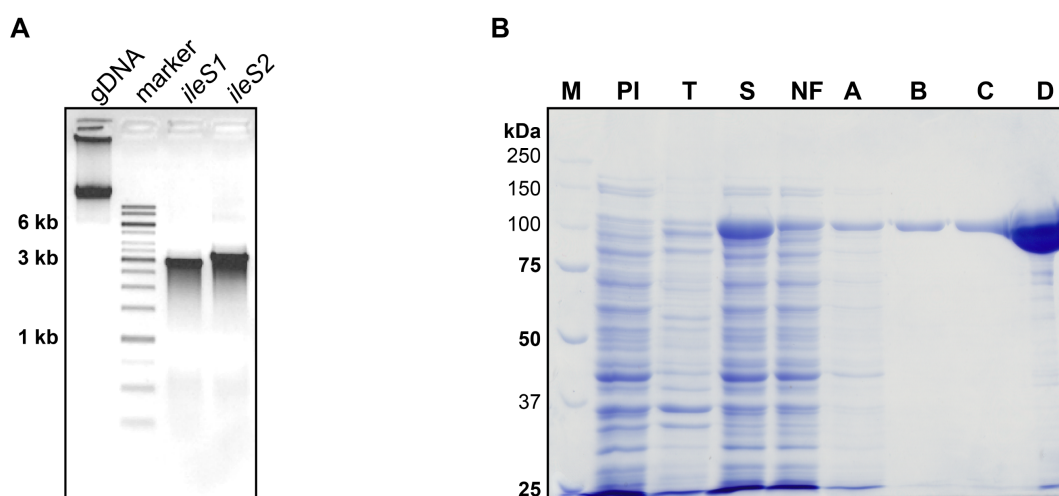
Slika 4.7. Bioinformatička analiza nizvodne regije gena *ileS1* i *ileS2* iz bakterije *B. megaterium*. A) Regije nizvodno od gena *ileS1* i *ileS2* analizirane su bioinformatičkim alatima za predikciju terminatora, a dobiveni rezultati označeni su crvenim linijama ovisno o korištenom alatu: *ARNold* (••••), *PePPER* (—). Masno su otisnuti nukleotidi otvorenog okvira čitanja s naznačenim aminokiselinama, dok je zvjezdicom (*) označen stop kodon. Brojevi odgovaraju genu *ileS* počevši od prvog nukleotida otvorenog okvira čitanja. B) Predikcija sekundarnih struktura transkripcijskih terminatora gena *ileS1* i *ileS2* napravljena je pomoću alata *ARNold* i *PePPER*.

4.2. Proizvodnja *B. megaterium* izoleucil-tRNA-sintetaza i tRNA^{Ile}

4.2.1. Proizvodnja i pročišćavanje divljih tipova enzima *IleRS*

U svrhu biofizičke i kinetičke karakterizacije, proizvedene su i pročišćene obje izoleucil-tRNA-sintetaze iz bakterije *B. megaterium*. Dvije *BmIleRS* pokazuju 31 % identičnosti na aminokiselinskoj razini, u skladu s prijašnjim analizama [121]. Nakon izolacije genomske DNA iz bakterije *B. megaterium*, kodirajući slijed za oba proteina umnožen je reakcijom PCR i ugrađen u plazmidni vektor pET28b pod inducibilni promotor T7 na način da se protein translatira s His₆ privjeskom na N-kraju proteina (slika 4.8A). Rekombinantni plazmidni vektori potom su uneseni u soj BL21(DE3) bakterije *E. coli*, a ekspresija proteina inducirana je dodatkom IPTG-a. Za razliku od proteina *IleRS1* koji je uspješno eksprimiran tijekom 4 h na 30 °C, protein *IleRS2* nije pokazao vidljivu razinu ekspresije pri povišenoj temperaturi (nije prikazano), već je uspješno eksprimiran tijekom 16 h na 15 °C. Nakon prekomjerne ekspresije

proteina, stanice su lizirane sonikacijom, a topljiva frakcija proteina odmah je korištena za pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu (slika 4.8B). Gotovo sav prekomjerno eksprimirani protein nalazio se u topljivoj frakciji, dok je količina netopljivog proteina bila zanemariva. Pročišćavanje proteina IleRS1 bilo je izuzetno uspješno, te je protein nakon provedene afinitetne kromatografije ukoncentriran do koncentracije otprilike $\gamma = 20 \text{ mg mL}^{-1}$ i preveden u pufer za skladištenje te nije dalje pročišćavan. Pročišćavanje proteina IleRS2 bilo je jednako uspješno (nije prikazano). Rutinski je iz 0,5 L bakterijske kulture *E. coli* dobiveno 10 mg pročišćenog proteina IleRS1 i 5 mg pročišćenog proteina IleRS2.



Slika 4.8. Kloniranje i pročišćavanje *B. megaterium* IleRS. A) Analiza izolacije genomske DNA (gDNA) iz bakterije *B. megaterium*, te PCR produkata (*ileS1* – 2792 bp, *ileS2* – 3122 bp) agaroznom gel-elektroforezom. Marker: *GeneRuler 1 kb DNA Ladder*. B) Analiza na 9 %-tnom poliakrilamidnom gelu pročišćavanja proteina IleRS1 afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu. M: marker molekularnih masa *Precision Plus Protein Standards*; PI: bakterijska kultura *E. coli* soja BL21(DE3) prije indukcije; T: talog bakterijskih stanica nakon sonikacije i centrifugiranja bakterijskih stanica; S: topljiva frakcija proteina nakon sonikacije i centrifugiranja bakterijskih stanica; NF: nevezana frakcija nakon nanošenja uzorka na Ni-NTA kolonu; A-C: frakcije dobivene ispiranjem Ni-NTA kolone puferima A, B i C; D: frakcija dobivena elucijom proteina His₆-IleRS1 puferom D.

Pročišćeni proteini nisu bili značajnije kontaminirani nukleinskim kiselinama (omjer $A_{260/280}$ bio je 0,5-0,6), međutim, bili su kontaminirani izoleucinom i/ili izoleucil-adenilatom. Postotak kontaminacije određen je kinetičkim testom (opisano u poglavlju 3.2.6.6) i u prosjeku je iznosio od 5 do 10 %, ovisno o enzimu i šarži. U reakcijama gdje se koristi mala koncentracija enzima, kontaminacija enzima pripadnom aminokiselinom ne utječe na rezultate mjerenja, jer je koncentracija produkta koji nastane u pravilu 1000 puta veća od koncentracije korištenog enzima. Međutim, u reakcijama gdje je koncentracija enzima usporediva s koncentracijom supstrata, primjerice kod pripreme misacilirane tRNA^{Ile} ili pak značajnije veća od nje, kao

primjerice kod deacilacije praćene kinetikom jednog kruga, enzim kontaminiran pripadnom aminokiselinom može utjecati na rezultate mjerenja prilikom korištenja neprikladnih aminokiselina. Stoga je nakon pročišćavanja proteina afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA koloni napravljen dodatan korak pročišćavanja proteina od izoleucina i izoleucil-adenilata (opisano u poglavlju 3.2.5.4), nakon kojeg je postotak kontaminacije iznosio manje od 1 %. Dodatan korak pročišćavanja nije utjecao na aktivnost enzima (nije prikazano).

Oba proteina prekomjerno su eksprimirana i u bakteriji *B. megaterium*, i to na način da se proteini transliraju s His₆ privjeskom na C-kraju. Prosječan prinos proteina bio je 5-10 puta manji u odnosu na ekspresiju proteina u bakteriji *E. coli*¹. Kinetički parametri u reakciji aktivacije^[188] i ukupnom aminoaciliranju (poglavlje 4.2.3 i^[188]) bili su isti neovisno o korištenom organizmu, stoga je ekspresija proteina rutinski rađena u bakteriji *E. coli*. Također, budući da prisutnost His₆ privjeska nije utjecala na aktivnost proteina, neovisno da li je His₆ privjesak prisutan na N- ili C-kraju proteina, nije bilo potrebe za njegovim uklanjanjem.

4.2.2. Dizajn deacilacijski inaktivnih varijanti enzima IleRS

Kako bi se ispitali mehanizmi popravka pogreške prije i nakon prijenosa aminokiseline na tRNA kod enzima IleRS (poglavlje 4.4), pripremljeni su mutanti koji su inaktivni u popravku pogreške nakon prijenosa. Proteinske sekvence IleRS kojima su riješene kristalne strukture ili za koje postoje publicirani podaci o popravku pogreške prije, odnosno nakon prijenosa, korištene su za višestruko sravnjenje skupa sa sekvencama *B. megaterium* IleRS1 i IleRS2. Analizom je uočen izrazito očuvan aspartat (*EcIleRS* D342, *SgIleRS* D334, *ScIleRS* D333) unutar domene za popravak pogreške, čija supstitucija u alanin dovodi do potpune inaktivacije hidrolitičke aktivnosti (deacilacije) *EcIleRS*, *SgIleRS* i *ScIleRS* prema Val-tRNA^{Ile} (slika 4.9) (vidi poglavlje 2.3.4.2). Međutim, budući da je pokazano da ovakav mutant ipak pokazuje određenu hidrolitičku aktivnost prema Nva-tRNA^{Ile} kod *EcIleRS*, uvedena je dodatna mutacija, supstitucija treonina u arginin (T243R) za koju je pokazano da potpuno inaktivira hidrolitičku aktivnost *EcIleRS* prema Nva-tRNA^{Ile} (slika 4.9). Mutirane varijante proteina IleRS (jednostruki i dvostruki mutanti, prilog tablica 9.5) pripremljene su ciljanom mutagenom odgovarajućih nukleotida. Ekspresija i pročišćavanje mutiranih varijanti proteina bili su jednako efikasni kao i za odgovarajući divlji tip. Kinetički parametri u reakciji aktivacije (K_m

¹ Prekomjerna ekspresija proteina IleRS1 i IleRS2 u bakteriji *B. megaterium* i kinetička karakterizacija dobivenih proteina napravljena je u sklopu diplomskog rada Bartola Božića, mag. chem.^[188]

		↓		↓																				
<i>B. megaterium</i> IleRS1	228	F	I	I	W	T	T	T	P	W	T	M	P	239	329	H	G	E	D	D	F	I	V	336
<i>B. megaterium</i> IleRS2	219	F	L	G	W	T	T	T	P	W	T	L	P	230	320	Y	G	E	D	D	Y	R	V	327
<i>B. subtilis</i> IleRS1	228	I	I	I	W	T	T	T	P	W	T	I	P	239	329	H	G	E	D	D	F	I	I	336
<i>E. coli</i> IleRS1 (P00956)	237	L	V	I	W	T	T	T	P	W	T	L	P	248	338	H	G	P	D	D	Y	V	I	345
<i>T. thermophilus</i> IleRS2 (P56690)	224	L	L	I	W	T	T	T	P	W	T	L	P	235	324	F	G	A	E	D	L	E	T	331
<i>S. griseus</i> IleRS2 (B1W0J8)	227	L	L	V	W	T	T	T	P	W	T	L	V	238	330	F	G	A	D	D	L	V	V	337
<i>P. fluorescens</i> IleRS1 (P18330)	234	I	V	I	W	T	T	T	P	W	T	I	P	245	334	Y	G	V	D	D	F	V	I	341
<i>P. fluorescens</i> IleRS2 (Q8L1B1)	222	F	L	A	W	T	T	T	P	W	T	L	P	233	322	F	G	E	D	D	A	L	L	329
<i>S. cerevisiae</i> IleRS2 (P09436)	219	L	V	A	W	T	T	T	P	W	T	L	P	230	329	F	G	E	D	N	A	A	336	

Slika 4.9. Višestruko sravnjenje proteinskih sekvenci domene za popravak pogreške nakon prijena enzima IleRS iz različitih organizama. Proteinske sekvence preuzete su iz *UniProtKB* baze podataka pomoću dostupnih pristupnih brojeva (u zagradama) i sravnjene bioinformatičkim alatom *MUSCLE*. Strelicom je označen očuvani treonin (*BmIleRS1* T234, *BmIleRS2* T225) i aspartat (*BmIleRS1* D333, *BmIleRS2* D324) unutar domene za popravak pogreške nakon prijena, čije mutacije u arginin, odnosno alanin dovode do inaktivacije hidrolitičke aktivnosti (deacilacije) enzima prema neprikladnim aa-tRNA^{Ile}.

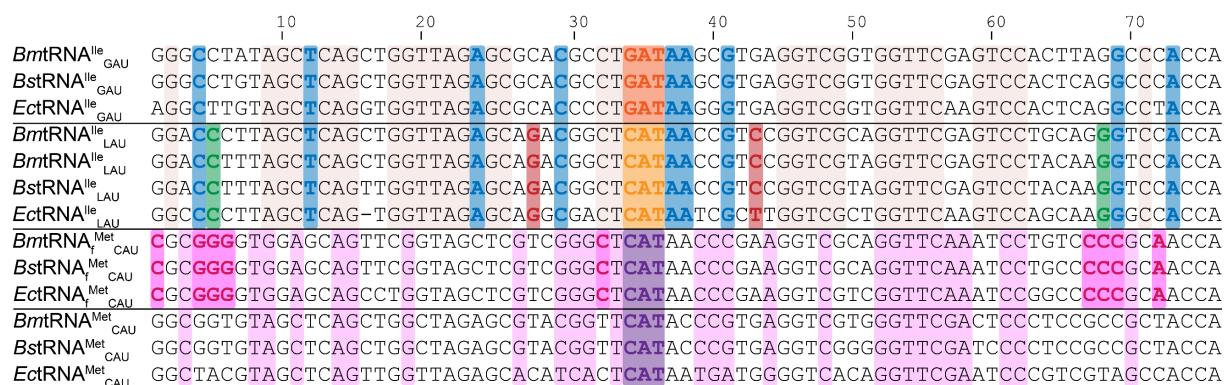
za Ile i ATP te k_{cat}) za sve mutante bili su istovjetni kao i za odgovarajući divlji tip enzima (nije prikazano) čime je potvrđeno da uvođenje mutacija u domenu za popravak pogreške nakon prijena ne utječe na reakciju aktivacije koja se odvija u sintetskom mjestu enzima.

4.2.3. Prekomjerna ekspresija tRNA^{Ile} u bakteriji *E. coli*

Genom bakterije *B. megaterium* kodira za dva izoakceptora molekule tRNA^{Ile}: glavni (GAU, prepoznaje antikodone AUU, AUC) i sporedni (LAU, prepoznaje antikodon AUA) izoakceptor. Analizom genoma bakterije *B. megaterium* uočeno je da je glavni izoakceptor prisutan u pet kopija u genomu, svi geni imaju identičnu nukleotidnu sekvencu i nalaze se u operonu s genima za ostale tRNA i ribosomske RNA. S druge strane, identifikacija sporednog izoakceptora je teža budući da je nukleotidna sekvencija antikodona sporednog izoakceptora identična antikodonu za tRNA^{Met} (vidi poglavlje 2.3.3), a određen je na temelju očuvanih nukleotida koji predstavljaju elemente identiteta za tRNA^{Ile} i tRNA^{Met} (slika 4.10). Genom bakterije *B. megaterium* kodira za dva sporedna izoakceptora tRNA^{Ile}_{LAU} koji pokazuju minimalne razlike u nukleotidnoj sekvenci, a oba se nalaze unutar operona skupa s genima za druge tRNA.

Proizvodnja tRNA za kinetičke eksperimente moguća je na tri načina: i) prekomjernom ekspresijom gena za tRNA u bakteriji (vidi u nastavku), ii) izolacijom nativnog specifičnog izoakceptora tRNA iz bakterije (vidi poglavlje 4.2.5) i iii) transkripcijom *in vitro* gena za tRNA. Budući da je pokazano da je brzina aminoacilacije korištenjem tRNA^{Ile} iz bakterije *E. coli* dobivene transkripcijom *in vitro* i do 400 puta sporija u odnosu na tRNA^{Ile} proizvedenu *in vivo*

(pretpostavljeno zbog nedostatka posttranskripcijskih modifikacija) [133], u sklopu ovog rada nije rađena transkripcija *in vitro* gena za tRNA^{Ile}.



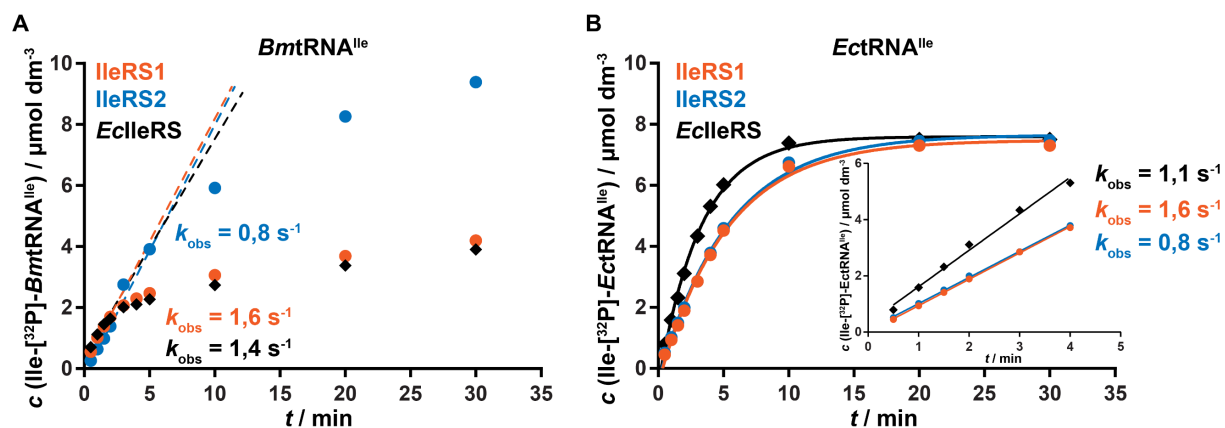
Slika 4.10. Identifikacija glavnog (GAU) i sporednog (LAU) izoakceptora molekule tRNA^{Ile} u bakteriji *B. megaterium*. Plavo su osjenčani elementi identiteta tRNA^{Ile}, dok su zeleno i crveno osjenčani elementi identiteta za prepoznavanje tRNA^{Ile}_{LAU} od strane enzima TilS (zeleno), odnosno za diskriminaciju tRNA^{Ile} od strane enzima TmcA (crveno) [130, 135]. Svjetlo smeđe su osjenčani očuvani nukleotidi tRNA^{Ile}, dok su tamno (glavni) i svjetlo (sporedni) narančasto osjenčani antikodoni tRNA^{Ile}. Svjetlo ružičasto su osjenčani očuvani nukleotidi tRNA^{Met}, tamno ružičasto su osjenčani nukleotidi diskriminacije između inicijatorske (tRNA^{Met}) i elongatorske tRNA^{Met}, dok je ljubičasto osjenčan antikodon tRNA^{Met} [111, 214, 215]. Kod tRNA^{Ile} i tRNA^{Met} antikodon je ujedno i element identiteta. Za sve tRNA prikazana je konsenzus sekvenca. Bm – *B. megaterium*, Bs – *B. subtilis*, Ec – *E. coli*

Kako je za kinetičke eksperimente potrebna velika količina tRNA, dizajniran je sustav za prekomjernu ekspresiju glavnog izoakceptora tRNA^{Ile}_{GAU} bakterije *B. megaterium* u bakteriji *E. coli*. Akceptorska aktivnost tRNA^{Ile}_{GAU} dobivene prekomjernom ekspresijom u bakteriji *E. coli* mjerena korištenjem [¹⁴C]-izoleucina iznosila je visokih 85 %. Obilježavanje tRNA^{Ile} radioaktivnim izotopom α -[³²P]-ATP dovelo je do blagog pada akceptorske aktivnosti, koja je iznosila prosječno 78 %, te su sve brzine dobivene korištenjem [³²P]-tRNA^{Ile} korigirane s obzirom na udio aktivne tRNA^{Ile}_{GAU}, odnosno tRNA^{Ile} koju je moguće aminoacilirati.

U ukupnoj reakciji aminoacilacije primijećena je nelinearna ovisnost nastanka produkta (Ile-tRNA^{Ile}) u vremenu već pri malim koncentracijama nastalog produkta, i to korištenjem oba enzima IleRS (slika 4.11A). Kao kontrola, reakcije aminoacilacije napravljene su korištenjem *EcIleRS* te *EctRNA*^{Ile}, prethodno pročišćene kromatografijom obrnutih faza i obilježene na terminalnom adenzinu s α -[³²P]-ATP akceptorske aktivnosti 70 %². Aminoaciliranje *BmtRNA*^{Ile} korištenjem *EcIleRS* također pokazuje postojanje dviju faza, pri čemu brža faza iznosi oko 10 % ukupne aktivne tRNA (slika 4.11A). S druge strane, aminoaciliranjem

² Pročišćenu *EcIleRS* te [³²P]-*EctRNA*^{Ile} ustupio je dr. sc. Igor Živković.

EctRNA^{Ile} korištenjem *EcIleRS* ili *B. megaterium* *IleRS1* i *IleRS2* nije uočeno postojanje dvije faze, a ukupno je aminoacilirano oko 80 % aktivne tRNA (slika 4.11B). Opaženi koeficijent brzine aminoacilacije (k_{obs}) korištenjem *EctRNA^{Ile}* odgovara opaženom koeficijentu brzine aminoacilacije brže faze korištenjem *BmtRNA^{Ile}* (slika 4.11A, označeno isprekidanim linijama), stoga je kinetički produktivnija, brža faza korištena prilikom određivanja kinetičkih parametara.



Slika 4.11. Ukupno aminoaciliranje *EctRNA^{Ile}* i *BmtRNA^{Ile}* korištenjem enzima *EcIleRS* i *BmIleRS*. Aminoacilacija je napravljena u standardnom aminoacilacijskom puferu korištenjem c (aktivne *BmtRNA^{Ile}*) = 15 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ (A) i c (aktivne *EctRNA^{Ile}*) = 10 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ (B). Enzimi su bili prisutni u koncentraciji c (*EcIleRS*) = 20 nmol dm^{-3} (\blacklozenge), c (*BmIleRS1*) = 10 nmol dm^{-3} (\bullet), c (*BmIleRS2*) = 20 nmol dm^{-3} (\bullet). A) Aminoacilacija *BmtRNA^{Ile}* pokazala je bifazni nastanak produkta, pri čemu brža faza, označena isprekidanim linijama, odgovara otprilike oko 10 % aktivne *BmtRNA^{Ile}* (korištenjem enzima *EcIleRS* i *BmIleRS1*), dok je korištenjem enzima *BmIleRS2* bifazna ovisnost manje izražena. B) Aminoacilacija *EctRNA^{Ile}* ne pokazuje bifazni nastanak produkta. Umetnuta slika pokazuje dio vremenskog tijeka u kojem je reakcija u ustaljenom stanju.

Nadeksprimirana tRNA^{Ile} pročišćena je kromatografijom obrnutih faza te su uočena tri kromatografska vrha koja moguće predstavljaju tri forme različito modificirane tRNA^{Ile} (prilog slika 9.1, vidi i reference [6, 188, 216]). Međutim, iako su preliminarna istraživanja sugerirala da postoji razlika između pročišćene i nepročišćene tRNA^{Ile} [188], detaljnijim analizama nije uočena značajna razlika u opaženom koeficijentu brzine aminoacilacije korištenjem pročišćene, odnosno nepročišćene frakcije tRNA^{Ile} (nije prikazano), stoga je za većinu eksperimenata (osim prijenosa i deacilacije) korištena ukupna tRNA s nadeksprimiranom tRNA^{Ile} koja nije kromatografski pročišćena³.

³ tRNA^{Ile} koja je korištena u eksperimentima prijenosa i deacilacije pročišćena je kromatografijom obrnutih faza u sklopu diplomskog rada Bartola Božića, mag. chem. [188].

4.2.4. Prekomjerna ekspresija tRNA^{Ile} u bakteriji *B. megaterium*

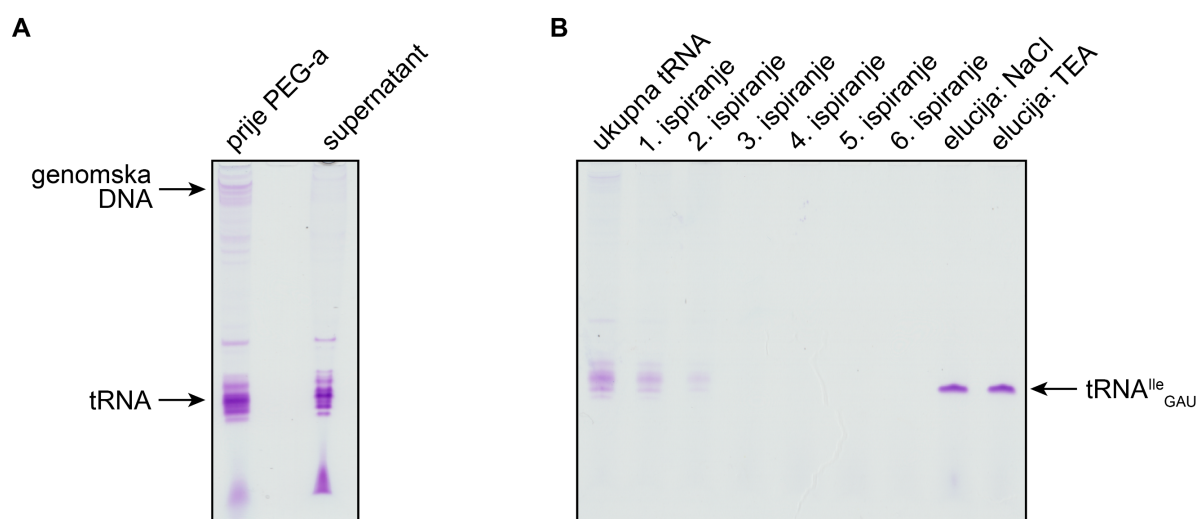
Iako se tRNA^{Ile} nadeksprimirana u bakteriji *E. coli* pokazala dovoljno dobrim supstratom za kinetička mjerenja, tRNA je ipak dobivena heterolognom ekspresijom u bakteriji *E. coli*, te je moguće da postoje određene posttranskripcijske modifikacije koje su nužne za aktivnosti BmtRNA^{Ile}, a bakterija *E. coli* ih nije mogla uvesti zbog nepostojanja potrebnih enzima. Također, moguće je da je bakterija *E. coli* uvela neke dodatne modifikacije koje se prirodno ne nalaze u tRNA^{Ile} iz bakterije *B. megaterium*. Stoga je dizajniran sustav kojim bi se trebala postići prekomjerna ekspresija BmtRNA^{Ile} u bakteriji *B. megaterium* na način da je gen za tRNA^{Ile} ugrađen u plazmidni vektor pP_{T7} (pP_{T7}_tRNA^{Ile}) pod kontrolom promotora T7. Uz vektor pP_{T7}_tRNA^{Ile}, protoplasti bakterije *B. megaterium* kotransformirani su plazmidom pT7_RNAP koji sadrži gen za T7-RNA-polimerazu (RNAP) pod kontrolom inducibilnog promotora P_{xyIA}. Dodatkom D-ksiloze dolazi do ekspresije RNAP koja potom započinje transkripciju gena nizvodno od promotora T7, u ovom slučaju gena za tRNA^{Ile}. Međutim, unatoč brojnim pokušajima i variranju različitih uvjeta indukcije i ekspresije, nije postignuta prekomjerna ekspresija tRNA^{Ile} u bakteriji *B. megaterium* (nije prikazano, vidi referencu [188]).

4.2.5. Izolacija native tRNA^{Ile} iz bakterije *B. megaterium*

Konačno, kako bi se sa sigurnošću utvrdilo da je heterologno nadeksprimirana tRNA^{Ile} dobar supstrat enzimima BmIleRS, iz bakterije *B. megaterium* izoliran je i pročišćen nativni tRNA^{Ile}_{GAU} izoakceptor. Stanice su uzgajane do srednje logaritamske faze rasta, nakon čega su ukupne nukleinske kiseline izolirane pomoću vrućeg fenola, a genomski DNA je uklonjena standardnim postupkom korištenjem otopine PEG/NaCl (slika 4.12A). Otopina dobivene ukupne tRNA iz bakterije *B. megaterium* bila je izrazito viskozna, unatoč niskoj koncentraciji tRNA u otopini. Budući da bakterija *B. megaterium* sadrži gusti peptidoglikanski sloj izrazito bogat kompleksnim ugljikohidratima, a koji su topljivi u vodenoj otopini, pretpostavljeno je da su se i oni izolirali skupa s tRNA zbog korištenja vrućeg fenola. Stoga je uveden dodatni korak pročišćavanja ukupne tRNA korištenjem smjese CTAB-a i PVP-a. CTAB je kationski detergent koji potiče odvajanje proteina i polisaharida od nukleinskih kiselina, dok PVP inhibira oksidaciju uzorka. Kako bi se spriječilo vezanje CTAB-a za nukleinske kiseline, u smjesu je dodana i visoka koncentracija NaCl ($c = 2 \text{ mol dm}^{-3}$) čime se stvaraju uvjeti za precipitaciju nukleinskih kiselina, dok polisaharidi ostaju topljivi. Tretman uzorka otopinom CTAB/PVP uspješno je smanjio viskoznost uzorka uz minimalan gubitak tRNA. Izolirana ukupna tRNA

potom je korištena za pročišćavanje nativnog tRNA^{Ile}_{GAU} izoakceptora metodom hibridizacije oligonukleotida (vidi poglavlje 3.2.4.3, slika 4.12B).

Za optimizaciju uvjeta hibridizacije korištena su dva pufera (s TEA i s NaCl). Nativna tRNA^{Ile}_{GAU} dobivena s oba pufera bila je jednako čista, međutim, korištenjem pufera s TEA dobiven je veći prinos tRNA koja je pokazivala veću akceptorsku aktivnost (85 %) u odnosu na tRNA dobivenu korištenjem pufera s NaCl (75 %). Prosječan prinos izoakceptora tRNA^{Ile}_{GAU} nakon elucije s kolone iznosio je 1,5 – 3 % ukupno nanosene tRNA, a iz 0,5 L bakterijske kulture prosječno je dobiveno oko 0,1 mg izoakceptora tRNA^{Ile}_{GAU}, u usporedbi s nadekspresijom tRNA^{Ile} u bakteriji *E. coli* gdje je prosječan prinos iznosio 20 mg tRNA^{Ile} iz 0,5 L bakterijske kulture. Obilježavanje nativne tRNA^{Ile} radioaktivnim izotopom [³²P] nije dovelo do značajnijeg pada akceptorske aktivnosti, međutim nativna [³²P]-tRNA^{Ile} također je pokazivala bifaznu ovisnost nastanka produkta u vremenu u reakciji aminoacilacije (nije prikazano). Kinetički parametri u ukupnom aminoaciliranju korištenjem nativne tRNA^{Ile} bili su usporedivi (nije prikazano) s korištenjem tRNA^{Ile} heterologno nadekspimirane u bakteriji *E. coli* (tablica 4.3). Također su određene i brzine prijenosa izoleucina na tRNA^{Ile} koristeći nativnu tRNA^{Ile} i tRNA^{Ile} nadekspimiranu u bakteriji *E. coli* koji su također bili usporedivi (vidi poglavlje 4.3.2). Provedeni eksperimenti potvrdili su da je tRNA^{Ile} nadekspimirana u bakteriji



Slika 4.12. Izolacija i pročišćavanje nativnog tRNA^{Ile}_{GAU} izoakceptora iz bakterije *B. megaterium*.

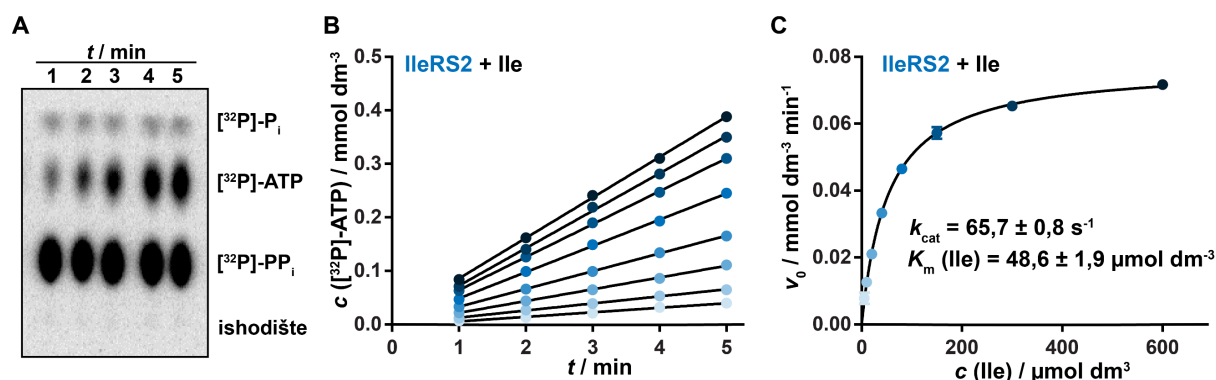
A) Provjera uspješnosti uklanjanja genomske DNA iz uzorka ukupnih nukleinskih kiselina dodatkom otopine PEG/NaCl denaturirajućom elektroforezom na poliaktilamidnom gelu u prisustvu uree. B) Pročišćavanje nativnog tRNA^{Ile}_{GAU} izoakceptora iz ukupne tRNA. Nakon nanošenja uzorka ukupne tRNA s hibridiziranim biotiniziranim oligonukleotidom na streptavidinsku agarozu, kolona je isprana 6 puta kako bi se uklonile nespecifično vezane tRNA. Elucija specifičnog nativnog izoakceptora tRNA^{Ile}_{GAU} postignuta je dodatkom pufera s NaCl ili s TEA i zagrijavanjem otopine.

E. coli dovoljno dobar supstrat enzimima IleRS1 i IleRS2, te je zbog jednostavnosti i ekonomičnosti dobivanja veće količine tRNA^{Ile}, ekspresija tRNA^{Ile} rutinski rađena u bakteriji *E. coli*.

4.3. Kinetička karakterizacija sintetskih reakcija IleRS

4.3.1. Diskriminacija aminokiselina u reakciji aktivacije

Aktivacija aminokiseline predstavlja prvi korak u ukupnoj reakciji sinteze aminoacilirane tRNA, a u sklopu ove doktorske disertacije mjerena je metodom izmjene pirofosfata. Aktivacijom aminokiseline nastaje aminoacil-adenilat (aa-AMP) uz oslobađanje pirofosfata. Budući da se u reakcijskoj smjesi nalazi [³²P]-PP_i u velikom suvišku, pirofosforolizom dolazi do njegove ugradnje u [³²P]-ATP. Kako je brzina nastajanja aa-AMP znatno sporija od brzine pirofosforolize, mjerenjem pirofosforolize zapravo se mjeri aktivacija aminokiseline. Radioaktivni produkt ([³²P]-ATP) je od reaktanta ([³²P]-PP_i) razdvojen tankoslojnom kromatografijom (slika 4.13A). Koncentracija nastalog [³²P]-ATP-a određena je umnoškom koncentracije dodanog [³²P]-PP_i (budući da je količina nastalog [³²P]-ATP-a direktno proporcionalna količini nastalog [³²P]-PP_i) i omjera intenziteta signala [³²P]-ATP-a u ukupnoj radioaktivnosti. Iz vremenskih tijekova nastanka ATP-a određene su početne brzine reakcija (slika 4.13B), dok su iz ovisnosti početnih brzina o koncentraciji korištenog supstrata određeni kinetički parametri aktivacije aminokiseline, K_m i k_{cat} (slika 4.13C, tablica 4.1).



Slika 4.13. Određivanje kinetičkih parametara za aminokiselinu izoleucin u reakciji aktivacije u uvjetima ustaljenog stanja s enzimom IleRS2. A) Reprezentativni kromatogram razdvajanja [³²P]-PP_i, [³²P]-ATP i [³²P]-P_i. Nastajanje ortofosfata nije enzimski katalizirano, te se njegova koncentracija ne mijenja u vremenu. B) Reprezentativni prikaz linearne ovisnosti nastanka produkta ([³²P]-ATP) u vremenu pri različitim koncentracijama supstrata, c (izoleucin) = 5 (●), 10 (●), 20 (●), 40 (●), 80 (●), 150 (●), 300 (●) i 600 (●) $\mu\text{mol dm}^{-3}$ uz c (ATP) = 15 mmol dm^{-3} . Koncentracija enzima iznosila je c (IleRS2) = 20 nmol dm^{-3} . C) Reprezentativni prikaz ovisnosti početnih brzina reakcije o koncentraciji izoleucina. Podaci su utočnjeni nelinearnom regresijom u Michaelis-Menten model (jednadžbe 3.4 i 3.5, poglavlje 3.2.6.1) iz kojeg su dobiveni kinetički parametri aktivacije aminokiseline, k_{cat} i K_m .

Enzimi IleRS1 i IleRS2 pokazuju značajnu razliku u kinetičkim parametrima sinteze izoleucil-adenilata. Navedena razlika nije toliko izražena na razini katalize (razlika svega dva puta), već je prvenstveno izražena preko vrijednosti K_m za oba supstrata (izoleucin i ATP) (tablica 4.1). Razlika K_m za ATP iznosi svega 4 puta, dok je razlika za izoleucin izraženija i iznosi oko 25 puta. Glavni doprinos diskriminaciji neprirodnih aminokiselina L-valina i L-norvalina za oba enzima je povećanje vrijednosti K_m , što sugerira da oba enzima razlikuju prirodni izoleucin od neprirodnog valina i norvalina prvenstveno na temelju vezanja aminokiseline u osnovnom stanju (tablica 4.1). Međutim, nakon vezanja neprirodnih aminokiselina u aktivno mjesto enzima, one se jednako efikasno prevode u aminoacil-adenilat kao i prirodni izoleucin te potencijalno predstavljaju prijetnju točnosti aminoacilacije. Diskriminacijski faktor (D), definiran kao $(k_{cat}/K_m)_{\text{prirodna aminokiselina}} / (k_{cat}/K_m)_{\text{neprirodna aminokiselina}}$, za obje neprirodne aminokiseline za oba enzima je približno isti i upućuje na nužnost postojanja aktivnog popravka pogreške enzima IleRS u cilju očuvanja niske pogreške prilikom biosinteze proteina (ukoliko je $D < 3300$ smatra se da je aktivacija aminokiseline navedenim enzimom prijetnja točnosti ukupne translacije, vidi poglavlje 2.3.4).

Tablica 4.1. Kinetički parametri u aktivaciji aminokiselina u uvjetima ustaljenog stanja mjereni metodom izmjene pirofosfata koristeći divlji tip enzima. ^{a, b}

IleRS	Supstrat	$K_m / \mu\text{mol dm}^{-3}$	k_{cat} / s^{-1}	$k_{cat} / K_m / \text{s}^{-1} \mu\text{mol}^{-1} \text{dm}^3$	D ^c
IleRS1	L-Ile	$2,1 \pm 0,3$	30 ± 1	14,29	
	ATP	395 ± 32	30 ± 1	0,08	
	L-Val	277 ± 33	25 ± 1	0,09	159
	L-Nva	387 ± 74	27 ± 2	0,07	204
	D-Ile	$(3,8 \pm 0,3) \times 10^3$	30 ± 3	0,008	1786
IleRS2	L-Ile	$48,6 \pm 1,9$	66 ± 2	1,36	
	ATP	$(1,6 \pm 0,1) \times 10^3$	66 ± 2	0,04	
	L-Val	$(5,4 \pm 0,4) \times 10^3$	39 ± 1	0,007	194
	L-Nva	$(8,0 \pm 0,8) \times 10^3$	33 ± 1	0,004	340
	D-Ile	$(2,3 \pm 0,1) \times 10^3$	$1,5 \pm 0,1$	$6,7 \times 10^{-4}$	2031

^a Mjerenja su napravljena korištenjem enzima nadeksprimiranih u bakteriji *E. coli*

^b Aktivnost enzima nije detektirana korištenjem D-valina (testirano korištenjem D-Val do koncentracije $c = 150 \text{ mmol dm}^{-3}$ i korištenjem enzima do koncentracije $c = 5 \mu\text{mol dm}^{-3}$)

^c Diskriminacijski faktor (D) izračunat je kao $(k_{cat}/K_m)_{\text{prirodna}} / (k_{cat}/K_m)_{\text{neprirodna aminokiselina}}$

Mjerenja su ponovljena najmanje tri puta, a vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost \pm SEM

U sklopu ovog rada testirana je i aktivacija D-aminokiselina, budući da dodatni paralog TyrRS u bakteriji *B. subtilis* služi sprječavanju ugradnje D-Tyr u proteine [21]. I dok oba enzima IleRS 2000 puta lošije aktiviraju D-Ile od L-Ile, zanimljivo je uočiti drugačiji mehanizam diskriminacije (tablica 4.1). IleRS1 diskriminira D-Ile slično kao i ostale aminokiseline – prvenstveno na temelju vezanja aminokiseline u osnovnom stanju (efekt kroz povećanje vrijednosti K_m gotovo 2 000 puta u odnosu na L-Ile) uz jednaku brzinu katalize. S druge strane, IleRS2 podjednako diskriminira D-Ile na temelju vezanja aminokiseline u osnovnom stanju (povećanje vrijednosti K_m oko 47 puta) i brzine katalize (koja je usporena gotovo 45 puta). Sličan efekt opažen je i kod *EcLeuRS*, gdje je pokazano da se nepripadni L-izoleucin diskriminira značajno uslijed katalitičkog koraka aktivacije, za razliku od ostalih aminokiselina koje se predominantno diskriminiraju tijekom vezanja u osnovnom stanju [83].

IleRS ne zahtijeva prisutnost tRNA za sintezu aminoacil-adenilata, stoga je aktivacija aminokiseline mjerena bez prisutnosti tRNA. Međutim, pokazano je da prisutnost tRNA^{Ile} značajno modulira kinetičke parametre enzima *EcIleRS* u reakciji aktivacije [12]. Budući da je u fiziološkim, staničnim uvjetima tRNA uvijek prisutna, određeni su i kinetički parametri aktivacije aminokiseline u prisutnosti oksidirane *BmtRNA*^{Ile} (tablica 4.2). Oksidirana tRNA ne sadrži vicinalne diole na terminalnom adenzinu, te nije supstrat u reakciji prijenosa aminokiseline. U skladu s podacima dostupnim za *EcIleRS* [2, 12], prisutnost tRNA nije utjecala na brzinu katalize korištenjem enzima IleRS1, ali je uzrokovala povećanje vrijednosti K_m za oba supstrata 6-8 puta (tablica 4.2). Zanimljivo, dodatak tRNA nije imao gotovo nikakav utjecaj na kinetičke parametre za supstrate enzima IleRS2 (osim blagog povećanja vrijednosti K_m za ATP).

Tablica 4.2. Kinetički parametri u aktivaciji aminokiselina u uvjetima ustaljenog stanja mjereni metodom izmjene pirofosfata koristeći divlji tip enzima u prisutnosti oksidirane tRNA^{Ile}. a, b

IleRS	Supstrat	$K_m / \mu\text{mol dm}^{-3}$	$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	$k_{\text{cat}} / K_m / \text{s}^{-1} \mu\text{mol}^{-1} \text{dm}^3$
IleRS1	L-Ile	$16,3 \pm 0,4$	24 ± 3	1,48
	ATP	$(2,3 \pm 0,3) \times 10^3$	24 ± 3	0,01
IleRS2	L-Ile	$69,3 \pm 5,5$	65 ± 4	0,94
	ATP	$(3,8 \pm 0,2) \times 10^3$	65 ± 4	0,02

^a Mjerenja su napravljena korištenjem enzima nadeksprimiranih u bakteriji *E. coli*

^b Koncentracija oksidirane tRNA^{Ile} iznosila je $c = 10 \mu\text{mol dm}^{-3}$

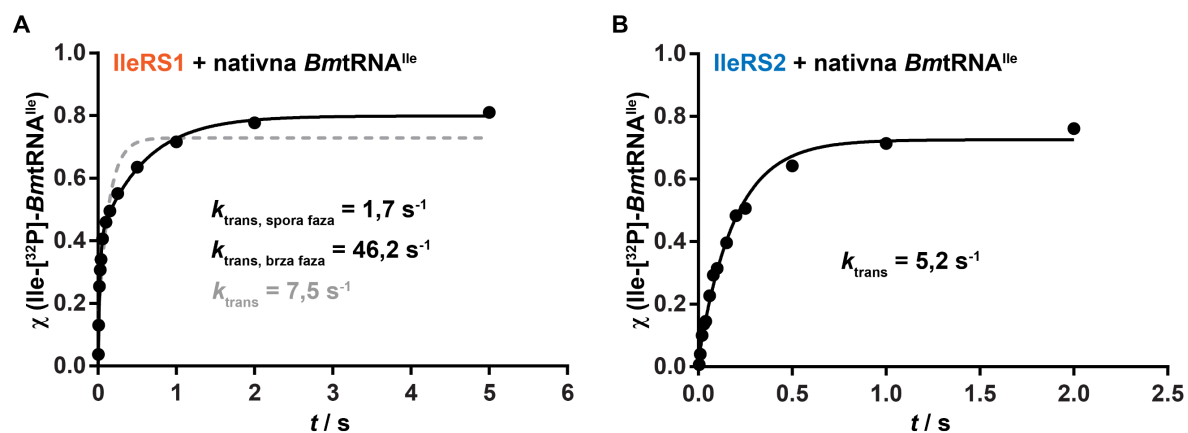
Mjerenja su ponovljena najmanje tri puta, a vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost \pm SEM

4.3.2. Prijenos izoleucina na tRNA

Dosadašnja istraživanja su pokazala da korak prijenosa nije diskriminatoran kod enzima IleRS, te da enzim, jednom aktivirane nepripadne aminokiseline, jednako efikasno prenosi na tRNA^{Ile} kao i pripadni izoleucin (vidi poglavlje 2.3.4). Stoga u sklopu ove doktorske disertacije nije okarakterizirana diskriminacija aminokiselina u koraku prijenosa na tRNA^{Ile}, već je korak prijenosa okarakteriziran kako bi se potvrdilo da je tRNA^{Ile} nadeksprimirana u bakteriji *E. coli* dovoljno dobar supstrat enzimima IleRS1 i IleRS2, kao i nativna tRNA^{Ile} iz bakterije *B. megaterium*. Izvorno je za *EcIleRS* pokazano da korak prijenosa ograničava brzinu ukupne reakcije aminoacilacije [6, 217], što je u suprotnosti s ostalim aaRS razreda I kod kojih je disocijacija produkta ograničavajući korak [1, 142, 218]. Međutim, novija istraživanja ipak ukazuju da *EcIleRS* prenosi Ile na tRNA^{Ile} značajno brže nego je inicijalno izmjereno [9], stoga je izolirani korak prijenosa potrebno izvoditi u uvjetima jednog kruga, kako bi se osiguralo da izmjereni koeficijent brzine odgovara prijenosu aminokiseline, a ne nekom sporijem koraku nakon nastanka aminoacilirane tRNA. Eksperimentalno se to postiže dodatkom enzima u značajnom suvišku u odnosu na tRNA, čime se korak prijenosa ograničava na jedan krug katalize enzima. Kao radioaktivni biljeg za praćenje signala korištena je tRNA obilježena s [³²P] na terminalnom adenozinu, koja nakon tretmana s nukleazom P1 daje dva krajnja radioaktivna produkta: [³²P]-AMP koji odgovara neaminoaciliranoj tRNA i aa-2'-[³²P]-AMP koji odgovara aminoaciliranoj tRNA (prilog, slika 9.2A).

Izmjereni opaženi koeficijent brzine prijenosa (k_{trans}) izoleucina na nativnu tRNA^{Ile} pomoću enzima IleRS1 izrazito je brz ($k_{\text{trans}} = 46 \text{ s}^{-1}$) (slika 4.14A), te je gotovo 5 puta brži od brzine prijenosa kod *EcIleRS* [9]. Ovako brzi prijenos pokazan je do sada samo za *ScIleRS2* ($k_{\text{trans}} = 35 \text{ s}^{-1}$) [8], te je više karakterističan za ValRS i LeuRS [6, 142]. Međutim, uočeno je postojanje druge sporije faze prijenosa ($k_{\text{trans}} = 1,7 \text{ s}^{-1}$) koja po koeficijentu brzine prijenosa odgovara brzini aminoacilacije u ustaljenom stanju (tablica 4.3), pri čemu amplituda spore faze iznosi otprilike 60 % aminoacilirane tRNA^{Ile}. S druge strane, izmjereni koeficijent brzine prijenosa izoleucina na nativnu tRNA^{Ile} pomoću enzima IleRS2 je oko 9 puta sporiji nego kod enzima IleRS1 (slika 4.14B), te je bliži vrijednostima za *EcIleRS* [9] i *SgIleRS2* [8]. Dodatno su reakcije prijenosa napravljene korištenjem tRNA^{Ile} nadeksprimirane u bakteriji *E. coli* i pročišćene kromatografijom obrnutih faza. Dobiveni koeficijenti brzine prijenosa aminokiseline na tRNA^{Ile} odgovaraju brzinama dobivenim korištenjem nativne tRNA^{Ile} (IleRS1: $k_{\text{trans, brza faza}} = 17,8 \pm 3,2 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{trans, spora faza}} = 1,7 \pm 0,2 \text{ s}^{-1}$; IleRS2: $k_{\text{trans}} = 3,5 \pm 0,3 \text{ s}^{-1}$,

nije prikazano) potvrđujući da je tRNA^{Ile} nadeksprimirana u bakteriji *E. coli* dobar supstrat enzima *BmIleRS1* i *BmIleRS2*.



Slika 4.14. Prijenos izoleucina na nativnu [³²P]-BmtRNA^{Ile} izoliranu iz bakterije *B. megaterium*. A) Podaci su utočnjeni u bieksponencijalnu jednadžbu. Pokušaj utočnjavanja u monoeksponencijalnu jednadžbu prikazan je iscrtkanim sivim linijama uz pripadni koeficijent brzine prijenosa. B) Podaci su utočnjeni u monoeksponencijalnu jednadžbu.

4.3.3. Ukupno aminoaciliranje s enzimima *IleRS*

Aktivacija aminokiseline u prisutnosti oksidirane tRNA pokazala je da prisutnost tRNA^{Ile} značajno modulira kinetičke parametre enzima *IleRS1* (prvenstveno K_m vrijednosti za supstrate), dok su kinetički parametri enzima *IleRS2* ostali nepromijenjeni. Stoga su određeni kinetički parametri i u ukupnom aminoaciliranju, kao fiziološki najrelevantnijoj reakciji (tablica 4.3). Ukupno aminoaciliranje obuhvaća aktivaciju aminokiseline, prijenos aminoacilne skupine na tRNA^{Ile} te disocijaciju Ile-tRNA^{Ile} što predstavlja regeneraciju enzima za novi ciklus katalize. Reakcije su praćene korištenjem divljeg tipa enzima, u uvjetima ustaljenog stanja.

U ukupnoj aminoacilaciji, enzim *IleRS1* pokazao je manji afinitet prema izoleucinu, ali veći afinitet prema ATP-u, u odnosu na reakciju aktivacije, pri čemu je brzina smanjena s 30 s⁻¹ na 1,7 s⁻¹. S druge strane, enzim *IleRS2* pokazao je veći afinitet prema izoleucinu i ATP-u (10 – 50 puta), uz značajno smanjenje brzine (~ 60 puta) (tablica 4.3).

Uzimajući u obzir fiziološke koncentracije supstrata ($c(\text{Ile}) \sim 100 - 300 \mu\text{mol dm}^{-3}$, $c(\text{ATP}) > 1 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{tRNA}^{\text{Ile}}) \sim 10 \mu\text{mol dm}^{-3}$) [219-222], oba enzima će u fiziološkim uvjetima biti u zasićenju sa supstratima, te će brzina sinteze Ile-tRNA^{Ile} biti otprilike duplo brža kod *IleRS1* u odnosu na *IleRS2*. Jedino u uvjetima izrazito niske koncentracije izoleucina, zbog povećanog afiniteta za izoleucin kod enzima *IleRS2*, brzina sinteze Ile-tRNA^{Ile} će biti brža kod *IleRS2* (zbog niže koncentracije supstrata koja je potrebna da se postigne zasićenje).

Tablica 4.3. Kinetički parametri u ukupnom aminoaciliranju u uvjetima ustaljenog stanja koristeći divlji tip enzima.^{a, b}

IleRS	Supstrat	$K_m / \mu\text{mol dm}^{-3}$	$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	$k_{\text{cat}} / K_m / \text{s}^{-1} \mu\text{mol}^{-1} \text{dm}^3$
IleRS1	L-Ile	$43,2 \pm 3,3$	$1,75 \pm 0,12$	0,04
	ATP	$246,0 \pm 19,8$	$1,75 \pm 0,12$	0,01
	tRNA ^{Ile}	$2,03 \pm 0,15$	$1,75 \pm 0,12$	0,86
IleRS2	L-Ile	$6,2 \pm 0,8$	$0,96 \pm 0,03$	0,15
	ATP	$76,4 \pm 1,4$	$0,96 \pm 0,03$	0,01
	tRNA ^{Ile}	$3,7 \pm 0,3$	$0,96 \pm 0,03$	0,26

^a Mjerenja su napravljena korištenjem enzima nadeksprimiranih u bakteriji *B. megaterium*

^b Preliminarna kinetička karakterizacija napravljena je u sklopu diplomskog rada Bartola Božića, mag. chem.^[188]

Mjerenja su ponovljena najmanje tri puta, a vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost \pm SEM

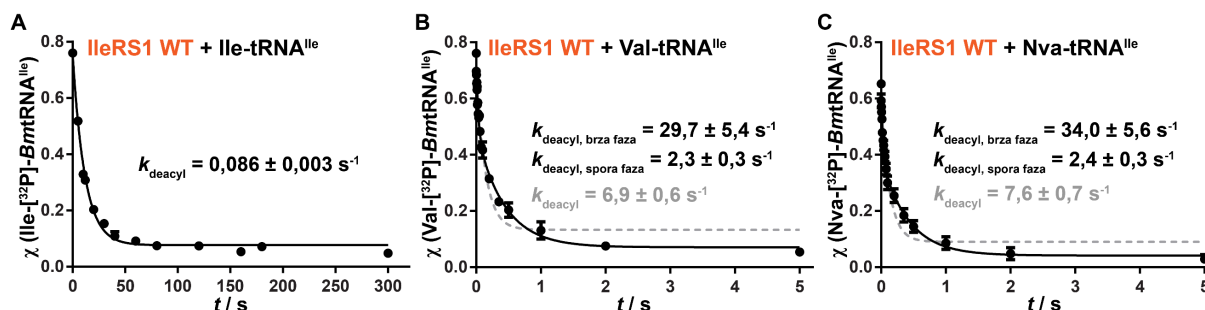
4.4. Analiza korektivnih reakcija enzima IleRS

4.4.1. Popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline

Dosadašnja istraživanja IleRS pokazala su da je popravak pogreške nakon prijenosa, koji se odvija u zasebnoj domeni za popravak pogreške, glavni mehanizam osiguravanja točnosti sinteze Ile-tRNA^{Ile} (vidi poglavlje 2.3.4). Kako bi se istražilo je li postojanje dvije IleRS u bakteriji *B. megaterium* povezano s točnošću sinteze Ile-tRNA^{Ile}, u sklopu ove disertacije prvo je okarakteriziran popravak pogreške nakon prijenosa kod *B. megaterium* IleRS. Metoda kojom je okarakteriziran ovaj tip popravka pogreške temelji se na praćenju sposobnosti deacilacije aa-tRNA^{Ile} u uvjetima jednog kruga katalize *in trans*, pri čemu se enzimu kao supstrat ponudi preformirana misacilirana tRNA^{Ile}.

Očekivano, oba enzima IleRS pokazuju slabu hidrolitičku aktivnost prema ispravnom produktu aminoacilacije, Ile-tRNA^{Ile} (slika 4.15A, tablica 4.4). Međutim, izmjereni koeficijent brzine deacilacije ipak je veći od neenzimske hidrolize Ile-tRNA^{Ile}, ukazujući da divlji tip enzima ipak posjeduje određenu hidrolitičku aktivnost prema Ile-tRNA^{Ile} (tablica 4.4). Kao i kod prijenosa, deacilacija Val-tRNA^{Ile} i Nva-tRNA^{Ile} pomoću IleRS1 bolje je opisana biekspencijalnom jednadžbom, pri čemu su dobivena dva opažena koeficijenta brzine deacilacije (slika 4.15B, 4.15C, tablica 4.4). Bržoj fazi odgovara koeficijent brzine deacilacije $k_{\text{deacyl}} \sim 30 \text{ s}^{-1}$, dok sporij fazi koeficijent brzine deacilacije $k_{\text{deacyl}} \sim 2,3 \text{ s}^{-1}$, pri čemu udio brže faze iznosi otprilike 40 % deacilirane tRNA kod obje aa-tRNA^{Ile}, iako je u ukupnoj aminoacilaciji brža faza iznosila otprilike 10 % ukupne tRNA. Bifazna priroda deacilacije uočena je i kod deacilacije Nva-tRNA^{Ile} katalizirane od strane *EcIleRS*, a uzrok za sada nije

poznat [2]. S druge strane, deacilacija obje misacilirane tRNA pomoću enzima IleRS2 opisana je monoeksponencijalnom jednadžbom uz dobivanje jednog koeficijenta brzine deacilacije (tablica 4.4), a rezultati su usporedivi s enzimom IleRS1.



Slika 4.15. Deacilacija aa- ^{32}P - $BmtRNA^{Ile}$ koristeći divlji tip enzima IleRS1. Opaženi koeficijenti brzina deacilacija (k_{deacyl}) predstavljaju srednju vrijednost \pm SEM od najmanje tri nezavisna eksperimenta. A) Deacilacija Ile- ^{32}P -tRNA Ile . B) Deacilacija Val- ^{32}P -tRNA Ile . C) Deacilacija Nva- ^{32}P -tRNA Ile . Podaci su utočnjeni u monoeksponencijalnu (A) ili bieksponencijalnu (B, C) jednadžbu. Sivim iscrtkanim linijama prikazan je pokušaj utočnjavanja u monoeksponencijalnu jednadžbu uz pripadni koeficijent brzine deacilacije (B, C).

Tablica 4.4. Deacilacija aa- ^{32}P - $BmtRNA^{Ile}$ u uvjetima jednog kruga enzima koristeći divlje tipove enzima i mutante s utišanim popravkom pogreške nakon prijenosa. ^{a, b}

IleRS	$k_{deacyl} / \text{s}^{-1}$		
	Ile- ^{32}P -tRNA Ile	Val- ^{32}P -tRNA Ile	Nva- ^{32}P -tRNA Ile
IleRS1 WT ^c	0,086 \pm 0,003	29,7 \pm 5,4	34,0 \pm 5,6
IleRS2 WT	0,020 \pm 0,001	20,1 \pm 1,3	27,4 \pm 1,5
IleRS1 D333A/T234R	0,0015 \pm 0,0001	0,0004 \pm 0,0001	0,0016 \pm 0,0001
IleRS2 D324A/T225R	0,0003 \pm 0,0001	0,0005 \pm 0,0001	0,0008 \pm 0,0001
Bez enzima	0,0003 \pm 0,0001	0,0006 \pm 0,0002	0,0008 \pm 0,0001

^a Mjerenja su napravljena korištenjem enzima nadeksprimiranih u bakteriji *E. coli* i dodatno pročišćenih od izoleucil-adenilata pirofosforolizom

^b Korištena je $BmtRNA^{Ile}$ dodatno pročišćena kromatografijom obrnutih faza

^c Deacilacija Val- ^{32}P -tRNA Ile i Nva- ^{32}P -tRNA Ile korištenjem divljeg tipa enzima IleRS1 pokazala je bifaznu kinetiku, pri čemu je udio spore faze korištenjem obje tRNA bio 60 %

Mjerenja su ponovljena najmanje tri puta, a vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost \pm SEM

Uvođenjem dvije mutacije unutar domene za popravak pogreške (IleRS1 D333A/T234R, IleRS2 D324A/T225R) u potpunosti je dokinuta enzimska hidroliza oba enzima prema sve tri testirane aa-tRNA Ile , pri čemu je koeficijent brzine deacilacije smanjen i do 10^4 puta, na istu razinu i kada enzim nije bio prisutan (tablica 4.4). Mutanti inaktivni u popravku pogreške nakon prijenosa korišteni su u analizi popravka pogreške prije prijenosa.

4.4.2. Popravak pogreške prije prijenosa aminokiseline

Izoleucil-tRNA-sintetaze mogu koristiti 3 različita mehanizma popravka pogreške prije prijenosa aminokiseline na tRNA (detaljnije opisano u poglavlju 2.3.4). Međutim, pokazano je da neke IleRS ne posjeduju tRNA-ovisan popravak pogreške prije prijenosa, a autori su postavili hipotezu da je enzim kompromitirao navedeni sporedni korektivni mehanizam u korist dobivanja visoke mupirocinske rezistencije [8]. Stoga je jedna od hipoteza ovog rada bila da je enzim *BmIleRS2* izgubio tRNA-ovisan popravak pogreške prije prijenosa kako bi dobio višu mupirocinsku rezistenciju. Enzim *BmIleRS1* bi analogno tome trebao biti točniji i posjedovati tRNA-ovisan popravak pogreške prije prijenosa.

Metoda karakterizacije tRNA-ovisnog popravka pogreške prije prijenosa aminokiseline na tRNA temelji se na paralelnom mjerenju brzine nastanka AMP-a (tj. utrošku ATP-a) korištenjem [³²P]-ATP-a i brzine nastanka aa-[³²P]-tRNA^{Ile} korištenjem obilježene [³²P]-tRNA^{Ile} u prisutnosti mutanata inaktivnih u popravku pogreške nakon prijenosa. Budući da je za sintezu jedne molekule aa-[³²P]-tRNA^{Ile} potrebno utrošiti jednu molekulu ATP-a, stehiometrija utroška ATP-a po aminoaciliranoj tRNA^{Ile} koja je veća od 1 upućuje na aktivan tRNA-ovisan popravak pogreške prije prijenosa. S druge strane, ukoliko se reakcije provedu korištenjem divljeg tipa enzima, prati se ukupni popravak pogreške (popravak pogreške prije i nakon prijenosa). Reprezentativni kromatogrami razdvajanja signala u reakcijama gdje je praćeno nastajanje aa-tRNA, odnosno gdje je praćen utrošak ATP-a, prikazani su na slici 9.3 (prilog).

U prisustvu pripadnog izoleucina, divlji tip enzima IleRS1 utroši otprilike 1,3 molekula ATP-a za sintezu jedne molekule Ile-tRNA^{Ile} (tablica 4.5). Slični rezultati pokazani su i za *EcIleRS*, koja također utroši 1,3 molekula ATP-a za sintezu jedne molekule Ile-tRNA^{Ile} [217]. S druge strane, u prisustvu nepripadnog valina, odnosno norvalina, divlji tip IleRS1 utroši oko 9, odnosno 48 molekula ATP-a po misaciliranoj tRNA^{Ile}, što je posljedica aktivnog popravka pogreške. Budući da je u reakciji korišten divlji tip enzima, na ovaj način je praćen ukupni popravak pogreške (popravak pogreške prije i nakon prijenosa). Slični rezultati dobiveni su i za enzim IleRS2 (tablica 4.5).

Zanimljivo, oba divlja tipa enzima pokazuju značajno veći utrošak ATP-a u prisustvu norvalina nego valina, a sličan efekt uočen je i kod *EcIleRS* [2]. Detaljnom proteomskom analizom pokazano je da se i norvalin i valin jednakom frekvencijom ugrađuju na ista izoleucinska mjesta u proteomu, međutim ugradnja norvalina uzrokuje i do 4 puta manju

vijabilnost stanica u odnosu na ugradnju valina [2], sugerirajući da je ugradnja neproteinogenog norvalina značajno toksičnija za stanicu od ugradnje valina na izoleucinska mjesta, te nude moguće objašnjenje opaženog povećanog utroška ATP-a u prisustvu norvalina.

Tablica 4.5. Paralelno praćenje nastanka [³²P]-AMP-a i aa-[³²P]-tRNA^{Ile} u uvjetima ustaljenog stanja koristeći divlji tip enzima IleRS i mutante s utišanim popravkom pogreške nakon prijenosa. Reakcije su napravljene uz c ([³²P]-ATP) = 200 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ te nisu sadržavale NH₄Cl, a pokrenute su dodatkom enzima. ^{a, b}

IleRS	Supstrat	$k_{\text{AMP}} / \text{s}^{-1}$	$k_{\text{aa-tRNA}} / \text{s}^{-1}$	$k_{\text{AMP}} / k_{\text{aa-tRNA}}$
IleRS1 WT	L-Ile	0,578 ± 0,080	0,439 ± 0,038	1,32
	L-Val	0,440 ± 0,048	0,048 ± 0,006	9,17
	L-Nva	0,429 ± 0,024	0,009 ± 0,004	47,8
IleRS1 D333A/T234R	L-Ile	0,254 ± 0,008	0,186 ± 0,006	1,37
	L-Val	0,244 ± 0,010	0,178 ± 0,017	1,37
	L-Nva	0,198 ± 0,015	0,121 ± 0,008	1,64
IleRS2 WT	L-Ile	0,827 ± 0,061	0,982 ± 0,050	0,84
	L-Val	0,534 ± 0,033	0,127 ± 0,003	4,20
	L-Nva	0,886 ± 0,074	0,024 ± 0,006	36,9
IleRS2 D324A/T225R	L-Ile	0,473 ± 0,125	0,477 ± 0,013	0,99
	L-Val	0,341 ± 0,011	0,316 ± 0,035	1,08
	L-Nva	0,503 ± 0,053	0,505 ± 0,032	1,00

^a Mjerenja su napravljena korištenjem enzima nadeksprimiranih u bakteriji *E. coli*

^b Reakcije su napravljene i u prisutnosti NH₄Cl ($c = 150 \text{ mmol dm}^{-3}$), pri čemu je prisutnost NH₄Cl povećala brzinu aminoacilacije, ali i brzinu utroška ATP-a do 2 puta, te nije utjecala na omjer utroška [³²P]-ATP-a i nastanka aa-[³²P]-tRNA^{Ile}

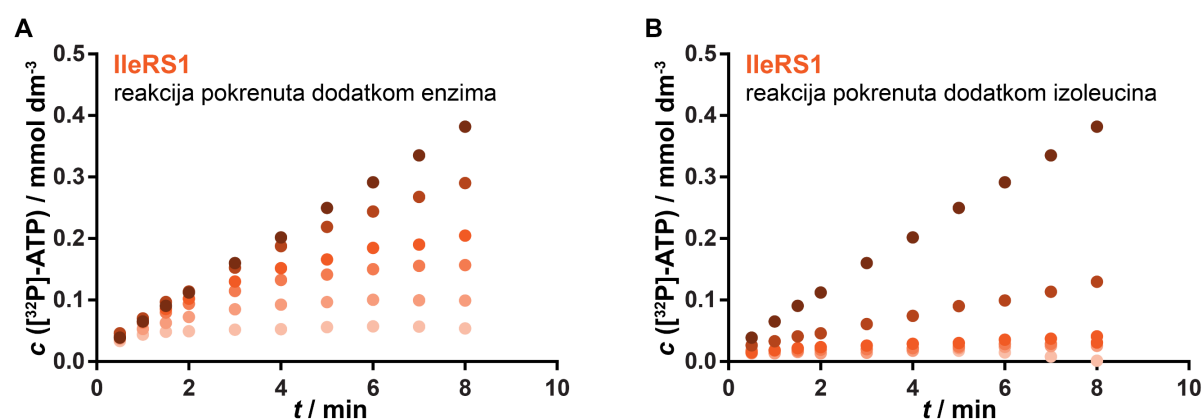
Mjerenja su ponovljena najmanje tri puta, a vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost ± SEM

Kako bi se ispitalo postoji li razlika u tRNA-ovisnom popravku pogreške prije prijenosa kod enzima *BmIleRS*, korišteni su deacilacijski inaktivni mutanti (mutanti s utišanim popravkom pogreške nakon prijenosa). Zanimljivo, u prisustvu nepripadnog valina, IleRS1 D333A/T234R također troši oko 1,4 molekula ATP-a po molekuli sintetizirane Val-tRNA^{Ile}. Budući da je omjer utroška ATP-a po misaciliranoj tRNA^{Ile} u prisutnosti nepripadnog valina isti kao i u prisutnosti pripadnog izoleucina korištenjem mutanta s utišanim popravkom pogreške nakon prijenosa, može se zaključiti da IleRS1 ne posjeduje tRNA-ovisan popravak pogreške prije prijenosa. Sličan rezultat dobiven je i korištenjem neproteinogene aminokiseline norvalin, pri čemu je omjer utroška ATP-a po sintetiziranoj Nva-tRNA^{Ile} malo povećan u odnosu na pripadni izoleucin (tablica 4.5). Rezultati pokazuju da IleRS1 ne koristi tRNA-ovisan

popravak pogreške prije prijenosa za uklanjanje Val-AMP-a ni Nva-AMP-a, kao ni IleRS2 (tablica 4.5), sugerirajući da IleRS1 nije zadržana u bakteriji *B. megaterium* zbog veće točnosti sinteze Ile-tRNA^{Ile}.

4.5. Inhibicija aktivnosti enzima IleRS mupirocinom

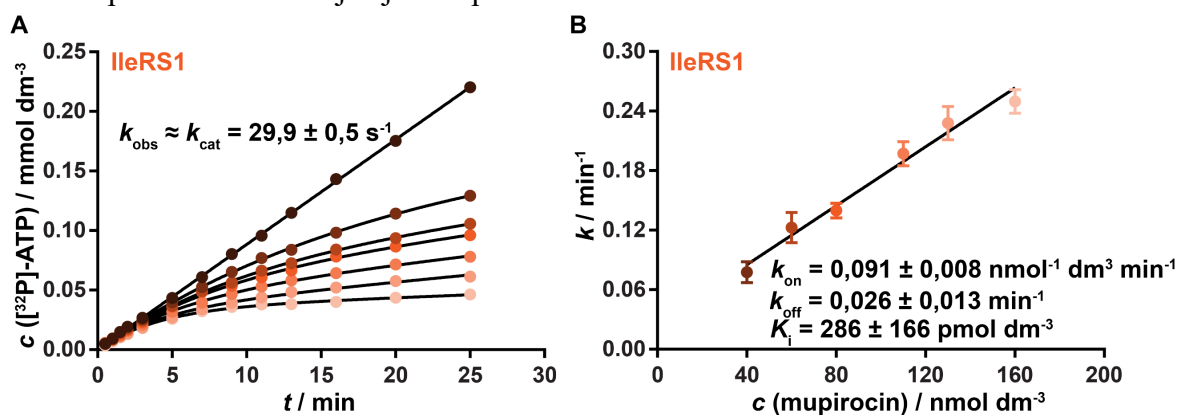
Dosadašnja istraživanja pokazala su da je mupirocin kompetitivni inhibitor enzima IleRS i prema izoleucinu i prema ATP-u (detaljno opisano u 2.3.5). Kako bi se dobio detaljniji uvid u mehanizam mupirocinske rezistencije, te potencijalne razlike između dva enzima u mehanizmu vezanja mupirocina, kinetički su okarakterizirane obje IleRS iz bakterije *B. megaterium* u inhibiciji mupirocinom. Inhibicija aktivnosti enzima mupirocinom testirana je u reakciji aktivacije, budući da mupirocin kompetitivno inhibira upravo sintezu izoleucil-adenilata. Budući da je prilikom karakterizacije SaIleRS1 uočeno da mupirocin uzrokuje vremensku ovisnost inhibicije [16], ispitan je utjecaj pokretanja reakcije dodatkom enzima, odnosno izoleucina. U slučaju enzima IleRS1, pokretanje reakcije enzimom ili izoleucinom bez prisutnosti mupirocina nije utjecalo na inicijalnu brzinu reakcije, ukazujući na brzu ravnotežu između enzima i supstrata (slika 4.16). Međutim, kada je reakcijska smjesa sadržavala mupirocin uočena je drastična razlika s obzirom na način pokretanja reakcije. U slučaju kada je reakcija pokrenuta dodatkom enzima (enzim nije bio predinkubiran s mupirocinom, slika 4.16A) vidljiva je izražena bifazna ovisnost nastanka produkta u vremenu, odnosno postojanje dvije faze vezanja, što ukazuje da između enzima i mupirocina ne postoji brza ravnoteža. Također je uočljivo da s povećanjem koncentracije mupirocina pri istoj korištenoj koncentraciji



Slika 4.16. Vremenski tijek nastanka produkta ($[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$) pri različitim koncentracijama mupirocina korištenjem enzima IleRS1 u reakciji aktivacije. Koncentracije mupirocina su iznosile c (mupirocin) = 0 (●), 100 (●), 200 (●), 300 (●), 400 (●) i 500 (●) nmol dm^{-3} , uz c (Ile) = $250 \mu\text{mol dm}^{-3}$, c (ATP) = 4 mmol dm^{-3} , c (IleRS1) = 25 nmol dm^{-3} . Reakcije su pokrenute dodatkom enzima (A) ili izoleucina (B).

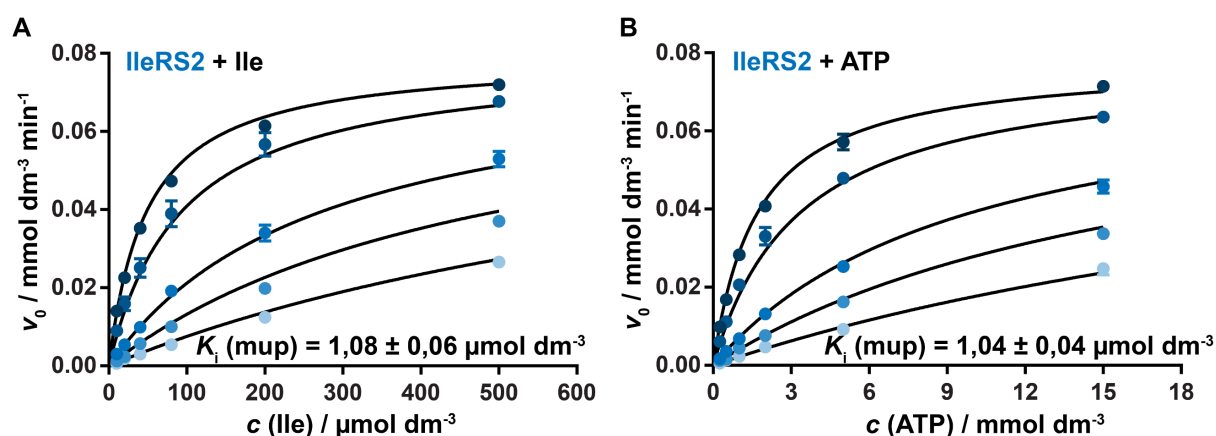
izoleucina dolazi do jače inhibicije enzimske aktivnosti. Posve suprotno, kada je reakcija pokrenuta izoleucinom (enzim je predinkubiran s mupirocinom, slika 4.16B) jasno je vidljivo da brzina reakcije ne odgovara brzini reakcije pri istoj koncentraciji mupirocina kada je reakcija pokrenuta dodatkom enzima. Štoviše, korištenjem većih koncentracija mupirocina došlo je do potpune inhibicije enzimske aktivnosti, što ukazuje da IleRS1 nije pokazala viši afinitet prema izoleucinu u odnosu na mupirocin. Rezultati ukazuju na moguću izrazito sporu disocijaciju mupirocina, odnosno izrazito jaki afinitet enzima prema mupirocinu, a u skladu su s publiciranim rezultatima za *SaIleRS1*, gdje je također uočena vremenska ovisnost inhibicije u prisutnosti mupirocina [16].

Izrazito visok afinitet enzima IleRS1 prema mupirocinu prividno je eliminiran korištenjem visokih koncentracija supstrata ($60 \times K_m$), pri čemu nije primijećena inhibicija aktivnosti enzima IleRS1 supstratom. Ovako podešeni eksperimentalni uvjeti omogućili su utočnjavanje podataka u jednadžbu za sporo-vezujuću inhibiciju (jednadžba 2.3, poglavlje 2.3.5.1), eliminirajući, ili barem smanjujući, visok afinitet enzima prema mupirocinu podizanjem prividne konstante inhibicije ($K_{i, \text{app}} \sim 17 \text{ nmol dm}^{-3}$) iznad koncentracije korištenog enzima ($c = 5 \text{ nmol dm}^{-3}$) (slika 4.17). Prava konstanta inhibicije potom je izračunata uzevši u obzir korištene koncentracije supstrata i pripadne vrijednosti K_m , a iznosi $K_i = 286 \pm 166 \text{ pmol dm}^{-3}$, pri čemu je izrazito visok afinitet enzima prema mupirocinu prvenstveno posljedica izrazito spore brzine disocijacije kompleksa.



Slika 4.17. Određivanje ukupne konstante inhibicije mupirocinom (K_i) za enzim IleRS1. Koncentracije mupirocina iznose c (mupirocin) = 0 (●), 40 (●), 60 (●), 80 (●), 110 (●), 130 (●) i 160 (●) nmol dm^{-3} . A) Reprezentativni vremenski tijek nastanka produkta ($[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$) pri različitim koncentracijama mupirocina. Podaci su utočnjeni u jednadžbu za sporo-vezujuću inhibiciju, iz koje je nelinearnom regresijom dobiven opaženi koeficijent brzine reakcije prvog reda, k . B) Iz ovisnosti opaženog koeficijenta brzine reakcije prvog reda k o korištenoj koncentraciji mupirocina linearnom regresijom dobiveni su kinetički parametri brzine reakcije k_{on} i k_{off} . Konstanta inhibicije (K_i) određena je omjerom konstanti k_{off} i k_{on} uz korekciju korištenih koncentracija supstrata. Mjerenja su ponovljena najmanje tri puta, a vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost \pm SEM.

Za razliku od enzima IleRS1, enzim IleRS2 nije pokazao vremensku ovisnost nastanka produkta u prisutnosti mupirocina (nije prikazano). Inicijalne brzine reakcija bile su iste neovisno o tome je li reakcija pokrenuta dodatkom enzima ili je enzim predinkubiran s mupirocinom, a reakcije pokrenute dodatkom izoleucina ili ATP-a, što upućuje da enzim i mupirocin uspostavljaju brzu ravnotežu te se radi o klasičnoj kompetitivnoj inhibiciji. Stoga je zbog jednostavnosti izvođenja eksperimenta enzim predinkubiran s mupirocinom, a reakcije su pokrenute dodatkom supstrata. Iz ovisnosti nastanka produkta u vremenu dobivene su početne brzine reakcije, a iz njihove ovisnosti o koncentraciji korištenog supstrata pri različitim koncentracijama mupirocina, nelinearnom regresijom određena je konstanta inhibicije prema izoleucinu i ATP-u (slika 4.18). U oba slučaja, dobiveni obrtni broj i vrijednosti K_m odgovaraju vrijednostima dobivenim u reakciji aktivacije bez prisutnosti mupirocina, potvrđujući da je mupirocin kompetitivni inhibitor enzima IleRS2 (prilog tablica 9.9). Konstanta inhibicije prema izoleucinu istovjetna je konstanti inhibicije prema ATP-u ($K_i \sim 1 \mu\text{mol dm}^{-3}$), ukazujući da je mupirocin jednako dobar kompetitivni inhibitor izoleucina i ATP-a.



Slika 4.18. Određivanje konstante inhibicije mupirocinom (K_i) u reakciji aktivacije u uvjetima ustaljenog stanja za enzim IleRS2. Koncentracije mupirocina iznose 0 (●), 1 (●), 5 (●), 10 (●) i 20 (●) $\mu\text{mol dm}^{-3}$. Ovisnost početne brzine reakcije o koncentraciji supstrata (A – izoleucin, B – ATP) u prisutnosti inhibitora mupirocina. Podaci su utočnjeni direktno u jednadžbu za kompetitivnu inhibiciju, pri čemu je nelinearnom regresijom određena konstanta inhibicije (K_i) prema mupirocinu. Mjerenja su ponovljena najmanje tri puta, a vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost \pm SEM.

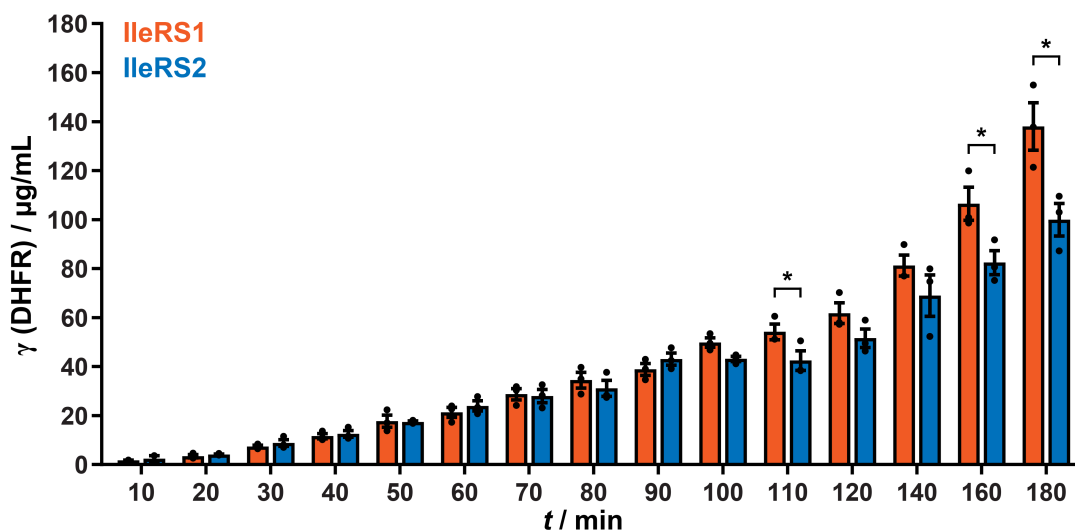
4.6. Mjerenje brzine translacije u uvjetima *in vitro*

Kinetička karakterizacija sintetskih reakcija dvije IleRS iz bakterije *B. megaterium* pokazala je da je enzim IleRS1 dva puta brži u sintezi Ile-tRNA^{Ile} od enzima IleRS2, u uvjetima potpunog zasićenja enzima supstratima (koncentracije supstrata (Ile, ATP, tRNA^{Ile}) bile su minimalno 10

puta veće od vrijednosti K_m za pojedini supstrat). Bitno je napomenuti da su uvjeti korišteni u reakciji aminoacilacije idealni uvjeti pri kojima se postiže maksimalna brzina reakcije. Pitanje je da li u nekim drugim uvjetima IleRS1 zaista brže sintetizira Ile-tRNA^{Ile} od IleRS2, te može li razlika u brzini sinteze dva enzima biti relevantna. Budući da je aminoacilirana tRNA^{Ile} supstrat ribosomu prilikom biosinteze proteina, relevantnost razlike u brzini sinteze Ile-tRNA^{Ile} ispitana je mjerenjem brzine translacije u uvjetima *in vitro*.

Za mjerenje brzine translacije u uvjetima *in vitro* korišten je komercijalno dostupan komplet PURExpress (NEB). Kao reporterski protein za mjerenje brzine translacije korištena je dihidrofolat-reduktaza (DHFR) iz bakterije *E. coli*, ugrađena u plazmidni vektor pod kontrolom promotora T7. Mjerenje brzine translacije temelji se na mjerenju količine nastale DHFR, preko ugradnje [³⁵S]-metionina. Reakcija započinje dodatkom plazmida u reakcijsku smjesu i podizanjem temperature na 37 °C (optimalna temperatura za translaciju bakterije *E. coli*). U određenim vremenskim intervalima reakcija je zaustavljena miješanjem alikvota reakcijske smjese s natrijevim hidroksidom, koji momentalno dovodi do denaturacije svih enzima te zaustavljanja reakcije. Također, lužnati uvjeti uzrokuju neenzimsku hidrolizu esterske veze između aminokiseline i tRNA, stoga je sva tRNA u smjesi deacilirana, uključujući i [³⁵S]-Met-tRNA^{Met}. Nanošenjem alikvota zaustavljene reakcijske smjese na filter papirić i ispiranjem s hladnom TCA, jedina radioaktivno obilježena makromolekula koja sadrži ugrađeni [³⁵S]-metionin je DHFR, čija količina se potom kvantificira pomoću scintilacijskog brojača. Kako bi se ispitali uvjeti u kojima je jedan od enzima bolji u translaciji *in vitro*, sama brzina translacije mora biti ograničena brzinom sinteze Ile-tRNA^{Ile}, te je stoga koncentracija *B. megaterium* IleRS smanjena na $c = 4 \text{ nmol dm}^{-3}$. Dobiveni podaci potvrđuju da u uvjetima kada je brzina translacije ograničena brzinom sinteze Ile-tRNA^{Ile}, IleRS1 je bolji u osiguravanju potrebne količine Ile-tRNA^{Ile} za translaciju u odnosu na IleRS2 (slika 4.19).

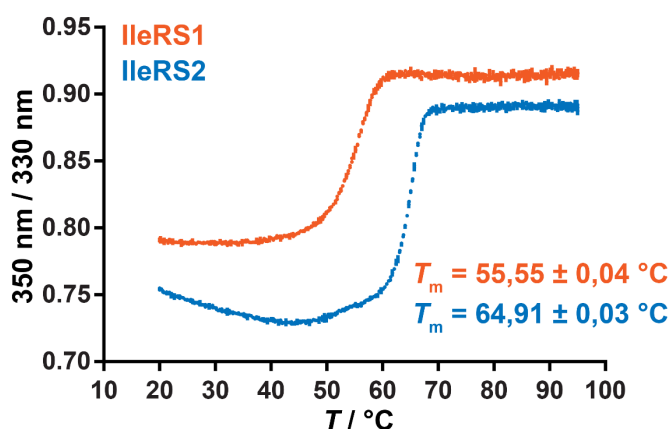
Budući da je reakcija translacije *in vitro* praćena na dugim vremenskim intervalima (mjereno do 3 h), napravljeni su kontrolni eksperimenti u kojima su oba enzima predinkubirana 3 h na 37 °C kako bi se eliminirala mogućnost da je do sporije sinteze DHFR došlo uslijed gubitka aktivnosti enzima IleRS2, nakon čega su testirani u reakciji aminoacilacije. Kod oba enzima nije primijećen pad enzimske aktivnosti uslijed produžene inkubacije potvrđujući da je sporija sinteza DHFR korištenjem IleRS2 zaista posljedica sporije brzine translacije zbog smanjene brzine sinteze Ile-tRNA^{Ile}, a ne inaktivacije enzima IleRS2 (nije prikazano).



Slika 4.19. Određivanje količine nastale dihidrofolat-reduktaze u vremenu korištenjem sustava PURExpress za translaciju *in vitro*. Reakcije su napravljene na 37 °C, korištenjem c ($BmIleRS$) = 4 nmol dm⁻³. Mjerenja su ponovljena tri puta, a stupići predstavljaju srednju vrijednost ± SEM. Statistički značajna razlika u količini nastale DHFR izračunata je korištenjem Student-ovog t-testa, te je zvijezdicom (*) označena statistički značajna razlika ($p < 0,05$).

4.7. Mjerenje termičke stabilnosti izoleucil-tRNA-sintetaza

Ekspresija $BmIleRS2$, ali i $SgIleRS$ [8] i $PfIleRS2$ [15] u bakteriji *E. coli* bila je moguća isključivo pri sniženoj temperaturi (vidi poglavlje 4.2.1), sugerirajući da su proteini nestabilni pri povišenoj temperaturi. Kako bi se ispitalo je li prisutnost dvije IleRS unutar istog genoma povezana s temperaturnim stresom, tj. je li IleRS1 temperaturno stabilnija od IleRS2, u sklopu ove doktorske disertacije okarakterizirana je termička stabilnost oba proteina određivanjem temperature mekšanja (T_m), tj. temperature pri kojoj dolazi do 50 %-tne denaturacije proteina praćenjem razlike 350/330 nm. Zanimljivo, dobiveni rezultati jasno su pokazali da je protein



Slika 4.20. Određivanje temperature mekšanja (T_m) za enzime IleRS1 i IleRS2. Mjerenja su ponovljena tri puta, a vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

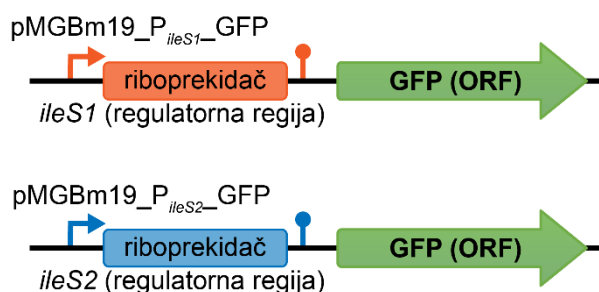
IleRS2 bitno stabilniji od proteina IleRS1 zbog 10 °C veće vrijednosti T_m (slika 4.20) sugerirajući da IleRS1 nije zadržana zbog temperaturnog stresa.

4.8. Analiza ekspresije gena *ileS* u bakteriji *B. megaterium*

4.8.1. Analiza ekspresije gena *ileS* koristeći zeleni fluorescentni protein

Postojanje dva gena *ileS* u bakteriji *B. megaterium* navodi na istraživanje njihove ekspresije, budući da jedan gen *ileS* nužno mora biti konstitutivno eksprimiran kako bi se osigurala neometana sinteza Ile-tRNA^{Ile} za biosintezu proteina i rast stanice. Međutim, drugi gen može, ali i ne mora biti konstitutivno eksprimiran. Kako sve analizirane vrste roda *Bacillus* uvijek sadrže *ileS1*, a samo neke sadrže *ileS2*, jedna od hipoteza ovog rada je da je gen *ileS1* konstitutivno eksprimiran, dok gen *ileS2* primarno služi kao dodatan sigurnosni mehanizam važan za stresne uvjete.

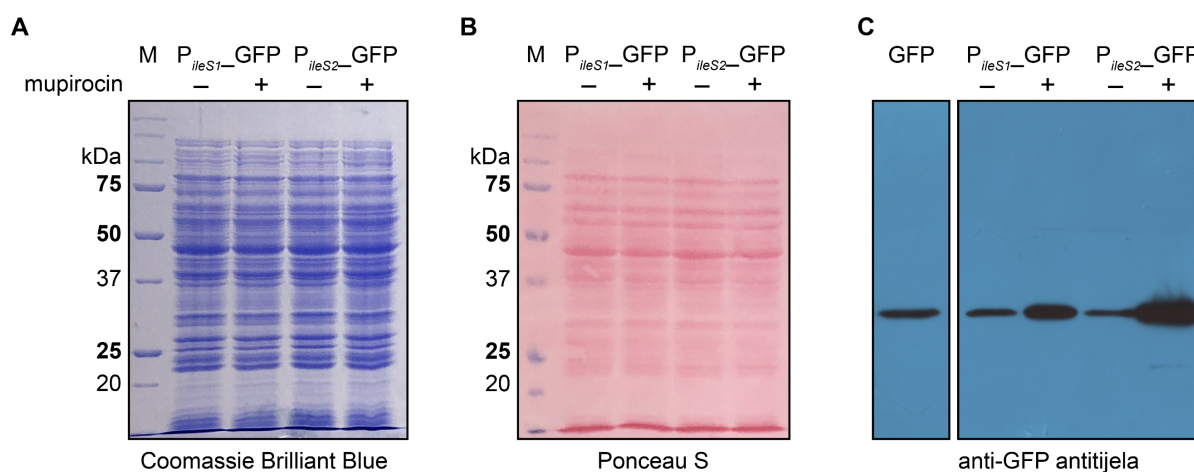
Kao reporterski sustav za praćenje ekspresije gena *ileS1* i *ileS2* u različitim uvjetima rasta korišten je gen za zeleni fluorescentni protein (engl. *green fluorescent protein*, GFP). Gen *gfp* umnožen je s plazmida pP_{T7}_GFP i ugrađen u vektor pMGBm19 pod nativnu regulatornu regiju gena *ileS1* (pMGBm19_P_{*ileS1*}_GFP), odnosno gena *ileS2* (pMGBm19_P_{*ileS2*}_GFP) (slika 4.21). Rekombinantni plazmid napravljeni su u bakteriji *E. coli*, a već prilikom uzgoja bakterija u tekućem mediju uočeno je da je bakterijska kultura koja sadrži plazmid pMGBm19_P_{*ileS1*}_GFP zelena, sugerirajući da dolazi do značajne ekspresije proteina GFP i u bakteriji *E. coli*. Slična razina ekspresije uočena je i s plazmida pRBBm34 u bakteriji *E. coli* koji sadrži gen *gfp* pod kontrolom ksiloznog promotora P_{*xylA*} (nije prikazano), za koji je poznato da nije u potpunosti reprimiran u bakteriji *E. coli* [171]. S druge strane, bakterijska kultura koja



Slika 4.21. Konstrukcija sojeva bakterije *B. megaterium* s ugrađenim genom *gfp* pod regulatornu regiju gena *ileS1* i *ileS2*. Kao regulatorna regija korišteno je otprilike 500 nukleotida uzvodno od start kodona gena *ileS*. Regulatorna regija uključuje promotor te riboprekidač, a fuzionirana je s genom *gfp* na način da se start kodon gena *ileS* poklapa sa start kodonom gena *gfp*. Divlji tip bakterije *B. megaterium* potom je transformiran rekombinantnim plazmidima.

je sadržavala plazmid pMGBm19_ *P_{ileS2}*_GFP nije bila zelena, sugerirajući da nema ekspresije s navedenog promotora ili je razina ekspresije preniska da bi bila detektirana.

Međutim, *western*-hibridizacijska analiza korištenjem anti-GFP antitijela pokazala je podjednaku razinu ekspresije proteina GFP u bakteriji *B. megaterium* i s promotora gena *ileS1* i s promotora gena *ileS2* (slika 4.22). Dobiveni rezultati sugeriraju da su oba gena *ileS* istovremeno konstitutivno eksprimirana, što je izrazito neočekivan rezultat, jer sugerira staničnu potrebu za oba proteina, dok većina vrsta roda *Bacillus* uopće ne sadrži gen *ileS2*. Dodatak mupirocina uzrokovao je povećanje razine ekspresije proteina GFP ukazujući da mupirocin pozitivno stimulira ekspresiju s oba promotora, najvjerojatnije putem riboprekidača. Međutim, razina ekspresije s promotora gena *ileS2* je puno veća (~ 25 puta) nego s promotora gena *ileS1* (~ 6 puta) u prisutnosti mupirocina u odnosu na odsutnost mupirocina.



Slika 4.22. Analiza ekspresije proteina GFP s promotora gena *ileS1* i *ileS2* u bakteriji *B. megaterium*. A) Bakterije transformirane plazmidima pMGBm19_ *P_{ileS1}*_GFP (*P_{ileS1}*_GFP) i pMGBm19_ *P_{ileS2}*_GFP (*P_{ileS2}*_GFP) uzgajane su u mediju LB do srednje ekspanzijske faze rasta bez (-) i u prisutnosti (+) mupirocina ($c = 50 \mu\text{mol dm}^{-3}$). Ukupni proteom (30 μg) je nakon izolacije iz stanica razdvojen na 10 %-tnom poliakrilamidnom gelu. M – marker *Precision Plus Protein Standards* (*Bio-rad*). B) Proteini su s poliakrilamidnog gela preneseni na nitroceluloznu membranu, a uspješan prijenos proteina potvrđen je bojanjem membrane otopinom boje Ponceau S. C) *Western*-analiza ekspresije proteina GFP. Kao pozitivna kontrola korišten je GFP eksprimiran s plazmida pPT7_GFP.

4.8.2. Analiza ekspresije gena *ileS* koristeći nativni *IleRS* protein

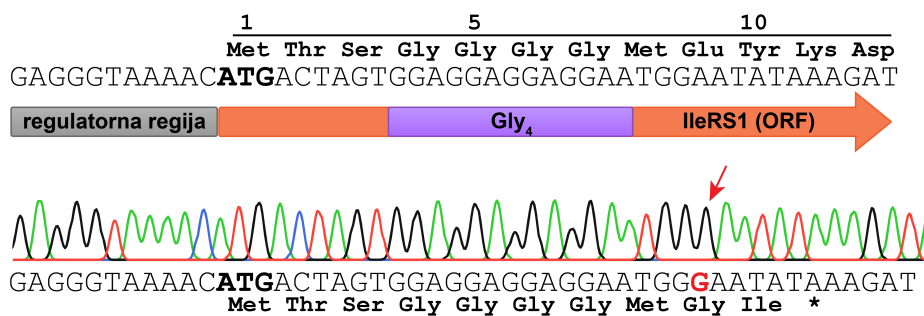
Budući da rezultati dobiveni praćenjem ekspresije gena *ileS* pomoću proteina GFP nisu ponudili jednoznačan odgovor na način regulacije ekspresije gena *ileS*, dizajniran je sustav koji uključuje praćenje ekspresije gena *ileS* preko nativnih proteina *IleRS*. U tu svrhu dizajnirani su rekombinantni plazmidni vektori koji sadrže gen *ileS* pod nativnim regulatornim regijama.

Regulatorne regije uključivale su pretpostavljene promotorske elemente i riboprekidač, odnosno regiju otprilike 500 nukleotida uzvodno od start kodona odgovarajućeg *ileS* gena, kao i regiju otprilike 200 nukleotida nizvodno od stop kodona koja uključuje pretpostavljeni intrinzični transkripcijski terminator. Dodatno, prilikom kloniranja gena nadodan je kodirajući slijed za His₆ privjesak kako bi uslijed translacije nastao fuzijski protein s His₆ privjeskom na C-kraju proteina. C-kraj proteina odabran je kako bi se detektirali isključivo cjeloviti, a ne djelomično sintetizirani proteini koji bi se možda detektirali ako bi privjesak bio na N-kraju proteina, kao i da se spriječi eventualni utjecaj His₆ privjeska na početak translacije. Također, kako bi se spriječilo i/ili smanjilo zastajkivanje ribosoma prilikom translacije proteina, His₆ privjesak je kodonski optimiziran, uzevši u obzir relativnu zastupljenost histidinskih kodona u bakteriji *B. megaterium*.

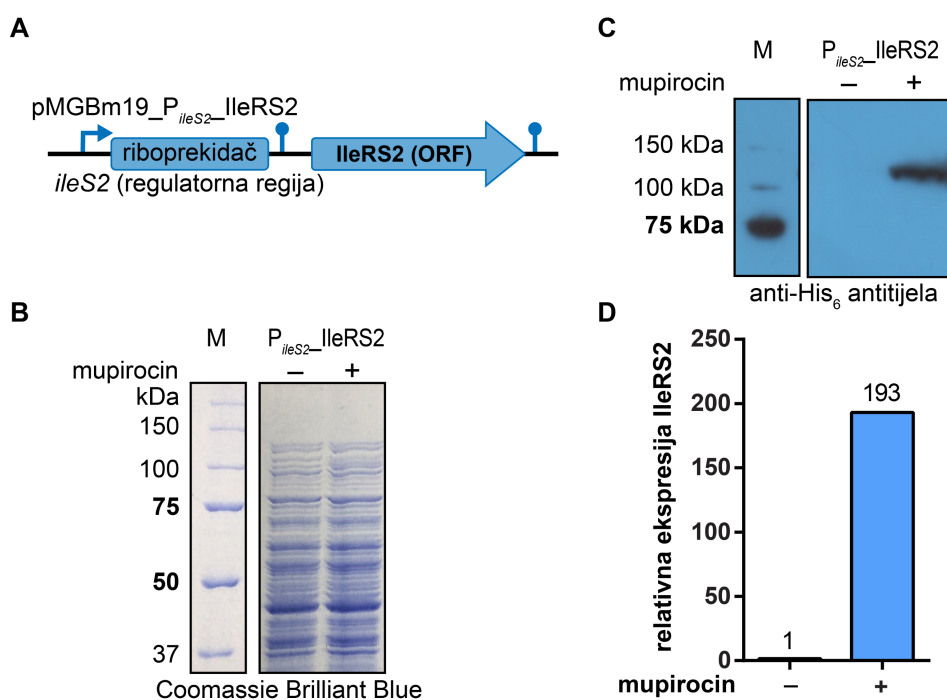
Kloniranje gena *ileSI* pod nativnu regulatornu regiju pokazalo se izrazito problematično. Naime, unatoč višestrukim pokušajima kloniranja i variranju različitih uvjeta oporavka bakterija nakon transformacije, te korištenjem različitih sojeva bakterije *E. coli* nije bilo moguće dobiti bakterijski klon koji sadrži ispravan konstrukt. Nezavisno je potvrđeno da su svi uzvodni koraci u kloniranju (PCR, restrikcija, ligacija) bili uspješni (nije prikazano). Od > 200 pretraženih kolonija, pronađeno je svega par kolonija koje su na restrikcijskoj razgradnji upućivale na ispravan konstrukt, međutim, nakon provedenog sekvenciranja uočen je pomak okvira čitanja uslijed insercije i/ili delecije nukleotida, koji je uvijek rezultirao uvođenjem stop kodona na početku gena (nije prikazano, vidi kasnije u tekstu).

Budući da je i prilikom kloniranja gena *gfp* pod regulatornu regiju gena *ileSI* uočena značajna razina ekspresije u bakteriji *E. coli* (vidi poglavlje 4.8.1), pretpostavljeno je da dolazi do ekspresije gena *ileSI* sa svog nativnog promotora, te da je takva bazalna razina ekspresije najvjerojatnije letalna za *E. coli*. Rezultat je posebno iznenađujuć jer bakterija *E. coli* sadrži IleRS tipa 1 u svom genomu. Budući da ne postoji represorski protein koji bi utišao ekspresiju s nativnog promotora gena *ileSI*, problem se pokušao riješiti utišanjem ili barem smanjenjem razine ekspresije preko smanjenja efikasnosti translacije mRNA. Naime, nailaskom ribosoma na slabo zastupljene kodone dolazi do njegovog zastajanja i usporavanja translacije^[223], stoga je kombinacijom nekoliko uzastopnih kodona koji su slabo zastupljeni u bakteriji *E. coli* moguće smanjiti razinu ekspresije na razini translacije^[166]. Na sam početak gena *ileSI* stoga je nadodan slijed koji kodira za četiri glicina, pri čemu su odabrani glicinski kodoni slabo zastupljeni u bakteriji *E. coli*, a izrazito zastupljeni u bakteriji *B. megaterium*. Nailaskom

ribosoma *E. coli* na navedene kodone trebalo bi doći do utišavanja translacije što bi moglo omogućiti kloniranje navedenog konstrukta. S druge strane, nadodani glicinski kodoni ne bi trebali imati utjecaj na brzinu translacije u bakteriji *B. megaterium*. Međutim, navedeni pristup nije se pokazao uspješnim, te su svi klonovi koji su ukazivali na potencijalno ispravan konstrukt uvijek sadržavali insercije/delecije na početku gena koje dovode do nastanka nizvodnog stop kodona (slika 4.23). Budući da su svi pokušaji kloniranja gena *ileS1* pod nativnu regulatornu regiju bili neuspješni, zaključeno je kako je ekspresija proteina IleRS1 s nativnog promotora u bakteriji *E. coli*, posebno u ranim fazama oporavka bakterije nakon transformacije, najvjerojatnije letalna. S druge strane, kloniranje gena *ileS2* pod nativnu regulatornu regiju nije predstavljalo problem, te je uspješno dobiven konstrukt pMGBM19_ *P_{ileS2}*_IleRS2. Rezultat nije iznenađujuć jer i prilikom kloniranja gena *gfp* pod regulatornu regiju gena *ileS2* nije primijećena značajna razina ekspresije proteina GFP u bakteriji *E. coli* (vidi poglavlje 4.8.1), a također nije uočena ni značajna razina ekspresije proteina IleRS2 s plazmida pET28b na 30 °C, već isključivo na 15 °C (vidi poglavlje 4.2.1), ukazujući da ne dolazi do ekspresije proteina IleRS2 u bakteriji *E. coli* pri povišenoj temperaturi. *Western*-hibridizacijska analiza pokazala je da je ekspresija IleRS2 u bakteriji *B. megaterium* snažno stimulirana dodatkom mupirocina, koji uzrokuje povećanje ekspresije proteina IleRS2 i do 200 puta u odnosu na bazalnu razinu ekspresije bez prisutnosti mupirocina (slika 4.24).



Slika 4.23. Konstrukcija plazmida s ugrađenim genom *ileS1* pod nativnu regulatornu regiju. Dio regulatorne regije (koja obuhvaća promotor i riboprekidač) označen je sivo, nukleotidni slijed za *ileS1* označen je narančasto, a ljubičasto je označena insercija nukleotidnog slijeda za četiri glicina, kodonski optimizirana za bakteriju *B. megaterium*, korištenjem kodona slabo zastupljenih u bakteriji *E. coli*. Dio proteinske sekvence proteina IleRS1 ispisan je iznad nukleotidnog slijeda. Podebljano je otisnut start kodon (ATG). Na elektroferogramu dobivenom nakon sekvenciranja plazmida crvenom strelicom označeno je mjesto insercije gvanina (označen crveno) uslijed kojeg dolazi do pomaka okvira čitanja i nastanka nizvodnog stop kodona (TAA, označen zvijezdicom, *).



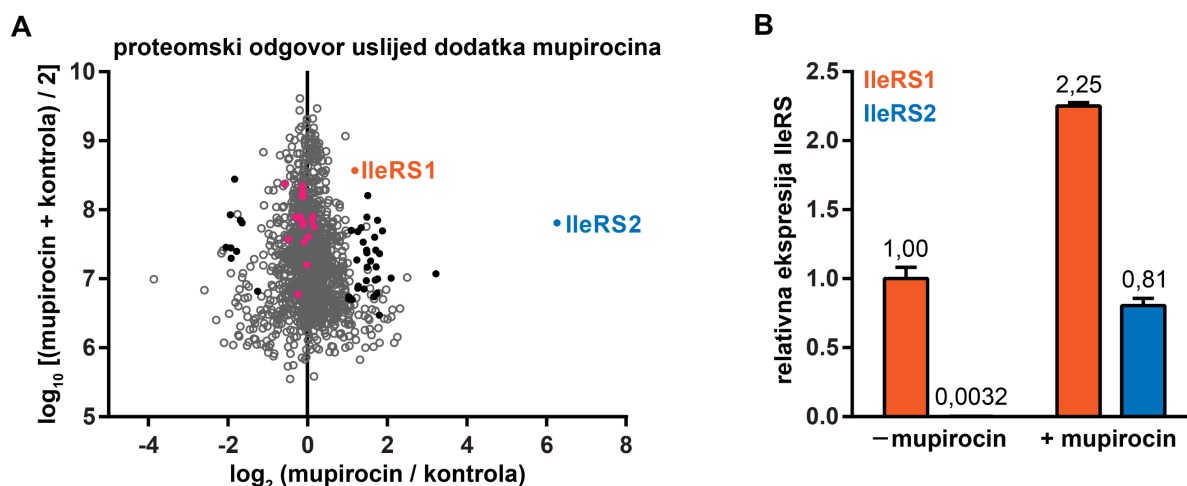
Slika 4.24. Regulacija ekspresije gena *ileS* u divljem tipu bakterije *B. megaterium*. A) Shematski prikaz konstrukta pMGBm19_P_{*ileS2*}_IleRS2, koji sadrži gen *ileS2* skupa s His₆ privjeskom na C-kraju proteina, pod nativnom regulatornom regijom gena *ileS2*. B) Stanice transformirane plazmidom pMGBm19_P_{*ileS2*}_IleRS2 uzgajane su do srednje eksponencijalne faze rasta u mediju LB, u odsutnosti (-) i prisutnosti (+) mupirocina ($c = 50 \mu\text{mol dm}^{-3}$). Dvadeset mikrograma ukupnih proteina razdvojeno je na 9 %-tnom poliakrilamidnom gelu. C) *Western*-analiza ekspresije gena *ileS2*. Detekcija proteina napravljena je pomoću primarnih antitijela anti-His₆, dok je vizualizacija napravljena izlaganjem membrane fotografskom filmu. Kao marker (M) korišten je *Precision Protein Plus Standards*. C) Relativna ekspresija proteina IleRS2. Signali su normirani prema ekspresiji proteina IleRS2 u odsutnosti mupirocina, koja je postavljena na 1.

4.8.3. Analiza ekspresije proteina IleRS spektrometrijom masa

Budući da rezultati korištenjem proteina GFP i IleRS nisu ponudili jednoznačan odgovor o ekspresiji proteina IleRS1 i IleRS2 (osim u slučaju ekspresije gena *ileS2* s nativnog promotora), napravljena je spektrometrija masa⁴ na ukupnom proteomu bakterije *B. megaterium* kako bi se u nativnim uvjetima utvrdila ekspresija navedena dva proteina. Stanice su uzgajane do srednje logaritamske faze rasta, bez i u prisutnosti mupirocina, nakon čega su istaložene centrifugiranjem te resuspendirane u puferu za lizu. Liza stanica dodatno je pospješana blagom sonikacijom, nakon čega je lizat kratko centrifugiran kako bi se istaložili stanični ostatci i nelizirane stanice. Ukupni proteom potom je precipitiran i tretiran tripsinom, nakon čega je analiziran korištenjem spregnutog sustava nanoLC s Q Exactive Plus spektrometrom masa.

⁴ Spektrometrija masa napravljena je u suradnji s doc. dr. sc. Markom Močibobom, PMF, Zagreb, detaljnije opisano u referenci^[201]

U proteomu bakterije *B. megaterium* detektirano je oko 2000 proteina, uz detekciju svih aaRS (slika 4.25A). Najznačajnija promjena u ekspresiji odgovara promjeni ekspresije proteina IleRS2 u prisutnosti mupirocina, pri čemu je dodatak mupirocina uzrokovao povećanje ekspresije od oko 70 puta u odnosu na uzorak bez dodatka mupirocina. Istovremeno, dodatak mupirocina uzrokovao je povećanje ekspresije proteina IleRS1 svega 2 puta, dok nije značajnije utjecao na ekspresiju ostalih staničnih proteina. Budući da je razina ekspresije proteina IleRS2 bez prisutnosti mupirocina bila izrazito niska, gotovo na razini detekcije, ukupni proteom dodatno je prvo razdvojen na poliakrilamidnom gelu, nakon čega su vrpce na oko 100 kDa izrezane iz gela te je napravljena digestija proteoma direktno u gelu. Na ovaj način uzorak je obogaćen proteinom IleRS2, jer su iz uzorka uklonjeni svi drugi proteini nižih molekularnih masa. MS analiza ovako pripremljenog uzorka pokazala je da dodatak mupirocina uzrokuje povećanje ekspresije proteina IleRS2 od oko 250 puta (slika 4.25B), što je u skladu s *western*-hibridizacijskom analizom ekspresije IleRS2 s nativnog promotora (4.24D).



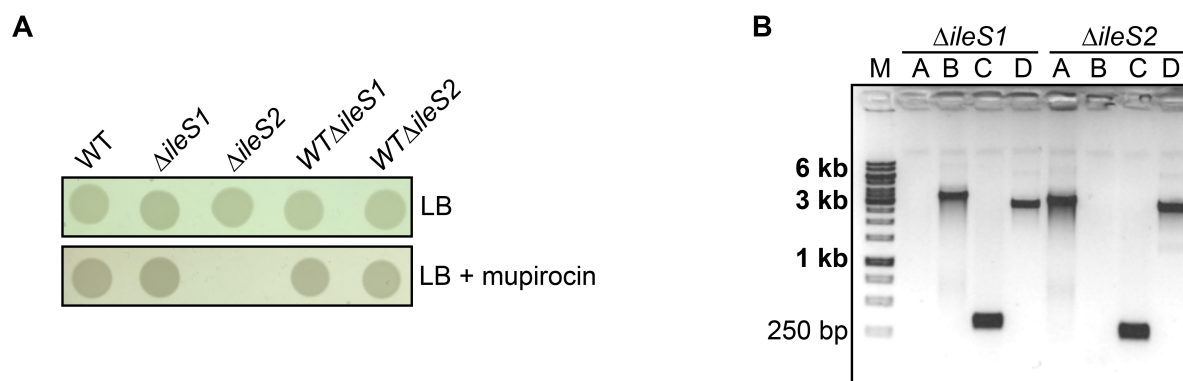
Slika 4.25. Analiza proteomskog odgovora bakterije *B. megaterium* uslijed dodatka mupirocina spektrometrijom masa. Divlji tip bakterije *B. megaterium* uzgajan je do srednje eksponencijalne faze rasta u mediju LB bez (kontrola) i uz dodatak mupirocina ($c = 1 \mu\text{mol dm}^{-3}$). Iz stanica je izoliran ukupan proteom, koji je potom precipitiran i tretiran s LysC i tripsinom. Nakon tretmana, snimljen je spektar masa korištenjem uređaja nanoLC-MS/MS. Iz intenziteta signala peptida određena je relativna količina proteina u uzorku. Svi uzorci napravljeni su kao triplikati. A) Ukupan proteomski odgovor uslijed dodatka mupirocina. Puni crni kružići predstavljaju proteine koji imaju više od 2 puta statistički značajnu promjenu u ekspresiji, dok puni ružičasti kružići predstavljaju aaRS. IleRS1 je označen narančasto, a IleRS2 plavo. B) Relativna količina proteina IleRS1 i IleRS2 uslijed dodatka mupirocina. Kompleksnost proteomskog uzorka smanjena je razdvajanjem ukupnog proteoma na 9 %-tnom poliakrilamidnom gelu, iz kojeg su potom izrezane vrpce koje odgovaraju proteinima relativne molekulske mase od 90 000 – 130 000, nakon čega su podvrgnuti digestiji direktno u gelu. Relativna količina proteina IleRS1 u kontrolnim uvjetima (bez mupirocina) postavljena je na 1.

4.9. Fenotipska karakterizacija bakterije *B. megaterium*

4.9.1. Dizajn i konstrukcija sojeva s uklonjenim genima za izoleucil-tRNA-sintetaze

Kako bi se ispitala fenotipska svojstva vezana uz postojanje *ileS* tipa 1, odnosno tipa 2 u bakteriji *B. megaterium* napravljena je ciljana genomski delecija gena *ileS1*, odnosno *ileS2* pomoću plazmidnog vektora pUCTV2. Rekombinantni plazmidni vektori pUCTV2_Δ*ileS1*, odnosno pUCTV2_Δ*ileS2* pripremljeni su na način da su sačuvani svi elementi uzvodno od start kodona, te nizvodno od stop kodona, uključujući prvih i zadnjih 7 aminokiselina proteina koje su fuzionirane u otvorenom okviru čitanja. Na ovaj način osigurano je da ne dođe do polarne mutacije, odnosno utjecaja ekspresije nizvodnih ili uzvodnih gena, te terminacije transkripcije, odnosno translacije ukoliko se radi o policistronskoj mRNA. Postupak stvaranja sojeva prikazan je na slici 4.26 i slici 9.3 (prilog, za detalje vidi i poglavlje 3.2.2.4).

Soj koji ne sadrži gen *ileS2* (Δ*ileS2*) dobiven je jednostavno, te je plazmid izgubljen već nakon 2 dana (3-4 razrijeđenja kulture, slika 4.26A). Dobivanje soja Δ*ileS1* bilo je zahtjevnije, budući da, iako je došlo do izgradnje plazmida iz genoma (provjereno PCR-om s početnicama koje se vežu na genomsku DNA, nije prikazano), nije bilo moguće riješiti se plazmida, odnosno

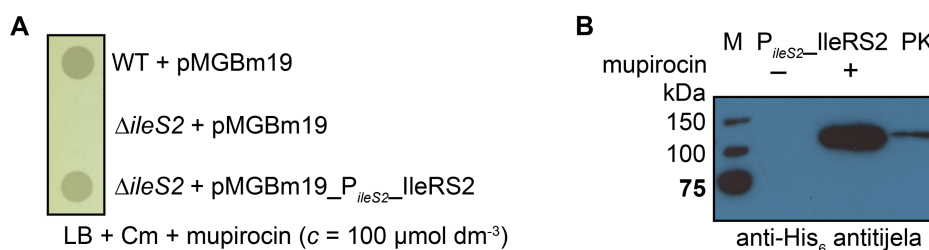


Slika 4.26. Konstrukcija sojeva bakterije *B. megaterium* s uklonjenim genima *ileS1* i *ileS2*. A) Divlji tip bakterije *B. megaterium* (WT) transformiran je rekombinantnim plazmidima pUCTV2_Δ*ileS1* i pUCTV2_Δ*ileS2* i uzgajan u prisutnosti tetraciklina na 42 °C kako bi se plazmid integrirao u genom. Izgradnja plazmida iz genoma i gubitak plazmida može rezultirati izgradnjom odgovarajućeg gena (dobiveni sojevi Δ*ileS1* i Δ*ileS2*) ili genotipom divljeg tipa (dobiveni sojevi WTΔ*ileS1* i WTΔ*ileS2*). Svi sojevi su vijabilni na krutom mediju LB, dok u prisutnosti mupirocina (testirano korištenjem *c* (mupirocin) = 100 μmol dm⁻³) soj bez gena *ileS2* (Δ*ileS2*) nije vijabilan. B) Potvrda uspješnog stvaranja Δ*ileS* sojeva reakcijom PCR i agaroznom gel-elektroforezom. Iz dobivenih sojeva izolirana je genomski DNA koja je potom poslužila kao kalup za reakciju PCR. Kombinacije početnica su: A (BM_ileS1_F i BM_ileS1_R, detekcija gena *ileS1*, veličina produkta ~2,8 kb), B (BM_ileS2_F, BM_ileS2_R, detekcija gena *ileS2*, veličina produkta ~3,1 kb), C (BMx_ko_seq2, BMx_ko_seq3, detekcija izgradnje gena *ileSx*, veličina produkta ~250-300 bp) i D (BMx_ko_seqF, BMx_ko_seqR, detekcija izgradnje gena *ileSx*, veličina produkta ~2,7 kp). Slovo x označava broj 1 ili 2, te se odnosi na gen *ileS1*, odnosno *ileS2*. Shematski prikaz mjesta hibridizacija početnica prikazan je na slici 9.3 (prilog).

postojao je cijelo vrijeme prisutan selekcijski pritisak da plazmid ostane u navedenom soju (provjereno PCR-om s početnicama koje se vežu na plazmidnu, a ne genomsku DNA, nije prikazano). Konačno, plazmid je uklonjen uzgojem soja *ΔileS1* u prisutnosti mupirocina ($c = 1 \mu\text{mol dm}^{-3}$). Iz svih klonova izolirana je genomsku DNA te reakcijom PCR potvrđeno da je iz genoma uspješno uklonjen željeni gen (slika 4.26B).

4.9.2. Komplementacija soja *ΔileS2* s *IleRS2*

Za razliku od soja *ΔileS1* koji nije pokazao vidljivo fenotipsko svojstvo prilikom uzgoja na krutom mediju LB, soj *ΔileS2* nije mogao rasti u prisutnosti povećane koncentracije mupirocina (iznad $c \geq 1 \mu\text{mol dm}^{-3}$). Kako bi se potvrdilo da je gubitak gena *ileS2* zaista odgovoran za mupirocinsku rezistenciju, korišten je plazmidni vektor pMGBm19_ *P_{ileS2}*_ *IleRS2* koji sadrži kodirajući slijed za protein *IleRS2*, skupa s *His₆* privjeskom na C-kraju proteina, pod nativnom regulatornom regijom gena *ileS2* (vidi poglavlje 4.8.2, slika 4.24A). Protoplasti soja *ΔileS2* transformirani su vektorom pMGBm19_ *P_{ileS2}*_ *IleRS2*, dok su kao kontrola korišteni divlji tip i soj *ΔileS2* transformirani praznim plazmidom pMGBm19 (slika 4.27A). Nakon prekonoćnog uzgoja u tekućem mediju LB, alikvot kulture nanesen je na kruti hranjivi medij LB koji je dodatno sadržavao i mupirocin. Soj *ΔileS2* s plazmidom pMGBm19_ *P_{ileS2}*_ *IleRS2* pokazao je istu razinu mupirocinske rezistencije kao i divlji tip bakterije (slika 4.27A). Analiza ekspresije proteina *IleRS* u soju *ΔileS2* napravljena je *western*-hibridizacijskom analizom kojom je

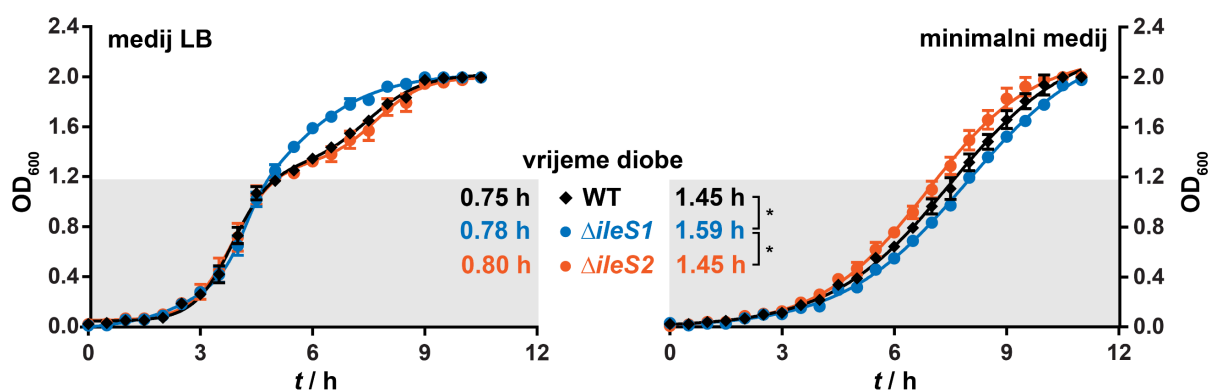


Slika 4.27. Komplementacija soja *ΔileS2* plazmidnim vektorom s ugrađenim genom *ileS2* pod nativnim promotorom. A) Komplementacija soja *ΔileS2*. Divlji tip bakterije *B. megaterium*, kao i soj *ΔileS2*, transformirani su praznim vektorom pMGBm19 (kontrolne reakcije), dok je soj *ΔileS2* dodatno transformiran i vektorom pMGBm19_ *P_{ileS2}*_ *IleRS2*. Deset μL prekonoćne kulture nanoseno je na kruti hranjivi medij LB, uz dodatak kloramfenikola (Cm) i mupirocina ($c = 100 \mu\text{mol dm}^{-3}$), te inkubirano preko noći na $30 \text{ }^\circ\text{C}$. B) Potvrda ekspresije proteina *IleRS2* s nativnog promotora u prisutnosti mupirocina *western*-hibridizacijskom analizom. Soj *ΔileS2*, transformiran plazmidom pMGBm19_ *P_{ileS2}*_ *IleRS2*, uzgajan je s (+) i bez (-) mupirocina ($c = 10 \mu\text{mol dm}^{-3}$) do srednje eksponencijalne faze rasta, nakon čega je iz stanica izoliran ukupan proteom. Dvadeset μg ukupnih proteina korišteno je za analizu. Za detekciju proteina na membrani korištena su anti-*His₆* antitijela. Pročišćena *IleRS2*-*His₆* korištena je kao pozitivna kontrola (PK). Kao marker (M) korišten je *Precision Protein Plus Standards*.

potvrđena snažna ekspresija proteina IleRS2-His₆ samo u prisutnosti mupirocina (slika 4.27B). Navedeni eksperimenti jednoznačno su potvrdili da je IleRS2 odgovorna za mupirocinsku rezistenciju te da je njena ekspresija povezana s prisutnošću mupirocina.

4.9.3. Analiza rasta sojeva bakterije *B. megaterium*

Kako bi se ispitala prednost gena *ileS1* u bakteriji *B. megaterium*, analiziran je rast sojeva u bogatom (LB) i siromašnom (minimalnom) mediju. Divlji tip bakterije i soj $\Delta ileS2$ ne pokazuju međusobno značajne razlike u izgledu krivulje prilikom uzgoja u bogatom mediju, te oba soja pokazuju dvije ekspanzionalne faze rasta razdvojene blagim zastojem u rastu (slika 4.28A). Navedeno fenotipsko svojstvo dobro je opisano u literaturi, a najvjerojatnije je posljedica rasta bakterija u uvjetima s više izvora šećera [224-227]. S druge strane, soj $\Delta ileS1$ ne pokazuje zastoj u rastu, već je njegov rast bitno različit od ostala dva soja i prati standardnu sigmoidalnu krivulju rasta. Rast sojeva u minimalnom mediju nije pokazao razlike u izgledu krivulja među sojevima, štoviše, došlo je do gubitka bifaznog fenotipa kod divljeg tipa i soja $\Delta ileS2$, međutim soj $\Delta ileS1$ je i do 10 % sporiji od divljeg tipa (slika 4.28B, prilog tablica 9.10). Iako se ovako mala razlika može činiti nerelevantnom, pokazano je da na duža vremenska razdoblja čak i male razlike u brzini rasta bakterija mogu predstavljati značajnu selekcijsku prednost ili nedostatak [228].



Slika 4.28. Praćenje rasta sojeva bakterije *B. megaterium* u bogatom (LB) i siromašnom (minimalnom) mediju. Rast bakterijskih sojeva (♦ WT, ● $\Delta ileS1$, ● $\Delta ileS2$) praćen je u LB (lijevo) i minimalnom (desno) mediju mjerenjem optičke gustoće na 600 nm (OD₆₀₀). Podaci su uočnjeni u bifaznu ili logističku jednadžbu. Za određivanje koeficijenta brzine rasta, OD₆₀₀ vrijednosti ekspanzionalne faze rasta (OD₆₀₀ < 1,2, osjenčano sivo) su uočnjene u ekspanzionalnu jednadžbu rasta (3.1). Iz koeficijenta brzine rasta izračunato je vrijeme diobe. Mjerenja su ponovljena najmanje tri puta koristeći najmanje dvije biološke replike, pri čemu je svaka biološka replika napravljena u najmanje dvije tehničke replike. Vrijednosti na grafovima su izražene kao srednja vrijednost ± SEM. Statistički značajna razlika u brzini rasta sojeva izračunata je korištenjem Student-ovog t-test-a, pri čemu zvijezdica (*) označava statistički značajnu razliku ($p < 0,05$).

4.9.4. Komplementacija soja *ΔileS1*

Budući da nije bilo moguće dobiti plazmid pMGBm19_*P_{ileS1}*_IleRS1, kako bi se komplementirao gubitak bifaznog rasta soja *ΔileS1* u bogatom mediju, te sporiji rast u minimalnom mediju, dizajniran je plazmid pMGBm19_*P_{xylA}*_IleRS1, koji sadrži gen *ileS1* pod promotorom koji je reguliran ksilozom. Regulacija ksiloznog promotora analogna je regulaciji promotora *lac*. Dodatkom ksiloze dolazi do njenog vezanja na ksilozni represorski protein, koji potom disocira sa svog operatora, čime je omogućeno da se RNA-polimeraza veže na promotorsku regiju i započne transkripciju. Međutim, poznato je da ksilozni promotor nije strogo reguliran u bakteriji *E. coli*, a budući da bakterija *E. coli* ne sadrži genomom kodirani ksilozni represor, dolazi do značajne bazalne razine ekspresije gena s navedenog promotora [171]. Aktivnost promotora *P_{xylA}* u bakteriji *E. coli* pokušala se reprimirati dodatkom ksiloznog represora kotransformacijom stanica plazmidom pMMec4. Međutim, *western*-hibridizacijska analiza je pokazala da unatoč dodatku arabinoze, koja je dovela do ekspresije ksiloznog represora, aktivnost ksiloznog promotora nije posve utišana (nije prikazano). Kao ni u slučaju plazmida pMGBm19_*P_{ileS1}*_IleRS1, konstrukcija plazmida pMGBm19_*P_{xylA}*_IleRS1 nije bila uspješna. Dodatak četiri glicina na N-kraj proteina ni u ovom slučaju nije se pokazao uspješnim pristupom (nije prikazano, vidi poglavlje 4.8.2).

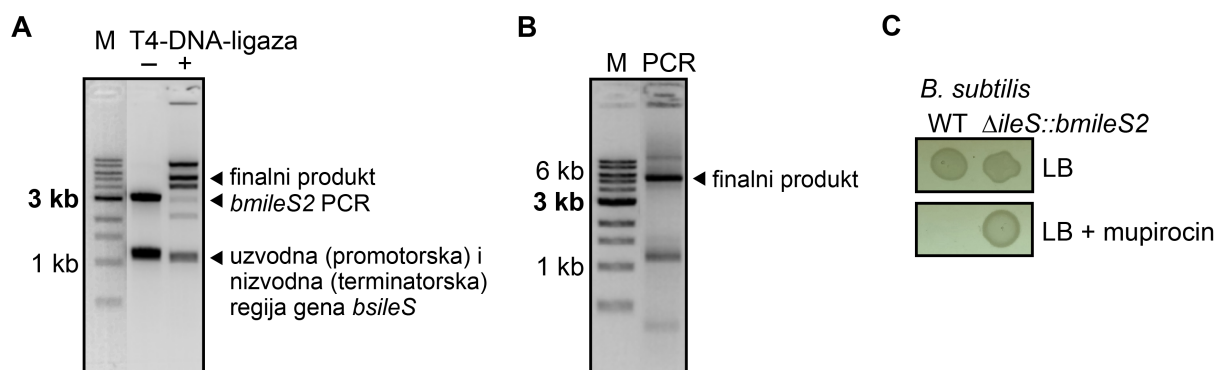
Budući da nije bilo moguće komplementirati fenotip soja *ΔileS1*, kako bi se sa sigurnošću potvrdilo da je za opaženi fenotip odgovorna upravo IleRS1, napravljeno je sekvenciranje cijelog genoma soja *ΔileS1*, ali i divljeg tipa te soja *WTΔileS1*. Dodatno, genom divljeg tipa konstruiran je *de novo* na temelju referentnog genoma bakterije *B. megaterium* iz baze NCBI (pristupni broj GCA_017086525.1). Analiza rezultata sekvenciranja napravljena je usporedbom divljeg tipa sa sojevima *WTΔileS1* i *ΔileS1*, te usporedbom svih sojeva s referentnim genomom ⁵. Detaljnom analizom uočeno je da je soj *ΔileS1* izgubio dva od šest plazmida (otprilike 2,3 % genoma) koji se prirodno nalaze u divljem tipu. Gubitak dva plazmida uzrokovao je gubitak oko 200 gena koja se nalaze na tim plazmidima, dok isti plazmidi nisu izgubljeni u soju *WTΔileS1*. Budući da je soj *ΔileS1* kompromitiran, te da su za opaženi fenotip rasta možda odgovorni geni kodirani plazmidom, a kako se opaženi fenotip nije mogao komplementirati plazmidima zbog nemogućnosti dobivanja ispravnih klonova, s navedenim sojem se nije dalje radilo.

⁵ Analiza rezultata sekvenciranja genoma napravljena je u suradnji s doc. dr. sc. Markom Močibobom, PMF, Zagreb

4.10. Prijenos gena *ileS2* iz bakterije *B. megaterium* u bakteriju *B. subtilis*

Za razliku od bakterije *B. megaterium* koja u genomu sadrži dva gena *ileS*, bakterija *B. subtilis* u genomu sadrži samo gen za *ileS1*. Kako bi se ispitalo može li bakterija *B. subtilis* koristiti isključivo gen *ileS2* kao glavni stanični gen, dizajniran je soj bakterije *B. subtilis* koji umjesto nativnog gena *ileS* sadrži gen *ileS2* iz bakterije *B. megaterium* (*BsΔileS::bmileS2*) (prilog slika 9.4). Za razliku od bakterije *B. megaterium* koje su transformirane plazmidnim vektorima pUCTV2, transformacija prirodno kompetentnih stanica bakterije *B. subtilis* napravljena je PCR produktom, dok je selekcija ispravnog soja napravljena nasađivanjem transformacijske smjese na selektivni hranjivi medij koji je sadržavao mupirocin.

Novonastali soj *BsΔileS::bmileS2* nije pokazao razlike prilikom rasta na krutoj hranjivoj podlozi u odnosu na divlji tip bakterije, ali je zbog gena *bmileS2* mogao rasti u prisutnosti visoke koncentracije mupirocina (slika 4.29), kao i divlji tip bakterije *B. megaterium*. Navedeni eksperiment potvrdio je da je horizontalni prijenos gena *bmileS2* između vrsta roda *Bacillus* moguć, te da bakterije *B. megaterium* i *B. subtilis* mogu preživjeti korištenjem samo gena *ileS2*.



Slika 4.29. Konstrukcija soja bakterije *B. subtilis* s genom *bmileS2* umjesto nativnog gena *ileS* (*BsΔileS::bmileS2*). A) Iz genoma bakterije *B. subtilis* umnožene su uzvodna i nizvodna regija (~ 1 kb) gena *ileS*, dok je iz genoma bakterije *B. megaterium* umnožen kodirajući slijed za gen *bmileS2* (veličine 3100 bp). Dobiveni PCR produkti porezani su odgovarajućim restrikcijским enzimima i povezani korištenjem T4-DNA-ligaze. Finalni produkt ima duljinu 5200 bp. B) Ligacijska smjesa potom je korištena kao kalup u reakciji PCR korištenjem „vanjskih“ početnica (BS_IleP_F i BS_IleT_R) nakon čega je dobiveni PCR produkt dodatno pročišćen izolacijom iz agaroznog gela. C) Divlji tip bakterije *B. subtilis* ne može rasti u prisutnosti mupirocina ($c = 100 \mu\text{mol dm}^{-3}$), dok soj s genom *bmileS2* (*BsΔileS::bmileS2*) pokazuje istu razinu rezistencije na mupirocin kao i divlji tip bakterije *B. megaterium*.

§ 5. RASPRAVA

Izoleucil-tRNA-sintetaza (IleRS) jedna je od dvadesetak staničnih aaRS s osnovnom ulogom povezivanja izoleucina na tRNA^{Ile} za potrebe ribosomske biosinteze proteina. Posebno zanimljivo je da postoje dva različita tipa enzima IleRS. Prvi je takozvani bakterijski tip (tip 1) koji je predominantno zastupljen u bakterija, a nalazi se još i u eukariotskim organelama (mitohondriji i kloroplasti). Drugi je eukariotski tip (tip 2) koji je karakterističan za eukariotski citosol, ali se može pronaći i kod nekih bakterija. Iako su prethodna istraživanja uočila da postoji skupina bakterija, prvenstveno unutar porodice *Bacillaceae* koja sadrži gene za oba tipa IleRS u genomu, sustavno istraživanje o važnosti oba proteina unutar istog organizma nikad nije provedeno.

5.1. Rasprostranjenost gena *ileS* u bakterija

U sklopu ovog rada, provedena bioinformatička analiza jasno je pokazala da bakterije u pravilu koriste samo jedan tip IleRS, te da je tip IleRS svojstvo bakterijskog koljena ili porodice (slika 4.1, 4.2). Dodatno je uočena obavezna prisutnost IleRS tipa 1 unutar porodice *Bacillaceae*, specifično unutar roda *Bacillus*. Sve analizirane bakterije roda *Bacillus* uvijek sadrže bakterijski tip gena *ileS*, dok neke uz *ileS1*, sadrže i eukariotski tip gena. Zbog čega bi bakteriji bila potrebna dva različita enzima koja efektivno rade istu stvar (sintezu Ile-tRNA^{Ile}) te zbog čega prisutnost oba enzima unutar istog organizma ipak nije generalno pravilo?

Razlike između dva tipa IleRS su jasno poznate. Još davno je pokazano da su IleRS2 značajno manje osjetljive na inhibiciju mupirocinom ^[17], prirodnim antibiotikom kojeg sintetizira bakterija *P. fluorescens*. Kako bakterija *P. fluorescens* ne bi ubila samu sebe uslijed proizvodnje mupirocina, uz tip 1 ona sadrži i tip 2 IleRS ^[15]. Za mnoge druge vrste također je pokazano da prisutnost IleRS tipa 2 osigurava preživljenje u prisutnosti visoke koncentracije mupirocina. Primjerice, bakterija *S. griseus* posve je rezistentna na inhibiciju mupirocinom, a kinetički podaci pokazali su da je to posljedica izrazito visoke konstante inhibicije prema mupirocinu ($K_i = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$), koja je istog reda veličine kao i kod *PfIleRS2* ^[8]. Slično je primijećeno i kod bakterije *S. aureus*, gdje plazmidna kopija gena *ileS2* bakteriju štiti od

djelovanja mupirocina ^[127]. Stoga je jasno zbog čega je stjecanje gena *ileS2* poželjno – bakterija si osigurava preživljenje i kompetitivnu prednost u okolišu s mupirocinom.

Međutim, zbog čega sve bakterije nemaju mupirocin-rezistentnu IleRS2 (slika 4.2)? Bakterije se od mupirocina mogu štititi na način i) da spriječe ulazak mupirocina u stanicu građom stanične membrane i ii) da imaju poseban enzim koji je otporniji na inhibiciju mupirocinom. Bakterija *E. coli* koristi prvi mehanizam kao zaštitu od mupirocina. Iako je *in vitro* kinetička karakterizacija pokazala da je *EcIleRS* izrazito osjetljiva na inhibiciju mupirocinom ($K_i \sim 2 \text{ nmol dm}^{-3}$) ^[14], bakterija *E. coli* ipak tolerira značajno veće koncentracije mupirocina *in vivo* (i do c (mupirocin) = $30 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$, ovisno o soju bakterije *E. coli* ^[229, 230]; u sklopu ovog rada testirani su klonirajući sojevi bakterije *E. coli* koji su se pokazali rezistentnim na mupirocin prilikom rasta na krutom mediju LB i do c (mupirocin) = $50 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$, nije prikazano). Nadalje, poznato je da mupirocin nije efikasan u kliničkoj primjeni protiv Gram-negativnih bakterija, te se liječenje mupirocinom koristi prvenstveno za Gram-pozitivne bakterije, te rijetko, i to samo za neke Gram-negativne bakterije ^[231, 232]. Pretpostavlja se da je najveći problem taj što mupirocin ne može efikasno prijeći vanjsku membranu Gram-negativnih bakterija te je stoga neupotrebljiv protiv ovih organizama ^[233, 234]. Navedeni rezultati mogli bi objasniti zbog čega gotovo sve bakterije koljena *Proteobacteria*, koje su sve Gram-negativne bakterije ^[235], ne sadrže gen *ileS2*. Izuzetak je rod *Rickettsia* (slika 4.2), međutim kako se radi o većinom obligatnim intracelularnim eukariotskim patogenima ^[236, 237], moguće da su gen *ileS2* stekli horizontalnim prijenosom gena zbog selekcijskog pritiska. Izuzetak je, naravno, i mupirocin-producirajuća *Proteobacteria P. fluorescens*, međutim prvenstveno zbog visokih endogenih koncentracija mupirocina koje nastaju u stanici. U sklopu ovog rada pokazano je da bakterija *B. megaterium* bez gena *ileS2* u potpunosti osjetljiva na inhibiciju mupirocinom (slika 4.26, slika 4.27), kao i divlji tip bakterije *B. subtilis* (slika 4.29), dok ekspresija IleRS2 u obje bakterije osigurava visoku mupirocinsku rezistenciju (slika 4.27, slika 4.29). Zanimljivo, razlika između *in vitro* izmjerene konstante inhibicije prema mupirocinu za obje *BmIleRS* (K_i (IleRS1) = $0,286 \text{ nmol dm}^{-3}$, K_i (IleRS2) = $1 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$) i *in vivo* minimalne koncentracije mupirocina koja uzrokuje inhibiciju rasta sojeva bakterije *B. megaterium* i *B. subtilis* iznosi u oba slučaja oko 1000 puta (divlji tip *B. megaterium* i soj *ΔileS1*, te soj *BsΔileS::bmileS2* mogu rasti u prisutnosti maksimalno c (mupirocin) = 1 mmol dm^{-3} , a *B. subtilis* i *B. megaterium ΔileS2* do maksimalno c (mupirocin) $\sim 100 \text{ nmol dm}^{-3}$). Navedeni

rezultati, skupa s rezultatima na bakteriji *E. coli*, jasno ukazuju na važnost građe stanične membrane kao selektivne barijere ulaska mupirocina u stanicu.

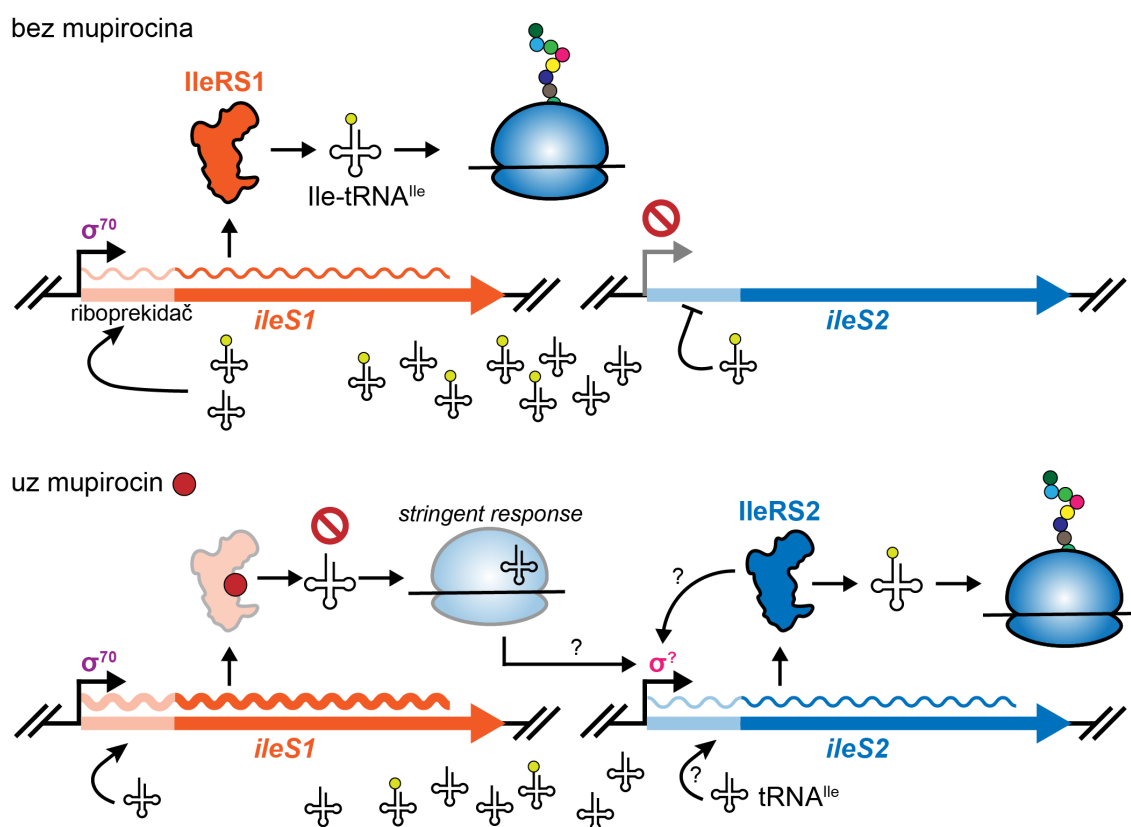
Stoga, Gram-negativne bakterije koljena *Proteobacteria* možda nemaju potrebu za dobivanjem gena *ileS2*, jer već građa njihove stanične membrane predstavlja efikasan mehanizam sprječavanja ulaska mupirocina u stanicu. S druge strane, kod Gram-pozitivnih bakterija koljena *Actinobacteria* mupirocin može efikasno ući u stanicu, te su navedene bakterije za preživljenje ipak morale steći gen *ileS2*, kao primjerice bakterija *S. griseus* [238]. Zanimljivo da navedene bakterije koriste upravo gen *ileS2* kao jedini gen (slika 4.2), pri čemu se on nalazi na sličnom genskom lokusu kao i gen *ileS1* kod bakterija koljena *Proteobacteria* (slika 4.3). Za bakterije roda *Bacillus*, mupirocin, zbog građe stanične membrane, također predstavlja značajnu opasnost, te su najvjerojatnije oni organizmi koji su u čestom kontaktu s bakterijom *P. fluorescens* horizontalnim prijenosom gena stekli gen *ileS2*. Unatoč tome, bioinformatička analiza napravljena u sklopu ovog rada jasno je pokazala da bakterije roda *Bacillus* uvijek, bez izuzetaka, zadržavaju genomsku kopiju gena *ileS1*, neovisno o tome sadrže li dodatno i gen *ileS2*. Rezultati upućuju da postoji značajna potreba za enzimom IleRS1 unutar bakterija roda *Bacillus* te da samostalna IleRS2 ne može zadovoljiti sve stanične potrebe.

5.2. Regulacija ekspresije dvije IleRS u bakteriji *B. megaterium*

Postojanje dvije IleRS u bakteriji *B. megaterium* sugerira da postoje uvjeti u kojima stanici treba svaki od navedenih proteina. Međutim, to ne znači da su oba proteina istovremeno i kontinuirano eksprimirana. Primjerice, bakterija *B. subtilis* sadrži dva gena za treonil-tRNA-sintetazu (ThrRS) i tirozil-tRNA-sintetazu (TyrRS), pri čemu su geni *thrS* i *tyrS* konstitutivno eksprimirani tijekom normalnog rasta, dok do ekspresije gena *thrZ* i *tyrZ* dolazi uslijed uklanjanja gena *thrS*, smanjenja stanične koncentracije proteina ThrRS(S) odnosno inaktivacije gena *tyrS* [19, 20]. U sklopu ovog rada, rezultati spektrometrije masa pokazali su da je u normalnim uvjetima rasta bakterije *B. megaterium* protein IleRS1 puno zastupljeniji od proteina IleRS2, a da dodatak mupirocina uzrokuje povećanje ekspresije proteina IleRS2 i do 250 puta (slika 4.25), sugerirajući da je protein IleRS1 konstitutivno, a protein IleRS2 inducibilno eksprimiran.

Međutim, kako je točno regulirana ekspresija dvije IleRS u bakteriji *B. megaterium*? Na temelju rezultata provedenih eksperimenata moguće je predložiti opći model regulacije ekspresije dvije IleRS (slika 5.1). Pri normalnim uvjetima rasta jedina eksprimirana IleRS je

upravo IleRS1. U prilog modelu, uz rezultate spektrometrije masa ide i i) provedena bioinformatička analiza koja je pokazala da promotor gena *ileS1* prepoznaje podjedinica σ^{70} (slika 4.5, slika 4.6), ii) s promotora gena *ileS1* uspješno je eksprimiran protein GFP prilikom uzgoja u mediju LB bez mupirocina (slika 4.22), iii) nije primijećena ekspresija proteina IleRS2 s nativnog promotora prilikom uzgoja bez mupirocina (slika 4.24) te iv) uklanjanje plazmida pUCTV2 iz soja *ΔileS1* bilo je moguće tek kada je medij suplementiran mupirocinom, koji je inaktivirao IleRS1 te omogućio ekspresiju IleRS2. Međutim, ekspresija gena *ileS1* dodatno je regulirana i aminoacilacijskim stanjem tRNA^{Ile} (slika 4.4). Nedavno je pokazano da, barem u bakteriji *B. subtilis*, količina aminoacilirane tRNA^{Ile} u normalnim uvjetima iznosi oko 50 %, što znači da je ekspresiju moguće smanjiti i povećati s obzirom na aminoacilacijsko stanje tRNA^{Ile} [228]. Stoga, pri normalnim uvjetima rasta bakterija održava optimalnu koncentraciju aminoacilirane tRNA^{Ile} eksprimirajući IleRS1 kako bi zadovoljila potrebe biosinteze proteina. Međutim, dodatkom mupirocina dolazi do inhibicije enzimske aktivnosti proteina IleRS1 (slika



Slika 5.1. Pretpostavljeni model regulacije ekspresije dvije IleRS bakterije *B. megaterium*. U normalnim uvjetima rasta, glavna stanična IleRS je IleRS1, te nema ekspresije IleRS2. Mupirocin inhibira IleRS1 uzrokujući porast neaminoacilirane tRNA^{Ile} koja dovodi do ekspresije IleRS2 uslijed i) ekspresije različitih podjedinica σ kao odgovor na vezanje neaminoacilirane tRNA^{Ile} na ribosom (*stringent response*), ii) različite osjetljivosti riboprekidača gena *ileS2* na tRNA^{Ile} ili iii) vlastitog auto-regulacijskog mehanizma ekspresije.

4.17), što dovodi do pada koncentracije aminoacilirane tRNA^{Ile}. U tim uvjetima stanica može pojačati ekspresiju proteina IleRS1 preko sustava riboprekidača, što je vidljivo iz rezultata spektrometrije masa gdje je uočeno povećanje ekspresije proteina IleRS1 od dva puta uslijed dodatka mupirocina (4.25). Slični rezultati uočeni su i kada se pod promotorom gena *ileS1* nalazio *gfp* u prisutnosti mupirocina (slika 4.22). Iako na prvu možda neintuitivno, zapravo je logično da uslijed inaktivacije enzima IleRS1 dolazi do povećane ekspresije gena *ileS1*. Naime, aktivnost riboprekidača ne ovisi o aktivnosti enzima IleRS1, već o količini aminoacilirane tRNA^{Ile}. Isti efekt trebao bi se dobiti ako bi stanica bila izložena starvaciji izoleucinom, budući da stanica zapravo pokušava naći način da održi količinu aminoacilirane tRNA^{Ile} na potrebnj razini. Iako prekomjerna ekspresija IleRS tipa 1 ne može omogućiti stanici preživljenje u prisutnosti mupirocina zbog izrazito visokog afiniteta enzima prema mupirocinu ($K_i = 10 - 15 \text{ nmol dm}^{-3}$) [15], očito smanjenje koncentracije tRNA^{Ile} inicijalno stimulira pojačanu ekspresiju IleRS1 kao osnovni odgovor. Identični rezultati dobiveni su proučavajući transkripciju gena *ileS1* bakterije *S. aureus*, koji je također reguliran putem riboprekidača, gdje je prisutnost mupirocina povećala razinu transkripcije i do 10 puta [126].

Daljni pad koncentracije aminoacilirane tRNA^{Ile} uslijed inaktivacije proteina IleRS1 dovodi do ekspresije proteina IleRS2 (slika 5.1). Zbog niskog afiniteta prema mupirocinu ($K_i = 1 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$, slika 4.18), mupirocin ne uzrokuje značajnu inhibiciju proteina IleRS2 koji potom preuzima ulogu glavne stanične IleRS. Međutim, trenutno i dalje nije u potpunosti jasno na koji način dolazi do ekspresije proteina IleRS2. Moguće je da smanjena koncentracija aminoacilirane tRNA^{Ile} uslijed dodatka mupirocina izaziva opći stanični stresni odgovor, poznat i kao *stringent response* [239]. Stanica u tim uvjetima može eksprimirati specifične podjedinice σ koje potom mogu započeti transkripciju gena *ileS2*. Također, unatoč rezultatima bioinformatičke analize, moguće je da promotor gena *ileS2* također prepoznaje podjedinica σ^{70} , ali da zbog dodatne peteljke unutar riboprekidača, koja nije pronađena kod riboprekidača gena *ileS1*, postoji jača regulacija ekspresije gena *ileS2* (slika 4.4), tj. do ekspresije gena *ileS2* dolazi samo u ekstremnim uvjetima smanjene koncentracije aminoacilirane tRNA^{Ile}. Zanimljivo da kada se pod regulatornu regiju gena *ileS2* stavi gen *gfp* dolazi do konstitutivne ekspresije nizvodnog proteina (slika 4.22). Jedino u uvjetima kada se gen *ileS2* nalazi pod nativnom regulatornom regijom uočena je jednoznačna ekspresija samo u prisutnosti mupirocina (slika 4.24, slika 4.27). Stoga je moguće da postoji i auto-regulacijski mehanizam ekspresije pri čemu bi protein IleRS2 mogao regulirati vlastitu ekspresiju. Auto-regulacija ekspresije gena kod

aaRS pokazana je za AlaRS bakterije *E. coli* koji regulira vlastitu transkripciju na način da se veže na palindromsku regiju koja okružuje mjesto inicijacije transkripcije [91], ali i za ThrRS koji negativno regulira ekspresiju vlastitog gena na razini translacije [93].

Analizirajući profil aminoacilacije, enzim IleRS2 pokazao se puno robusnijim u odnosu na enzim IleRS1, kod kojeg je uočena izražena bifazna priroda nastanka produkta u vremenu (slika 4.11, prilog slika 9.1). Iako je moguće da je to inherentno svojstvo ove tRNA, zanimljivo je pretpostaviti da zbog različitih posttranskripcijskih modifikacija navedena dva enzima mogu različito prepoznati pripadnu tRNA. Primjerice, u uvjetima normalnog rasta kada stanica nije pod stresom, tRNA^{Ile} je možda u potpunosti posttranskripcijski modificirana i aminoacilirana pomoću enzima IleRS1. S druge strane, u stresnim uvjetima, primjerice u prisutnosti mupirocina, čak i nepotpuno modificirana tRNA^{Ile} je dovoljno dobar supstrat enzimu IleRS2, budući da je prioritet u tom trenutku preživljenje bakterije, a ne sinteza dodatnih enzima odgovornih za posttranskripcijsku obradu tRNA^{Ile}. Moguće je, naravno, i da je manja osjetljivost tipa 2 IleRS prema modifikacijama tRNA^{Ile} inherentno svojstvo enzima. Naime, eukariotski tip enzima IleRS u pravilu pokazuje puno širu supstratnu specifičnost od bakterijskog tipa. Konkretno, *ScIleRS2* nije pokazao značajne razlike u brzini aminoacilacije bilo eukariotske (*SctRNA^{Ile}*) bilo bakterijske (*SgtRNA^{Ile}*, *EctRNA^{Ile}*) tRNA^{Ile}. S druge strane, *EcIleRS1* je aminoacilirala *SgtRNA^{Ile}* i do 10 puta lošije nego pripadnu *EctRNA^{Ile}*, iako su obje tRNA^{Ile} bakterijskog tipa, te čak 300 puta lošije aminoacilirala kvaščevu *SctRNA^{Ile}* [8]. Slično je uočeno i korištenjem IleRS2 iz bakterije *Mycobacterium tuberculosis* koja je mogla aminoacilirati kvaščevu tRNA^{Ile} [240]. Zapravo, široka supstratna specifičnost eukariotskih enzima prema bakterijskim pripadnim tRNA dobro je poznata [241, 242], a moguće je posljedica evolucije eukariotskih enzima koji moraju efikasno aminoacilirati tRNA različitog evolucijskog podrijetla, za razliku od bakterijskih enzima koji su puno specifičniji.

5.3. IleRS tipa 1 daje selekcijsku prednost bakteriji *B. megaterium*

U sklopu ove disertacije pokazano je da bakterija *B. megaterium* koristi IleRS1 kao glavnu staničnu IleRS, dok IleRS2 služi kao sporedna, pomoćna IleRS koja se eksprimira specifično kada bakterija bude izložena mupirocinu (slika 4.25). Intuitivno je za očekivati da bakterija *B. megaterium* može preživjeti i samo s genom *ileS2*, budući da bakterija može preživjeti u prisutnosti mupirocina kada dolazi do inhibicije enzima IleRS1 (slika 4.26). Međutim, pretragom baze podataka nije pronađena bakterija roda *Bacillus* koja bi imala isključivo gen

ileS2, već je dobiven suprotan rezultat – nije pronađena bakterija roda *Bacillus* koja nema gen *ileS1* (slika 4.2). Prednost posjedovanja gena *ileS1* u odnosu na gen *ileS2* istražena je pripremom sojeva bakterije *B. megaterium* s uklonjenim genima *ileS1* (soj *ΔileS1*) i *ileS2* (soj *ΔileS2*). Očekivano, konstrukcija soja *ΔileS2* nije predstavljala nikakav problem (slika 4.26), dok je soj *ΔileS1* dobiven jedino kada je medij suplementiran mupirocinom. Zanimljivo da problem nije bila homologna izgradnja plazmida iz genoma, već je postojao selekcijski pritisak koji je držao plazmid s IleRS1 cijelo vrijeme u stanici. U skladu s modelom ekspresije dvije IleRS u bakteriji *B. megaterium* opisanom u poglavlju 5.2, uklanjanje gena *ileS1* moguće je jedino u slučaju kada je stanici i dalje osiguran izvor aminoacilirane Ile-tRNA^{Ile}, u ovom slučaju u vidu ekspresije IleRS2 koja je potaknuta dodatkom mupirocina. Jednom kada je *ileS1* uklonjen iz organizma, dolazi do konstitutivne ekspresije *ileS2* neovisno o prisutnosti mupirocina, budući da stanica mora zadovoljiti osnovne potrebe za sintezom Ile-tRNA^{Ile}. Uspješno dobivanje soja *ΔileS1* potvrđuje da gen *ileS1* nije esencijalan gen, tj. bakterija *B. megaterium* može preživjeti samo zahvaljujući genu *ileS2* (slika 4.26). Zanimljivo, čak i bakterija *B. subtilis*, koja prirodno sadrži isključivo gen *ileS1*, može koristiti gen *bmileS2* kao jedini i glavni stanični gen (slika 4.29). Međutim, soj *ΔileS1*, unatoč mogućnosti preživljenja, značajno je kompromitiran te je izgubio dva od šest plazmida koja se prirodno nalaze u divljem tipu bakterije, te trenutno nije jasno zbog čega bi uklanjanje gena *ileS1* dovelo do gubitka nativnih plazmida.

Jedan od većih problema u sklopu ovog rada bilo je kloniranje gena *ileS1* bilo pod nativnu regulatornu regiju bilo pod ksilozni promotor P_{xyIA}, koje se pokazalo toksično za bakteriju *E. coli*. Rezultat je posebno neočekivan jer bakterija *E. coli* prirodno sadrži IleRS tipa 1 (slika 4.2) [123]. Budući da je poznato da promotor P_{xyIA} nije u potpunosti reprimiran u bakteriji *E. coli* [171], rezultati sugeriraju da je za toksičnost najodgovornija ekspresija gena *ileS1*. U literaturi su poznati problemi pri kloniranju gena *ileS*. Primjerice, prilikom karakterizacije lokusa *divIVA* iz bakterije *B. subtilis*, Cha i Stewart pokazali se da je ekspresija *bsileS1* u bakteriji *E. coli* letalna, pri čemu je plazmid sadržavao gen *bsileS* pod nativnim promotorom [243]. Zanimljivo, ekspresija se pokazala toksičnom unatoč korištenju plazmida s malim brojem kopija. Slični rezultati dobiveni su i u sklopu ovog rada, pri čemu nije bilo moguće dobiti ispravni konstrukt neovisno o korištenom vektoru (testirani su i vektori pET sustava koji su nisko-kopijski u bakteriji *E. coli*, nije prikazano). Ekspresija gena *ileS* iz drugih organizama također se pokazala toksičnom za bakteriju *E. coli*. Chalker i suradnici su još 1994. klonirali

genomsku kopiju gena *ileS* iz Gram-pozitivne bakterije *S. aureus* (Oxford izolat) [244]. Međutim, uslijed indukcije ekspresije gena *ileS* dodatkom IPTG-a uočili su da ne dolazi do daljnjeg rasta bakterije *E. coli*, navodeći ih na zaključak da je prekomjerna ekspresija gena *ileS* najvjerojatnije toksična za bakteriju *E. coli*, iako se bazalna razina ekspresije nije pokazala toksičnom. Zanimljivo je da prilikom analize uzvodne sekvence (do 90 nukleotida uzvodno) gena *saileS* nisu uočeni promotorski elementi, što je autore posebno zbunjivalo [244]. Danas je poznato da je gen *ileS* u bakteriji *S. aureus*, kao i drugim Gram-pozitivnim bakterijama, reguliran putem sustava riboprekidača, a promotorski elementi nalaze se uzvodno od riboprekidača koji je dugačak otprilike 400 nukleotida. U sklopu ovog rada kloniranje gena *ileS2* pod nativnu regulatornu regiju gena *ileS1* također je bilo problematično za bakteriju *E. coli*, iako ne u tolikoj mjeri kao i kloniranje gena *ileS1* (nije prikazano). S druge strane, kloniranje gena *gfp* nije predstavljalo nikakav problem bakteriji *E. coli*, sugerirajući da možda prekomjerna količina IleRS u stanici dovodi do promijenjene stanične koncentracije aminoacilirane tRNA^{Ile} uzrokujući nepremostivi stres za bakteriju *E. coli*.

5.4. Kompromis između brzine aminoacilacije i mupirocinske rezistencije odražava se na brzinu translacije

Nedavno je pokazano da IleRS iz bakterije *S. griseus* (SgIleRS tipa 2) pokazuje izrazito visoku rezistenciju prema mupirocinu, međutim nema sporedni korektivni mehanizam popravka pogreške (tRNA-ovisan popravak pogreške prije prijenosa) [8]. Autori su postavili hipotezu da je enzim kompromitirao dio korektivnih mehanizama u korist dobivanja visoke mupirocinske rezistencije. Poznato je da gubitak korektivnih mehanizama može imati štetne posljedice na stanicu. Primjerice, karakterizacija IleRS bakterije *B. subtilis* (IleRS tipa 1) pokazala je da je popravak pogreške nakon prijenosa bitan za formiranje temperaturno-rezistentnih spora [23]. Budući da enzim *BmIleRS2* pokazuje izrazito visoku rezistenciju prema mupirocinu (slika 4.18), inicijalna hipoteza ovog rada bila je da je enzim *BmIleRS2* žrtvovao sporedni korektivni mehanizam popravka pogreške kako bi dobio višu mupirocinsku rezistenciju, te da je enzim *BmIleRS1* prisutan prvenstveno zbog veće točnosti sinteze Ile-tRNA^{Ile}. Zanimljivo, u ovom radu pokazano je da oba enzima IleRS bakterije *B. megaterium* ne pokazuju značajne razlike u analiziranim korektivnim mehanizmima (tablica 4.4, tablica 4.5). Specifično, oba enzima ne koriste tRNA-ovisan popravak pogreške prije prijenosa kao mehanizam popravka pogreške (tablica 4.5) prema niti jednoj testiranoj neprikladnoj aminokiselini. Glavni aminokiselinski

ogranak odgovoran za tRNA-ovisni popravak pogreške prije prijenosa kod *EcIleRS* je Tyr59 [10]. Zanimljivo, iako postoji očuvani tirozin kod *BmIleRS1* analogan Tyr59 *EcIleRS*, *BmIleRS1* nema tRNA-ovisan popravak pogreške prije prijenosa (slika 5.2). Rezultati ove doktorske disertacije stoga govore da kompromis između visoke mupirocinske rezistencije i tRNA-ovisnog popravka pogreške prije prijenosa nije univerzalno pravilo za sve IleRS. U skladu s dosadašnjim eksperimentima na ostalim IleRS [2, 8, 9, 144], obje IleRS iz bakterije *B. megaterium* kao glavni popravak pogreške koriste popravak pogreške nakon prijenosa (tablica 4.4) koji je univerzalno prisutan u svim do sada okarakteriziranim IleRS, pri čemu oba enzima jednako brzo hidroliziraju sve misacilirane tRNA^{Ile}.

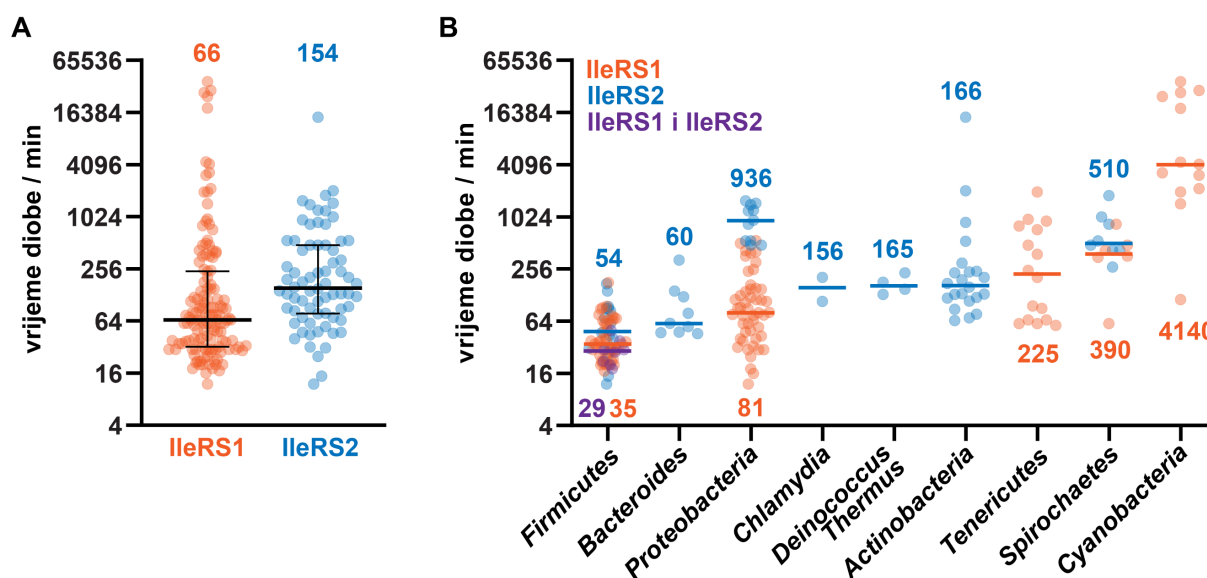
				tRNA-ovisan popravak pogreške prije prijenosa	K_i (mup) / $\mu\text{mol dm}^{-3}$
<i>E. coli</i> IleRS1	56	GPPYANGS I H I GHSV	70	+	6×10^{-3}
<i>S. cerevisiae</i> IleRS2	45	GPPFATGT PHYGHIL	59	+	9
<i>S. griseus</i> IleRS2	50	GPPTANGMPGAHHIE	64	-	10×10^3
<i>B. megaterium</i> IleRS1	55	GPPYANGD IHMGHAL	69	-	268×10^{-6}
<i>B. megaterium</i> IleRS2	45	GPPTANGL PHVGHAL	59	-	1

Slika 5.2. Višestruko sravnjenje proteinskih sekvenci katalitičke domene odabranih aaRS. Zvezdicom (*) je označen tirozin koji ima bitnu ulogu u tRNA-ovisnom popravku pogreške kod *E. coli* IleRS. Podaci tRNA-ovisnog popravka pogreške prije prijenosa i konstanti inhibicije (K_i) prema mupirocinu u reakciji aktivacije preuzeti su iz literature [8, 10, 14].

Druga moguća opcija je da se dva enzima razlikuju u sintetskim reakcijama. Karakterizacija aminoacilacije, kao fiziološki najrelevantnije reakcije, pokazala je da je enzim IleRS1 skoro dva puta brži u sintezi Ile-tRNA^{Ile} od enzima IleRS2 (tablica 4.3). Nedavno je na bakteriji *B. subtilis* pokazano da je koncentracija IleRS u stanici blizu minimalne koncentracije potrebne da se osiguraju optimalni uvjeti rasta [228]. Konkretno, već i malo smanjenje koncentracije sintetaze, pa čak i za samo 2 puta u odnosu na nativnu koncentraciju dovodi do smanjenja bakterijskog općeg stanja (fitnesa) i u konačnici rezultira gubitkom stanice u kompetirajućoj kulturi. Iako su kinetički podaci pokazali da je IleRS1 duplo brža u sintezi Ile-tRNA^{Ile} u odnosu na enzim IleRS2, treba uzeti u obzir da je aminoacilacija u uvjetima *in vitro* mjerena u uvjetima kada su oba enzima u potpunosti zasićena svim svojim supstratima, a to su Ile, ATP i tRNA^{Ile}. Međutim, ako se uzmu u obzir stanične koncentracije supstrata, koje iznose $c(\text{Ile}) \sim 300 \mu\text{mol dm}^{-3}$, $c(\text{ATP}) \sim 10 \text{ mmol dm}^{-3}$ i $c(\text{tRNA}) > 1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ [219-222], jasno je da će oba enzima uglavnom biti u potpunosti zasićena svojim supstratima i u staničnim, *in vivo* uvjetima, tj. radit će pri maksimalnim brzinama. U tim uvjetima brzina sinteze Ile-tRNA^{Ile} pomoću enzima IleRS2 bit će značajno sporija u odnosu na enzim IleRS1. Hipoteza je testirana

korištenjem sustava za translaciju *in vitro* s koncentracijama supstrata koje odgovaraju koncentracijama supstrata *in vivo*. I dok su oba enzima pri visokim koncentracijama uspješno osiguravala ribosomske potrebe za brzinom sinteze Ile-tRNA^{Ile}, smanjenje koncentracije enzima IleRS na razinu pri kojoj je ukupna brzina translacije ograničena brzinom sinteze Ile-tRNA^{Ile} jasno je pokazalo da enzim IleRS1 bolje podržava translaciju nego IleRS2 (slika 4.19). Kontrolni eksperimenti su pokazali da pad brzine translacije korištenjem enzima IleRS2 nije posljedica degradacije i/ili inaktivacije enzima, budući da enzim IleRS2 pokazuje i do 10 °C veću termičku stabilnost nego enzim IleRS1 (slika 4.20), a uz to brzina aminoacilacije nije smanjena uslijed produžene inkubacije enzima na povišenoj temperaturi.

Razlog da je enzim IleRS1 ostao prisutan u rodu *Bacillus* unatoč akviziciji enzima IleRS2 zbog brzine translacije, i posljedično brzine diobe stanice, je posebno zanimljiva. Kod bakterija koje se brzo dijele, primjerice bakterije *E. coli* i *B. subtilis*, gotovo 50 % energetskih potreba stanice troši se upravo na translaciju, dok se na cjelokupnu ribosomsku mašineriju, koja uključuje ribosomske proteine i RNA, ali i inicijacijske i elongacijske faktore, aminoacil-tRNA-sintetaze i modifikacijske faktore u pravilu troši i preko 30 % ukupnog proteoma [245, 246]. Budući da održavanje optimalne translacije zahtjeva znatnu količinu energije, stanica



Slika 5.3. Odnos između tipa enzima IleRS i vremena diobe bakterija. Svaka točka predstavlja jednu bakterijsku vrstu, a obojane su prema genomskom tipu IleRS (narančasto IleRS1, plavo IleRS2, ljubičasto IleRS1 i IleRS2). Vremena diobe bakterija preuzeta su iz literature [201], a prikazan je medijan izračunatog vremena diobe. Za svaku bakterijsku vrstu uzeto je najbrže publicirano vrijeme diobe (n (IleRS1) = 127, n (IleRS2) = 72, n (IleRS1 i IleRS2) = 8)). A) Sve bakterijske vrste grupirane su prema genomskom tipu IleRS. Vrste koje sadrže IleRS1 i IleRS2 grupirane su skupa s IleRS1. B) Vrste su grupirane prema koljenu.

prilagođava i broj ribosoma i brzinu translacije prema trenutno dostupnim nutrijentima kako bi osigurala optimalnu brzinu rasta [247-249]. U sklopu ovog rada napravljena je korelacija brzine diobe bakterija i prisutnosti genomske tipa *ileS*, pri čemu je jasno vidljivo da se bakterije koje sadrže IleRS1 dijele skoro duplo brže od bakterija koje sadrže samo IleRS2 (slika 5.3). Detaljnijom analizom uočljivo je da bakterije koje se brzo dijele, prvenstveno bakterije koljena *Firmicutes* i *Proteobacteria*, predominantno koriste IleRS1 kao jedinu staničnu IleRS. Štoviše, porodica *Clostridia* unutar koljena *Proteobacteria* primjer je gdje se organizam koji ima samo IleRS2 značajno sporije dijeli u odnosu na srodnike koji imaju IleRS1 unutar istog koljena. Sličan obrazac, iako malo manje izražen, uočen je i za sva ostala koljena u kojima postoje vrste koje imaju ili IleRS1 ili IleRS2. Na temelju relativno malog broja dostupnih podataka o brzini rasta bakterija koljena *Firmicutes*, jasno je vidljivo da bakterije koje sadrže obje IleRS pokazuju značajno brži rast (manje vrijeme diobe) u odnosu na bakterije koje ovise samo o IleRS2 (slika 5.3B).

§ 6. ZAKLJUČAK

- Glavna prijetnja točnosti sinteze Ile-tRNA^{Ile} pomoću obje IleRS bakterije *B. megaterium* su proteinogena aminokiselina valin i neproteinogena aminokiselina norvalin. Obje *BmIleRS* ne koriste tRNA-ovisan popravak pogreške prije prijenosa, te je glavni mehanizam održavanja točnosti izoleuciliranja kod obje *BmIleRS* popravak pogreške nakon prijenosa, tj. deacilacija misacilirane tRNA^{Ile}.
- Mupirocin je klasični kompetitivni inhibitor *BmIleRS2* ($K_i = 1 \mu\text{mol dm}^{-3}$). S druge strane, *BmIleRS1* je i do 1000 puta osjetljivija na inhibiciju mupirocinom u odnosu na *BmIleRS2* ($K_i = 286 \text{ pmol dm}^{-3}$), pri čemu je mupirocin jaki, sporo-vezujući inhibitor enzima *BmIleRS1*.
- *BmIleRS1* konstitutivno je eksprimirana IleRS u bakteriji *B. megaterium*, dok do ekspresije *BmIleRS2* dolazi uslijed inaktivacije enzima *BmIleRS1* mupirocinom ili uklanjanja *BmIleRS1* iz organizma. Ekspresija oba proteina *BmIleRS* dodatno je regulirana riboprekidačem osjetljivim na aminoacilacijsko stanje tRNA^{Ile}, a oba gena *bmileS* samostalne su transkripcijske jedinice.
- Bakterije roda *Bacillus* koriste IleRS1 kao glavnu staničnu IleRS, dok se IleRS2 pojavljuje sporadično. Iako u prirodi nisu pronađene bakterije roda *Bacillus* koje sadrže isključivo gen *ileS2*, i kod bakterije *B. megaterium* i kod bakterije *B. subtilis* samostalni gen *ileS2* omogućuje vijabilnost.
- *BmIleRS1* duplo je brža u aminoaciliranju tRNA^{Ile} od *BmIleRS2* u uvjetima potpunog zasićenja enzima supstratima, što u konačnici rezultira bržom translacijom u uvjetima kada je brzina translacije ograničena brzinom sinteze Ile-tRNA^{Ile}.
- Bakterija *B. megaterium* najvjerojatnije je horizontalnim prijenosom gena stekla gen *ileS2*, koji joj je omogućio visoku mupirocinsku rezistenciju i značajnu kompetitivnu prednost u okolišu s mupirocinom. S druge strane, stalno prisutan selekcijski pritisak za bržom translacijom i bržom diobom zahtjeva prisutnost IleRS1 kao glavne stanične IleRS kako bi bakterija zadržala svoju kompetitivnu prednost u okolišu s ostalim bakterijama koje se brzo dijele.

§ 7. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ

Popis kratica:

aa: aminokiselina

aa-AMP: aminoacil-adenilat

aaRS: aminoacil-tRNA-sintetaza

aa-tRNA: aminoacilirana tRNA

ATP: adenozin-5'-trifosfat

CP1: engl. *connective peptide 1*

IleRS: izoleucil-tRNA-sintetaza

k_{cat} : obrtni broj

k_{obs} : opaženi koeficijent brzine reakcije

k_{on} : konstanta brzine nastanka kompleksa, engl. *constant on-rate*

k_{off} : konstanta brzine raspada kompleksa, engl. *constant off-rate*

K_{m} : Michaelisova konstanta

K_{d} : ravnotežna konstanta disocijacije

K_{i} : konstanta inhibicije

$K_{\text{i, app}}$: prividna konstanta inhibicije

k_{trans} : koeficijent brzine reakcije prijenosa aminokiselina na tRNA

k_{decay} : koeficijent brzine reakcije prvog reda za hidrolizu (deacilaciju) (mis)aminoacilirane tRNA

mRNA: glasnička RNA, engl. *messenger RNA*

OD₆₀₀: optička gustoća bakterijske kulture mjerena pri 600 nm

ORF: otvoreni okvir čitanja, engl. *open reading frame*

PCR: lančana reakcija polimerazom, engl: *polymerase chain reaction*

SEM: standardna pogreška prosjeka, engl. *standard error of the mean*

T_{m} : temperatura mekšanja

tRNA: prijenosna (transfer) RNA, engl: *transfer RNA*

WT: divlji tip, engl. *wild type*

§ 8. LITERATURNI IZVORI

- [1] J. J. Perona, I. Gruic-Sovulj, *Top. Curr. Chem.* **344** (2014) 1-41.
- [2] M. Bilus, M. Semanjski, M. Mocibob, I. Zivkovic, N. Cvetesic, D. S. Tawfik, A. Toth-Petroczy, B. Macek, I. Gruic-Sovulj, *J. Mol. Biol.* **431** (2019) 1284-1297.
- [3] N. Cvetesic, M. Semanjski, B. Soufi, K. Krug, I. Gruic-Sovulj, B. Macek, *Sci. Rep.* **6** (2016) 28631.
- [4] P. R. Schimmel, D. Söll, *Annu. Rev. Biochem.* **48** (1979) 601-648.
- [5] A.R. Fersht, *Biochemistry* **16** (1977) 1025-1030.
- [6] M. Dulic, N. Cvetesic, J. J. Perona, I. Gruic-Sovulj, *J. Biol. Chem.* **285** (2010) 23799-23809.
- [7] R. B. Lofthfield, D. Vanderjagt, *Biochem. J.* **128** (1972) 1353-1356.
- [8] N. Cvetesic, M. Dulic, M. Bilus, N. Sostaric, B. Lenhard, I. Gruic-Sovulj, *J. Biol. Chem.* **291** (2016) 8618-8631.
- [9] I. Zivkovic, J. Moschner, B. Kokschi, I. Gruic-Sovulj, *FEBS J.* **287** (2020) 800-813.
- [10] M. Dulic, J. J. Perona, I. Gruic-Sovulj, *Biochemistry* **53** (2014) 6189-6198.
- [11] L. Lin, S. P. Hale, P. Schimmel, *Nature* **384** (1996) 33-34.
- [12] N. Cvetesic, M. Bilus, I. Gruic-Sovulj, *J. Biol. Chem.* **290** (2015) 13981-13991.
- [13] J. R. Brown, J. Zhang, J. E. Hodgson, *Curr. Biol.* **8** (1998) R365-R367.
- [14] J. Hughes, G. Mellows, *Biochem. J.* **191** (1980) 209-219.
- [15] T. Yanagisawa, M. Kawakami, *J. Biol. Chem.* **278** (2003) 25887-25894.
- [16] A. J. Pope, K. J. Moore, M. McVey, L. Mensah, N. Benson, N. Osbourne, N. Broom, M. J. Brown, P. O'Hanlon, *J. Biol. Chem.* **273** (1998) 31691-31701.
- [17] J. Hughes, G. Mellows, S. Soughton, *FEBS Lett.* **122** (1980) 322-324.
- [18] J. R. Brown, D. Gentry, J. A. Becker, K. Ingraham, D. J. Holmes, M. J. Stanhope, *EMBO Rep.* **4** (2003) 692-698.
- [19] H. Putzer, A. A. Brakhage, M. Grunberg-Manago, *J. Bacteriol.* **172** (1990) 4593-4602.
- [20] T. M. Henkin, B. L. Glass, F. J. Grundy, *J. Bacteriol.* **174** (1992) 1299-1306.
- [21] R. N. Williams-Wagner, F. J. Grundy, M. Raina, M. Ibba, T. M. Henkin. *J. Bacteriol.* **197** (2015) 1624-1631.

- [22] L. Noda-Garcia, M. L. Romero Romero, L. M. Longo, I. Kolodkin-Gal, D. S. Tawfik, *EMBO Rep.* **18** (2017) 1139-1149.
- [23] E. Kermgard, Z. Yang, A.-M. Michel, R. Simari, J. Wong, M. Ibba, B. A. Lazazzera, *Sci. Rep.* **7** (2017) 41763.
- [24] D. G. Vassilyev, S.-I. Sekine, O. Laptenko, J. Lee, M. N. Vassilyeva, S. Borukhov, S. Yokoyama, *Nature* **417** (2002) 712-719.
- [25] B. Bae, A. Feklistov, A. Lass-Napiorkowska, R. Landick, S. Darst, *eLife* **4** (2015) e08504.
- [26] R. M. Saecker, M. Thomas Record, Jr., P. L. deHaseth, *J. Mol. Biol.* **412** (2011) 754-771.
- [27] T. M. Gruber, C. A. Gross, *Annu. Rev. Microbiol.* **57** (2003) 441-466.
- [28] C. Mejía-Almonte, S. J. W. Busby, J. T. Wade, J. van Helden, A. P. Arkin, G. D. Stormo, K. Eilbeck, B. O. Palsson, J. E. Galagan, J. Collado-Vides, *Nat. Rev. Genet.* **21** (2020) 699-714.
- [29] S. T. Estrem, W. Ross, T. Gaal, Z. W. S. Chen, W. Niu, R. H. Ebright, R. L. Gourse, *Genes Dev.* **13** (1999) 2134-2147.
- [30] W. Ross, K. K. Gosink, J. Salomon, K. Igarashi, C. Zou, A. Ishihama, K. Severinov, R. L. Gourse, *Science* **262** (1993) 1407-1413.
- [31] E. A. Campbell, O. Muzzin, M. Chlenov, J. L. Sun, C. A. Olson, O. Weinman, M. L. Trester-Zedlitz, S. A. Darst, *Mol. Cell* **9** (2002) 527-539.
- [32] K. S. Murakami, *J. Biol. Chem.* **288** (2013) 9126-9134.
- [33] M. Lonetto, M. Gribskov, C. A. Gross, *J. Bacteriol.* **174** (1992) 3843-3849.
- [34] S. Lisser, H. Margalit, *Nucleic Acids Res.* **21** (1993) 1507-1516.
- [35] Y. Zou, T. A. Steitz, *Mol. Cell* **58** (2015) 534-540.
- [36] A. Feklistov, S. A. Darst, *Cell* **147** (2011) 1257-1269.
- [37] K. S. Murakami, S. Masuda, E. A. Campbell, O. Muzzin, S. A. Darst, *Science* **296** (2002) 1285-1290.
- [38] T. Aoyama, M. Takanami, E. Ohtsuka, Y. Taniyama, R. Marumoto, H. Sato, M. Ikehara, *Nucleic Acids Res* **11** (1983) 5855-5864.
- [39] W. G. Haldenwang, *Microbiol. Rev.* **59** (1995) 1-30.
- [40] R. K. Shultzaberger, Z. Chen, K. A. Lewis, T. D. Schneider, *Nucleic Acids Res.* **35** (2007) 771-788.

- [41] D. K. Hawley, W. R. McClure, *Nucleic Acids Res.* **11** (1983) 2237-2255.
- [42] K. Zhao, M. Liu, R. R. Burgess, *Nucleic Acids Res.* **38** (2010) 1273-1283.
- [43] D. W. Cowing, J. C. Bardwell, E. A. Craig, C. Woolford, R. W. Hendrix, C. A. Gross, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82** (1985) 2679-2683.
- [44] S. J. Lee, J. D. Gralla, *J. Biol. Chem.* **276** (2001) 30064-30071.
- [45] C. P. Moran Jr, N. Lang, S. F. LeGrice, G. Lee, M. Stephens, A. L. Sonenshein, J. Pero, R. Losick, *Mol. Gen. Genet.* **186** (1982) 339-346.
- [46] A. Reder, D. Albrecht, U. Gerth, M. Hecker, *Environ. Microbiol.* **14** (2012) 2741-2756.
- [47] M. Predich, G. Nair, I. Smith, *J. Bacteriol.* **174** (1992) 2771-2778.
- [48] S. Roels, A. Driks, R. Losick, *J. Bacteriol.* **174** (1992) 575-585.
- [49] D. G. Vassylyev, M. N. Vassylyeva, A. Perederina, T. H. Tahirov, I. Artsimovitch, *Nature* **448** (2007) 157-162.
- [50] G. A. Belogurov, I. Artsimovitch, *Annu. Rev. Microbiol.* **69** (2015) 49-69.
- [51] V. Svetlov, E. Nudler, *Biochim. Biophys. Acta* **1829** (2013) 20-28.
- [52] A. Ray-Soni, M. J. Bellecourt, R. Landick, *Annu. Rev. Biochem.* **85** (2016) 319-347.
- [53] Y. d'Aubenton Carafa, E. Brody, C. Thermes, *J. Mol. Biol.* **216** (1990) 835-858.
- [54] I. Gusarov, E. Nudler, *Mol. Cell* **3** (1999) 495-504.
- [55] C. Lowery-Goldhammer, J. P. Richardson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **71** (1974) 2003-2007.
- [56] W. D. Morgan, D. G. Bear, B. L. Litchman, P. H. von Hippel, *Nucleic Acids Res.* **13** (1985) 3739-3754.
- [57] D. J. Koslover, F. M. Fazal, R. A. Mooney, R. Landick, S. M. Block, *J. Mol. Biol.* **423** (2012) 664-676
- [58] A. Korostelev, S. Trakhanov, M. Laurberg, H. F. Noller, *Cell* **126** (2006) 1065-1077.
- [59] R. Kohler, R. A. Mooney, D. J. Mills, R. Landick, P. Cramer, *Science* **356** (2017) 194-197.
- [60] C. Wang, V. Molodtsov, E. Firlar, J. T. Kaelber, G. Blaha, M. Su, R. H. Ebricht, *Science* **69** (2020) 1359-1365.
- [61] J. K. Sussman, E. L. Simons, R. W. Simons, *Mol. Microbiol.* **21** (1996) 347-360.
- [62] J. Shine, L. Dalgarno, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **71** (1974) 1342-1346.
- [63] R. A. Calogero, C. L. Pon, M. A. Canonaco, C. O. Gualerzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85** (1988) 6427-6431.

- [64] S. Ringquist, S. Shinedling, D. Barrick, L. Green, J. Binkley, G. D. Stormo, L. Gold, *Mol. Microbiol.* **6** (1992) 1219-1229.
- [65] W. J. Van Etten, G. R. Janssen, *Mol. Microbiol.* **27** (1998) 987-1001.
- [66] T. Accetto, G. Avguštin, *PLoS One* **6** (2011) e22914
- [67] B. Chang, S. Halgamuge, S.-L. Tang, *Gene* **373** (2006) 90-99.
- [68] L. B. Scharff, L. Childs, D. Walther, R. Bock, *PLoS Genet.* **7** (2011) e1002155.
- [69] C. O. Gualerzi, C. L. Pon, *Cell. Mol. Life Sci.* **72** (2015) 4341-4367.
- [70] S. Shetty, U. Varshney, *J. Biol. Chem.* **296** (2021) 100088
- [71] M. V. Rodnina, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **10** (2018) a032664
- [72] J.-C. Schuette, F. V. Murphy, A. C. Kelley, J. R. Weir, J. Giesebrecht, S. R. Connell, J. Loerke, T. Mielke, W. Zhang, P. A. Penczek, V. Ramakrishnan, C. M. T. Spahn, *EMBO J.* **28** (2009) 755-765.
- [73] H. Stark, M. V. Rodnina, H.-J. Wieden, F. Zemlin, W. Wintermeyer, M. van Heel, *Nat. Struct. Biol.* **9** (2002) 849-854.
- [74] A. Sievers, M. Beringer, M. V. Rodnina, R. Wolfenden, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101** (2004) 7897-7901.
- [75] G. Wallin, J. Aqvist, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107** (2010) 1888-1893.
- [76] D. A. Hiller, V. Singh, M. Zhong, S. A. Strobel, *Nature* **476** (2011) 236-239.
- [77] A. Savelsbergh, V. I. Katunin, D. Mohr, F. Peske, M. V. Rodnina, W. Wintermeyer, *Mol. Cell* **11** (2003) 1517-1523.
- [78] N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Science* **289** (2000) 905-920.
- [79] M. R. Capecchi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **58** (1967) 1144-1151.
- [80] E. M. Youngman, M. E. McDonald, R. Green, *Annu. Rev. Microbiol.* **62** (2008) 353-373.
- [81] H. Jin, A. C. Kelley, D. Loakes, V. Ramakrishnan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107** (2010) 8593-8598.
- [82] F. H. Crick, *J. Mol. Biol.* **19** (1966) 548-555.
- [83] N. Cvetic, A. Palencia, I. Halasz, S. Cusack, I. Gruic-Sovulj, *EMBO J.* **33** (2014) 1639-1653.
- [84] B. Ruan, S. Palioura, J. Sabina, L. Marvin-Guy, S. Kochhar, R. A. Larossa, D. Söll, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105** (2008) 16502-16507.

- [85] F. Janiak, V. A. Dell, J. K. Abrahamson, B. S. Watson, D. L. Miller, A. E. Johnson, *Biochemistry* **29** (1990) 4268-4277.
- [86] H. Asahara, O. C. Uhlenbeck, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99** (2002) 3499-3504.
- [87] F. J. LaRiviere, A. D. Wolfson, O. C. Uhlenbeck, *Science* **294** (2001) 165-168.
- [88] N. Cveticic, I. Akmacic, I. Gruic-Sovulj, *Croat. Chem. Acta* **86** (2013) 73-82.
- [89] I. Bervoets, D. Charlier, *FEMS Microbiol. Rev.* **43** (2019) 304-339.
- [90] E. Van Assche, S. Van Puyvelde, J. Vanderleyden, H. P. Steenackers, *Front. Microbiol.* **6** (2015) 141.
- [91] S. D. Putney, P. Schimmel, *Nature* **291** (1981) 632-635.
- [92] M. Springer, J. F. Mayaux, G. Fayat, J. A. Plumbridge, M. Graffe, S. Blanquet, M. Grunberg-Manago, *J. Mol. Biol.* **181** (1985) 467-478.
- [93] M. Springer, J. A. Plumbridge, J. S. Butler, M. Graffe, J. Dondon, J. F. Mayaux, G. Fayat, P. Lestienne, S. Blanquet, M. Grunberg-Manago, *J. Mol. Biol.* **185** (1985) 93-104.
- [94] F. J. Grundy, T. M. Henkin, *Cell* **74** (1993) 475-482.
- [95] T. M. Henkin, *Mol. Microbiol.* **13** (1994) 381-387.
- [96] A. V. Sherwood, F. J. Grundy, T. M. Henkin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112** (2015) 1113-1118.
- [97] K. D. Kreuzer, T. M. Henkin, *Microbiol. Spectr.* **6** (2018) doi:10.1128/microbiolspec.RWR-0028-2018.
- [98] A. Gutiérrez-Preciado, T. M. Henkin, F. J. Grundy, C. Yanofsky, E. Merino, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **73** (2009) 36-61.
- [99] F. J. Grundy, W. C. Winkler, T. M. Henkin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99** (2002) 11121-11126.
- [100] J. C. Grigg, Y. Chen, F. J. Grundy, T. M. Henkin, L. Pollack, A. Ke, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110** (2013) 7240-7245.
- [101] E. Caserta, L.-C. Liu, F. J. Grundy, T. M. Henkin, *J. Biol. Chem.* **290** (2015) 23336-23347.
- [102] J. J. Perona, A. Hadd, *Biochemistry* **61** (2012) 8705-8729.
- [103] F. H. Crick, *Symp. Soc. Exp. Biol.* **12** (1958) 138-163.
- [104] R. W. Holley, G. A. Everett, J. T. Madison, A. Zamir, *J. Biol. Chem.* **240** (1965) 2122-2128.

- [105] F. Jühling, M. Mörl, R. K. Hartmann, M. Sprinzl, P. F. Stadler, J. Pütz, *Nucleic Acids Res.* **37** (2009) D159-162.
- [106] H. Betat, C. Rammelt, M. Mörl, *Cell. Mol. Life Sci.* **67** (2010) 1447-1463.
- [107] S. H. Kim, F. L. Suddath, G. J. Quigley, A. McPherson, J. L. Sussman, A. H. Wang, N. C. Seeman, A. Rich, *Science* **185** (1974) 435-440.
- [108] H. Shi, P. B. Moore, *RNA* **6** (2000) 1091-1105.
- [109] S. U. Aström, A. S. Byström, *Cell* **79** (1994) 535-546.
- [110] C. Lorenz, C. E. Lünse, M. Mörl, *Biomolecules* **7** (2017) 35.
- [111] R. Giegé, M. Sissler, C. Florentz, *Nucleic Acids Res.* **26** (1998) 5017-5035.
- [112] L. H. Schulman, H. Pelka, *Science* **242** (1988) 765-768.
- [113] T. Meinnel, Y. Mechulam, C. Lazennec, S. Blanquet, G. Fayat, *J. Mol. Biol.* **229** (1993) 26-36.
- [114] H. Asahara, H. Himeno, K. Tamura, T. Hasegawa, K. Watanabe, M. Shimizu, *J. Mol. Biol.* **231** (1993) 219-229.
- [115] H. Asahara, H. Himeno, K. Tamura, N. Nameki, T. Hasegawa, M. Shimizu, *J. Mol. Biol.* **236** (1994) 738-748.
- [116] G. Eriani, M. Delarue, O. Poch, J. Gangloff, D. Moras, *Nature* **347** (1990) 203-206.
- [117] O. Nureki, D. G. Vassylyev, M. Tateno, A. Shimada, T. Nakama, S. Fukai, M. Konno, T. L. Hendrickson, P. Schimmel, S. Yokoyama, *Science* **280** (1998) 578-582.
- [118] L. F. Silvián, J. Wang, T. A. Steitz, *Science* **285** (1999) 1074-1077.
- [119] C. R. Woese, G. J. Olsen, M. Ibba, D. Söll, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64** (2000) 202-236.
- [120] E. Glasfeld, J. A. Landro, P. Schimmel, *Biochemistry* **35** (1996) 4139-4145.
- [121] J. E. Hodgson, S. P. Curnock, K. G. Dyke, R. Morris, D. R. Sylvester, M. S. Gross, *Antimicrob. Agents Chemother.* **38** (1994) 1205-1208.
- [122] R. F. Doolittle, J. Handy, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8** (1998) 630-636.
- [123] Y. Kamio, C. K. Lin, M. Regue, H. C. Wu, *J. Biol. Chem.* **260** (1985) 5616-5620.
- [124] K. W. Miller, H. C. Wu, *J. Biol. Chem.* **262** (1987) 389-393.
- [125] X.-J. Zhao, H. C. Wu, *FEBS Lett.* **299** (1992) 80-84.
- [126] F. J. Grundy, M. T. Haldeman, G. M. Hornblow, J. M. Ward, A. F. Chalker, T. M. Henkin, *J. Bacteriol.* **179** (1997) 3767-3772.

- [127] K. G. Dyke, S. P. Curnock, M. Golding, W. C. Noble, *FEMS Microbiol. Lett.* **61** (1991) 195-198.
- [128] A. O. Shittu, F. Layer-Nicolaou, B. Strommenger, M.-T. Nguyen, S. Bletz, A. Mellmann, F. Schaumburg. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **12** (2022) 860163.
- [129] A. Soma, Y. Ikeuchi, S. Kanemasa, K. Kobayashi, N. Ogasawara, T. Ote, J.-I. Kato, K. Watanabe, Y. Sekine, T. Suzuki, *Mol. Cell* **12** (2003) 689-698.
- [130] Y. Ikeuchi, A. Soma, T. Ote, J.-I. Kato, Y. Sekine, T. Suzuki, *Mol. Cell* **19** (2005) 235-246.
- [131] G. R. Björk, T. G. Hagervall, *EcoSal Plus* **6** (2014) doi:10.1128/ecosalplus.ESP-0007-2013
- [132] T. Niimi, O. Nureki, T. Yokogawa, N. Hayashi, K. Nishikawa, K. Watanabe, S. Yokoyama, *Nucleos. Nucleot.* **13** (1994) 1231-1237.
- [133] O. Nureki, T. Niimi, T. Muramatsu, H. Kanno, T. Kohno, C. Florentz, R. Giegé, S. Yokoyama, *J. Mol. Biol.* **236** (1994) 710-724.
- [134] T. Taniguchi, K. Miyauchi, D. Nakane, M. Miyata, A. Muto, S. Nishimura, T. Suzuki, *Nucleic Acids Res.* **41** (2013) 2621-2631.
- [135] T. Suzuki, K. Miyauchi, *FEBS Lett.* **584** (2010) 272-277.
- [136] B. E. Yacoubi, M. Bailly, V. de Crécy-Lagard, *Annu. Rev. Genet.* **46** (2012) 69-95.
- [137] T. N. Lamichhane, N. H. Blewett, R. J. Maraia, *RNA* **17** (2011) 1846-1857.
- [138] J. E. Jackman, J. D. Alfonzo, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **4** (2013) 35-48.
- [139] G. R. Björk, P. M. Wikström, A. S. Byström, *Science* **244** (1989) 986-989.
- [140] G. R. Björk, K. Jacobsson, K. Nilsson, M. J. Johansson, A. S. Byström, O. P. Persson, *EMBO J.* **20** (2001) 231-239.
- [141] S. S. Lam, P. R. Schimmel, *Biochemistry* **14** (1975) 2775-2780.
- [142] N. Cveticic, J. J. Perona, I. Gruic-Sovulj, *J. Biol. Chem.* **287** (2012) 25381-25394.
- [143] A. C. Bishop, T. K. Nomanbhoy, P. Schimmel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99** (2002) 585-590.
- [144] I. Zivkovic, K. Ivkovic, N. Cveticic, A. Marsavelski, I. Gruic-Sovulj, *Nucleic Acids Res.* (2022) gkac207, doi: 10.1093/nar/gkac207
- [145] L. Pang, S. D. Weeks, A. Van Aerschot, *Int. J. Mol. Sci.* **22** (2021) 1750.
- [146] A. T. Fuller, G. Mellows, M. Woolford, G. T. Banks, K. D. Barrow, E. B. Chain, *Nature* **234** (1971) 416-417.

- [147] C. A. Whatling, J. E. Hodgson, M. K. R. Burnham, N. J. Clarke, F. C. H. Franklin, C. M. Thomas, *Microbiology* **141** (1995) 973-982.
- [148] A. K. El-Sayed, J. Hothersall, S. M. Cooper, E. Stephens, T. J. Simpson, C. M. Thomas, *Chem. Biol.* **10** (2003) 419-430.
- [149] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, W. H. Freeman, New York, 2002.
- [150] R. A. Copeland, *Enzymes: A practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*, Wiley-VCH, New York, 2000.
- [151] J. W. Williams, J. F. Morrison, *Methods Enzymol.* **63** (1979) 437-467.
- [152] J. F. Morrison, *Biochim. Biophys. Acta* **185** (1969) 269-286.
- [153] K. Tornheim, *Anal. Biochem.* **221** (1994) 53-56.
- [154] S. Cha, *Biochem. Pharmacol.* **24** (1975) 2177-2185.
- [155] J. F. Morrison, C. T. Walsh, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **61** (1988) 201-301.
- [156] R. A. Copeland, *Methods Biochem. Anal.* **46** (2005) 1-265.
- [157] J. F. Morrison, *Trends Biochem. Sci.* **7** (1982) 102-105.
- [158] C. J. Chou, D. Herman, J. M. Gottesfeld, *J. Biol. Chem.* **283** (2008) 35402-35409.
- [159] A. J. Pope, J. Lapointe, L. Mensah, N. Benson, M. J. B. Brown, K. J. Moore, *J. Biol. Chem.* **273** (1998) 31680-31690.
- [160] S. Chung, S. Kim, S. H. Ryu, K. Y. Hwang, Y. Cho, *Mol. Cells* **43** (2020) 350-359.
- [161] D. H. Bergey, W. B. Whitman, P. De Vos, G. M. Garrity, D. Jones, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, svez. 3: The Firmicutes*, Springer, New York, 2009.
- [162] R. S. Gupta, S. Patel, N. Saini, S. Chen, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **70** (2020) 5753-5798.
- [163] P. S. Vary, *Microbiology (Reading)* **140** (1994) 1001-1013.
- [164] M.-L. Rosso, P. S. Vary, *Plasmid* **53** (2005) 205-217.
- [165] G. Arya, N. Petronella, J. Crosthwait, C. D. Carrillo, P. S. Shwed, *Genome Announc.* **2** (2014) e01124-14
- [166] M. Gamer, D. Fröde, R. Biedendieck, S. Stammen, D. Jahn, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **82** (2009) 1195-1203.
- [167] M. Malten, R. Hollmann, W.-D. Deckwer, D. Jahn, *Biotechnol. Bioeng.* **89** (2005) 206-218.
- [168] P. S. Vary, R. Biedendieck, T. Fuerch, F. Meinhardt, M. Rohde, W.-D. Deckwer, D. Jahn, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76** (2007) 957-967.

- [169] F. W. Studier, B. A. Moffatt, *J. Mol. Biol.* **189** (1986) 113-130.
- [170] M. Eppinger, B. Bunk, M. A. Johns, J. N. Edirisinghe, K. K. Kutumbaka, S. S. K. Koenig, H. H. Creasy, M. J. Rosovitz, D. R. Riley, S. Daugherty, M. Martin, L. D. H. Elbourne, I. Paulsen, R. Biedendieck, C. Braun, S. Grayburn, S. Dhingra, V. Lukyanchuk, B. Ball, R. Ul-Qamar, J. Seibel, E. Bremer, D. Jahn, J. Ravel, P. S. Vary, *J. Bacteriol.* **193** (2011) 4199-4213.
- [171] E. Jordan, M. Hust, A. Roth, R. Biedendieck, T. Schirrmann, D. Jahn, S. Dübel, *Microbiol. Cell Fact.* **6** (2007) 2.
- [172] K. D. Wittchen, F. Meinhardt, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42** (1995) 871-877.
- [173] S. de A. E. Silva, S. Echeverrigaray, G. J. L. Gerhardt, *J. Theor. Biol.* **287** (2011) 92-99.
- [174] M. G. Reese, *Comput. Chem.* **26** (2001) 51-56.
- [175] A. de Jong, H. Pietersma, M. Cordes, O. P. Kuipers, J. Kok, *BMC Genomics* **13** (2012) 299
- [176] V. Solovyev, A. Salamov, u R. W. Li (ur.), *Metagenomics and its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmental Studies*, Nova Science Publishers, 2011, str. 61-78
- [177] WebLogo 3, <http://weblogo.threeplusone.com/create.cgi>, pristupljeno 2019-2021.
- [178] M. Naville, A. Ghullot-Gaudeffroy, A. Marchais, D. Gautheret, *RNA Biol.* **8** (2011) 11-13.
- [179] A. R. Gruber, R. Lorenz, S. H. Bernhart, R. Neuböck, I. L. Hofacker, *Nucleic Acids Res.* **36** (2008) 70-74
- [180] R. C. Edgar, *Nucleic Acids Res.* **32** (2004) 1792-1797.
- [181] MUSCLE – Multiple Sequence Alignment, <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>, pristupljeno 2019-2021.
- [182] A. M. Waterhouse, J. B. Procter, D. M. A. Martin, M. Clamp, G. J. Barton, *Bioinformatics* **25** (2009) 1189-1191.
- [183] S. Capella-Gutiérrez, J. M. Silla-Martínez, T. Gabaldón, *Bioinformatics* **25** (2009) 1972-1973.
- [184] Phylemon 2, <http://phylemon.bioinfo.cipf.es/>, pristupljeno 2019-2021.
- [185] A. Stamatakis, *Bioinformatics* **30** (2014) 1312-1313.
- [186] CIPRES, <https://www.phylo.org/>, pristupljeno 2019-2021.

- [187] J. F. Sambrook, D. W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [188] B. Božić, *Kinetička karakterizacija homologno nadeksprimiranih izoleucil-tRNA-sintetaza iz bakterije Bacillus megaterium*, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2020.
- [189] R. Biedendieck, C. Borgmeier, B. Bunk, S. Stammen, C. Scherling, F. Meinhardt, C. Wittmann, D. Jahn, *Methods Enzymol.* **500** (2011) 165-195.
- [190] P. R. Bennallack, S. R. Burt, M. J. Heder, R. A. Robison, J. S. Griffiths, *J. Bacteriol.* **196** (2014) 4344-4350.
- [191] M. H. Zwietering, I. Jongenburger, F. M. Rombouts, K. van 't Riet, *Appl. Environ. Microbiol.* **56** (1990) 1875-1881.
- [192] M. Biluš, *Mehanizam diskriminacije prirodnih proteinogenih i neproteinogenih nepripadnih aminokiselina kod aminoacil-tRNA-sintetaza razreda IA*, Doktorska disertacija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2016.
- [193] K. B. Mullis, *Sci. Am.* **262** (1990) 56-61.
- [194] N. Cvetešić, *Mehanizmi popravka pogreške leucil-tRNA-sintetaze sprječavaju nekanonsku mistranslaciju proteoma bakterije Escherichia coli*, Doktorska disertacija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2015.
- [195] G. Gambino, I. Perrone, I. Gribaudo, *Phytochem. Anal.* **19** (2008) 520-525.
- [196] T. Yokogawa, Y. Kitamura, D. Nakamura, S. Ohno, K. Nishikawa, *Nucleic Acids Res.* **38** (2010) e89.
- [197] A. D. Wolfson, O. C. Uhlenbeck, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99** (2002) 5965-5970.
- [198] I. Gruic-Sovulj, M. Dulic, J. Jaric, N. Cvetic, K. Majsec, I. Weygand-Đurasevic, *Croat. Chem. Acta* **83** (2010) 163-169.
- [199] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **72** (1976) 248-254.
- [200] M. R. Wilkins, E. Gasteiger, A. Bairoch, J. C. Sanchez, K. L. Williams, R. D. Appel, D. F. Hochstrasser, *Methods Mol. Biol.* **112** (1999) 531-532.
- [201] V. Zanki, B. Bozic, M. Mocibob, N. Ban, I. Gruic-Sovulj, *Protein Sci.* (2022) e4418, doi: 10.1002/pro.4418.
- [202] C. S. Francklyn, E. A. First, J. J. Perona, Y.-M. Hou, *Methods* **44** (2008) 100-118.
- [203] N. Cvetic, I. Gruic-Sovulj, *Methods* **113** (2017) 13-26.
- [204] C. Tuckey, H. Asahara, Y. Zhou, S. Chong, *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **108** (2014) 1-22.

- [205] Y. Shimizu, A. Inoue, Y. Tomari, T. Suzuki, T. Yokogawa, K. Nishikawa, T. Ueda, *Nat. Biotechnol.* **19** (2001) 751-755.
- [206] Y. Shimizu, T. Ueda, *Methods Mol. Biol.* **607** (2010) 11-21.
- [207] D. H. Edwards, J. Errington, *Mol. Microbiol.* **24** (1997) 905-915.
- [208] M. Paetzel, A. Karla, N. C. J. Strynadka, R. E. Dalbey, *Chem. Rev.* **102** (2002) 4549-4580.
- [209] M. T. Nguyen, F. Götz, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **80** (2016) 891-903.
- [210] S. O. Jensen, L. S. Thompson, E. J. Harry, *J. Bacteriol.* **187** (2005) 6536-6544.
- [211] J. T. Kemp, A. Driks, R. Losick, *J. Bacteriol.* **184** (2002) 3856-3863.
- [212] V. K. Chary, M. Meloni, D. W. Hilbert, P. J. Piggot, *J. Bacteriol.* **187** (2005) 6832-6840.
- [213] S. Patel, R. S. Gupta, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **70** (2020) 406-438.
- [214] C. Marck, H. Grosjean, *RNA* **8** (2002) 1189-1232.
- [215] J. M. Guillon, T. Meinnel, Y. Mechulam, C. Lazennec, S. Blanquet, G. Fayat, *J. Mol. Biol.* **224** (1992) 359-367.
- [216] N. Cvetesic, *Kloniranje, prekomjerna ekspresija te pročišćavanje molekula tRNA^{Ala} i tRNA^{Val} iz bakterije Escherichia coli*, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2010.
- [217] A. R. Fersht, M. M. Kaethner, *Biochemistry* **15** (1976) 818-823.
- [218] C.-M. Zhang, J. J. Perona, K. Ryu, C. Francklyn, Y.-M. Hou, *J. Mol. Biol.* **361** (2006) 300-311.
- [219] B. D. Bennett, E. H. Kimball, M. Gao, R. Osterhout, S. J. Van Dien, J. D. Rabinowitz, *Nat. Chem. Biol.* **5** (2009) 593-599.
- [220] V. L. Clark, D. E. Peterson, R. W. Bernlohr, *J. Bacteriol.* **112** (1972) 715-725.
- [221] H. Dong, L. Nilsson, C. G. Kurland, *J. Mol. Biol.* **260** (1996) 649-663.
- [222] S. Rudorf, R. Lipowsky, *PLoS One* **10** (2015) e0134994.
- [223] A. H. Rosenberg, E. Goldman, J. J. Dunn, F. W. Studier, G. Zubay, *J. Bacteriol.* **175** (1993) 716-722.
- [224] J. Mondo, *Annu. Rev. Microbiol.* **3** (1949) 371-394.
- [225] P. Salvy, V. Hatzimanikatis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **118** (2021) e2013836118.
- [226] J. Wang, E. Atolia, B. Hua, Y. Savir, R. Escalante-Chong, M. Springer, *PLoS Biol.* **13** (2015) e1002041.

- [227] D. Chu, D. J. Barnes, *Sci. Rep.* **6** (2016) 25191.
- [228] D. J. Parker, J.-B. Lalanne, S. Kimura, G. E. Johnson, M. K. Waldor, G.-W. Li, *Cell Syst.* **11** (2020) 121-130.
- [229] D. Bakkiyaraj, R. Sritharadol, A. R. Padmavathi, T. Nakpheng, T. Srichana, *Biofouling* **33** (2017) 591-600.
- [230] F. Serafini, F. Bottacini, A. Viappiani, E. Baruffini, F. Turrone, E. Foroni, T. Lodi, D. van Sinderen, M. Ventura, *Appl. Environ. Microbiol.* **77** (2011) 3141-3146.
- [231] R. Sutherland, R. J. Boon, K. E. Griffin, P. J. Masters, B. Slocombe, A. R. White, *Antimicrob. Agents Chemother.* **27** (1985) 495-498.
- [232] J. M. Wilson, B. Oliva, R. Cassels, P. J. O'Hanlon, I. Chopra, *Antimicrob. Agents Chemother.* **39** (1995) 1925-1933.
- [233] S. B. Al-Masaudi, A. D. Russell, M. Day, *Lett. Appl. Microbiol.* **7** (2008) 45-47.
- [234] M. Vaara, *J. Antimicrob. Chemother.* **29** (1992) 221-222.
- [235] R. Gupta, *FEMS Microbiol. Rev.* **24** (2000) 367-402.
- [236] T. Uchiyama, *Front. Microbiol.* **3** (2012) 230.
- [237] A. Sahni, R. Fang, S. K. Sahni, D. H. Walker, *Annu. Rev. Pathol.* **14** (2019) 127-152.
- [238] E. A. Barka, P. Vatsa, L. Sanchez, N. Gaveau-Vaillant, C. Jacquard, J. P. Meier-Kolthoff, H.-P. Klenk, C. Clément, Y. Ouhdouch, G. P. van Wezel, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **80** (2015) 1-43.
- [239] V. Haurlyuk, G. C. Atkinson, K. S. Murakami, T. Tenson, K. Gerdes, *Nat. Rev. Microbiol.* **13** (2015) 298-309.
- [240] M. Sassanfar, J. E. Kranz, P. Gallant, P. Schimmel, K. Shiba, *Biochemistry* **35** (1996) 9995-10003.
- [241] J. Rokov-Plavec, S. Lesjak, I. Gruic-Sovulj, M. Mocibob, M. Dulic, I. Weygand-Durasevic, *Arch. Biochem. Biophys.* **529** (2013) 122-130.
- [242] M. Kekez, N. Bauer, E. Saric, J. Rokov-Plavec, *J. Plant Biol.* **59** (2016) 44-54.
- [243] J. H. Cha, G. C. Stewart, *J. Bacteriol.* **179** (1997) 1671-1683.
- [244] A. F. Chalker, J. M. Ward, A. P. Fosberry, J. E. Hodgson, *Gene* **141** (1994) 103-108.
- [245] J. B. Russell, G. M. Cook, *Microbiol. Rev.* **59** (1995) 48-62.
- [246] J.-B. Lalanne, J. C. Taggart, M. S. Guo, L. Herzel, A. Schieler, G.-W. Li, *Cell* **173** (2018) 749-761.
- [247] G.-W. Li, D. Burkhardt, C. Gross, J. S. Weissman, *Cell* **157** (2014) 624-635.

-
- [248] E. Bosdriesz, D. Molenaar, B. Teusink, F. J. Bruggeman, *FEBS J.* **282** (2015) 2029-2044.
- [249] S. Klumpp, M. Scott, S. Pedersen, T. Hwa, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110** (2013) 16754-16759.

§ 9. PRILOZI

Tablica 9.1. Nukleotidni sljedovi početnica korišteni za sekvenciranje plazmida i PCR produkata.

Naziv početnice	Nukleotidni slijed (5' → 3')
BM_ileS1_seq1	GAATCTGCTTTAGCAGAAGCGG
BM_ileS1_seq2	TTTCTCGCCAACGTGCATGG
BM_ileS1_seq3	CATAAATATTCATTCAGCCCCTG
BM_ileS1_seq4	GCAAAAAGATGTATTGTACATCG
BM_ileS2_seq1	GCGGTGCATGAAGAGATGAG
BM_ileS2_seq2	CGATGCCGTTTGCACAGTATC
BM_ileS2_seq3	AACGAAGGATACCCTTCTCG
BM_ileS2_seq4	GTCTTTCACCTGTGGTAACGG
xylR_seq1	ATCCACCGAACTAAGTTGGTG
xylR_seq2	GGACTCAGGCATATGGGTTAC
pBM100_seq	GCAGACAGTTTTAGTTAACAGTTG
BS_ileT_R	GTCCGCGATGTAAATATCGGG
BS_ileP_F	GATCCTTCATACATAGTCGCG
BS_seq1	GCCTTCATAGCGACCCGG
BS_seq_F	GTCGAAATAAGAGATGACACGG
BS_seq_R	GCCAAAAATTTATCAATCCGCTC
BM1_ko_seqF	GCGAGGTTTATTTACAACAAGCAC
BM1_ko_seqR	ATATTCAGCTCGTAGTTGCAG
BM1_ko_seq1	GTATGGATTCGTTTGATTTTATTGCG
BM1_ko_seq2	GCAGTGGCGGTTTATTAC
BM1_ko_seq3	GGCTTTAAATGCTTTATACCATTG
BM1_ko_seq4	GTCCATCGCAATTTTACGAGAC
BM2_ko_seqF	CCTGCTCAATGACTTTACTTGC
BM2_ko_seqR	ATTGTTACGTCTTACCTTTAAGG
BM2_ko_seq1	TTTCAAAGCTTTGCACCACC
BM2_ko_seq2	TGAGTGCTATTGATGAACGGATC
BM2_ko_seq3	GTTTGGCCGAGTCTTAAGAACG
BM2_ko_seq4	CCCCGACTTGAAAGATGCTC
tRNAIleGAT-biot ^a	ATCAGGCGTGCGCTCTAACCAGCTGAG-biotin

^a Oligonukleotid je korišten za afinitetno pročišćavanje nativnog izoakceptora tRNA^{Ile}_{GAU} (vidi poglavlje 3.2.4.3)

Tablica 9.2. Nukleotidni slijedovi početnica korišteni u kloniranju gena od interesa. Restriksijska mjesta s odgovarajućim stršećim krajevima su obojana i podebljana: *Bam*HI – **G[▼]GATCC**, *Bsa*I – **GGTCTC** (stršeći kraj nastao nakon cijepanja je podcrtan), *Nde*I – **C[▼]ATATG**, *Nhe*I – **G[▼]CTAGC**, *Not*I – **GC[▼]GGCCGC**, *Sac*I – **G[▼]AGCTC**, *Spe*I – **A[▼]CTAGT**, *Xho*I – **C[▼]TCGAG**. **ATGATGATGGTGATGATG** – kodon optimizirani His₆ privjesak. **GGAGGAGGAGGA** – Gly₄ privjesak. **TAATACGACTCACTATA** – promotor T7.

Naziv početnice	Nukleotidni slijed (5' → 3')
BM_ileS1_F	GAGAGAG GCTAGC ATGGAATATAAAGATACATTATTGATGCC
BM_ileS1_R	GAGAGAG CTCGAG TTACTGCTGAACGTAGTGATTTTTTAC
BM_ileS2_F	GAGAGAG CATATG AAAGAAGTGAATGTAAGGGAGTC
BM_ileS2_R	GAGAGAG CTCGAG TCAGCTCTGATTTAAAACGCGAAG
BM1_ko_pro_F	GTGTTTTTGTAAATTACTGCTGAACGTAGTGATTTTTTAATGTATCTTTATATTCCATGTTTTACCCTCCAAAAAAAACG
BM1_ko_pro_R	GAGAGA CGGCCCGC AAGACAAAAAGTCCAGCCGTTTATTG
BM1_ko_ter_F	GAGAGAG GGATCC GCTGCACTTGTGAACGTGACCATTC
BM1_ko_ter_R	TTTTGGAGGGTAAACATGGAATATAAAGATACATTAATAAAATCACTACGTTTCAGCAGTAATTAACAAAAACACGTCCT
BM2_ko_pro_F	AGCTCTGATTTAAAACGCGAAGCCTTACATTCCTTTCATGTGATACTACT
BM2_ko_pro_R	GAGAGA CGGCCCGC ATTATTGCTCAAGGTGAATTCGTTGG
BM2_ko_ter_F	GAGAGAG GGATCC GTCGTAATGAGGACAGTTGCTG
BM2_ko_ter_R	ACATGAAAGAAGTGAATGTAAGGCTTCGCGTTTTAAATCAGAGCTG
BM1_cp_pro_F	GAGAGAG CTCGAG TGTTAAACAGCGACTGG
BM1_cp_pro_R	GAGAGAG GGTCTC ACTAGTCATGTTTTACCCTCCAAAAAAAACG
BM1_cp_ileS_R	GAGAGAG GGATCCGGTCTC ATTAATTA ATGATGATGGTGATGATG CTGCTGAACGTAGTGATTTTTTAC
BM1_cp_ter_F	GAGAGAG GAGCTC GTTCTGTAGCATATCTCAATAGGCG
BM1_cp_ter_R	GAGAGAG GGTCTC ATTAACAAAAACACGTCCTTTTTGGG
BM1_cp_4G_ileS_F	GAGAGAG ACTAGTGGAGGAGGAGGA ATGGAATATAAAGATACATTATTGATGCC
BM2_cp_pro_F	GAGAGAG CTCGAG TTTCCCTCAGAGCATCCC
BM2_cp_ileS_F	GAGAG GGTCTC TCTAGAATGAAAGAAGTGAATGTAAGGGAGTC
BM2_cp_ileS_R	GAGAGAG GGATCCGGTCTC ATTTATCA ATGATGATGGTGATGATG GCTCTGATTTAAAACGCGAAG

Naziv početnice	Nukleotidni slijed (5' → 3')
BM2_cp_ter_F	GAGAGA GAGCTC GATAAAACCATCACGCTGAAGC
BM2_cp_ter_R	GAGAGA GGTCTC CATAAAAAGCACTTACCTCATAGCGG
BM_pro1_GFP	GAGA GGTCTC ACATGTTTTACCCTCCAAAAAAAACG
BM_pro2_GFP	GAGA GGTCTC ACATGTGATACCACTCCTTTTAAAG
Cycle3GFP_F	GAGAGA GGTCTC ACATGGTCCAAACTAGTTCGAAG
Cycle3GFP_R	GAGAGA GAGCTC TTATTTGTAGGGCTCATCCATG
BS_ileP_F	GATCCTTCATACATAGTCGCG
BS_ileP_R	GAGA GGTCTC ATCATTTTCATTCCTCCACTGC
BS_ileT_F	GAGA GGATCC TGCAAAGAGCCCGGCG
BS_ileT_R	GTCCGCGATGTTAAATATCGGG
BM_ex_pro1_ileS2_F	GAGAGA GGTCTC AAATGAAAGAAGTGAATGTAAGGGAGTC
BM_ex_pro1_ileS2_R	GAGAGA GGATCC TCA ATGATGATGGTGATGATG GCTCTGATTTAAAACGCGAAG
BM_tRNAIleGAT_F	TCGA CTAATAC ACTCACTATA GGGCCTATAGCTCAGCTGGTTAGAGCGCACGCCTGATAAGCGTGAGGTCGGTGGTTTCGAGTCCACTTAGGCCACCAG
BM_tRNAIleGAT_R	GATC CTGGTGGGCCTAAGTGGACTCGAACCACCGACCTCACGCTTATCAGGCGTGCCTAACCAGCTGAGCTATAGGCCCTATAGTGTGAGTCGTATTAG

Tablica 9.3. Reakcijski parametri i uloga produkata lančane reakcije polimerazom.

PCR produkt	Početnice	Kalup	T_m / °C	T_a / °C	Duljina PCR produkta / bp	Uloga PCR produkta
ileS1 ^a	BM_ileS1_F	<i>B. megaterium</i> gDNA	63	60	2766	Ugradnja kodirajućeg slijeda gena <i>ileS1</i> u plazmidni vektor pET28b
	BM_ileS1_R		63			
ileS2 ^a	BM_ileS2_F	<i>B. megaterium</i> gDNA	64	61	3099	Ugradnja kodirajućeg slijeda gena <i>ileS2</i> u plazmidni vektor pET28b
	BM_ileS2_R		67			

PCR produkt	Početnice	Kalup	T_m / °C	T_a / °C	Duljina PCR produkta / bp	Uloga PCR produkta
Δ ileS1_P ^b	BM1_ko_pro_F BM1_ko_pro_R	<i>B. megaterium</i> gDNA	71 68	68	1204	Umnažanje uzvodne regije gena <i>ileS1</i> za pripremu soja s uklonjenim genom <i>ileS1</i>
Δ ileS1_T ^b	BM1_ko_ter_F BM1_ko_ter_R	<i>B. megaterium</i> gDNA	72 74	72	1178	Umnažanje nizvodne regije gena <i>ileS1</i> za pripremu soja s uklonjenim genom <i>ileS1</i>
Δ ileS2_P ^b	BM2_ko_pro_F BM2_ko_pro_R	<i>B. megaterium</i> gDNA	70 68	66	1169	Umnažanje uzvodne regije gena <i>ileS2</i> za pripremu soja s uklonjenim genom <i>ileS2</i>
Δ ileS2_T ^b	BM2_ko_ter_F BM2_ko_ter_R	<i>B. megaterium</i> gDNA	67 68	68	1194	Umnažanje nizvodne regije gena <i>ileS2</i> za pripremu soja s uklonjenim genom <i>ileS2</i>
Δ ileS1 ^c	BM1_ko_pro_R BM1_ko_ter_F	Δ ileS1_P Δ ileS1_T	-	66	2308	Fuzioniranje Δ ileS1_P i Δ ileS1_T PCR produkata za ugradnju u plazmidni vektor pUCTV2
Δ ileS2 ^c	BM2_ko_pro_R BM2_ko_ter_F	Δ ileS2_P Δ ileS2_T	-	66	2318	Fuzioniranje Δ ileS2_P i Δ ileS2_T PCR produkata za ugradnju u plazmidni vektor pUCTV2
Δ ileS1 seq ^d	BM1_ko_seqF BM1_ko_seqR	<i>B. megaterium</i> Δ ileS1 gDNA	64 61	67	2663	Sekvenciranje genomske regije <i>B. megaterium</i> soja Δ ileS1
Δ ileS1 seq ^e	BM2_ko_seqF BM2_ko_seqR	<i>B. megaterium</i> Δ ileS2 gDNA	63 62	63	2653	Sekvenciranje genomske regije <i>B. megaterium</i> soja Δ ileS2
cp_pro1 ^b	BM1_cp_pro_F BM1_cp_pro_R	<i>B. megaterium</i> gDNA	65 63	64	465	Umnažanje promotora gena <i>ileS1</i>
cp_pro_ileS1 ^b	BM1_cp_pro_F BM1_cp_ileS_R	<i>B. megaterium</i> gDNA	65 62	64	3251	Umnažanje gena <i>ileS1</i> s His ₆ privjeskom na C-kraju skupa s nativnim promotorom
cp_ter1 ^b	BM1_cp_ter_F BM1_cp_ter_R	<i>B. megaterium</i> gDNA	65 65	65	283	Umnažanje terminatora gena <i>ileS1</i>
cp_4G_ileS1 ^b	BM1_cp_4G_ileS_F BM1_cp_ileS_R	<i>B. megaterium</i> gDNA	60 62	61	2832	Umnažanje gena <i>ileS1</i> s Gly ₄ privjeskom na N-kraju i His ₆ privjeskom na C-kraju
cp_ileS1 ^b	BM_ileS1_F BM1_cp_ileS_R	<i>B. megaterium</i> gDNA	61 62	64	2820	Umnažanje gena <i>ileS1</i> s His ₆ privjeskom na C-kraju

PCR produkt	Početnice	Kalup	T_m / °C	T_a / °C	Duljina PCR produkta / bp	Uloga PCR produkta
cp_ter2^b	BM2_cp_ter_F BM2_cp_ter_R	<i>B. megaterium</i> gDNA	64 65	65	253	Umnažanje terminatora gena <i>ileS2</i>
cp_pro_ileS2^b	BM2_cp_pro_F BM2_cp_ileS_R	<i>B. megaterium</i> gDNA	64 62	64	3705	Umnažanje gena <i>ileS2</i> s His ₆ privjeskom na C-kraju skupa s nativnim promotorom
cp_ileS2^b	BM2_cp_ileS_F BM2_cp_ileS_R	<i>B. megaterium</i> gDNA	64 62	64	3157	Umnažanje gena <i>ileS2</i> s His ₆ privjeskom na C-kraju
P_{ileS1} za GFP^b	BM1_cp_pro_F BM_pro1_GFP	<i>B. megaterium</i> gDNA	65 63	64	458	Umnažanje promotora gena <i>ileS1</i> za ugradnju pod gen <i>gfp</i>
P_{ileS2} za GFP^b	BM2_cp_pro_F BM_pro2_GFP	<i>B. megaterium</i> gDNA	62 60	62	579	Umnažanje promotora gena <i>ileS2</i> za ugradnju pod gen <i>gfp</i>
GFP^b	Cycle3GFP_F Cycle3GFP_R	pP _{T7} _GFP	62 62	63	770	Umnažanje gena <i>gfp</i>
BS_pro^b	BS_IleP_F BS_IleP_R	<i>B. subtilis</i> gDNA	62 64	63	1061	Umnažanje promotorske regije gena <i>ileS</i>
BS_ter^b	BS_IleT_F BS_IleT_R	<i>B. subtilis</i> gDNA	66 66	67	1008	Umnažanje terminatorske regije gena <i>ileS</i>
BM_ileS2^b	BM_ex_pro1_ileS2_F BM_ex_pro1_ileS2_R	<i>B. megaterium</i> gDNA	62 62	63	3140	Umnažanje gena <i>ileS2</i> za ugradnju u genom bakterije <i>B. subtilis</i>
BS_P_bmileS2_T^b	BS_IleP_F BS_IleT_R	ligacijska smjesa ^f	63 66	63	5189	Fuzioniranje PCR produkata za transformaciju bakterije <i>B. subtilis</i>

^a PCR produkt dobiven korištenjem *Pfu*-DNA-polimeraze

^b PCR produkt dobiven korištenjem Q5-DNA-polimeraze

^c PCR dobiven korištenjem metode produljenja preklapajućih regija (vidi poglavlje 3.2.3.3)

^d PCR produkt dobiven korištenjem Phusion-DNA-polimeraze uz $c(\text{MgCl}_2) = 2,5 \text{ mmol dm}^{-3}$

^e PCR produkt dobiven korištenjem Phusion-DNA-polimeraze uz $c(\text{MgCl}_2) = 2 \text{ mmol dm}^{-3}$

^f Ligacija PCR produkata napravljena je bez prisutnosti vektora, nakon čega je smjesa korištena kao kalup u reakciji PCR (vidi i tablicu 9.6)

Tablica 9.4. Početnice korištene za uvođenje mutacija u proteine IleRS bakterije *B. megaterium*. Crveno su označeni mutirani nukleotidi.

Naziv početnice	Nukleotidni slijed (5' → 3')	Uloga
BM1_T234R_F	AAATTCATCATTTGGACGACAA G ACCATGGACAATGCC	Supstitucija treonina u arginin na poziciji 234 u proteinu IleRS1
BM1_T234R_R	GGCATTGTCCATGGT C TTGTCGTCCAAATGATGAATTT	
BM1_D333A_F	GGACACGGGGAAGACG C CTTTATCGTTGGTCAA	Supstitucija aspartata u alanin na poziciji 333 u proteinu IleRS1
BM1_D333A_R	TTGACCAACGATAAAG G CGTCTTCCCCGTGTCC	
BM2_T225R_F	GGGCTGGACGACAA G GCCTTGGACG	Supstitucija treonina u arginin na poziciji 225 u proteinu IleRS2
BM2_T225R_R	CGTCCAAGGC C TTGTCTCCAGCCC	
BM2_D324A_F	CCTGCTTACGGGAAGATG C TTACAGAGTTGTAAAAGAA	Supstitucija aspartata u alanin na poziciji 324 u proteinu IleRS2
BM2_D324A_R	TTCTTTTACAACCTCTGTAA G CATCTTCCCCGTAAGCAGG	

Tablica 9.5. Opisi mutiranih proteina IleRS bakterije *B. megaterium*.

Ime proteina	Opis mutanta
IleRS1 D333A ^a	Mutirana varijanta proteina IleRS1 s mutacijom D333A u domeni za popravak pogreške nakon prijenosa, čime je spriječena hidroliza misacilirane Val-tRNA ^{Ile}
IleRS1 D333A/T234R ^b	Mutirana varijanta proteina IleRS1 s mutacijama D333A i T234R u domeni za popravak pogreške nakon prijenosa, čime je spriječena hidroliza misaciliranih Val-tRNA ^{Ile} i Nva-tRNA ^{Ile}
IleRS2 D324A ^a	Mutirana varijanta proteina IleRS2 s mutacijom D324A u domeni za popravak pogreške nakon prijenosa, čime je spriječena hidroliza misacilirane Val-tRNA ^{Ile}
IleRS2 D324A/T225R ^b	Mutirana varijanta proteina IleRS2 s mutacijama D324A i T225R u domeni za popravak pogreške nakon prijenosa, čime je spriječena hidroliza misaciliranih Val-tRNA ^{Ile} i Nva-tRNA ^{Ile}

^a U sklopu ove doktorske disertacije nije testirana hidroliza misacilirane Val-tRNA^{Ile} korištenjem jednostrukih mutanata (IleRS1 D333A, IleRS2 D324A), već je opis mutanata dan na temelju dostupnih podataka za *Ec*IleRS, *Sg*IleRS i *Sc*IleRS ^[8]

^b Hidroliza misaciliranih Val-tRNA^{Ile} i Nva-tRNA^{Ile} opisana u u poglavlju 4.4.1

Tablica 9.6. Korištene kombinacije vektora i PCR produkata za ligaciju s pripadajućim restriksijskim enzimima.

Finalni konstrukt	Vektor	Restriksijski enzimi za razgradnju vektora	PCR produkt(i)	Restriksijski enzimi za razgradnju PCR produkta	Opis plazmidnog vektora ^a
pET28b_ileS1	pET28b	<i>NheI/XhoI</i>	ileS1	<i>NheI/XhoI</i>	Plazmidni vektor pET28b s ugrađenim genom <i>ileS1</i> pod inducibilni promotor T7 s His ₆ privjeskom na N-kraju, korišten za nadekspresiju proteina IleRS1 u bakteriji <i>E. coli</i>
pET28b_ileS2	pET28b	<i>NdeI/XhoI</i>	ileS2	<i>NdeI/XhoI</i>	Plazmidni vektor pET28b s ugrađenim genom <i>ileS2</i> pod inducibilni promotor T7 s His ₆ privjeskom na N-kraju, korišten za nadekspresiju proteina IleRS2 u bakteriji <i>E. coli</i>
pUCTV2_ΔileS1	pUCTV2	<i>BamHI/NotI</i>	ΔileS1	<i>BamHI/NotI</i>	Plazmidni vektor pUCTV2 s ugrađenom uzvodnom i nizvodnom regijom gena <i>ileS1</i> , korišten za pripremu soja bakterije <i>B. megaterium</i> s uklonjenim genom <i>ileS1</i> (Δ <i>ileS1</i>)
pUCTV2_ΔileS2	pUCTV2	<i>BamHI/NotI</i>	ΔileS2	<i>BamHI/NotI</i>	Plazmidni vektor pUCTV2 s ugrađenom uzvodnom i nizvodnom regijom gena <i>ileS2</i> , korišten za pripremu soja bakterije <i>B. megaterium</i> s uklonjenim genom <i>ileS2</i> (Δ <i>ileS2</i>)
pMGBm19_P _{ileS1} _ileS1 ^b	pMGBm19	<i>BamHI/XhoI</i>	cp_pro_ileS1	<i>BamHI/XhoI</i>	Plazmidni vektor pMGBm19 s ugrađenim genom <i>ileS1</i> s His ₆ privjeskom na C-kraju pod nativni promotor gena <i>ileS1</i>
pMGBm19_P _{ileS1} _ileS1_T _{ileS1} ^b	pMGBm19	<i>XhoI/SacI</i>	cp_pro_ileS1 cp_ter1	<i>BsaI/XhoI</i> <i>BsaI/SacI</i>	Plazmidni vektor pMGBm19 s ugrađenim genom <i>ileS1</i> s His ₆ privjeskom na C-kraju skupa s nativnim terminatorom pod nativni promotor gena <i>ileS1</i>
pMGBm19_P _{ileS1} _Gly ₄ _ileS1 ^b	pMGBm19	<i>BamHI/XhoI</i>	cp_pro1 cp_4G_ileS1	<i>XhoI/BsaI</i> <i>SpeI/BsaI</i>	Plazmidni vektor pMGBm19 s ugrađenim genom <i>ileS1</i> s His ₆ privjeskom na C-kraju pod nativni promotor gena <i>ileS1</i> s 4 glicinska kodona na početku gena <i>ileS1</i>
pMGBm19_P _{ileS1} _Gly ₄ _ileS1_T _{ileS1} ^b	pMGBm19	<i>SacI/XhoI</i>	cp_pro1 cp_4G_ileS1 cp_ter1	<i>XhoI/BsaI</i> <i>SpeI/BsaI</i> <i>SacI/BsaI</i>	Plazmidni vektor pMGBm19 s ugrađenim genom <i>ileS1</i> s His ₆ privjeskom na C-kraju skupa s nativnim terminatorom pod nativni promotor gena <i>ileS1</i> s 4 glicinska kodona na početku gena <i>ileS1</i>
pMGBm19_P _{xytA} _ileS1 ^b	pMGBm19	<i>SpeI/BamHI</i>	cp_ileS1	<i>NheI/BamHI</i>	Plazmidni vektor pMGBm19 s ugrađenim genom <i>ileS1</i> s His ₆ privjeskom na C-kraju pod inducibilni promotor P _{xytA}
pMGBm19_P _{xytA} _ileS1_T _{ileS1} ^b	pMGBm19	<i>SacI/SpeI</i>	cp_ileS1 cp_ter1	<i>NheI/BsaI</i> <i>BsaI/SacI</i>	Plazmidni vektor pMGBm19 s ugrađenim genom <i>ileS1</i> s His ₆ privjeskom na C-kraju skupa s nativnim terminatorom pod inducibilni promotor P _{xytA}

Finalni konstrukt	Vektor	Restrikcijски enzimi za razgradnju vektora	PCR produkt(i)	Restrikcijски enzimi za razgradnju PCR produkta	Opis plazmidnog vektora ^a
pMGBm19_P_{xyIA}_Gly₄_ileS1 ^b	pMGBm19	<i>SpeI/BamHI</i>	cp_4G_ileS1	<i>SpeI/BamHI</i>	Plazmidni vektor pMGBm19 s ugrađenim genom <i>ileS1</i> s His ₆ privjeskom na C-kraju pod inducibilni promotor P _{xyIA} s 4 glicinska kodona na početku gena <i>ileS1</i>
pMGBm19_P_{ileS2}_ileS2_T_{ileS2}	pMGBm19	<i>XhoI/SacI</i>	cp_pro_ileS2 cp_ter2	<i>BsaI/XhoI</i> <i>BsaI/SacI</i>	Plazmidni vektor pMGBm19 s ugrađenim genom <i>ileS2</i> s His ₆ privjeskom na C-kraju pod nativnim promotorom i terminatorom gena <i>ileS2</i>
pMGBm19_P_{xyIA}_ileS2	pMGBm19	<i>SpeI/BamHI</i>	cp_ileS2	<i>XbaI/BamHI</i>	Plazmidni vektor pMGBm19 s ugrađenim genom <i>ileS2</i> s His ₆ privjeskom na C-kraju pod inducibilni ksilozni promotor P _{xyIA} , za nadekspresiju proteina IleRS2 u bakteriji <i>B. megaterium</i>
pMGBm19_P_{ileS1}_GFP	pMGBm19	<i>XhoI/SacI</i>	P _{ileS1} za GFP GFP	<i>XhoI/BsaI</i> <i>BsaI/SacI</i>	Plazmidni vektor pMGBm19 s ugrađenim genom <i>gfp</i> (Cycle3 GFP varijanta) pod promotorom gena <i>ileS1</i>
pMGBm19_P_{ileS2}_GFP	pMGBm19	<i>XhoI/SacI</i>	P _{ileS2} za GFP GFP	<i>XhoI/BsaI</i> <i>BsaI/SacI</i>	Plazmidni vektor pMGBm19 s ugrađenim genom <i>gfp</i> (Cycle3 GFP varijanta) pod promotorom gena <i>ileS2</i>
BS_p_bmileS2_T	-	-	BS_pro BM_ileS2 BS_ter	<i>BsaI</i> <i>BamHI/BsaI</i> <i>BamHI</i>	Ligacijska smjesa koja sadrži gen <i>bmileS2</i> pod promotorskom i terminatorskom regijom gena <i>bsileS</i> za zamjenu gena <i>bmileS</i> genom <i>bmileS2</i> u genomu bakterije <i>B. subtilis</i>
ΔpET3a_tRNA^{Ile}	ΔpET3a	<i>BamHI/SalI</i>	tRNA ^{Ile} ^c	-	Plazmidni vektor ΔpET3a s ugrađenim genom za tRNA ^{Ile} (izoakceptor GAT) iz bakterije <i>B. megaterium</i> pod promotor T7, za nadekspresiju tRNA ^{Ile} u bakteriji <i>E. coli</i>
pP_{T7}_tRNA^{Ile} ^d	pP _{T7} _XhoI ^d	<i>XhoI/BamHI</i>	tRNA ^{Ile} ^c	-	Plazmidni vektor pP _{T7} s ugrađenim genom za tRNA ^{Ile} (izoakceptor GAT) iz bakterije <i>B. megaterium</i> pod promotor T7, za nadekspresiju tRNA ^{Ile} u bakteriji <i>B. megaterium</i>

^a Pod promotor se u ovom slučaju smatra uzvodna regulatorna regija gena koja obuhvaća promotorski dio i riboprekidač

^b Navedene plazmidne vektore nije bilo moguće dobiti zbog pretpostavljene toksičnosti u bakteriji *E. coli*

^c Produkt je dobiven hibridizacijom oligonukleotida (vidi poglavlje 3.2.3.6)

^d Rekombinantni plazmidni vektori napravljeni su u sklopu diplomskog rada Bartola Božića, mag. chem. ^[188]

Tablica 9.7. Popis vrsta korišten za konstrukciju filogenetskog stabla skupa s pripadnim pristupnim brojevima proteina IleRS iz baze *UniProt*.

Ime organizma	Pristupni broj	Ime organizma	Pristupni broj
<i>Acaryochloris marina</i>	B0C872	<i>Blochmannia pennsylvanicus</i>	Q493S3
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	A9NG38	<i>Bordetella avium</i>	Q2L2K5
<i>Acinetobacter baylyi</i>	Q6FG02	<i>Bordetella pertussis</i>	Q7VXK3
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	B3GZN4	<i>Bordetella petrii</i>	A9IRC2
<i>Aeromonas hydrophila</i>	A0KG39	<i>Borrelia afzelii</i>	Q0SM18
<i>Aeromonas salmonicida</i>	A4SIX5	<i>Borrelia bavariensis</i>	Q65ZU1
<i>Agrobacterium fabrum</i>	Q8UHH6	<i>Borrelia burgdorferi</i>	O51773
<i>Alcanivorax borkumensis</i>	Q0VSE1	<i>Borrelia hermsii</i>	B2S1H8
<i>Aliivibrio fischeri</i>	Q5E7N4	<i>Borrelia recurrentis</i>	B5RQH0
<i>Aliivibrio salmonicida</i>	B6EMY6	<i>Borrelia turicatae</i>	A1R0Q9
<i>Alkalimnicola ehrlichii</i>	Q0AAD1	<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	C0R112
<i>Anaplasma marginale</i>	Q5PAL9	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	Q89DF8
<i>Aquifex aeolicus</i>	O66651	<i>Brevibacillus brevis</i>	C0ZG86
<i>Arcobacter butzleri</i>	A8ES62	<i>Brucella abortus</i>	P0C124
<i>Aromatoleum aromaticum</i>	Q5P221	<i>Brucella melitensis</i>	Q8YB57
<i>Azotobacter vinelandii</i>	C1DPH5	<i>Buchnera aphidicola</i>	B8D8V0
<i>Bacillus anthracis</i>	Q81WE4	<i>Burkholderia lata</i>	Q39DM8
<i>Bacillus anthracis</i>	Q81R75	<i>Burkholderia mallei</i>	Q62HL4
<i>Bacillus cereus</i>	Q819R4	<i>Burkholderia multivorans</i>	A9AGN6
<i>Bacillus cereus</i>	Q81E30	<i>Caldanaerobacter subterraneus</i>	Q8R9L3
<i>Bacillus clausii</i>	Q5WFI3	<i>Caldicellulosiruptor bescii</i>	B9MRZ5
<i>Bacillus cytotoxicus</i>	A7GRM0	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	A4XKR2
<i>Bacillus halodurans</i>	Q9K9V0	<i>Campylobacter curvus</i>	A7GX26
<i>Bacillus licheniformis</i>	Q65JV7	<i>Campylobacter jejuni</i>	Q5HU41
<i>Bacillus megaterium</i>	A0A0B6A6A8	<i>Carboxydotherrmus hydrogenofomans</i>	Q3AEP2
<i>Bacillus megaterium</i>	A0A0B6AVD3	<i>Caulobacter vibrioides</i>	Q9AAA5
<i>Bacillus mycoides</i>	A9VTD5	<i>Chlamydia abortus</i>	Q5L5L0
<i>Bacillus subtilis</i>	Q45477	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Q9Z972
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Q6HER9	<i>Chlamydia trachomatis</i>	O84022
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Q6HJF2	<i>Chlamydomphila caviae</i>	Q822L8
<i>Bacteroides fragilis</i>	Q5LCU8	<i>Chlorobaculum tepidum</i>	Q8KFL5
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Q8A9K9	<i>Chromobacterium violaceum</i>	Q7NS57
<i>Bartonella henselae</i>	Q6G4S5	<i>Chromohalobacter salexigens</i>	Q1R0B5
<i>Bartonella quintana</i>	Q6G0K6	<i>Citrobacter koseri</i>	A8ALT6
<i>Baumannia cicadellinicola</i>	Q1LSS9	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Q97ES0
<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>	Q6MKX0	<i>Clostridium kluyveri</i>	A5N3P1
<i>Bifidobacterium longum</i>	Q8G3I2	<i>Clostridium novyi</i>	A0Q3B0
<i>Blochmannia floridanus</i>	Q7VQL0		

Ime organizma	Pristupni broj
<i>Clostridium perfringens</i>	Q8XHE4
<i>Clostridium tetani</i>	Q899C3
<i>Colwellia psychrerythraea</i>	Q486U0
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Q6NGD7
<i>Corynebacterium efficiens</i>	Q8FNV0
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Q8NNP0
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	Q4JW85
<i>Coxiella burnetii</i>	B6J1S2
<i>Crocospaera subtropica</i>	B1WVA3
<i>Cronobacter sakazakii</i>	A7MIM3
<i>Cupriavidus metallidurans</i>	Q1LJB8
<i>Cupriavidus necator</i>	Q0K7A0
<i>Cupriavidus pinatubonensis</i>	Q46XM7
<i>Cupriavidus taiwanensis</i>	B3R6E8
<i>Cutibacterium acnes</i>	Q6AB89
<i>Cytophaga hutchinsonii</i>	Q11NV4
<i>Dechloromonas aromatica</i>	Q47BK5
<i>Dehalococcoides mccartyi</i>	Q3Z7P5
<i>Deinococcus radiodurans</i>	Q9RUP8
<i>Desulfitobacterium hafniense</i>	B8FT35
<i>Desulforudis audaxviator</i>	B1I4A3
<i>Desulfotalea psychrophila</i>	Q6AK45
<i>Desulfotomaculum reducens</i>	A4J2F4
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	B8J3R3
<i>Desulfovibrio salexigens</i>	C6BV89
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	Q72AR5
<i>Dichelobacter nodosus</i>	A5EWT0
<i>Edwardsiella ictaluri</i>	C5B7M4
<i>Ehrlichia canis</i>	Q3YRX3
<i>Ehrlichia ruminantium</i>	Q5FH91
<i>Enterococcus faecalis</i>	Q836V1
<i>Erwinia tasmaniensis</i>	B2VGR6
<i>Escherichia coli</i>	B1IRE9
<i>Escherichia fergusonii</i>	B7LVN2
<i>Exiguobacterium sibiricum</i>	B1YIS7
<i>Fervidobacterium nodosum</i>	A7HMY6
<i>Fervidobacterium pennivorans</i>	Q9XDB4
<i>Francisella philomiragia</i>	B0TZQ5
<i>Francisella tularensis</i>	A7NAD2
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Q8RH47

Ime organizma	Pristupni broj
<i>Geobacillus kaustophilus</i>	Q5L0V9
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	A4IM25
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	Q747X9
<i>Gloeobacter violaceus</i>	Q7NF75
<i>Gloeotheca citrififormis</i>	B7KFT1
<i>Gluconobacter oxydans</i>	Q5FRI6
<i>Haemophilus ducreyi</i>	Q7VP34
<i>Haemophilus influenzae</i>	P43824
<i>Haemophilus somnus</i>	Q0I1V8
<i>Hahella chejuensis</i>	Q2S9T9
<i>Halorhodospira halophila</i>	A1WY38
<i>Halothermothrix orenii</i>	B8CWL4
<i>Helicobacter hepaticus</i>	Q7VGX8
<i>Helicobacter pylori</i>	P56456
<i>Herminiimonas arsenicoxydans</i>	A4G3E6
<i>Histophilus somni</i>	B0UV12
<i>Idiomarina loihiensis</i>	Q5QZS6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	B5Y235
<i>Kosmotoga olearia</i>	C5CHA1
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Q5FKU5
<i>Lactobacillus casei</i>	B3WDZ1
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Q1GAS8
<i>Lactobacillus fermentum</i>	B2GB86
<i>Lactobacillus helveticus</i>	A8YUP7
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	Q74JX6
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Q88V89
<i>Lactobacillus reuteri</i>	B2G6L2
<i>Lactobacillus sakei</i>	Q38XM0
<i>Lactobacillus salivarius</i>	Q1WTA9
<i>Lactococcus lactis</i>	Q9CEH8
<i>Laribacter hongkongensis</i>	C1DCX2
<i>Lawsonia intracellularis</i>	Q1MPH2
<i>Legionella pneumophila</i>	Q5ZWZ6
<i>Leifsonia xyli</i>	Q6AFZ0
<i>Leptospira biflexa</i>	B0STE5
<i>Leptospira borgpetersenii</i>	Q04QS6
<i>Leptospira interrogans</i>	Q72PR7
<i>Levilactobacillus brevis</i>	Q03QI3
<i>Listeria innocua</i>	Q929Z6
<i>Listeria monocytogenes</i>	B8DBR2

Ime organizma	Pristupni broj
<i>Listeria welshimeri</i>	A0AKC5
<i>Macrococcus caseolyticus</i>	B9EB60
<i>Mannheimia succiniciproducens</i>	Q65RQ2
<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	A1TTY9
<i>Mesoplasma florum</i>	Q6F175
<i>Mesorhizobium japonicum</i>	Q983N4
<i>Methylacidiphilum infernorum</i>	B3DYQ6
<i>Methylococcus capsulatus</i>	Q605M7
<i>Microcystis aeruginosa</i>	B0JSP4
<i>Moorella thermoacetica</i>	Q2RK59
<i>Mycobacterium leprae</i>	Q9X7E5
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	P9WVF3
<i>Mycolicibacterium paratuberculosis</i>	Q740U6
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	Q7NKG0
<i>Mycoplasma mobile</i>	Q6KHN7
<i>Natranaerobius thermophilus</i>	B2A2I8
<i>Nautilia profundicola</i>	B9L8Z9
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Q5FAF5
<i>Neisseria meningitidis</i>	Q9JYV4
<i>Nitrobacter winogradskyi</i>	Q3SPJ6
<i>Nitrosococcus oceani</i>	Q3J8W1
<i>Nitrosomonas europaea</i>	Q820M6
<i>Nocardia farcinica</i>	Q5YYW9
<i>Nostoc punctiforme</i>	B2IZP5
<i>Oceanobacillus iheyensis</i>	Q8ET99
<i>Oceanobacillus iheyensis</i>	Q8ER41
<i>Onion yellows phytoplasma</i>	Q6YR34
<i>Paraburkholderia phymatum</i>	B2JDY9
<i>Pasteurella multocida</i>	Q9CKF7
<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	Q6D0C3
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	C6DF04
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Q03EY9
<i>Pelagibacter ubique</i>	Q4FPA9
<i>Pelobacter carbinolicus</i>	Q3A1R3
<i>Persephonella marina</i>	C0QP76
<i>Petrotoga mobilis</i>	A9BI29
<i>Photobacterium profundum</i>	Q6LUL1
<i>Photorhabdus laumondii</i>	Q7N8X2

Ime organizma	Pristupni broj
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Q7MUD3
<i>Prochlorococcus marinus</i>	Q7V352
<i>Proteus mirabilis</i>	B4F2T5
<i>Protochlamydia amoebophila</i>	Q6MDY1
<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	Q15R04
<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	Q3IEA2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Q9HVM4
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Q8L1B1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	P18330
<i>Pseudomonas mendocina</i>	A4XQV5
<i>Pseudomonas putida</i>	Q88Q92
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	A4VI60
<i>Pseudomonas syringae</i>	Q889E4
<i>Pseudothromotoga lettingae</i>	A8F465
<i>Psychrobacter arcticus</i>	Q4FUS5
<i>Psychromonas ingrahamii</i>	A1SZP3
<i>Ralstonia pickettii</i>	B2UAQ4
<i>Rhodopirellula baltica</i>	Q7UNZ2
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	Q6N1M8
<i>Rickettsia bellii</i>	A8GW18
<i>Rickettsia conorii</i>	Q92H19
<i>Rickettsia felis</i>	Q4UMD8
<i>Rickettsia typhi</i>	Q68WC2
<i>Rippkaea orientalis</i>	B7K5H5
<i>Ruegeria pomeroyi</i>	Q5LNR7
<i>Ruthia magnifica</i>	A1AW09
<i>Saccharophagus degradans</i>	Q21HK3
<i>Salmonella typhi</i>	Q8Z9N2
<i>Serratia proteamaculans</i>	A8G9L4
<i>Shewanella halifaxensis</i>	B0TJA9
<i>Shewanella sediminis</i>	A8FSI2
<i>Shigella boydii</i>	Q326J7
<i>Shigella dysenteriae</i>	Q32K71
<i>Shigella flexneri</i>	Q83MH2
<i>Shigella sonnei</i>	Q3Z5Y4
<i>Sodalis glossinidius</i>	Q2NVY6
<i>Staphylococcus aureus</i>	P41368
<i>Staphylococcus aureus</i>	P41972
<i>Staphylococcus carnosus</i>	B9DPP7
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Q8CSX1

Ime organizma	Pristupni broj	Ime organizma	Pristupni broj
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Q4L5P4	<i>Thioalkalivibrio sulfidiphilus</i>	B8GQR1
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Q49WX5	<i>Thiobacillus denitrificans</i>	Q3SHS3
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	B2FTJ0	<i>Treponema denticola</i>	Q73JB2
<i>Streptococcus mutans</i>	Q8DVD3	<i>Treponema pallidum</i>	O83466
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	B8ZM55	<i>Tropheryma whipplei</i>	Q83I16
<i>Streptococcus pyogenes</i>	P0DG42	<i>Ureaplasma parvum</i>	Q9PQ79
<i>Streptococcus sanguinis</i>	A3CLP4	<i>Vesicomysocius okutanii</i>	A5CX61
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Q5M4X2	<i>Vibrio campbellii</i>	A7MTD6
<i>Streptomyces avermitilis</i>	Q82AC9	<i>Vibrio cholerae</i>	Q9KU47
<i>Streptomyces coelicolor</i>	Q9S2X5	<i>Vibrio tasmaniensis</i>	B7VJ87
<i>Streptomyces griseus</i>	B1W0J8	<i>Vibrio vulnificus</i>	Q8DES7
<i>Sulfurimonas denitrificans</i>	Q30SH2	<i>Wigglesworthia glossinidia brevipalpis</i>	Q8D2R0
<i>Symbiobacterium thermophilum</i>	Q67Q27	<i>Wolbachia pipientis</i>	Q73HW7
<i>Syntrophomonas wolfei</i>	Q0AYC7	<i>Wolbachia sp. subsp. Brugia malayi</i>	Q5GSS3
<i>Teredinibacter turnerae</i>	C5BQX2	<i>Wolinella succinogenes</i>	Q7MAL0
<i>Thermoanaerobacter pseudethanolicus</i>	B0K8R7	<i>Xanthomonas axonopodis</i>	Q8PN19
<i>Thermobifida fusca</i>	Q47QV9	<i>Xanthomonas campestris</i>	Q4US40
<i>Thermosipho africanus</i>	B7IGT1	<i>Xanthomonas oryzae</i>	Q5H2E1
<i>Thermosipho melanesiensis</i>	A6LK77	<i>Xylella fastidiosa</i>	Q87BL5
<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	Q8DGI7	<i>Yersinia enterocolitica</i>	A1JJE1
<i>Thermotoga neapolitana</i>	B9K8X3	<i>Yersinia pestis</i>	Q8ZIM0
<i>Thermotoga petrophila</i>	A5IML2	<i>Zymomonas mobilis</i>	Q5NQQ7
<i>Thermus thermophilus</i>	Q72JR6	<i>Escherichia coli ValRS</i>	P07118

Tablica 9.8. Popis vrsta s pripadajućim pristupnim brojevima genoma u bazi NCBI korištenih za generiranje konsenzus genomske okoline, riboprekidača, promotora i slijeda Shine-Dalgarno (SD). Plus (+) označava da je vrsta korištena prilikom odgovarajuće analize.

Ime organizma	NCBI pristupni broj	<i>ileS</i> ^a	genomska okolina ^a	ribo prekiđač	promotor i SD
<i>B. aerolatus</i>	NZ_WEIO01000002	1	+	–	–
<i>B. albus</i>	NZ_SDFS01000002	1	+	+	+
<i>B. albus</i>	NZ_SDFS01000001	2	+	+	+
<i>B. altitudinis</i>	NZ_CP011150	1	+	+	+
<i>B. amyloliquefactiens</i>	NC_020272	1	+	+	+
<i>B. anthracis</i>	NC_007530	1	+	+	+
<i>B. anthracis</i>	NC_007530	2	+	+	+
<i>B. aquiflavi</i>	NZ_JAAIWN010000022	1	+	+	+
<i>B. aquimaris</i>	NZ_LQXM01000029	1	+	+	+

Ime organizma	NCBI pristupni broj	<i>ileS</i> ^a	genomska okolina ^a	ribo prekidač	promotor i SD
<i>B. aryabhatai</i>	NZ_CP024035	1	+	+	+
<i>B. aryabhatai</i>	NZ_CP024035	2	–	+	+
<i>B. atrophaeus</i>	NZ_CP007640	1	+	+	+
<i>B. australimaris</i>	NZ_LGYN01000026	1	+	+	+
<i>B. azotoformans</i>	NZ_AJLR01000035	1	+	+	+
<i>B. bingmayongienseis</i>	NZ_JH921517	1	+	+	+
<i>B. bingmayongienseis</i>	NZ_AKCS01000005	2	+	–	–
<i>B. caeni</i>	NZ_SWLG01000025	1	+	+	+
<i>B. camelliae</i>	NZ_PIQO01000001	1	+	+	+
<i>B. cereus</i>	NZ_CP072774	1	+	+	+
<i>B. cereus</i>	NZ_CP072774	2	+	+	+
<i>B. circulans</i>	NZ_CP053989	1	+	+	+
<i>B. circulans</i>	NZ_CP053989	2	–	+	+
<i>B. clausii</i>	NZ_NPBN01000012	1	+	+	+
<i>B. coagulans</i>	FQUB01000028.1	1	+	+	+
<i>B. coahuilensis</i>	NZ_LDYG01000024	1	+	+	+
<i>B. cohnii</i>	NZ_CP018866	1	+	+	+
<i>B. cytotoxicus</i>	NZ_CP024109	1	+	+	+
<i>B. daliensis</i>	NZ_FNIL01000001	1	+	+	+
<i>B. enclensis</i>	NZ_FMAU01000002	1	+	+	+
<i>B. endophyticus</i>	NZ_LWAG01000029	1	+	+	+
<i>B. endozanthoxylicus</i>	NZ_VYKL01000015	1	+	+	+
<i>B. filamentosus</i>	NZ_NQYF01000001	1	+	+	+
<i>B. flexus</i>	NZ_JAEMWV010000001	1	+	+	+
<i>B. fortis</i>	NZ_VEKZ01000002	1	+	+	+
<i>B. freudenreichii</i>	NZ_FNIL01000001	1	+	+	+
<i>B. fungorum</i>	NZ_NWUW01000002	1	+	+	+
<i>B. fungorum</i>	NZ_NWUW01000014	2	+	+	+
<i>B. gaemokensis</i>	NZ_LTAQ01000001	1	+	+	+
<i>B. gaemokensis</i>	NZ_LTAQ01000034	2	+	+	+
<i>B. galactosidilyticus</i>	NZ_LDJR01000037	1	+	–	–
<i>B. gindengihumi</i>	NZ_JAAIWK010000002	1	+	+	+
<i>B. glennii</i>	NZ_QVTD01000006	1	+	+	+
<i>B. glycinifermentans</i>	NZ_CP035232	1	+	+	+
<i>B. gobiensis</i>	NZ_CP012600	1	+	+	+
<i>B. halodurans</i>	NC_002570	1	+	+	+
<i>B. halotolerans</i>	NZ_CP029364	1	+	+	+
<i>B. haynesii</i>	NZ_MRBL01000005	1	+	+	+
<i>B. hisashii</i>	NZ_NJGA01000028	1	+	+	+
<i>B. idriensis</i>	NZ_CAJFZX010000003	1	+	+	+

Ime organizma	NCBI pristupni broj	<i>ileS</i> ^a	genomska okolina ^a	ribo prekidač	promotor i SD
<i>B. infantis</i>	NC_022524	1	+	+	+
<i>B. infantis</i>	NC_022524	2	–	+	+
<i>B. intestinalis</i>	NZ_MUXL01000001	1	+	+	+
<i>B. koreensis</i>	NZ_LILC01000032	1	+	+	+
<i>B. koreensis</i>	NZ_LILC01000037	2	–	+	+
<i>B. kyonggiensis</i>	NZ_SWBM01000001	1	+	+	+
<i>B. kyonggiensis</i>	NZ_SWBM01000003	2	–	+	+
<i>B. lentus</i>	NZ_LS483476	1	+	+	+
<i>B. licheniformis</i>	NZ_CP014842	1	+	+	+
<i>B. luti</i>	NZ_CP040336	1	+	+	+
<i>B. luti</i>	NZ_CP040336	2	+	+	+
<i>B. manliponensis</i>	NZ_JOTN01000002	1	+	+	+
<i>B. manliponensis</i>	NZ_JOTN01000015	2	+	+	+
<i>B. marisflavi</i>	NZ_LGUE01000001	1	+	+	+
<i>B. marisflavi</i>	NZ_LGUE01000001	2	–	+	+
<i>B. megaterium</i>	CP009920	1	+	+	+
<i>B. megaterium</i>	CP009920	2	–	+	+
<i>B. mobilis</i>	NZ_JAAFYT010000005	1	+	+	+
<i>B. mobilis</i>	NZ_JAAFYT010000010	2	+	+	+
<i>B. mojavensis</i>	NZ_CP051464	1	+	+	+
<i>B. mycooides</i>	NZ_CP035997	1	+	+	+
<i>B. mycooides</i>	NZ_CP035997	2	+	+	+
<i>B. nakamura</i>	NZ_LSAZ01000041	1	+	+	+
<i>B. nealsonii</i>	NZ_PISE01000046	1	+	+	+
<i>B. nealsonii</i>	NZ_PISE01000018	2	–	+	+
<i>B. nitratireducens</i>	NZ_MAOC01000007	1	+	+	+
<i>B. nitratireducens</i>	NZ_MAOC01000020	2	+	+	+
<i>B. obstructivus</i>	NZ_MPHG01000191	1	+	+	+
<i>B. obstuctivus</i>	NZ_MPHG01000148	2	–	+	+
<i>B. oleivorans</i>	NZ_OAOP01000007	1	+	+	+
<i>B. pacificus</i>	NZ_NJQG01000001	1	+	+	+
<i>B. pacificus</i>	NZ_NJQG01000009	2	+	+	+
<i>B. paralicheniformis</i>	NZ_CP023665	1	+	+	+
<i>B. paramycooides</i>	NZ_JACAXA010000005	1	+	+	+
<i>B. paramycooides</i>	NZ_JACAXA010000018	2	+	+	+
<i>B. paranthracis</i>	NZ_VOVG01000001	1	+	+	+
<i>B. paranthracis</i>	NZ_VOVG01000003	2	+	+	+
<i>B. piezotolerans</i>	NZ_QNQT01000001	1	+	+	+
<i>B. piezotolerans</i>	NZ_QNQT01000002	2	–	+	+
<i>B. pseudomycooides</i>	NZ_CM000745	1	+	+	+

Ime organizma	NCBI pristupni broj	<i>ileS</i> ^a	genomska okolina ^a	ribo prekidač	promotor i SD
<i>B. pseudomycooides</i>	NZ_CM000745	2	+	+	+
<i>B. pumilus</i>	NZ_PVQT01000001	1	+	+	+
<i>B. safensis</i>	NZ_CP043404	1	+	+	+
<i>B. saganii</i>	NZ_QVTE01000066	1	+	+	+
<i>B. salacetis</i>	NZ_QXIR01000005	1	+	+	+
<i>B. salarius</i>	NZ_RBVX01000025	1	+	+	+
<i>B. shackletonii</i>	NZ_LJJC01000004	1	+	+	+
<i>B. shackletonii</i>	NZ_LJJC01000015	2	–	+	+
<i>B. siamensis</i>	NZ_AJVF01000013	1	+	+	+
<i>B. smithii</i>	NZ_CP012024	1	+	+	+
<i>B. solimangrovi</i>	NZ_MJEH01000063	1	+	+	–
<i>B. solimangrovi</i>	NZ_MJEH01000064	2	–	–	–
<i>B. sonorensis</i>	NZ_LDIP01000021	1	+	+	+
<i>B. sporothermodurans</i>	NZ_NAZB01000011	1	+	+	+
<i>B. subtilis</i>	NC_000964	1	+	+	+
<i>B. swezeyi</i>	NZ_VTEL01000001	1	+	+	+
<i>B. taenensis</i>	NZ_QOCW01000040	1	+	+	+
<i>B. taxi</i>	NZ_RZTZ01000001	1	+	+	+
<i>B. taxi</i>	NZ_RZTZ01000012	2	–	+	+
<i>B. tequilensis</i>	NZ_CP048852	1	+	+	+
<i>B. terrae</i>	NZ_QYTW02000003	1	+	+	+
<i>B. thermoamylovorans</i>	NZ_CP023704	1	+	+	+
<i>B. thuringiensis</i>	NZ_CM000753	1	+	+	+
<i>B. thuringiensis</i>	NZ_CM000753	2	+	+	+
<i>B. timonensis</i>	NZ_CABKRH010000001	1	+	+	–
<i>B. toyonensis</i>	NZ_JH792135	1	+	+	+
<i>B. toyonensis</i>	NZ_JH792135	2	+	+	+
<i>B. tropicus</i>	NZ_CP049019	1	+	+	+
<i>B. tropicus</i>	NZ_CP049019	2	+	+	+
<i>B. urumquiensis</i>	NZ_PVNS01000009	1	+	+	+
<i>B. vallismortis</i>	NZ_CP033052	1	+	+	+
<i>B. vietnamensis</i>	NZ_BCVQ01000010	1	+	+	+
<i>B. vietnamensis</i>	NZ_BCVQ01000027	2	–	+	+
<i>B. wiedmannii</i>	NZ_CP032365	1	+	+	+
<i>B. wiedmannii</i>	NZ_CP032365	2	+	+	+
<i>B. xiamenensis</i>	NZ_CP017786	1	+	+	+
<i>B. yapensis</i>	NZ_RXNT01000002	1	+	+	+
<i>B. yapensis</i>	NZ_RXNT01000013	2	–	+	+

Ime organizma	NCBI pristupni broj	<i>ileS</i> ^a	genomska okolina ^a	ribo prekidač	promotor i SD
<i>B. zhangzhouensis</i>	NZ_JOTP01000002	1	+	+	+
<i>S. avermitilis</i>	NC_003155	2	+	–	–
<i>S. aureofaciens</i>	NZ_JPRF03000032	2	+	–	–
<i>S. coelicolor</i>	NC_003888	2	+	–	–
<i>S. lividans</i>	CP071800	2	+	–	–
<i>S. griseus</i>	AP009493	2	+	–	–
<i>S. thermoviolaceus</i>	NZ_BMVZ01000002	2	+	–	–

^a Geni *ileS* klasificirani su kao *ileS1* ili *ileS2* na temelju filogenetske analize proteinske sekvence analogno kao na slici 4.2 (vidi poglavlje 3.2.1.3 materijala i metoda)

Tablica 9.9. Kinetički parametri inhibicije aktivnosti enzima IleRS2 mupirocinom u uvjetima ustaljenog stanja u reakciji aktivacije mjereni metodom izmjene pirofosfata.^a

Supstrat	$K_m / \mu\text{mol dm}^{-3}$	$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	$K_i / \mu\text{mol}^{-1} \text{dm}^3$
Izoleucin	$48,5 \pm 2,5$	66 ± 1	$1,08 \pm 0,06$
ATP	$(1,7 \pm 0,1) \times 10^3$	65 ± 1	$1,04 \pm 0,04$

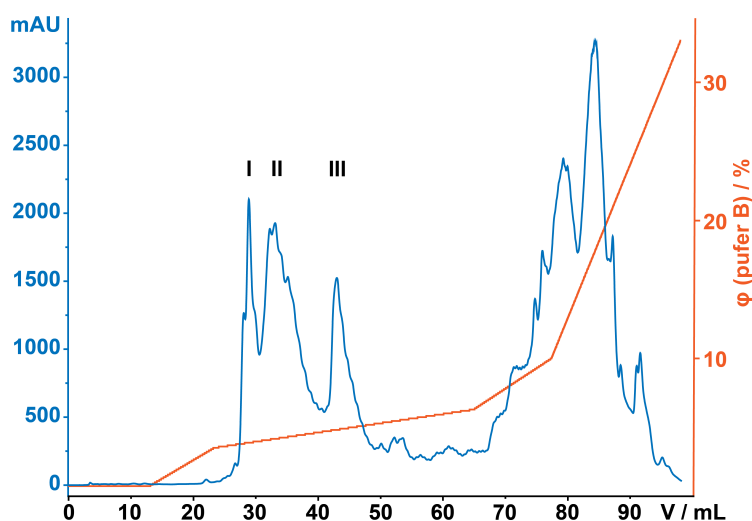
^a Mjerenja su napravljena korištenjem enzima nadeksprimiranih u bakteriji *E. coli*

Mjerenja su ponovljena najmanje tri puta, a vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost \pm SEM

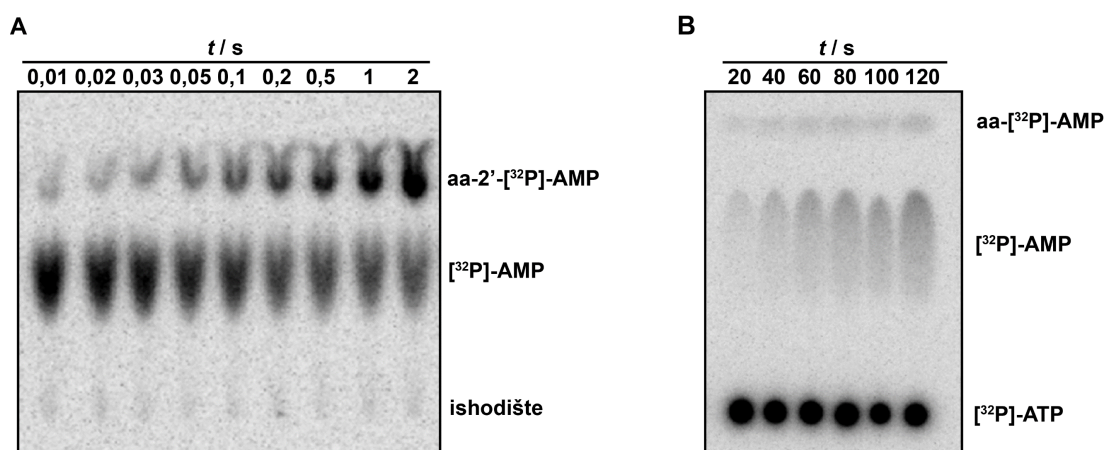
Tablica 9.10. Brzina rasta sojeva bakterije *B. megaterium* u bogatom i siromašnom mediju.

Soj ^b	Bogati (LB) medij	Siromašni (minimalni) medij
	r^a / h^{-1}	
WT	$0,918 \pm 0,051$	$0,478 \pm 0,011$
$\Delta ileS1$	$0,889 \pm 0,054$	$0,435 \pm 0,008$
$\Delta ileS2$	$0,863 \pm 0,070$	$0,479 \pm 0,012$

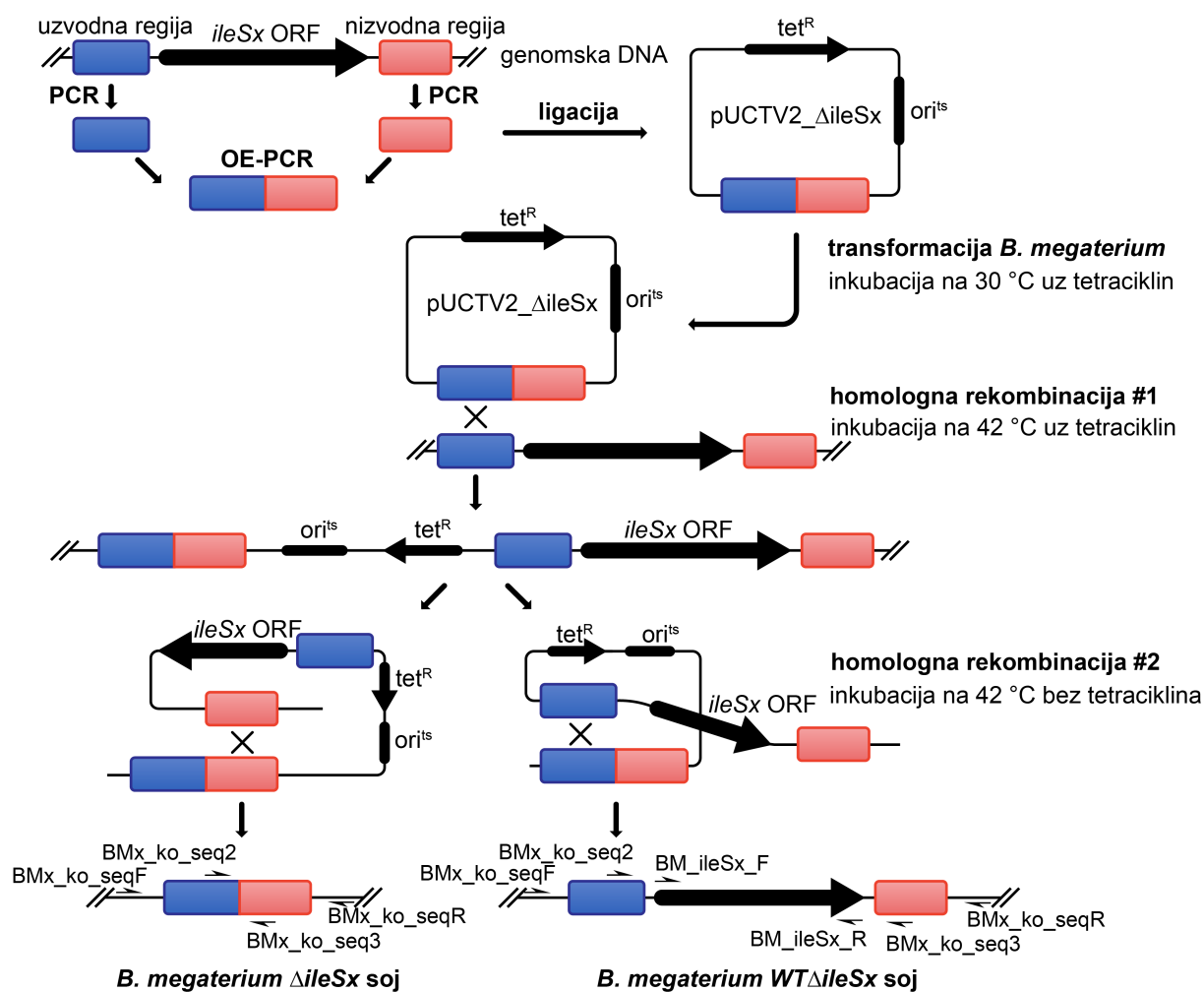
^a Brzina rasta sojeva dobivena je utočnjavanjem podataka iz eksponencijalne faze rasta ($OD_{600} < 1,2$) u eksponencijalnu jednadžbu rasta (3.1)



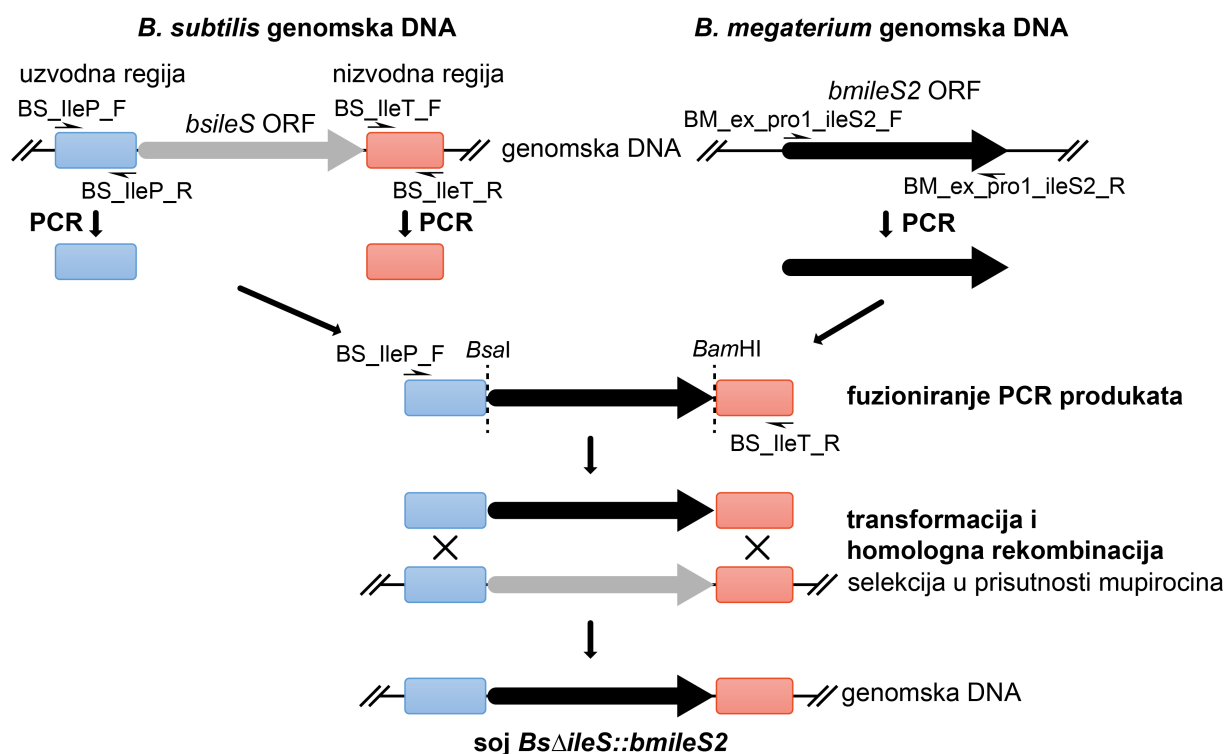
Slika 9.1. Reprezentativan kromatogram pročišćavanja ukupne tRNA bakterije *E. coli* s nadeksprimiranom *B. megaterium* tRNA^{Ile}. Pročišćavanje je napravljeno kromatografijom obrnutih faza korištenjem kolone Jupiter 4C 5 μ m 300 Å 4,6 \times 250 mm (*Phenomenex*). Na kolonu je nanoseno oko 3 mg ukupne tRNA. Sve tri frakcije (I, II, III) pokazale su visoku akceptorsku aktivnost (> 95 %, mjereno korištenjem [¹⁴C]-Ile). Iako se frakcija 3 inicijalno pokazala kinetički najkompetentnijom, detaljnim analizama nije uočena značajna razlika u opaženom koeficijentu brzine aminoacilacije u odnosu na nepročišćenu tRNA, dok su se frakcije I i II pokazale značajno sporije. Za detalje vidi referencu [188].



Slika 9.2. Reprezentativni kromatogram razdvajanja radioaktivnih produkata i reaktanata. A) Reprezentativni kromatogram razdvajanja aa-2'-[³²P]-AMP i [³²P]-AMP. Udio nastalog aa-2'-[³²P]-AMP-a određen je omjerom intenziteta signala nastalog aa-2'-[³²P]-AMP-a u ukupnoj radioaktivnosti, dok je koncentracija nastale aa-[³²P]-tRNA^{Ile} određena umnoškom tRNA^{Ile} dodane u reakcijsku smjesu i udjela nastalog aa-2'-[³²P]-AMP-a, te korigirana s obzirom na udio aktivne tRNA^{Ile}. B) Reprezentativan kromatogram razdvajanja aa-[³²P]-AMP, [³²P]-AMP i [³²P]-ATP. Koncentracija nastalog [³²P]-AMP-a određena je umnoškom dodanog [³²P]-ATP-a u reakcijsku smjesu i udjela [³²P]-AMP-a u ukupnoj radioaktivnosti. U slučaju nastanka zamjetne količine aa-[³²P]-AMP-a, signali aa-[³²P]-AMP i [³²P]-AMP kvantificirani su zajedno.



Slika 9.3. Shematski prikaz konstrukcije sojeva $\Delta ileS1$ i $\Delta ileS2$ bakterije *B. megaterium*. Regije uzvodno (plavo) i nizvodno (crveno) od gena *ileSx* (otprilike 1 kb) umnožene su reakcijom PCR iz genomске DNA bakterije *B. megaterium* i povezane lančanom reakcijom polimerazom metodom preklapajućih regija (OE-PCR). Finalni PCR produkt je ugrađen u plazmidni vektor pUCTV2 koji sadrži gen za rezistenciju na tetraciklin (tet^R) te temperaturno osjetljivo ishodište replikacije (ori^{ts}). Pomoću dva rekombinacijska događaja između homolognih regija na plazmidu i genomskoj DNA dobiveni su sojevi koji ne sadrže gen *ileSx* ($\Delta ileSx$), odnosno sojevi koji su prošli cijeli postupak, ali nije došlo do izgradnje gena *ileSx* ($WT\Delta ileSx$ soj). Konačno, iz dobivenih sojeva izolirana je genomска DNA, te je reakcijom PCR korištenjem navedenih početnica potvrđeno uspješno stvaranje sojeva (vidi sliku 4.26). Slovo x označava broj 1 ili 2, te se odnosi na gen *ileS1*, odnosno *ileS2*.



Slika 9.4. Shematski prikaz konstrukcije soja bakterije *B. subtilis* s genom *bmileS2* umjesto nativnog gena *ileS* (*BsΔileS::bmileS2*). Iz genoma bakterije *B. subtilis* umnožene su uzvodna (plavo) i nizvodna (crveno) regija gena *ileS* (sivo), dok je iz genoma bakterije *B. megaterium* umnožen kodirajući slijed za protein *BmIleRS2*. Dobiveni PCR produkti fuzionirani su na način da se promotorska regija poveže s genom *bmileS2* u istom okviru čitanja kao i kod nativnog gena *bsileS*. Za transformaciju prirodno kompetentnih stanica *B. subtilis* korišteno je 2 μg DNA uz dodatak mupirocina ($c = 100 \text{ nmol dm}^{-3}$). Niska koncentracija mupirocina nije letalna za bakteriju *B. subtilis*, a pomaže izgradnji nativnog gena *ileS* iz genoma. Nakon oporavka, stanice su nanosene na kruti hranjivi medij uz dodatak mupirocina ($c = 5 \text{ μmol dm}^{-3}$). Navedenim postupkom dobivene su najmanje tri biološke replike soja *BsΔileS::bmileS2*.

§ 10. ŽIVOTOPIS

Vladimir Zanki završio je preddiplomski studij biologije i diplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od siječnja 2017. zaposlen je kao asistent na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Sudjeluje u izvođenju seminarske i praktikumske nastave iz biokemijskih kolegija za studente preddiplomskih i diplomskih studija PMF-a. Doktorski studij kemije, smjer biokemija, upisao je u akademskoj godini 2018./2019. Znanstveno se usavršavao tri mjeseca u laboratoriju prof. Jeffa Erringtona, Newcastle University, Newcastle upon Tyne, Velika Britanija u sklopu dobivene stipendije od Europske organizacije za molekularnu biologiju (EMBO). Neposredni je voditelj jednog diplomskog rada i jednog rada nagrađenog Rektorovom nagradom Sveučilišta u Zagrebu.

Znanstvene publikacije:

1. **V. Zanki**, B. Bozic, M. Mocibob, N. Ban, I. Gruic-Sovulj, *Protein Sci.* **31** (2022) e4418, doi: 10.1002/pro.4418.
2. L. Pang, **V. Zanki**, S. V. Strelkov, A. V. Aerschot, I. Gruic-Sovulj, S. D. Weeks, *Commun. Biol.* **5** (2022) 883, doi: 10.1038/s42003-022-03825-8.
3. M. Kekez, **V. Zanki**, I. Antičević, J. Rokov-Plavec, A. Maršavelski, *Int. J. Biol. Macromol.* **192** (2021) 692-700.
4. M. Kekez, **V. Zanki**, I. Kekez, J. Baranasic, V. Hodnik, A.-M. Duchêne, G. Anderluh, I. Gruic-Sovulj, D. Matković-Čalogović, I. Weygand-Durasevic, J. Rokov-Plavec, *FEBS J.* **286** (2019) 536-554.
5. G. Josipović, V. Tadić, M. Klasić, **V. Zanki**, I. Bečeheli, F. Chung, A. Ghantous, T. Keser, J. Madunić, M. Bošković, G. Lauc, Z. Herceg, A. Vojta, V. Zoldoš, *Nucleic Acids Res.* **47** (2019) 9637-9657.

Sudjelovanja na konferencijama:

1. **Zanki, Vladimir**; Božić, Bartol; Gruić-Sovulj, Ita, *Isoleucyl-tRNA synthetase carrying antibiotic resistance cannot support sporulation and biofilm formation in Bacillus*

- megaterium*, The 45th FEBS Congress: Molecules of Life: Towards New Horizons, Ljubljana, Slovenija (virtualno), 2021.
2. **Zanki, Vladimir**; Gruić-Sovulj, Ita, *Izoleucil-tRNA-sintetaza tipa I presudna je za sporulaciju i nastanak biofilmova u bakteriji Bacillus megaterium*, Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a, Zagreb, Hrvatska, 2020.
 3. **Zanki, Vladimir**; Gruić-Sovulj, Ita, *Two IleRSs in Bacillus megaterium: is there a difference?*, Molecular biophysics: ABC of the puzzle of life, Zagreb, Hrvatska, 2019.
 4. **Zanki, Vladimir**; Gruić-Sovulj, Ita, *IleRS2 is responsible for mupirocin resistance of Bacillus megaterium*, Bacell 2019, Ljubljana, Slovenija, 2019.
 5. **Zanki, Vladimir**; Gruić-Sovulj, Ita, *Two distinct IleRS proteins in Bacillus megaterium and their possible roles in adaptation to various stress conditions*, HDBMB2019 - Crossroads in Life Sciences, Lovran, Hrvatska, 2019.
 6. Tadić, Vanja; Dobrinić, Paula; Josipović, Goran; **Zanki, Vladimir**; Klasić, Marija; Vojta, Aleksandar; Zoldoš, Vlatka, *CRISPR/Cas9-based molecular tools for epigenetic manipulations*, 10th ISABS Conference on Forensic and Anthropologic Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualized Medicine, Dubrovnik, Hrvatska, 2017.