Dinamika sklapanja aminoacil-tRNA-sintetaznog kompleksa

Crnković, Ana

Doctoral thesis / Disertacija

2014

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:783710

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Ana Crnković

DINAMIKA SKLAPANJA AMINOACIL-tRNA-SINTETAZNOG KOMPLEKSA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2014.



Sveučilište u Zagrebu

FACULTY OF SCIENCE

Ana Crnković

DYNAMICS OF AN AMINOACYL-tRNA SYNTHETASE COMPLEX ASSEMBLY

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2014.

Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

ANA CRNKOVIĆ

DINAMIKA SKLAPANJA AMINOACIL-tRNA-SINTETAZNOG KOMPLEKSA

DOKTORSKI RAD

Mentori:
dr.sc. Ivana Weygand-Đurašević, red. prof.
dr.sc. Ita Gruić Sovulj, izv. prof.

Zagreb, 2014.



Sveučilište u Zagrebu

FACULTY OF SCIENCE

Ana Crnković

DYNAMICS OF AN AMINOACYL-tRNA SYNTHETASE COMPLEX ASSEMBLY

DOCTORAL THESIS

Supervisors:
dr.sc. Ivana Weygand-Đurašević, Professor
dr.sc. Ita Gruić Sovulj, Associate Professor

Zagreb, 2014.

Ovaj rad posvećen je mojoj mentorici Ivani Weygand-Đurašević.

Zahvale

Zahvalna sam svojoj mentorici red. prof. dr. Ivani Weygand-Đurašević što me prihvatila (kako davno!) najprije kao diplomanda, potom kao novaka. Što me znanstveno obrazovala i što me motivirala, što je njena podrška uvijek bila neupitna. Neobično mi zvuči isticati osobine koje su neraskidivo povezane s njenim likom, ali hvala joj na neizmjernoj radnoj etici, na čovječnosti i toleranciji.

Veliko hvala mentorici izv. prof. dr. Iti Gruić Sovulj što me „udomila" u zadnjim fazama doktorata, pored svih svojih drugih zaduženja. Hvala na povjerenju i pomoći, na stručnim savjetima i zanimljivim znanstvenim diskusijama.

Hvala svim članovima Zavoda za biokemiju na prijateljstvu i savjetima-Mariju, Maji, Vesni, Igoru, Vlatki, Mirni, Neveni, Morani, Marku, Jeleni, Sonji, Jasmini i doc. Borisu Mildneru: od svakoga sam imala prilike naučiti!

Hvala profesoru Anderluhu i Vesni Hodnik: bilo mi je prekrasno raditi s vama i kod vas!

Hvala mojoj diplomandici Mireli na trudu, radu i prijateljstvu.

Hvala Antunu i roditeljima, sretna sam što ste mi „mama samipe".

SADRŽAJ

SAŽETAK X
ABSTRACT XI
1 Uvod 1
2 Literaturni pregled 6
2.1 Opći pregled translacije 6
2.2 Transfer RNA 8
2.3 Aminoacil-tRNA-sintetaze 9
2.3.1 Opće značajke i podjela na razrede 9
2.3.2 Popravak pogreške 13
2.3.3 Nediskriminirajuće aminoacil-tRNA-sintetaze 15
2.3.4 Multisintetazni kompleksi 21
2.4 Seril-tRNA-sintetaza 23
2.4.1 Prepoznavanje $tRNA^{Ser}$ 24
2.4.2 Konformacijske promjene SerRS inducirane vezanjem $tRNA^{Ser}$ 27
2.4.3 Struktura $tRNA^{Ser}$ 27
2.4.4 Građa aktivnog mjesta SerRS bakterijskog tipa 29
2.4.5 Opće topološke značajke metanogenih seril-tRNA-sintetaza 31
2.4.6 Građa aktivnog mjesta metanogenih seril-tRNA-sintetaza 32
2.4.7 Modularnost seril-tRNA-sintetaza - domena UNE-S 34
2.5 Arginil-tRNA-sintetaza 35
2.5.1 Opće topološke značajke arginil-tRNA-sintetaze 35
2.5.2 Prepoznavanje $tRNA^{Arg}$ 36
2.5.3 Aktivno mjesto ternarnog kompleksa 42
2.6 Molekula tRNA i njene uloge izvan translacije 45
2.6.1 Sazrijevanje tRNA 46
3 Materijali i metode 49
3.1 Materijali 49
3.1.1 Standardne kemikalije 49
3.1.2 Aminokiseline i nukleotidi 49
3.1.3 Enzimi i ostali proteini 49
3.1.4 Boje 50
3.1.5 Sastojci tekućih i krutih hranjivih podloga za uzgoj *E. coli* 50
3.1.6 Sojevi i plazmidi *E. coli* 50
3.1.7 Ostale kemikalije i komercijalni kompleti 52
3.1.8 Kromatografske kolone i punila 52
3.1.9 Elektroforetski i neki kromatografski puferi 52
3.1.10 Čipovi za metodu rezonancije površinskih plazmona 53
3.2 Metode 53
3.2.1 Bioinformatički alati 53
3.2.2 Određivanje koncentracije proteina 55
3.2.3 Snimanje fluorescencijskih spektara 57
3.2.4 Snimanje spektara cirkularnog dikroizma 57
3.2.5 Elektroforetske metode 57
3.2.5.1 Elektroforeza na gelu agaroze 57
3.2.5.2 Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u prisustvu SDS-a 58
3.2.5.3 *Western*-analiza 59
3.2.5.4 Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u prisustvu ureje 61
3.2.6 Bojanje gelova srebrom 62
3.2.7 Metode rekombinantne DNA 64

3.2.7.1 Lančana reakcija polimeraze ... 64
3.2.7.2 Razgradnja DNA restrikcijskim endonukleazama ... 66
3.2.7.3 Pročišćavanje DNA-fragmenata iz gela ... 67
3.2.7.4 Ligacija DNA pomoću T4 DNA-ligaze ... 67
3.2.7.5 Priprema kemijski kompetentnih stanica *E. coli* ... 68
3.2.7.6 Transformacija kompetentnih stanica ... 68
3.2.7.7 Određivanje nukleotidnog slijeda DNA – sekvenciranje ... 69
3.2.7.8 Određivanje koncentracija DNA i RNA ... 69
3.2.8 Metode rada s proteinima ... 69
3.2.8.1 Prekomjerna ekspresija rekombinantnih proteina ... 69
3.2.8.2 Otvaranje stanica soniciranjem ... 70
3.2.8.3 Afinitetna kromatografija ... 71
3.2.8.4 Pročišćavanje rekombinantnih proteina u nativnom obliku ... 71
3.2.8.5 Gel-filtracija ... 73
3.2.9 Metode rada s tRNA ... 73
3.2.9.1 Izolacija RNA iz stanica domaćina ... 73
3.2.9.2 Odvajanje tRNA od nukleinskih kiselina većih molekulskih masa ... 74
3.2.9.3 Kromatografija ionske izmjene ... 74
3.2.9.4 Kromatografija obrnutih faza ... 75
3.3 Detekcija nekovalentnih kompleksa aaRS:tRNA ... 76
3.3.1 Nativna elektroforeza na poliakrilamidnom gelu ... 76
3.3.2 Detekcija metodom rezonancije površinskih plazmona ... 77
3.4 Detekcija nekovalentnih kompleksa MtSerRS:MtArgRS ... 78
3.4.1 Metoda afinitetnog supročišćavanja ... 78
3.4.1.1 Određivanje ravnotežne konstante za interakciju [SerRS:tRNA^{Ser}] s proteinskim partnerom ArgRS korištenjem afinitetnog supročišćavanja ... 78
3.4.2 Metoda rezonancije površinskih plazmona ... 79
3.5 Enzimski testovi ... 80
3.5.1 Određivanje akceptorske aktivnosti tRNA ... 80
3.5.2 Određivanje kinetičkih parametara K_m i k_{cat} za tRNA^{Arg} ... 81
4 Rezultati ... 82
4.1 Stvaranje strukturnih modela i uvod u pristup istraživanju ... 82
4.2 Proizvodnja rekombinantnih proteina metodom rekombinantne DNA ... 85
4.3 Proizvodnja rekombinantnih makromolekula heterolognom ekspresijom u E. coli 93
4.3.1 Pročišćavanje rekombinantnih enzima s privjeskom ... 93
4.3.2 Pročišćavanje tRNA dobivene uzgojem *in vivo* ... 99
4.4 Topološke odrednice kompleksa MtArgRS:MtSerRS ... 102
4.4.1 Proizvodnja mutantnih oblika ... 103
4.4.2 Potvrda ispravnog smatanja krnjih mutanata MtArgRS ... 104
4.4.3 Interakcija krnjih varijanti s MtSerRS ... 107
4.4.4 Interakcija krnjih varijanti MtArgRS s pripadnom tRNA ... 111
4.5 Dinamika sklapanja kompleksa MtArgRS:MtSerRS: utjecaj reakcijskih intermedijera ... 117
4.6 Utjecaj SRS na arginilaciju tRNA^{Arg} supstrata različitog stupnja modificiranosti 125
5 Rasprava ... 133
5.1 Metode istraživanja protein-protein interakcija ... 133
5.2 Utjecaj pripadnih tRNA na interakciju MtArgRS:MtSerRS ... 139
5.3 Usmjeravanje suptrata u procesu translacije ... 143
5.4 Neke posebnosti prepoznavanja tRNA^{Arg} ... 146

5.5 Heterologno prepoznavanje MttRNA^{Arg} u bakterijskom sustavu-sazrijevanje tRNA-molekula 147
5.6 Veza ribosoma i modificirajuće mašinerije 151
6 Zaključci 153
7 Literatura 154
8 Popis kratica XII
9 Životopis XIV

SAŽETAK

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek Doktorski rad

Dinamika sklapanja aminoacil-tRNA-sintetaznog kompleksa

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

Vjernost biosinteze proteina očuvana je točnim aminoaciliranjem specifične transfer-RNA (tRNA) pripadnom aminokiselinom i dekodiranjem pojedine aminoacilirane tRNA na ribosomu. Aminoacil-tRNA-sintetaze kataliziraju prvu reakciju te često stupaju u interakcije s drugim staničnim proteinima.

U arheji *Methanothermobacter thermautotrophicus* arginil- i seril-tRNA-sintetaza (MtArgRS i MtSerRS) stupaju u prolaznu interakciju oblikujući kompleks. Metodom afinitetnog supročišćavanja i rezonancije površinskih plazmona s krnjim oblicima MtArgRS pokazano je da MtSerRS prepoznaje N-terminalni dio ArgRS, s naglaskom na elemente zadužene za prepoznavanje pripadne tRNA. Krnji oblici Δ89-ArgRS i ΔN_{tot}-ArgRS zamjetno oslabljeno vežu i aminoaciliraju pripadnu tRNA. S obzirom na prisutnost reakcijskih prekursora pokazano je da serilacijski intermedijeri ne utječu na stabilnost kompleksa ArgRS:SerRS. Dapače, molekula $tRNA^{Ser}$ može participirati u formiranju ternarnog kompleksa [SerRS:$tRNA^{Ser}$]:ArgRS čija je stabilnost usporediva s onom binarnog kompleksa SerRS:ArgRS. Nasuprot tome, interakcija ovih proteina osjetljiva je na dodatak potpuno modificirane $tRNA^{Arg}$, koja dovodi do disocijacije proteinskog kompleksa.

Transkripcija $MttRNA^{Arg}$ u bakteriji *E. coli* rezultira nastankom triju karakterističnih molekulskih vrsta koje se razlikuju s obzirom na stupanj nadodanih posttranskripcijskih modifikacija. Istraživana arginil-tRNA-sintetaza aminoacilira takve supstrate s podjednakom učinkovitošću. Zanimljivo, SerRS inhibira arginilaciju lošijih supstrata, tj. manje modificiranih molekula $tRNA^{Arg}$. Uklanjanje djelomično modificiranih tRNA iz procesa translacije pokazuje kako ovaj proteinski kompleks djeluje poput osigurača čija je funkcija poboljšanje točnosti dekodiranja.

162 stranica, 61 slika, 13 tablica, 163 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski
Rad je pohranjen u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, ulica Hrvatske bratske zajednice 4, i Središnjoj kemijskoj knjižnici u Zagrebu, Horvatovac 102A
Ključne riječi: kompleksi aminoacil-tRNA-sintetaza / seril-tRNA-sintetaza / arginil-tRNA-sintetaza, točnost translacije, protein-protein interakcije, posttranskripcijske modifikacije / tRNA
Mentori: Dr. sc. Ivana Weygand-Đurašević, red. prof.
Dr. sc. Ita Gruić Sovulj, izv. prof.
Ocjenitelji: Dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović, red. prof.
Dr. sc. Ita Gruić Sovulj, izv. prof.
Dr. sc. Gregor Anderluh, red. prof.
Rad prihvaćen: 10. rujna 2014.

ABSTRACT

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry Doctoral Thesis

Dynamics of an aminoacyl-tRNA synthetase complex assembly

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

The fidelity of protein biosynthesis is preserved by accurate aminoacylation of a specific transfer RNA (tRNA) with a cognate amino acid and the ribosomal decoding of each aminoacylated tRNA. Aminoacyl-tRNA synthetases (aaRS) catalyze the first reaction and are well known to interact with other cellular proteins. In the archaeon *Methanothermobacter thermautotrophicus* a complex is formed by the transient gathering of the arginyl- and seryl-tRNA synthetase (ArgRS and SerRS). Pull down and surface plasmon resonance experiments with truncated ArgRS variants showed that N-terminal part of ArgRS serves as the recognition platform for SerRS, with emphasis to the elements involved in $tRNA^{Arg}$ recognition. Shortened variants Δ89-ArgRS and ΔN_{tot}-ArgRS show decreased ability for cognate tRNA binding and charging. Regarding the effect that reaction precursors may have on the stability of ArgRS:SerRS complex it is shown that serylation reaction precursors exert no influence. Furthermore, $tRNA^{Ser}$ is able to participate in ternary [SerRS:$tRNA^{Ser}$]:ArgRS complex formation with the stability comparable to that of the binary SerRS:ArgRS assembly. In contrast, interaction of these proteins is susceptible to the addition of fully modified $tRNA^{Arg}$ transcript which ultimately leads to dissociation of the complex. Overexpression of $MttRNA^{Arg}$ in *E. coli* cells results with the production of three distinct molecular species which differ in the amount of added posttranscriptional modifications. Arginyl-tRNA synthetase investigated in this work aminoacylates such substrates with comparable efficacy. Interestingly, SerRS is able to inhibit arginylation of poorer substrates, i. e. less modified $tRNA^{Arg}$ molecules. Elimination of the partly modified tRNAs from the translation process shows how this protein complex acts as a safeguarding switch improving decoding accuracy.

162 pages, 61 figures, 12 tables, 163 references, original in: Croatian

Thesis deposited in National and University Library in Zagreb, ulica Hrvatske bratske zajednice 4, and Central Chemical Library in Zagreb, Horvatovac 102A
Key words: aminoacyl-tRNA synthetase complexes / seryl-tRNA synthetase / arginyl-tRNA synthetase, translational accuracy, protein-protein interactions, posttranscriptional modifications / tRNA
Supervisors: Dr. sc. Ivana Weygand-Đurašević, Professor
Dr. sc. Ita Gruić Sovulj, Associate Professor
Reviewers: Dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović, Professor
Dr. sc. Ita Gruić Sovulj, Associate Professor
Dr. sc. Gregor Anderluh, Professor
Thesis accepted: Septmber 10th, 2014

1
Uvod

Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) članovi su familije RNA-vežućih proteina s centralnom ulogom u procesu translacije. Ovi enzimi kataliziraju nastanak aminoacil-tRNA, molekula koje predstavljaju aktivirani oblik aminokiseline iskoristiv u biosintezi polipeptidnog lanca na ribosomu.

U većini organizama postoji 20 različitih aaRS[1], od kojih je svaka odgovorna za aminoacilaciju svoje pripadne tRNA jedinstvenom aminokiselinom[2]. Ova reakcija odvija se u 2 koraka. Po vezanju malih supstrata (aminokiseline i adenozin-trifosfata (ATP-a)) te magnezijevih iona, u prvom koraku nastaje reakcijski intermedijer, aminoacil-adenilat. Intermedijer ostaje nekovalentno vezan na enzim. U drugom koraku, aminoacilna skupina prenosi se unutar aktivnog mjesta na jednu od hidroksilnih grupa riboze 3'-terminalnog nukleotida (adenozina) tRNA čime nastaje aminoacil-tRNA (slika 1.1).

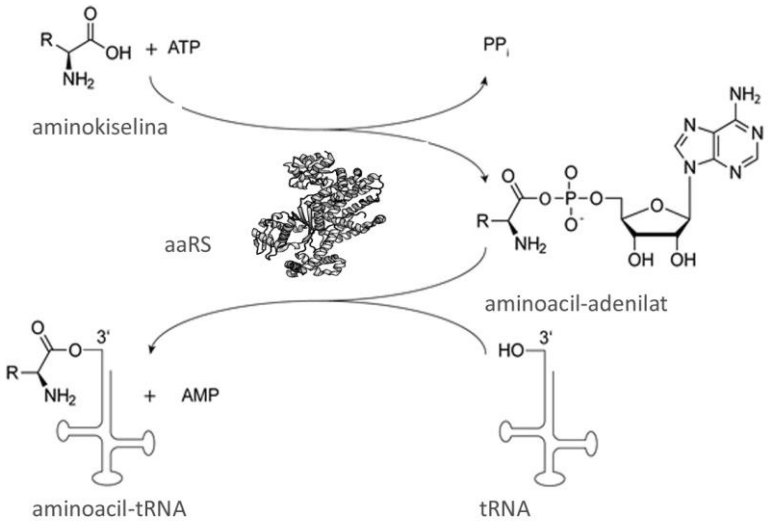
Aminoacilirana tRNA svojim antikodonom prepoznaje nukleotidni triplet mRNA (odn. kodon) izložen na ribosomu. Uspostavom ispravnih interakcija između kodona i antikodona, ribosomom se pronosi signal o ispravnosti smještene molekule aa-tRNA te dolazi do ugradnje donesene aminokiseline. Budući da se u reakciji aminoacilacije uspostavlja veza između kodona i aminokiseline, neki autori aminoacil-tRNA-sintetaze nazivaju i (jedinim) staničnim čitačima genetskog koda. S obzirom na fundamentalnu važnost reakcije koju kataliziraju, aaRS se smatraju jednom od najstarijih proteinskih familija.

AaRS istoimene specifičnosti najčešće pokazuju veliku sličnost po pitanju osnovnih

[1] U eukariota taj broj je nešto veći, budući da osim citosolnih varijanti, stanični odjeljci poput mitohondrija posjeduju vlastite inačice aaRS. Po pitanju specifičnosti, pirolizil-tRNA-sintetazu (zaslužnu za aktivaciju pirolizina, Pyl, prirodne aminokiseline koju koriste metanogene arheje) nalazimo isključivo kod organizama koji koriste pirolizin kao sastavni dio svojih enzima.

[2] Možda bi bilo točnije reći da je aaRS odgovorna za nekoliko svojih tRNA, budući da zbog degeneriranosti koda susrećemo više izoakceptora tRNA odgovornih za dekodiranje određene aminokiseline. Ovdje je zbog jednostavnosti i preglednosti ostavljeno kao da svaka aaRS odgovara jednoj tRNA.

elemenata[3], neovisno o organizmu iz kojeg potječu[4]. No, kako je nemoguće da će stanični (kontekstni) zahtjev biti sličan, primjerice, između jednostaničnog prokariota i kralješnjaka, raznolikost se kod aaRS postiže dodavanjem zasebnih domena koje poprimaju novu (nekanonsku) funkciju. Iz tog razloga kažemo da aaRS posjeduju modularnu građu.



Slika 1-1 Reakcija aminoacil-tRNA-sintetaza. U prvom koraku karboksilna skupina aminokiseline nukleofilno napada α-atom fosfora molekule ATP-a te nastaje međuprodukt, aminoacil-adenilat, te anorganski pirofosfat kao izlazna skupina. Aminoacil-adenilat ulazi u drugi dio reakcije aminoaciliranja u kojem kisik 2'- ili 3'-hidroksilne skupine riboze krajnjeg adenozina na 3'-kraju molekule tRNA nukleofilno napada anhidridni ugljikov atom aminoacil-adenilata te nastaje aminoacil-tRNA i adenozin-monofosfat (AMP).

Produžeci smješteni na N- ili C-kraju proteina, insertirane petlje ili čitave domene, najčešće su posljedica adaptacije sintetaze na specifični zahtjev organizma te stoga igraju ulogu u procesima koji mogu, ali i ne moraju, nužno biti vezani za prijenos genetičke informacije.

Stanični proteini rijetko kad djeluju samostalno i vrlo se često međusobno udružuju. Takvim udruživanjem nastaju tzv. "molekulske mašine" čije sklapanje najčešće ima intrigantne posljedice na staničnoj i/ili sistemskoj razini. Interaktom, odn. ukupna mreža proteinskih interakcija unutar stanice, trenutno je jedan od glavnih ciljeva bioloških istraživanja.

Aminoacil-tRNA-sintetaze stupaju u interakcije sa staničnim proteinima koji mogu, ali ne

[3] Dakle, s obzirom na ustroj aktivnog mjesta i domene predviđene za vezanje tRNA.
[4] Postoje naravno izuzeci. Jedan od njih je i seril-tRNA-sintetaza, o kojoj će detaljnije biti govora kasnije. Također, LysRS se prirodno javlja u dva oblika, od kojih jedan pripada razredu I, a drugi razredu II.

moraju biti direktno uključeni u proces translacije. Funkcionalna pozadina takvih interakcija često je nepoznata (kao što je to u slučaju multisintetaznog kompleksa u viših eukariota, a koji obuhvaća 9 sintetaznih aktivnosti) i najčešće se pretpostavlja da je takvim okupljanjem aminoacil-tRNA-sintetaza podupire proces tzv. translacijskog usmjeravanja (eng. *channeling*) čime se postiže brža i učinkovitija regeneracija uporabljenog supstrata (tRNA), kao i stanična ko-lokalizacija enzimskih komponenata uključenih u proces translacije[1,2].

U drugim slučajevima, aminoacil-tRNA-sintetaze stupaju u interakcije s proteinima čija je funkcija nezavisna od translacijskog procesa; tako sintetaze mogu biti dijelom procesa koji se odnosi na programiranu staničnu smrt (apoptozu[5])[3], proces prekrajanja eukariotskih mRNA (eng. *splicing*)[4], upalni odgovor stanica[5] itd. Ove nekanonske i nekatalitičke funkcije aminoacil-tRNA-sintetaza pokazuju kako ti proteini, bez obzira na njihovu esencijalnu ulogu u preživljenju samog organizma, djeluju na raznolikim razinama unutar stanice.

U ovom radu istraživana je interakcija arginil-tRNA-sintetaza (ArgRS) te seril-tRNA-sintetaza (SerRS). Seril-tRNA-sintetaze u živom svijetu prisutne su u dva tipa, bakterijskom (takvu posjeduju sve bakterije, svi eukarioti i dio arheja) te metanogenom (nalazimo ju samo u maloj skupini metanogenih arheja)[6]. Ta dva tipa razlikuju se prema građi N-terminalne domene zadužene za vezanje tRNA te prema mehanizmu prepoznavanja aminokiselinskog supstrata, serina. U ovom radu korištena SerRS pripada metanogenom tipu[7].

Arginil-tRNA-sintetaza specifična je po tomu što prvi korak reakcije aminoaciliranja (aktivaciju aminokiseline) katalizira isključivo u prisustvu pripadne tRNA.[8] Taj enzim po vezanju tRNA podliježe nizu konformacijskih promjena koje dovode do sklapanja (funkcionalnog) aktivnog mjesta. Tijekom procesa translacije, aminoacilirane molekule tRNA selektivno se vežu na elongacijski faktor (EF-1α kod eukariota i arheja, EF- Tu kod bakterija) koji ih odnosi na ribosom. Ciljano usmjeravanje (aminoacil-)tRNA tijekom

[5] Aminoacil-tRNA-sintetaze mogu biti specifično i nespecifično uključene u apoptozu. Diadenozin-fosfat, Ap4A, signalna je molekula koju stvaraju neke aaRS, a koja može inducirati apoptozu u humanim stanicama endotela[3]. Nasuprot tomu, SerRS je direktno involviran u programiranu staničnu smrt kod živčanih stanica i to kao supstrat kaspaze 3.[160]

sinteze proteina *in vivo* olakšava se ko-lokalizacijom komponenata makromolekulaske mašinerije uključene u proces translacije. Takvo usmjeravanje supstrata (v. ranije), kao proces u kojem se intermedijeri nekog puta prenose s jednog enzima na drugi bez miješanja s okolnim medijem nije ograničeno na aminoacil-tRNA-sintetaze i ostale sudionike translacijskih događanja; uvriježeno je mišljenje da kod većine metaboličkih putova, *in vivo*, postoji usmjereni prijenos supstrata[9].

Preduvjet za ovaj proces uključuje postojanje nekog oblika strukturne organizacije komponenata koje sudjeluju u određenom metaboličkom putu (npr. multienzimske komplekse, multifunkcionalne enzime, smještaj enzima na membranama i sl.), a koja dopušta mogućnost katalize naredne reakcije u putu bez disocijacije intermedijera[1]. U tom smislu, kompleksi u kojima se udružuje više aminoacil-tRNA-sintetaza (multisintetazni kompleksi) smatra se da pospješuju ciljani prijenos supstrata (aa-)tRNA *in vivo*.

Osim ciljanog prijenosa, uzajamno blisko smještanje komponenata translacijske mašinerije može osiguravati prisutnost aaRS sa sekundarnom funkcijom u translaciji.

Postojanje multisintetaznih kompleksa zabilježeno je i u prokariotskih i eukariotskih organizama. U metanogenoj arheji *Methanothermobacter thermautothophicus* ranije je uočeno postojanje nekolicine kompleksa u koje su aminoacil-tRNA-sintetaze uključene. Primjerice, ProRS, LysRS i LeuRS stupaju u direktnu interakciju[10,11], a kompleks može dodatno komunicirati s elongacijskim faktorom EF-1α[12].

U istom organizmu postoji binarni kompleks nastao udruživanjem atipične (metanogenu) seril-tRNA-sintetaze te ArgRS; taj kompleks predmet je ovog istraživanja. Arginil-tRNA-sintetaza je sposobna stimulirati katalitičku učinkovitost SerRS, posebice pri pri povećanoj temperaturi i osmolarnosti[13]. Također, ove dvije sintetaze sposobne su stupati u prolazne interakcije s velikom podjedinicom ribosoma. Upotreba sinonimnih kodona u genomu *M. thermautotrophicus* podupire pretpostavku prema kojoj interakcija SerRS i ArgRS služi kolokalizaciji sintetaze i deacilirane tRNA koja se, po ugradnji aminokiseline, otpušta s ribosoma[14].

Cilj ove disertacije je opisati opće topološke odrednice odgovorne za prepoznavanje arginil- i seril-tRNA-sintetaze metanogenog tipa iz arheje *M. thermautotrophicus* te odrediti funkcionalno značenje sklapanja takvog kompleksa unutar stanice. Prvi dio cilja

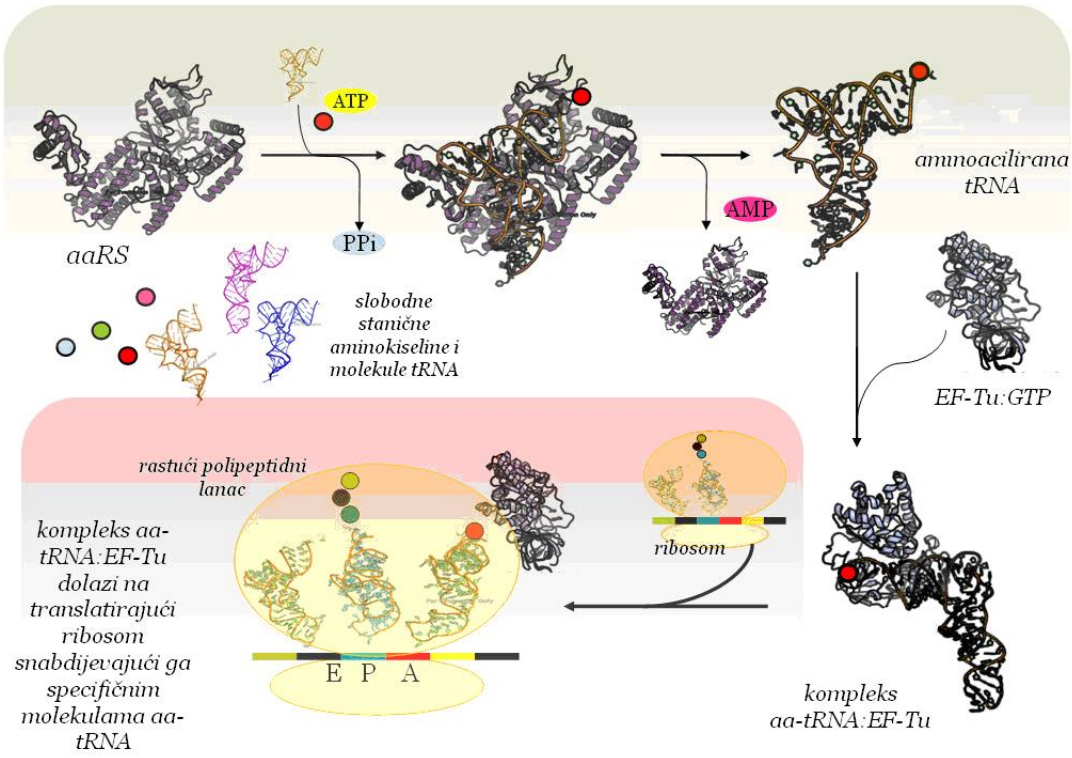
disertacije izveden je korištenjem skraćenih oblika arginil-tRNA-sintetaze te ispitivanjem stabilnosti kompleksa s proteinskim partnerom SerRS. Stabilnost je utvrđena korištenjem metoda *in vitro*, preciznije rezonancijom površinskih plazmona (SPR, prema eng. *surface plasmon resonance*) te metodom afinitetnog supročišćavanja proteina (eng. *pull down*). Sposobnost proizvedenih krnjih oblika ArgRS u vezanju pripadne $tRNA^{Arg}$ također je ispitana te su na osnovu modeliranih struktura korelirane topološke odrednice arginil-tRNA-sintetaze zaslužne za prepoznavanje pripadne tRNA te proteinskog partnera SerRS.
Dinamika sklapanja kompleksa ispitana je u prisustvu pripadnih supstrata istraživanih sintetaza. Nadalje je ispitana osjetljivost arginil-tRNA-sintetaze prilikom prepoznavanja pripadne $tRNA^{Arg}$ s različitom količinom posttranskripcijskih modifikacija, u prisutnosti i bez proteinskog partnera SerRS (određivanje kinetičkih parametara metodom aminoacilacijskog testa). Količina uvedenih posttranskripcijskih modifikacija kod testiranih populacija $tRNA^{Arg}$ procijenjena je spektrometrijom masa. Budući da pojedine modifikacije (posebno one u neposrednom susjedstvu antikodona) osiguravaju ispravno čitanje antikodonskog tripleta[6], utjecaj SerRS na arginilaciju hipomodificiranih vrsta $tRNA^{Arg}$ potencijalno razotkriva mehanizam kojim interakcija istraživanih sintetaza djeluje poput dodatnog osigurača unutar translacijskih događanja, a čija je uloga osigurati točnost ribosomske biosinteze proteina.

[6] Uglavnom regulirajući lokalnu konformaciju antikodonske omče tRNA.

2 Literaturni pregled

2.1 Opći pregled translacije

Proteini, polimeri sačinjeni od niza aminokiselina povezanih peptidnom vezom u stanici nastaju u procesu translacije. Navedeni proces dijelom je opsežnih događanja koje sveukupno nazivamo prijenosom genetičke informacije. Biosinteza proteina se ugrubo može podijeliti u dva zasebna koraka: kovalentno vezanje pripadne aminokiseline na molekulu tRNA i procese koji obuhvaćaju događanja vezana uz ribosome. Prvi korak, reakcija aminoacilacije u kojoj nastaje aminoacil-tRNA, kataliziran je od strane aminoacil-tRNA-sintetaza (aaRS). Tako aktivirana aminokiselina (što će reći vezana na tRNA) doprema se na ribosom u kompleksu s elongacijskim faktorom (EF-Tu u bakterija, EF-1α kod arheja i eukariota) gdje se na temelju ispravnog sparivanja baza kodona mRNA i antikodona tRNA donesena aminokiselina ugrađuje u rastući polipeptidni lanac. Općeniti prikaz translacijskih događaja dan je na slici 2.1.



Slika 2-1. Shema translacijskih događaja. Reakcija aminoaciliranja, kao i prijenos na elongacijski faktor odvija se unutar citosola (zeleno); biosinteza proteina na ribosomu prikazana tijekom elongacijskog ciklusa (ružičasto).

Za početak biosintetskog procesa na ribosomu ključan je nastanak inicijacijskog kompleksa. Isti obuhvaća inicijacijsku tRNA ($tRNA_i$), mRNA i cjeloviti ribosom, a njihovo udruživanje olakšano je usklađenim djelovanjem inicijacijskih faktora. Sklapanjem funkcionalnog

inicijacijskog kompleksa uspostavlja se točan okvir čitanja te se nukleotidni tripleti mRNA mogu ispravno prevoditi u odgovarajući slijed aminokiselina. Slijedno formiranje peptidnih veza između aktiviranih aminokiselina donesenih na ribosom u vidu aa-tRNA naziva se još i elongacijskom fazom biosinteze proteina na ribosomu. Elongacijski faktor Tu (EF-Tu) koji doprema molekule aa-tRNA aktivira se vezanjem GTP-a. Po ispostavi aa-tRNA u prazno mjesto na ribosomu (mjesto A) ispravnost sparivanja vezane molekule aa-tRNA i prisutnog kodona mRNA uzrokuje konformacijsku promjenu unutar EF-Tu zbog čega dolazi do hidrolize vezanog GTP-a na GDP i anorganski fosfat. Hidroliza, odnosno, sada vezana molekula GDP-a uzrokuje dodatne promjene u tercijarnoj strukturi EF-Tu koji disocira s ribosoma ostavaljajući isporučenu aa-tRNA vezanu u A-mjestu ribosoma.

Spomenuta ispravnost sparivanja vezane molekule aa-tRNA i prisutnog kodona mRNA odnosi se na mogućnost nastanka vodikovih veza između kodona (mRNA) i antikodona (aa-tRNA). Formiranjem tih veza konformacija kodona i antikodona se mijenja zbog čega određene (i univerzalno očuvane) baze 16S rRNA mogu s njima stupiti u interakciju.[a] Na ovaj način se informacija o prisutnom i ispravnom dupleksu mRNA:aa-tRNA prenosi kroz ribosom. Određena konformacija čitavog ribosoma stabilizira se opisanom interakcijom što predstavlja mehanizam (ribosoma) za detekciju vezanja ispravne aa-tRNA *prije* negoli je nastala nova peptidna veza[15,16].

Sada kada je ispravna aa-tRNA vezana unutar A-mjesta ribosoma, između nje i peptidil-tRNA peptidna veza se stvara brzo. Kao rezultat te reakcije u P-mjestu ribosoma ostaje deacilirana tRNA dok je peptidil-tRNA s nadodanom aminokiselinom smještena u A-mjestu. Elongacijski faktor EF-G potpomaže nužno premještanje peptidil-tRNA u P-mjestu, zajedno s vezanom mRNA. Time naredni kodon dolazi u (opet) slobodno A-mjestu i "čeka" dolazak nove, odgovarajuće molekule aa-tRNA.[b]

Transpeptidacija (odn. nastanak peptidne veze) uključuje nukleofilni napad dušika primarne amino skupine aminokiseline smještene u A-mjestu na karbonilni C-atom aminokiseline vezane esterskom vezom za tRNA u P-mjestu. Reakcija je olakšana geometrijom aktivnog mjesta ribosoma koje je čitavo izgrađeno od molekule 23S rRNA.[c] Elongacijski faktor EF-G,

[a] Evolucijski očuvane baze ribosomske 16S RNA "osjećaju" konformaciju malog utora na kratkom dvolančanom segmentu što ga oblikuju parovi baza kodona i antikodona.

[b] Opisani proces elongacije očuvan je u sve tri domene života. Gore korištena imena elongacijskih faktora odgovaraju bakterijskoj domeni; njihove funkcije u eukariotskim i arhejskim organizmima pripadaju faktorima EF-1α (homolog EF-Tu), EF-1βγ (homolog EF-Ts) te EF2 (homolog EF-G).

[c] Kao dio reakcijskog puta, proton se oduzima od napadajuće amino-skupine. Isti se potom donira hidroksilnoj skupini tRNA unutar P-mjesta tijekom cijepanja esterske veze. S obzirom na nedavna strukturna istraživanja zaključeno je da očuvani adenin u aktivnom mjestu (za kojeg se dugo vremena smatralo kako posreduje u ovom prijenosu H^+) služi samo za ispravno pozicioniranje supstrata. Umjesto toga, prijenos protona se pripisuje

slično kao EF-Tu, treba vezanu molekulu GTP-a za svoje djelovanje. Strukturna istraživanja i dinamičke simulacije upućuju na to da EF-G (u kompleksu s GTP) po vezanju blizini ribosomskog A-mjesta uzrokuje gibanje male podjedinice ribosoma u odnosu na veliku. Gibanje se ponekad uspoređuje s gibanjem zupčanika. Na opisani način EF-G stimulira premještanje peptidil-tRNA iz A- ponovo u P-mjesto [17].

Završni dio sinteze proteina dešava se uz pomoć faktora otpuštanja (RF, prema eng. *release factors*). Tri moguća kodona služe za signalizaciju završetka polipeptidnog lanca te njih vežu faktori otpuštanja, a ne molekule tRNA. Jednom kad se faktor otpuštanja (RF-1 ili RF-2) veže unutar A-mjesta, ribosomska peptidil-transferaza katalizira prijenos peptidilne skupine na molekulu vode (tj. hidrolizira se veza između dovršenog polipeptidnog lanca i posljednje molekule tRNA). Originalno spomenute faktore RF-1 i RF-2 na ribosom dovodi treći faktor otpuštanja RF-3. On je, kao prethodno EF-Tu i EF-G, GTP-aza. Za dovođenje RF-1 i RF-2 na ribosom nužno mora posjedovati vezani GTP. Hidroliza ovog GTP-a dovodi do konformacijske promjene u RF-3, a koja, pak rezultira disocijacijom svih spomenutih faktora otpuštanja.

Naposljetku, otpuštanje deacilirane tRNA iz P-mjesta, disocijaciju ribosoma s mRNA te odvajanje dviju ribosomskih podjedinica potpomažu ribosomski faktor za ponovnu upotrebu RRF (prema eng. *ribosomal recycling factor*), kompleks EF-G:GTP te inicijacijski faktor IF-3.

2.2 Transfer RNA

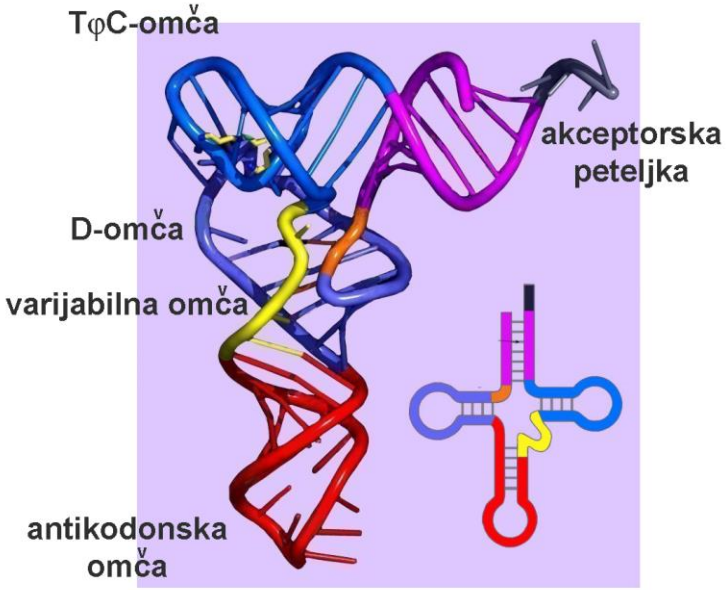
Molekule transfer RNA (tRNA) sačinjavaju strukturno homogenu familiju molekula. S izuzetkom nekih posebnih mitohondrijskih molekula tRNA, u sekundarnoj strukturi molekula tRNA mogu se uočiti 4 peteljke i 3 omče (slika 2.2). Takav karakterističan izgled molekule tRNA naziva se strukturom djeteline te se na njoj mogu zapaziti 2 glavne domene: jednu čine akceptorska peteljka i TψC miniheliks, a drugu antikodonska petlja. Konformacija antikodonske petlje s karakterističnim U-okretom, očuvana je u svih elongacijskih tRNA i tek je blago modificirana u bakterijske inicijacijske tRNA. Na temelju veličine varijabilne ruke, molekule tRNA se ponekad svrstavaju u razrede 1 (tRNA s kratkom varijabilnom rukom od 4 ili 5 nukleotida) i 2 (tRNA s dugom varijabilnom rukom, duljine 13 do 21 nukleotida). Razredu 2 pripadaju $tRNA^{Ser}$ i $tRNA^{Leu}$, a neke tRNA mogu pripadati različitim razredima

---

susjednoj 2'-OH-skupini riboze peptidil-tRNA smještenoj u P-mjestu, zajedno s OH-skupinama riboza katalitičkih nukleotida rRNA. U procesu sudjeluju i molekule vode koje sveukupno dovršavaju mrežu vodikovih veza unutar aktivnog mjesta ribosoma[17]

zavisno o organizmu (npr. $tRNA^{Tyr}$ iz *E. coli* pripada razredu 2, a kvaščeva $tRNA^{Tyr}$ razredu 1). Strukturno neobične tRNA nalazimo u mitohondrijima: može im nedostajati D- ili T-omča i najčešće su supstrat samo za pripadajuće, mitohondrijske sintetaze.

Tercijarna struktura tRNA posjeduje oblik slova "L", čije krakove oblikuju dva segmenta s konformacijom uzvojnice kakva odgovara A-DNA. Kraj jednog segmenta oblikuju uzvojnice T-peteljke i akceptorske peteljke, dok se na kraju drugog nalazi antikodonska omča. T- i D-omče nalaze se na suprotnim krajevima navedenih segmenata te stabiliziraju ukupnu tercijarnu strukturu tRNA na mjestu pregiba stupanjem u interakciju preko tripleta baza (slika 2.2).



Slika 2-2 Struktura molekule tRNA. Ključni elementi su naznačeni.

2.3 Aminoacil-tRNA-sintetaze

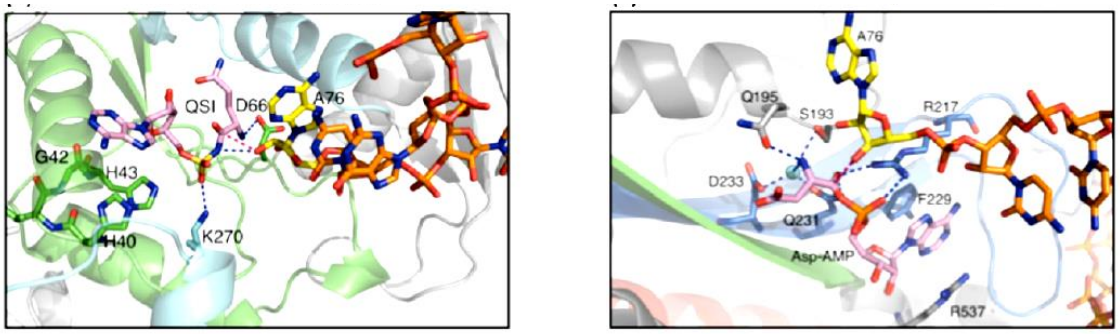
2.3.1 Opće značajke i podjela na razrede

Aminoacil-tRNA-sintetaze kataliziraju nastanak kovalentne veze između 3'-OH-skupine terminalnog adenozina *specifične* molekule tRNA *odgovarajućom,* pripadnom aminokiselinom. Reakcija aminoacilacije odvija se u dva koraka (v. Uvod). U prvom koraku karboksilna skupina aminokiseline nukleofilno napada α-atom fosfora molekule ATP-a te nastaje stabilni međuprodukt, aminoacil-adenilat, te anorganski pirofosfat kao izlazna skupina. Aminoacil-adenilat ulazi u drugi dio reakcije aminoaciliranja u kojem kisik 2'- ili 3'-hidroksilne skupine riboze krajnjeg adenozina na 3'-kraju molekule tRNA nukleofilno napada anhidridni ugljikov atom aminoacil-adenilata te nastaje aminoacil-tRNA i adenozin-monofosfat (AMP).

Za svaku od dvadeset aminokiselina postoji specifična aaRS koja katalizira njen prijenos na pripadnu tRNA. S obzirom na strukturne, ali i kinetičke značajke, aminoacil-tRNA-sintetaze dijele se u dva zasebna razreda[18–20]. Razredu I pripadaju sintetaze odgovorne za aktivaciju aminokiselina Met, Val, Ile, Leu, Cys, Glu, Gln, Lys, Arg, Trp i Tyr, a razredu II za Ala, His, Pro, Thr, Ser, Gly, Phe, Asp, Asn, i Lys. Tipično pojedina aaRS pripada jednom od dva moguća razreda, no LysRS dolazi u 2 oblika; jedan je karakterističan za eukariote i pojedine bakterijske organizme (LysRS razreda II), a drugi za arheje te preostale bakterijske vrste (LysRS razreda I; v. [21,22]). Prema filogenetskom položaju, aaRS se dalje grupiraju unutar podrazreda a koji mogu sadržavati samo jedan član (npr. ArgRS je jedini član podrazreda ID) ili više njih (najbrojniji je podrazred IIC s 5 članova, PheRS, GlyRS, AlaRS, SepRS, i PylRS)[23].

Strukturne odlike zajedničke sintetazama pojedinog razreda odnose se na građu katalitičke domene. Tako aminoacil-tRNA-sintetaze razreda I posjeduju karakteristični Rossmannov nabor (engl. *fold*) s motivima HIGH (His-Ile-Gly-His) i KMSKS odgovornima za vezanje ATP-a (Lys-Met-Ser-Lys-Ser) [20]. Ova domena građena je od peterolančane paralelne β-ploče povezane α-zavojnicama. U svih aaRS razreda I, domena s Rossmannovim naborom razdvojena je aminokiselinskim segmentom CP1 (prema eng. *connective peptide I*), odgovornim za vezanje 3'-kraja tRNA kod monomernih enzima ovog razreda (tj. ValRS, IleRS, LeuRS, GluRS, GlnRS, LysRS, ArgRS). Kod dimernih enzima TyrRS te TrpRS, CP1 oblikuje dimerno sučelje, a kod aaRS odgovornih za nabijanje nepolarnih aminokiselina Ile, Val i Leu (dakle, kod IleRS, ValRS iLeuRS) ovaj segment sadrži dodatno katalitičko mjesto (odgovorno za popravak pogreške, v. kasnije).

Katalitička domena aaRS razreda II posjeduje pak miješanu α/β organizaciju u kojoj je središnji dio izgrađen od antiparalelnih β-lanaca okruženih α-uzvojnicama. Kao i kod sintetaza razreda I, ova domena služi za vezanje aminokiseline, ATP-a i 3'-kraja tRNA te njihovo ispravno smještanje potrebno za katalizu. Također, tri kratka degenerirana motiva javljaju se u sintetaza razreda II, pri čemu dva sudjeluju u oblikovanju aktivnog mjesta (motivi 2 i 3), dok preostali motiv (motiv 1) formira dio dimerizacijskog sučelja (aaRS razreda II najčešće su homodimerni proteini; izuzeci su PheRS, GlyRS, AlaRS i SepRS). Motiv 1 oblikovan je kao dugačka α-zavojnica za kojom slijedi kraći lanac s univerzalno očuvanim prolinom. Motivi 2 i 3 smješteni su unutar aktivnog mjesta kao dio spomenutih antiparalelnih β-niti povezanih fleksibilnom omčom, odnosno, unutar supstrukture koja obuhvaća i zavojnicu i nit. Motiv 3 veže ATP, dok je motiv 2 ključan za koordinirano vezanje i smještaj malih liganada (ATP, aminokiselina) te 3′-kraja pripadne tRNA.



Slika 2-3. Usporedba građe aktivnog mjesta kod sintetaza razreda I i II na primjeru ternarnih kompleksa GlnRS:tRNA^{Gln}:Glu-AMP iz *E. coli* (lijevo, PDB ID 1QTQ) te AspRS:tRNA^{Asp}:Asp-AMP iz *T. thermophilus* (desno, PDB ID 1C0A). Adenilatni intermedijer obojen je užičasto, 3'-kraj tRNA narančasto, a adenozin76 žuto. Istaknuti su položaji i interakcije s očuvanim aminokiselinama (dane jednoslovnim skraćenicama) karakterističnima za pojedini razred. Crtkanom plavom linijom prikazane su vodikove veze. Crvena isprekidana linija prikazuje modeliranu poziciju za napad 2′-OH-skupine na karbonilni ugljik intermedijera Gln-AMP, odn. 3′-OH-skupine karbonilnog ugljika miješanog anhidrida Asp-AMP. Preuzeto iz [24].

Relativna molekulska masa molekula tRNA iznosi prosječno 25 000. Za usporedbu, relativna molekulska masa aaRS kreće se od 6 000 (minimalne aaRS ili "urzimi" duge tipično 60 do 130 ak[25])[a] do preko 120 000. Dakle, pogotovo kod manjih enzima, vezana tRNA može zauzeti veliki dio enzimske površine. Prepoznavanje tako velikog supstrata vrši se korištenjem tzv. elemenata identiteta. Elementi identiteta zapravo su točno određene nukleotidne baze smještene na točno određenim položajima specifične tRNA. Aminoacil-tRNA-sintetaza specifično prepoznaje takve nukleotidne determinante stupanjem u direktnu vezu s tim elementima (tj. stvaranjem vodikovih veza, hidrofobnih interakcija, van der Waalsovih i elektrostatskih interakcija). Raspored interakcija na sučelju sintetaze i tRNA stoga tipično uključuje van der Waalsove i hidrofobne interakcije koje ostvaruju izloženi aromatski i/ili alifatski bočni ogranci uključeni, dok pozitivno nabijeni ostaci stupaju u interakciju s šećerno-fosfatnom okosnicom. Polarni bočni ogranci mogu pak biti uključeni u direktne ili vodom posredovane interakcije s tRNA (eng. *indirect readout*).

Vezanje najčešće dovodi do više ili manje suptilnih promjena i u enzimu i u molekuli tRNA. Ponekad su takve promjene presudne za katalizu pa kažemo da molekula tRNA djeluje poput kofaktora. To je slučaj kod sintetaza GluRS, GlnRS i ArgRS koje sklapaju djelatno aktivno mjesto tek po vezanju pripadne tRNA čime s formira funkcionalan ribonukleoproteinski kompleks. Način "aktivacije" aaRS zavisnih od tRNA bit će kasnije detaljno objašnjen na primjeru ArgRS (v. poglavlje 2.4.4).

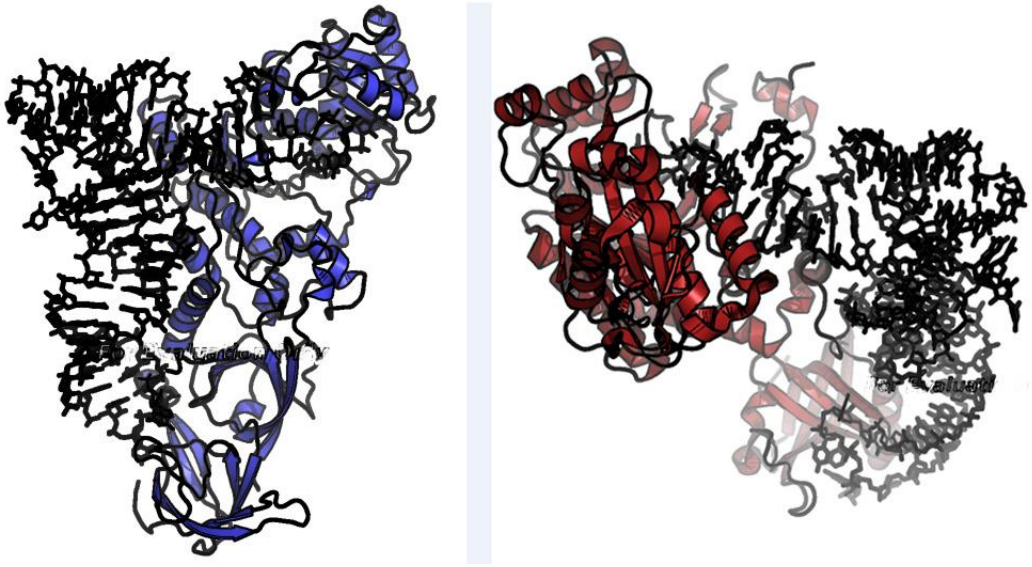
Monomerne aaRS razreda I vežu molekulu tRNA uzduž velikog dijela vlastite površine, obuhvaćajući tako tRNA od antikodonske ruke sve do 3'-kraja. U slobodnom obliku njihove

[a] Termin urzim dolazi od germanskog prefiksa "ur" što znači primitivan ili izvoran, te završetka riječi enzim.

tRNA često posjeduju uneređene lokalne regije koje se stabiliziraju vezanjem na pripadnu sintetazu (to se posebice odnosi na 3'-kraj i antikodonsku omču). Unutar Rossmannovog nabora ostvaruje se vezanje akceptorske peteljke tRNA sa strane malog utora te CCA-kraj molekule tRNA zauzima strukturu ukosnice koja se tada može vezati unutar aktivnog mjesta. Iznimku ovakvom načinu vezanja kod razreda I predstavljaju dimerne TyrRS i TrpRS kod kojih Rossmannov nabor svake podjedinice veže akceptorsku peteljku tRNA sa strane velikog utora (što je, kako je spomenuto ranije, svojstvo razreda II). Molekule tRNA vežu se u stehiometriji 1:1, što će reći da svaka podjedinica TyrRS, odn. TrpRS, veže po jednu molekulu tRNA. Svaka tRNA veže se uzduž pripadne podjedinice, slično kao kod aaRS razreda II.[a]

Dio sintetaza razreda II (podrazredi IIA i IIB) posjeduju specifičnu domenu predodređenu za vezanje/prepoznavanje antikodona. Topološki smještaj ove domene naprama katalitičkoj domeni zajednički je kod ove skupine aaRS, iako na razini primarne strukture aminokiseline ove domene mogu zauzeti bitno različiti položaj. Kod podrazreda IIb ta domena smještena je bliže N-kraju enzima te oblikuje β-bačvu (prema tipu ta β-bačva pripada tzv. OB-naboru, OB prema eng. *oligonucleotide binding*). Kod aaRS podrazreda IIa domena predodređena za vezanje antikodona smještena je prema C-kraju te se sastoji od peterolančane β-ploče okružene zavojnicama. Jedini enzim kojemu nedostaje ovakva domena jest SerRS, no o načinu vezanja tRNA u serinskom sustavu opširnije će biti raspravljano kasnije u tekstu (v. poglavlje 2.15). Sintetaze podrazreda IIc pripadaju najvećim i strukturno najsloženijim aaRS. S ostalim aaRS istog razreda dijele građu katalitičke domene (zajedno s karakterističnim motivima), no po sadržaju dodatnih (poli)peptidnih modula predstavljaju najraznolikiju skupinu.

[a] Možda bi trebalo spomenuti slučaj dimernih CysRS i MetRS. Dimerne MetRS vežu dvije $tRNA^{Met}$ antikooperativno. Za dimerizaciju takvih MetRS odgovorna je C-terminalna domena nadodana na srž enzima[161] Za eukariotsku CysRS još uvijek nije poznato veže li jednu ili dvije molekule tRNA. U dimernih familija MetRS i CysRS, enzim je uvijek blisko homologan osnovnoj strukturi viđenoj kod monomernih proteina, od kojih svaka pokazuje način vezanja tRNA karakterističan za razred I.



Slika 2-4. Kompleksi GlnRS:tRNA^{Gln} (lijevo, PDB ID 1QTQ) i AspRS:tRNA^{Asp} (desno, 1C0A). Vidljivo je prilaženje akceptorskoj peteljci tRNA sa strane malog utora (GlnRS), odn. prilaženje sa strane velikog utora (AspRS). Prilagođeno prema [26].

2.3.2 Popravak pogreške

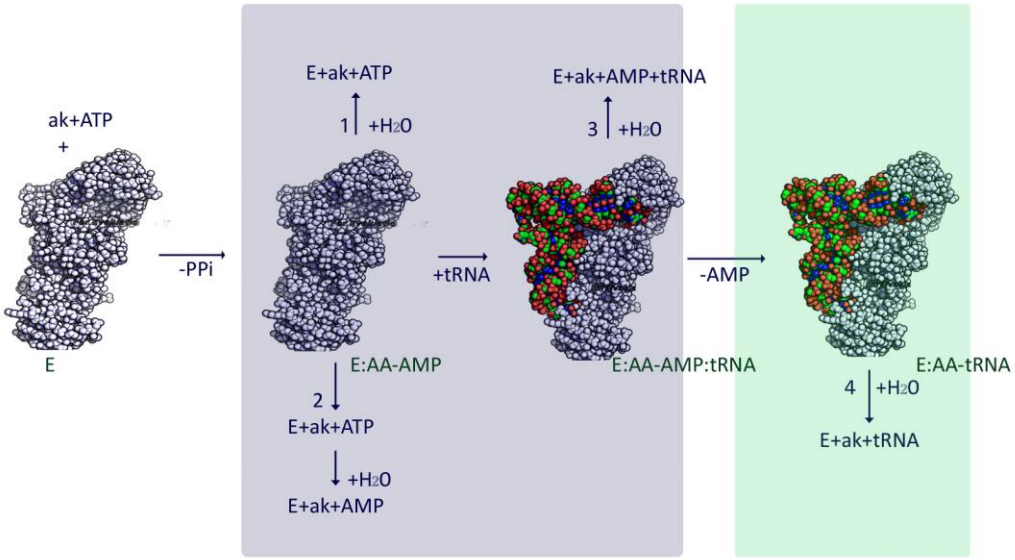
Za razliku od prepoznavanja tRNA (čiju pripadnost aaRS identificiraju uz pomoć aminokiselina na površini većeg dijela svog polipeptidnog lanca), prepoznavanje individualne aminokiseline dešava se uz pomoć za to predviđenih aminokiselinskih ostataka aktivnog mjesta. U slučaju prijenosa aminokiselina koje posjeduju sterički i kemijski sličan par (npr. Ser i Thr, Ile i Val) postoji mogućnost nabijanja tRNA pogrešnom aminokiselinom. Popravak aktivacije pogrešne aminokiseline (eng. *editing*) može se odvijati ciljanom hidrolizom pogrešnog aminoacil-adenilata (popravak prije prijenosa) ili hidrolizom pogrešne aminoacil-tRNA (popravak nakon prijenosa).

Deset aaRS sposobno je vršiti popravak pogreške; MetRS, LeuRS, IleRS, ValRS, SerRS, ProRS, ThrRS, PheRS, AlaRS te LysRS razreda II. Svih 10 sposobno je sintetizirati aminoacil-adenilat u odsustvu tRNA te sve pogrešno aktiviraju jednu ili više nepripadnih aminokiselina. Smatra se da je popravak pogreške prisutan kada se aktivacija pogrešne aminokiseline dešava s katalitičkom efikasnošću tisuću puta lošijom nego pri aktivaciji pripadne aminokiseline. Dakle, omjer k_{cat}/K_m za nepripadnu aminokiselinu može biti maksimalno 3 reda veličine niži u odnosu na omjer istih veličina dobivenih za pripadnu aminokiselinu[27].

Sintetaza može direktno hidrolizirati nepripadni aminoacil-AMP te ta reakcija može i ne mora zavisiti od prisustva tRNA. Druga mogućnost uključuje selektivno otpuštanje krivo aktivirane aminokiseline (tj. aa-AMP) u otopinu gdje se, pak, nestabilna anhidridna veza ovog spoja

može hidrolizirati neenzimatski. Hidroliza nepripadnog aminoacil-AMP-a (popravak prije prijenosa) dešava se unutar sintetskog, acilacijskog mjesta, tj. istog mjesta unutar kojeg se dešava njegov nastanak i slijedni prijenos na 3'-OH skupinu pripadne tRNA. S druge strane, popravak nakon prijenosa nepripadne aminokiseline na pripadnu tRNA dešava se unutar dodatnog (hidrolitičkog) katalitičkog mjesta. Od spomenutih 10 aaRS, 7 ih posjeduje prostorno odvojenu domenu kojoj je povjerena hidroliza misacilirane tRNA. One kojima takva domena nedostaje (SerRS, MetRS i LysRS razreda II) kataliziraju isključivo hidrolizu pogrešno nastalog aa-AMP, a ne pogrešnog produkta aa-tRNA. Da bi 3'-kraj tRNA (zajedno s vezanom, pogrešnom aminokiselinom) dosegao drugo katalitičko mjesto ono najprije disocira iz sintetskog aktivnog mjesta, po čemu čitavi kompleks aaRS:aa-tRNA prolazi kroz konformacijsku promjenu[a]. Čitav proces naziva se translokacijom te završava smještanjem esterske veze nepripadne aminoacil-tRNA unutar hidrolitičkog aktivnog mjesta. Po hidrolizi, nenabijena tRNA i slobodna aminokiselina disociraju s enzima. U pojedinim slučajevima pogrešno aminoacilirana tRNA otpušta se u otopinu gdje se potom pogrešno stvorena esterska veza hidrolizira po ponovnom vezanju na aaRS ili uz pomoć nezavisnog proteina. Potonji su zapravo samostojeće domene odgovorne za popravak pogrešno nabijenih molekula tRNA te kažemo da se aa-tRNA uz njihovu pomoć popravlja *in trans*. Svi opisani mehanizmi od izuzetne su važnosti za dobrobit čitavog organizma. Naime, ukoliko se oni ne bi dešavali, misacilirana tRNA bila bi dostupna za vezanje elongacijskom faktoru te bi kao posljedica, nastajali stanični proteini pogrešnog (dakle, neželjenog) slijeda aminokiselina.

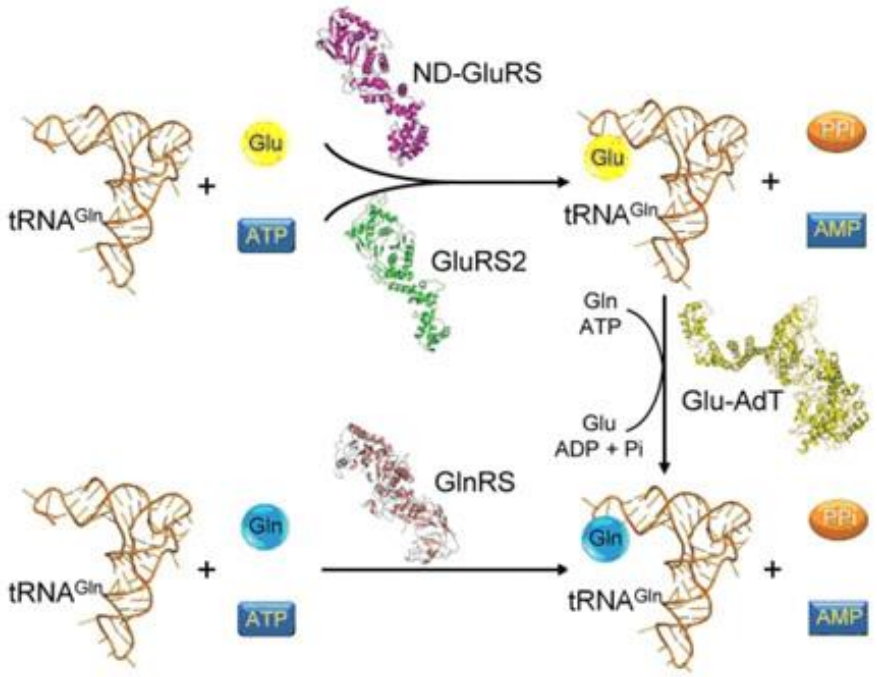
[a] nepripadna aminokiselina ovdje je označena kao aa' kako bi ju se razlikovalo prema pripadnoj (aa).



Slika 2-5 Shema popravka pogreške kod aaRS. Popravak pogreške prije prijenosa (tRNA-neovisni lijevo, a tRNA-ovisni desno) dan je unutar ljubičastog okvira. Popravak nakon prijenosa dan je unutar tirkiznog okvira. Prisustvo tRNA apostrofirano je slikom, a točan sastav kompleksa dan je u podnožju sličice.

2.3.3 Nediskriminirajuće aminoacil-tRNA-sintetaze

No, u određenih organizama ne postoji potpuni set svih dvadeset aminoacil-tRNA-sintetaza. Stoga, kako bi nastala molekula aminoacil-tRNA za koju *ne* postoji specifična aaRS, aminoacilacija takvih tRNA nužno se mora odvijati radom postojeće aaRS smanjene specifičnosti. Općeniti scenario pritom je sljedeći: nediskriminirajuća (tj. aaRS smanjene specifičnosti) prepoznaje (pored vlastite, pripadne tRNA) tRNA za koju odgovarajuća aaRS ne postoji. Aminoacilira ju aminokiselinom za koju je originalno odgovorna te po reakciji nastaje misacilirana tRNA. Po otpuštanju takvog produkta, dodatni stanični enzim (specifična amidotransferaza) modificira aminokiselinski dio takve (pogrešno acilirane) aa-tRNA, oblikujući završni produkt: ispravno aminoaciliranu tRNA. Postoje dva tipa spomenutih amidotransferaza: heterotrimerna amidotransferaza GatCAB koju sadrže bakterije, arheje i eukariotski organeli te heterodimerna GatDE koja je pak prisutna isključivo u arhejskom kraljevstvu.



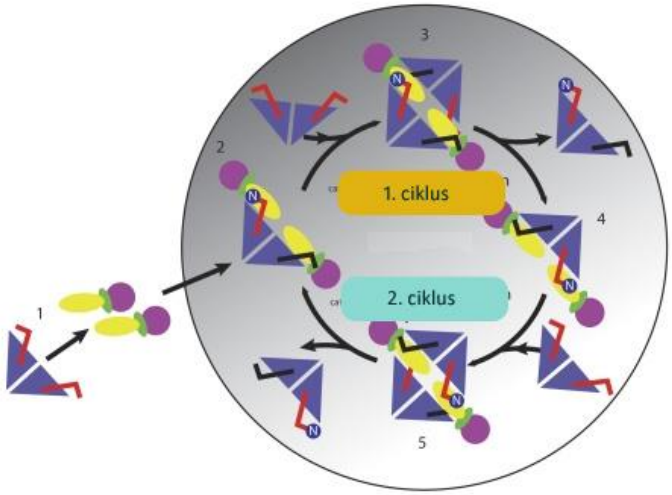
Slika 2-6 Mogući putevi za nastanak Glu-tRNA^{Gln} i Gln-tRNA^{Gln}. Nediskriminirajuća (ND-GluRS) glutamilira i tRNA^{Glu} i tRNA^{Gln}. Istovremeno, GluRS2 specifično esterificira tRNA^{Gln} glutamatom. Nastala Glu-tRNA^{Gln} se pretvara u Gln-tRNA^{Gln} u reakciji glutamat-amidotransferaze (Glu-AdT). Preuzeto uz adaptaciju iz [28].

Primjerice, GlnRS nedostaje u arheja i većine bakterija. Njena uloga nadomiješta se radom nediskriminirajuće GluRS (ND-GluRS) pa ti organizmi rabe isključivo indirektni put za nastanak Gln-tRNA^{Gln} (slika 2.6). Zapravo, samo 18 (od ukupno 22) vrsta aa-tRNA nastaju direktnim nabijanjem aminokiseline na pripadnu tRNA, tj. u jednom koraku, radom pripadne (diskriminirajuće) aaRS. Nasuprot tomu, pripadni parovi aminokiselina-tRNA odgovorni za ugradnju asparagina, glutamina i selenocisteina oblikuju se procesom od 2 (ranije opisana) koraka (slika 2.6). Takvo formiranje može biti sistematično (tj. posvudašnje; takav je slučaj Sec) ili alternativno (odn. rezervirano za određene organizme; takav je slučaj Asn, Gln i Cys [29,30]).

Kao što je rečeno, unutar alternativnog puta, odgovarajuća aa-tRNA nastaje konverzijom esterificirane nepripadne aminokiseline[31]. Ovaj put otvara pitanje kako misacilirani intermedijer (aa-tRNA) putuje od ND-aaRS do enzima odgovornog za modificiranje nepripadne aminokiseline misaciliranog intermedijera. Naizgled djeluje kako je unutar procesa nužno spriječiti upotrebu misacilirane aa-tRNA u daljnjim koracima translacije, no ovakve misacilirane vrste ne predstavljaju prijetnju translacijskoj vjernosti, budući da ih EF-Tu učinkovito odbacuje kao neprikladni supstrat za biosintezu proteina na ribosomu[32]. S druge strane, ukoliko se misacilirani intermedijer otpusti s ND-aaRS u otopinu/citosol

hidroliza labilne esterske veze između aa i tRNA je relativno izvjesna, i kao takva, predstavlja neželjeno uništavanje svježe sintetiziranog metaboličkog prekursora.

Blaise i suradnici [33] pokazali su sprezanje dvaju koraka indirektnog aminoacilacijskog puta kod nastanka Asn-tRNA^{Asn} u bakterije *Thermus thermophilus* koja u tu svrhu koristi indirektni proces aminoacilacije. Aspartat se pritom aktivira vezanjem na tRNA^{Asn} pomoću ND-AspRS po čemu slijedi amidacija aminokiseline uz pomoć modificirajućeg enzima GatCAB amidotransferaze[34]. Amidacijom bočnog ogranka aspartata nastaje asparagin, odn. funkcionalna molekula Asn-tRNA^{Asn}, budući da je aspartat u prvom koraku aktiviran vezanjem na tRNA^{Asn}. Oba enzima, zajedno s neaminoaciliranom tRNA oblikuju cjelovitu ribonukleoproteinsku česticu (RNP, prema eng. *ribonucleoprotein particle*) koja se naziva transamidosom. Unutar transamidosoma omogućen je usmjereni prijenos (eng. *channelling*) pogrešno aminoacilirane Asp-tRNA^{Asn} s nediskriminirajuće AspRS na amidotransferazu (ovdje GatCAB) koji amidira aspartat esterificiran na tRNA^{Asn}. Ovakvo udruživanje enzima ND-AspRS i GatCAB sprečava i hidrolizu labilne esterske veze intermedijera aa-tRNA kao i njegovo prerano otpuštanje koje bi potencijalno moglo stvarati izazov staničnoj mašineriji u očuvanju integriteta genetičkog koda [34].



Slika 2-7. Kristalna struktura transamidosoma iz bakterije *T. thermophilus* (PDB ID 3KFU) otkriva da je ribonukleoproteinska čestica izgrađena od dvije molekule GatCAB, dvije dimerne ND-AspRS te 4 $tRNA^{Asn}$ (ovdje prikazane shematski). Unutar kompleksa, samo dvije tRNA su funkcionalne, dok druge dvije služe kao skela koja omogućuje otpuštanje Asn-$tRNA^{Asn}$ bez disocijacije čitavog kompleksa. Plavo je označena ND-AspRS, katalitičke $tRNA^{Asn}$ crveno, strukturna $tRNA^{Asn}$ sivo te podjedinice trimernog proteina GatCAB zeleno, ljubičasto i žuto. Predloženi model rada transamidosoma; dvije molekule GatCAB vežu dimerne ND-AspRS u binarnom kompleksu s $tRNA^{Asn}$. Vezanjem na GatCAB (1), dva mjesta pojedine ND-AspRS vežu pojedinu tRNA na različiti način: samo jedna $tRNA^{Asn}$ vezana je produktivno (katalitička), dok druga ne funkcionira kao supstrat, već kao strukturni element odgovoran za stabilnost čitave čestice (2); stoga se samo jedna tRNA (katalitička) asparaginilira. Ovaj kompleks veže drugu dimernu ND-AspRS (opet u kompleksu s dvije molekule $tRNA^{Asn}$) (3) promovirajući disocijaciju ND-AspRS vezane na novostvorenu Asn-$tRNA^{Asn}$ (4) koja se zamjenjuje novim kompleksom ND-AspRS:$tRNA^{Asn}$ (5). Tijekom ove izmjene strukturna $tRNA^{Asn}$ vezana na drugu molekulu ND-AspRS održava integritet transamidosoma dok se katalitička $tRNA^{Asn}$ asparaginilira. Dimerna AspRS vezana na Asn-$tRNA^{Asn}$ se potom zamjenjuje s novim ND-AspRS:$tRNA^{Asn}$ kompleksom (2. ciklus). Slovo N označava molekulu asparagina kovalentno vezanu na katalitičku $tRNA^{Asn}$.

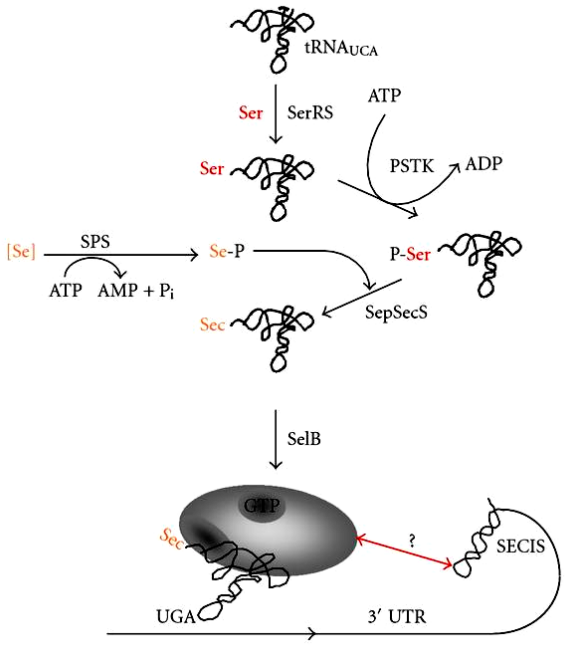
Upravo opisani alternativni aminoacilacijski put bitno se razlikuje od sistematičnog aminoacilacijskog puta karakterističnog za nastanak aktiviranog selenocisteina. Dvadesetprva aminokiselina (Sec) prirodno je prisutna u svim kraljevstvima života kao građevni blok za izgradnju selenoproteina [35]. Analog je cisteina (tiolna skupina bočnog ogranka zamijenjena je selenolnom). Atom selena odgovoran je za nižu vrijednost p*K*a bočnog ogranka Sec te jaču nukleofilnost u odnosu na cistein. Visoka reaktivnost selenocisteinskog bočnog ogranka odgovorna je za pojavu da su selenoproteini najvećim dijelom enzimi, pri čemu je Sec esencijalan za njihovu katalitičku učinkovitost. Reaktivnost selenocisteinskog ostatka tijekom katalitičkog ciklusa iskorištaju glutation-peroksidaze, tetrajodotironin-5'-dejodinaze, tioredoksin-reduktaze, format-dehidrogenaze itd. Navedeni enzimi su reprezentativni selenoproteini. Aminokiselinu selenocistein otkrila je biokemičarka Theresa Stadtman.

Ugradnja ove aminokiseline u rastući polipeptidni lanac uključuje dekodiranje kodona UGA (inače terminacijskog kodona, v. ranije) zbog čega se kaže da ugradnja ove aminokiseline predstavlja i proširenje genetičkog koda. Godine 1986. otkriveni su geni odgovorni za

nastanak selenoproteina glutation-peroksidaze i bakterijske format-dehidrogenaze od kojih svaki sadrži terminacijski UGA-kodon unutar vlastitih kodirajućih sljedova. Biosintetski put za Sec nešto je različit izmedju eukariota te arheja, a u odnosu na bakterijske sustave. Selenocistein posjeduje vlastitu tRNA, $tRNA^{Sec}$, a koja se inicijalno aminoacilira serinom u reakciji seril-tRNA-sintetaze. Dakle, aktivacija selenocisteina započinje na sličan način kao kod alternativnog puta za nastanak $Asn\text{-}tRNA^{Asn}$, pri čemu u prvom koraku nastaje misacilirana tRNA ($Ser\text{-}tRNA^{Sec}$ kod aktivacije selenocisteina, odn. $Asp\text{-}tRNA^{Asn}$ kod aktivacije asparagina u sustavima gdje nedostaje AsnRS). Serilna skupina potom se fosforilira kako bi nastao fosfoserin (reakcija O-fosfoseril-tRNA-kinaze). Selenocistein-sintaza (SecS) koristi $O\text{-fosfoseril-}tRNA^{Sec}$ te donor selena, selenofosfat[a], kao supstrate te generira finalni produkt, $Sec\text{-}tRNA^{Sec}$, [36]. Ovakvu, ispravno aminoaciliranu $Sec\text{-}tRNA^{Sec}$ preuzima posebni elongacijski faktor, SelB te ju dovodi na ribosom. Informacija da se zaista radi o UGA-kodonu koji treba dekodirati selenocisteinom, a ne o običnom terminacijskom kodonu, sadržana je unutar molekule mRNA željenog selenoproteina. Naime, posebne ukosničke strukture signaliziraju ribosomu akomodaciju $Sec\text{-}tRNA^{Sec}$, umjesto RF2.

Iako se sam proces donekle razlikuje između arheja/eukariota i bakterija, selenocistein se *u svim slučajevima* ugrađuje kotranslacijski, koordiniranim radom nekoliko proteinskih faktora.

[a] Selenofosfat se sintetizira iz selenida i ATP-a u reakciji selenofosfat-sintetaze 2 (SPS2).



Slika 2-8. Shema biosinteze selenocisteina u arheja. Kratice stoje za netranslatiranu regiju (UTR, orema eng. *untranslated region*), PSTK za seril-tRNA^{Sec} kinazu, SelB za elongacijski faktor specifičan za ugradnju selenocisteina, SepSecS, O-fosfoseril-tRNASec:selenocistein sintaza, SPS selenofosfat sintetaza. Reducirani selen označen je kao [Se], a selenomonofosfat kao Se-P. Ostale kratice su standardne (v.tekst). Preuzeto iz [37]

Cisteinil-tRNA^{Cys} tipično nastaje radom CysRS. No, kod nekih arheja (poput *Methanocaldococcus jannaschii*) sinteza Cys-tRNA^{Cys} odvija se korištenjem indirektnog puta, pri čemu O-fosfoseril-tRNA-sintetaza (SepRS) acilira tRNA^{Cys} fosfoserinom (Sep), a Sep-tRNA-Cys-tRNA-sintaza (SepCysS) potom pretvara na tRNA vezani fosfoserin u cistein[38].

Glutaminil-tRNA^{Gln} nastaje direktnim putom samo unutar eukariotskog citosola te kod malog dijela bakterija. Indirektni transamidacijski put koristi se pak u većine bakterija i arheja. Do danas je gotovo nemoguće predvidjeti kojim se putom stvaraju organelne molekule Gln-tRNA^{Gln} kod danog eukariotskog organizma. Unutar svih eukariotskih genoma sekvenciranih do danas nalazimo jedinstveni gen za GlnRS. Njegov produkt zasigurno je odgovoran za opaženu glutaminilacijsku aktivnost u citosolu spomenutih eukariotskih organizama. S druge strane, u spomenutim (sekvenciranim) genomima nalazimo i gen koji kodira mitohondrijski ortolog esencijalne GatB-podjedinice tRNA-zavisne amidotransferaze (AdT) što bi sugeriralo da se u eukariotskim mitohondrijima molekule Gln-tRNA^{Gln} sintetiziraju indirektnim putom. Direktna glutaminilacija pokazana je u mitohondrijima Protozoa, dok je transamidacijska (AdT) aktivnost okarakterizirana u biljnih organela.

2.3.4 Multisintetazni kompleksi

Suvremene aminoacil-tRNA-sintetaze posjeduju modularnu topologiju, s više ili manje definiranim domenama i modulima odgovornim za katalizu, popravak pogreške, prepoznavanje pripadne tRNA i njenih specifičnih elemenata, kao i raznih drugih proteinskih i RNA-partnera. Poželjna dodatna svojstva i aktivnosti mogu se ostvariti po interakciji aminoacil-tRNA-sintetaza s drugim staničnim proteinima i enzimima. Udruživanje staničnih proteina generalno propagira i/ili olakšava novu (nekanonsku) aktivnost vezane aaRS.

U smislu vremenske regulacije, stanični makromolekulski kompleksi mogu biti dugo- ili kratkoživući[39], pri čemu je takva "vijabilnost" molekulskog kompleksa direktno proporcionalna njegovoj stabilnosti. Prvi tip interakcije najčešće je vezan za procese od nekoliko koraka (slično kao na primjeru transamidosoma) pri čemu prednost udruživanja proizlazi iz mogućnosti koordinirane kontrole nad reakcijskim brzinama, nad otpuštanjem intermedijera i usmjerenom prijenosu supstrata. Prolazne interakcije su, pak, uglavnom involvirane u prijenosu signala ili kontekstnom odgovoru na specifični stanični zahtjev.

Gledajući komponente translacijske mašinerije prisutna su oba tipa interakcija. Ribosom je pritom reprezentatnivni primjer dugoživućih kompleksa. Obostrana udruživanja staničnih aaRS su također poprilično česta: vjerojatno najbolji primjer za to predstavlja multisintetazni kompleks (MSC prema eng. *multisynthetase complex*) sisavaca koji objedinjava 8 cjelovitih aminoacil-tRNA-sintetaza (od kojih je jedna bifunkcionalna, dakle, 9 različitih aminoacilacijskih aktivnost je prisutno unutar MSC). Unutar kompleksa nalazimo i 3 nesintetazne proteinske komponente, p18, p38 i p43[40]. Iako sve strukturne značajke ovog kompleksa nisu sasvim poznate, sintetazne komponente najvjerojatnije su uzajamno povezane pomoću svojih N- i C-terminalnih ekstenzija. Dostupne trodimenzionalne rekonstrukcije MSC [41] otkrivaju da je čestica oblikovana kao asimetrično slovo "V", s dubokom središnjom pukotinom. Pomoćni proteini, p18, p38 i p43, uključeni su u različite aktivnosti. Te komponente stupaju u uzajamne interakcije, kao i s participirajućim sintetazama unutar MSC (LysRS, ArgRS, GlnRS, AspRS, MetRS, IleRS, LeuRS te GluProRS) te je njihova očigledna funkcija ona strukturna, odnosno, putem interakcija ovih pomoćnih proteina, čuva se integritet ovog golemog citosolnog kompleksa (molekulska masa iznosi oko 1,5 milijuna Da).[42] Komponenta p18 u direktnoj je interakciji s MetRS unutar multisintetaznog kompleksa, no ujedno može djelovati i kao supresor tumorigeneze preko interakcija sa staničnom komponentom ATM, uzvodnom kinazom tumor supresora p53.[43] Protein p38 najvažniji je strukturni element, budući da stupa u direktne interakcije s LysRS, GlnRS, AspRS,

GluProRS, te IleRS (kao i, kao što je spomenuto, s nesintetaznim komponentama p43 i p18). Najraznovrsnije funkcije ipak pripadaju p43 te uključuju vezanje tRNA, moduliranje aminoacilacijske aktivnosti, sudjelovanje u sintezi citokina i doprinos strukturnom integritetu multisintetaznog kompleksa[44,45].

Jedna od predloženih funkcija[a] ovog kompleksa jest funkcija depoa[39] iz/sa kojega se individualne sintetaze mogu otpustiti u direktnom odgovoru na stanične podražaje, najčešće s ciljem izvođenja svoje nekanonske funkcije. S te strane, sposobnost aaRS za vezanje nukleinskih kiselina može biti iskorištena za prepoznavanje specijalnih regulatornih elemenata na mRNA, kao što to ilustrira uloga GluProRS unutar GAIT- kompleksa[46]. Ovaj kompleks veže definiranu 3'-netranslatiranu regiju mRNA uključenih u upalni odgovor te je vezanjem sposoban suprimirati njihovu translaciju. Protein-skela p43 (nesintetazna komponenta) može se otpustiti iz MSC kako bi regulirao ponašanje *heat shock* proteina gp96 unutar endoplazmatskog retikuluma. Zapriječeno izlaganje glikoproteina 96 na površini ER-a koči aktivaciju ili sazrijevanje dendritičkih stanica[47]. Nesintetazna komponenta p18 može se otpustiti iz MARS kompleksa u odgovoru na oštećenja DNA te se translocirati u jezgru s ciljem popravka DNA[48]. Otpuštanje individualnih sintetaza i nesintetaznih komponenata te posljedično djelovanje istih kroz nekanonske funkcije naširoko je dokumentirani fenomen [49,50]. S druge strane, jednom otpuštena aaRS slobodna je participirati u interakcijama s drugim staničnim makromolekulama. Takav je slučaj ranije spomenutog kompleksa GAIT[46].

Kod eukariota, kompleksnost MSC korelira s kompleksnošću organizma u kojem se nalazi. Tako je MSC jednostaničnog kvasca *S. cerevisiae* izgrađen od dvije sintetaze (MetRS i GluRS) i jedne nesintetazne proteinske komponente - Arc1p (prema eng. *aminoacyl-tRNA synthetase cofactor 1 protein*). Ovaj kompleks ponekad se naziva i AME, prema jednoslovnim skraćenicama aminokiselinskih specifičnosti participirajućih aaRS te prema prvom slovu naziva nesintetazne komponente.

Iako Arc1p nije esencijalni protein, sposoban je potaknuti aminoacilacijsku aktivnost MetRS i GluRS *in vitro*[51]. Također, oblikovanjem kompleksa inhibira se ulazak MetRS, GluRS i Arc1p u jezgru čime se aminoacilacijska mašinerija segregira unutar citosola[52]. Kompleks MetRS-Arc1p–GluRS može vezati i mismetionilirati mnoge vrste tRNA[53]. Sličan efekt postignut je kada se protein Trbp111 fuzionirao na kvaščev MetRS[54].

Spomenuti Trbp111 samostalni je protein koji veže tRNA te je karakterističan za bakterijsku domenu. Dijeli homologiju s domenom EMAP II koju nalazimo metazojskih TyrRS te kod

[a] Pored ranije predloženog usmjerenog prijenosa supstrata.

MetRS *C. elegans.* Protein Trbp111 specifično prepoznaje tRNA putem interakcija s kutom karakterističnog slova L kojeg oblikuje tercijarna struktura tRNA[55]. U određenih bakterija i biljaka, domena nalik Trbp111 fuzionirana je na C-kraj MetRS te olakšava vezanje tRNA[56].

Kompleks MetRS-Arc1p–GluRS posjeduje niz funkcija. Jedna od njih je spomenuta citosolna lokalizacija MetRS i GluRS. Delecija GST[a]-domene Arc1p rezultira s izrazitom lokalizacijom ovih komponenata u jezgri kvasca. Po ulasku u jezgru, GluRS i Arc1p vežu se na apurinska i apirimidinska mjesta oštećene kromosomske DNA[42].

S GST-domenom na N-kraju i C-terminalnom domenom koja naliči modulu EMAPII (odn., šire Trbp111), Arc1p je zapravo fuzijski protein unutar kojeg je povezan modul predisponiran za vezanje proteinskog partnera s domenom predviđenom za interakciju s tRNA. Uključen je u prijenos citosolne GluRS u mitohondrije[b], pri čemu se prijenos korelira s količinom prisutnog Arc1p u stanici. Ekspresija Arc1p je pak regulirana prijelazom stanice iz anaerobnog u anaerobni metabolizam čime se efektivno sprežu metabolički zahtjevi s biosintezom proteina unutar mitohondrija[57].

Unutar kraljevstva *Archaea*, nekoliko multisintetaznih kompleksa zabilježeno je dosad [40]. U arheji *Thermococcus kodakarensis*, 6 sintetaza kopurificira se s drugim komponentama translacijske mašinerije te su autori predložili direktnu interakciju staničnog MSC s ribosomima[58]. U arheji *Methanothermobacter thermautotrophicus* interakcija između elongacijskog faktora EF-1α i samostojećeg MSC (formiranog udruživanjem LeuRS, LysRS i ProRS) je zabilježena. Preko komunikacije s elongacijskim faktorom EF-1α autori su predložili potencijalno sprezanje dviju faza translacije: aminoacilacija tRNA i njihovo dekodiranje na ribosomu mogle bi biti usklađene putem direktne interakcije s elongacijskim faktorom [12].

2.4 Seril-tRNA-sintetaza

Seril-tRNA-sintetaza dimerni je enzim koji pripada podrazredu IIa. Dosad su poznata dva tipa SerRS, bakterijski tip (zajednički bakterijama, eukariotima i većem dijelu arheja) te metanogeni tip (rezerviran za malu skupinu metanogenih arhejskih vrsta). Trodimenzionalna struktura oba tipa je poznata, ali u kompleksu s pripadnom tRNA postoji samo za bakterijski tip enzima.

[a] Općenito, eukariotske aaRS veće su od prokariotskih, a uglavnom na uštrb produžetaka na N-, odn. C-kraju. Ono što je pritom interesantno jest činjenica da produžeci oblikuju neke dobro poznate strukture, primjerice leucinski zatvarač ili domenu glutation-S-transferaze te su naširoko rasprostranjene kod proteina ljudi.

[b] U mitohondrijima kvasca Gln-tRNA^{Gln} sintetizira se indirektnim putem za što je potrebna ND-GluRS. No mitohondrijska kopija GluRS ne posjeduje relaksiranu specifičnost te se za sintezu Gln-tRNA^{Gln} koristi citosolna varijanta GluRS (koja pritom mora biti specifično unesena u te stanične organele).

2.4.1 Prepoznavanje tRNA^{Ser}

Seril-tRNA-sintetaza zanimljiva je, između ostalog, zbog raznolikosti serinskih kodona. Serin je kodiran s ukupno 6 kodona koji se daju podijeliti u dvije skupine (zavisno od identiteta prva dva nukleotida tripleta). S obzirom na takvu raznolikost kodona (i sukladno tomu, antikodona tRNA^{Ser}), ne čudi da SerRS ne prepoznaje antikodon pripadnih tRNA-izoakceptora[59–61]. Ovakav način prepoznavanja je u skladu i s kotranslacijskom ugradnjom selenocisteina koja započinje reakcijom SerRS (v. str.15).

Serinske tRNA posjeduju dugu varijabilnu ruku[a] koju susrećemo i kod tRNA^{Sec}. Ovo svojstvo u prokariotskim sistemima posjeduju još jedino tRNA^{Leu} i tRNA^{Tyr},[62]. U sustavu *E. coli* minimalna duljina i ispravna orijentacija varijabilne ruke predstavljaju osnovni zahtjev za uspješnu serilaciju. Primarni slijed nukleotida varijabilne ruke pritom posjeduje mnogo manju važnost u prepoznavanju[59,60,62]. Ostali elementi identiteta tRNA^{Ser} bakterije *E. coli* smješteni su u akceptorskoj- i D-peteljci (C11-G24) [60,61].

Informacija o identitetnim elementima u spomenutom sustavu *E. coli* dolazi iz kinetičkih istraživanja u kojima su korištene varijantne serinske tRNA, kao i kristalografskih istraživanja. Struktura SerRS iz *E. coli* u slobodnom obliku riješena je još 1990.[63], a u kompleksu s tRNA^{Ser} 1993. godine[64]. Nažalost, nijedan od spomenutih modela nije unesen u bazu PDB. Struktura minimalne[b] tRNA^{Ser} *E. coli* (tzv. tRNA-mikroheliks) ukazala je na postojanje definiranog obrasca hidratizacije akceptorskog dijela tRNA^{Ser}, kao i postojanje veznih mjesta za ione magnezija[65]. Za mitohondrijski serinski sustav bika *Bos taurus* riješena je struktura SerRS u kompleksu s intermedijerom Ser-AMP pri rezoluciji od 1,65 Å. Detaljne informacije o vezanju tRNA dobivene su korištenjem modela u kojem je tRNA^{Ser} usidrena na riješenu strukturu proteina[66]. Konkretno, model kompleksa napravljen je superponiranjem katalitičke domene mitohondrijske BsSerRS na strukturu kompleksa SerRS:tRNA^{Ser} iz *T. thermophilus* (PDB ID 1SER)[67]. No kako mitohondrijska tRNA^{Ser} ne posjeduje dugu varijabilnu ruku, kvaščeva tRNA^{Phe} (PDB ID 1EVV) je superponirana na tRNA^{Ser}. Kao rezultat, okosnica tRNA usidrene na mitohondrijski enzim potječe od tRNA^{Phe}. S obzirom na dodatne posebnosti mitohondrijske tRNA^{Ser}, Chimnaronk i suradnici iskoristili su ovaj model tek kao odskočnu dasku za biokemijsku/mutacijsku analizu prepoznavanja tRNA^{Ser}, a ne kao točan model kojime bi se prepoznavanje između enzima i tRNA moglo diskutirati u detalje[66].

Riješene kristalne strukture slobodne prokariotske SerRS bakterijskog tipa uključuju one *E. coli*[63] (bez depozicije u PDB-bazi podataka) i *T. thermophilus* (PDB-kodovi 1SET, 1SES i

[a] Varijabilna ruka može biti dugačka do 20 nukleotida.
[b] U ovom slučaju je to akceptorska peteljka.

1SRY [68,69]. Obje su riješene su pri rezoluciji od 2,5 Å. Enzim iz *T. thermophilus* i enzim iz *E. coli* zamjetno su slični na razini primarnog slijeda, kao i na razini trodimenzionalne strukture. Strukturnu osnovicu katalitičke domene oba enzima čini sedmerolančana antiparalelna β-ploča s dvije povezujuće zavojnice. Dodatno, struktura SerRS u oba slučaja sadrži posebnu N-terminalnu domenu sačinjenu od izuzetno duge, otapalu izložene antiparalelne uzvojite zavojnice.[a] Prokariotske SerRS bakterijskog tipa iz gljivice *Candida albicans* (PDB-kodovi 3QNE, 3QO5, 3QO7 i 3QO8)[70] te arheje *Pyrococcus horikoshii* (PDB-kodovi 2DQ1, 2DQ0, 2ZR2 te 2ZR3)[71] posjeduju dodatne osobitosti, ali ne odudaraju odviše od kanonske građe ovog tipa SerRS.

Bakterijskom tipu SerRS pripadaju još spomenuta mitohondrijska SerRS *B. taurus* (PDB ID 1WLE)[66] i SerRS čovjeka (PDB-kodovi 4L87 i 3VBB)[72]. Humana SerRS primjer je modularnosti građe aaRS općenito te će u tom kontekstu biti diskutirana kasnije.

Biou i suradnici[67] riješili su kristalnu strukturu kompleksa SerRS s $tRNA^{Ser}_{GGA}$ iz bakterije *T. thermophilus* pri 2,9 Å. U danoj stukturi stehiometrijski odnos tRNA prema dimeru SerRS je 1:1. Homodimerni enzimi teoretski su sposobni vezati po dva supstrata, no to ne mora nužno biti tako. Budući da vezanje prve molekule supstrata može (iako ne mora) biti okidačem strukturnih rearanžmana unutar enzima, druga molekula može se vezati olakšano ili otežano. U slučaju bakterijskog tipa SerRS pokazano je da je simultano vezanje dviju molekula $tRNA^{Ser}$ moguće. Kao što je spomenuto ranije, aaRS razreda I su dominantno monomeri (izuzev TrpRS i TyrRS), dok su sintetaze razreda II homo- ili (rjeđe) heterodimeri (v. ranije). Dimerni enzimi mogu stoga vezati jednu ili dvije molekule tRNA. U nekim sustavima svaka od pripadnih molekula tRNA stupa u interakciju samo s jednom podjedinicom enzima dok je drugdje prisutno vezanje duž obje podjedinice. Iako je oligomerna građa pojedinih aaRS evolucijski očuvano svojstvo, ona ne mora nužno biti praćena istovjetnom stehiometrijom vezanja tRNA, odn., broja tRNA koje pojedini oligomer veže. Kao što se može zapaziti na osnovu broja riješenih struktura SerRS u kompleksu s pripadnom tRNA[b], nedvojbeni dokaz o smještaju $tRNA^{Ser}$ uzduž dimera SerRS postoji samo za bakterijske sustave[73,67]. Kod kvasca *S. cerevisiae* titracijom aktivnog mjesta dokazano je da oba aktivna mjesta enzima sudjeluju u sintezi seril-adenilata[74]. Kombinacijom biokemijskih tehnika i spektrometrije masa nadalje je pokazano da je kvaščeva citosolna SerRS sposobna oblikovati komplekse stehiometrije 2:1 u korist tRNA (kompleks $\alpha_2 tRNA_2$)[75]. Bez obzira na aktivnost oba mjesta u stvaranju

[a] Berhali i suradnici nazvali su ovu strukturu helikalnom rukom.

[b] To uključuje bakterijski tip SerRS u kompleksu s $tRNA^{Ser}$ iz *T. thermophilus* i metanogeni tip SerRS u kompleksu s $tRNA^{Sec}$.

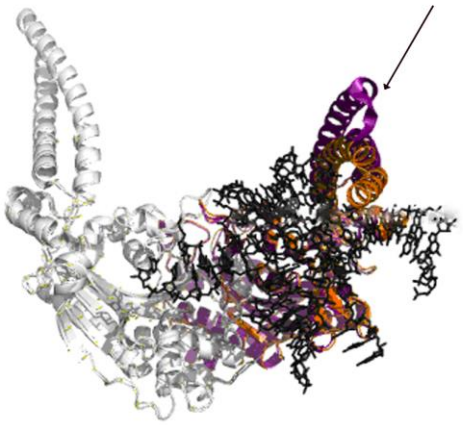
reakcijskog intermedijera i oblikovanje α_2tRNA$_2$-kompleksa, dvije molekule tRNA zauzimaju vezna mjesta na dimeru s nejednakim afinitetima. Seril-tRNA-sintetaza kvasca *S. cerevisiae* koristi tRNA-zavisno prepoznavanje pripadne aminokiseline[76], a dimerni SerRS u kompleksu s jednom molekulom tRNA^{Ser} je više specifičan i katalitički učinkovit u formiranju seril-adenilata u odnosu na slobodni oblik enzima. Također, interakcije tRNA i proteina povećavaju diskriminaciju nad aminokiselinskim supstratom vjerojatno preko inducirane konformacijske promjene u aktivnom mjestu enzima (do koje dolazi po vezanju tRNA^{Ser})[75] Ovo opažanje u skladu je s ranim eksperimentima u istom sustavu[77]. Uzimajući u obzir veliku razliku u afinitetu dvaju individualnih aktivnih mjesta za tRNA, za zaključiti je da je vezanje tRNA^{Ser} kod *S. cerevisiae* antikooperativno. Iako ne postoji adekvatan dokaz, za pretpostaviti je da je kompleks stehiometrije α_2tRNA$_1$ onaj koji je zaista funkcionalan *in vivo*.

U strukturi kompleksa SerRS:tRNA^{Ser} iz bakterije *T. thermophilus* po prilici jedna trećina molekule tRNA nije vidljiva u mapi elektronske gustoće. Slabije uređeni dijelovi uključuju antikodonsku ruku, varijabilnu omču[a], kao i 3'- i 5'-krajeve. Ovdje je zapažena stehiometrija vezanja (jedna molekula tRNA vezana je na dimer SerRS) rezultat kristalnog pakiranja proteina, budući da je aminokiselinski ostaci drugog, potencijalnog (ovdje slobodnog) mjesta vezanja tRNA sudjeluje u kristalnim kontaktima te je na taj način blokirano. Na prvi pogled u strukturi se razabiru direktne interakcije tRNA s antiparalelnom uzvojitom zavojnicom SerRS (N-terminalna domena) kao i opsežne tercijarne interakcije unutar srži tRNA. Potonje su izravno odgovorne za orijentaciju duge varijabilne ruke tRNA što je ključno za prepoznavanje u serinskom sustavu.

Nadalje je iz strukture vidljivo da se molekula tRNA^{Ser} veže uzduž dviju podjedinica dimera. Usporedbom slobodne TtSerRS[69] i iste sintetaze u kompleksu[67], može se zapaziti da se po vezanju tRNA inače fleksibilna N-terminalna domena (tj njena zavojita uzvojnica) stabilizira u specifičnoj orijentaciji. Pritom zavija uokolo TψC-omče i duge varijabilne ruke tRNA (slika 2.9). Okosnica SerRS stvara nekoliko kontakata s tRNA, od koji je mali broj bazno specifičan. Prepoznavanje duge varijabilne ruke tRNA ostvaruje se dominantno s njenom okosnicom i proteže do 6. para baza. Ovakav način prepoznavanja objašnjava potrebu za minimalnom duljinom ruke, kao i relativno nespecifično prepoznavanje s aspekta nukleotidnog slijeda/sastava.[b]

[a] Niti jedan od tih elemenata ne stupa u kontakt sa sintetazom niti stvara kristalne kontakte.

[b] Istovremeno, na ovaj način omogućeno je smještanje i dulje varijabilne ruke, nego što je to u slučaju tRNA^{Ser} (npr. one tRNA^{Sec}) te njeno posljedično prepoznavanje.



Slika 2-9. Gibanje uzvojite zavojnice (helikalne ruke, označena stralicom) kod bakterijskog tipa SerRS. Slika je generirana preklapanjem riješenih struktura 1SER (narančasto) i 1SES (ljubičasto).

Od posebne je važnosti način na koji su smješteni nukleotidi 20a (dihidrouridin) i 20b (gvanozin) u D-omči $tRNA^{Ser}$. Zakopani na razmeđi individualnih domena tRNA, ovi nukleotidi izravno utječu na oblikovanje srži tRNA. Posebno je zanimljiva baza 20b koja stupa u interakcije slaganja s prvim parom baza duge varijabilne ruke. Ovakav položaj ukazuje na mogućnost da gvanozin 20b kod ove tRNA uvjetuje orijentaciju varijabilne peteljke (slika 2.10).

2.4.2 Konformacijske promjene SerRS inducirane vezanjem $tRNA^{Ser}$

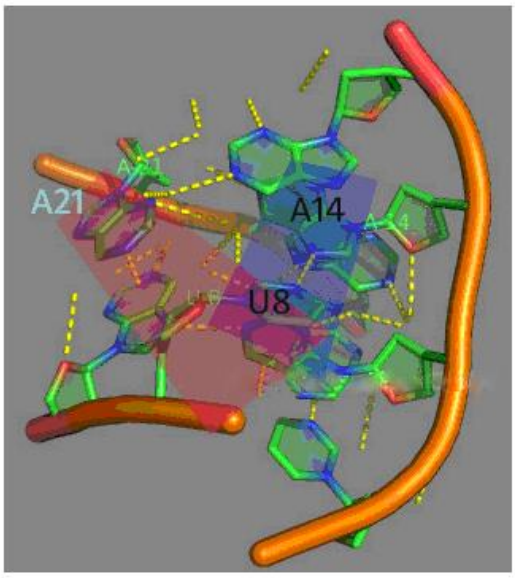
Prilikom vezanja tRNA helikalna domena SerRS mijenja orijentaciju i zakrivljenost. Tako helikalna ruka jednog monomera rotira za otprilike 20° u odnosu na monomer slobodnog oblika SerRS. Nova konformacija ove domene dozvoljava njeno smještanje u pukotinu $tRNA^{Ser}$, a koja postoji između D-omče i varijabilne ruke[67].

Ovakvo gibanje N-terminalne ruke navodi se i u radu s kristalnom strukturom kompleksa SerRS:$tRNA^{Ser}$ iz *E. coli*, koordinate kojeg nisu deponirane u PDB-bazi podataka [64].

2.4.3 Struktura $tRNA^{Ser}$

Sekundarna struktura prokariotske $tRNA^{Ser}$ karakterizirana je delecijom na položaju 17 unutar D-omče te dvostrukom insercijom 20a i 20b unutar iste. Ističe se i duljinom varijabilne ruke koja u slučaju *T. thermophilus* posjeduje 20 nukleotida i 7 parova baza. Tercijarne interakcije u srži tRNA također su posebne i daju se razlikovati od onih opisanih u drugim sustavima. Primjerice, tipična organizacija unutrašnjosti molekule tRNA uključuje četiri paralelno složene ravnine formirane sparivanjem baza. Od toga tri ravnine uključuju nukleotidni triplet

u kojem susrećemo jedan osnovni par baza[a], dok treća baza participira kroz dodatne vodikove veze[b]. Ekvivalentna regija u $tRNA^{Ser}$ je reorganizirana tako da akomodira inserciju nukleotida 20a i 20b unutar D-omče te može biti opisana notacijom D20a-[G15-C48], A21-[U8-A14], G9-[A22-G13] i [G23-C12] (slika 2.10)[c]. Važno svojstvo srži $tRNA^{Ser}$ je gubitak spomenute planarnosti nukleotidnih tripleta: baze A21 i G9 izbačene su van ravnine za gotovo 45°. Ovakav redoslijed je direktna posljedica prisustva insertirane baze G20b koja se smješta okomito na spomenutu/e ravininu/e. Ulaskom G20b u prostor srži tRNA spriječena je mogućnost da se A21 nađe u istoj ravnini s ostatkom svog tripleta (par [A14-U8]). Kao što je spomenuto, gvanozin 20b stupa u interakcije slaganja parom baza varijabilne ruke (par [A45-U47q]) te je na taj način u mogućnosti uvjetovati usmjerenje tog elementa.



Slika 2-10. Strukturna organizacija srži $tRNA^{Ser}$ (PDB ID 1SER). Žutim crtkanim linijama prikazane su vodikove veze te je istaknuti netipični triplet baza A21-[A14-U8]. Ravnine osnovnog para (A14-U8) te sturenog adenozina A21 prikazane su u plavoj, don. crvenoj boji.

Još jedna posebnost serinskih tRNA uključuje i konformaciju D-omče. Naime, iako su kontakti D- i TψC-omče takoreći kanonski[d], nedostatak baze na položaju 17 (v. ranije) kao i participacija gvanozina 20b u formiranju srži tRNA uzrokuje da okosnica D-omče u $tRNA^{Ser}$ poprima posebnu, "cik-cak" konformaciju[67].

[a] To ne znači da u njemu nužno moramo naći Watson-Crickov tip vodikovih veza.
[b] Npr. kod $tRNA^{Phe}$ nalazimo [G15-C48], A21-[U8-A14], 7MG46-[G22-C13] i A9-[A23-U12]; PDB ID 1TRA.
[c] Baza 46 u $tRNA^{Ser}$ sparuje se s bazom 47p (baza drugog para baza varijabilne ruke) zbog čega očito nije slobodna participirati u slaganju srži tRNA. Njen položaj zauzet je bazom G9, ostavljajući par [G23-C12] bez partnera za triplet. Ovaj gubitak kompenzira se formiranjem novog tripleta na vrhu srži što uključuje bazu D20a i Levittov par G15-C48.
[d] Precizniije, dolazi do normalne komunikacije tih domena formiranjem parova G18-ψ55 i G19-C56.

2.4.4 Građa aktivnog mjesta SerRS bakterijskog tipa

Kristalna struktura SerRS iz bakterije *T. thermophilus*[69] u kompleksu s analozima seril-adenilata po prvi put je u detalje razotkrila način vezanja ovog reakcijskog intermedijera te, sukladno tomu, i ulogu nekih očuvanih aminokiselinskih ostataka kod aaRS razreda 2 (PDB-kodovi 1SES i 1SET).

Serin-hidroksamat (SerHx)[a] opisan je u ranim biokemijskim istraživanjima kao analog koji inhibira rast bakterije *E. coli*. Njegovo djelovanje na fenotip proizlazi iz činjenice da se ponaša kao kompetitivni inhibitor seril-tRNA-sintetaze u reakciji aktivacije pripadne aminokiseline[78]. Zanimljivo je da SerRS koristi SerHx kao supstrat i katalizira njegovu aktivaciju, čime se formira molekula SerHx-AMP. Dakle, seril-tRNA-sintetaza je sposobna akomodirati dulju molekulu (dulja je za dužinu jedne dodatne veze, -N(H)-) što je neočekivano s obzirom na striktnost prepoznavanja pripadne aminokiseline kod ovog enzima. Aktivacija SerHx dokazana je i kod kvasca u uvjetima *in vitro*[79].[b]

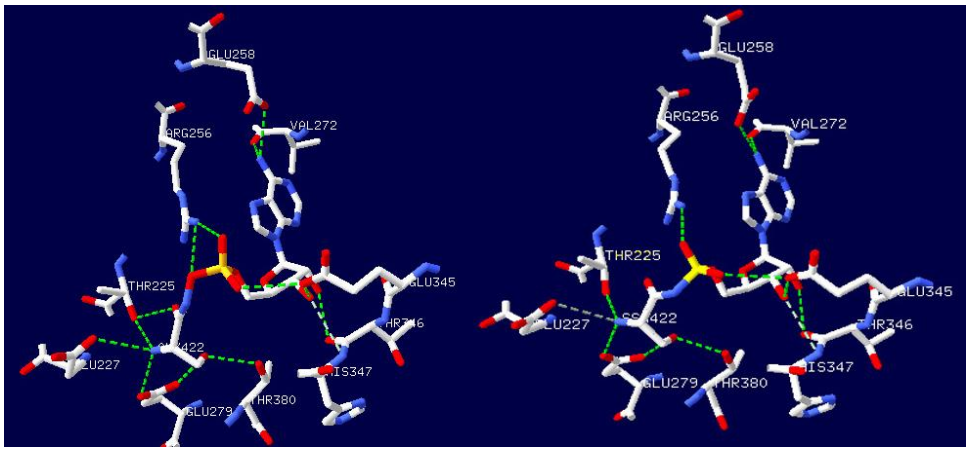
Spoj 5'-O-[N-(L-seril)-sulfamoiladenozin (Ser-AMS) drugi je analog intermedijera serilacijske reakcije korišten za ispitivanje vezanja kod TtSerRS. Berhali i suradnici pritom su se oslonili na otkriće Ueda i suradnika koji su dokazali da je istovrsni analog alanil-adenilata, 5'-O-[N-(L-alanil)-sulfamoiladenozin sposoban inhibirati aktivnost AlaRS [80]. Kada se način vezanja ovog analoga usporedi s vezanjem SerHx-AMP uočljivo je da se ta dva analoga ne vežu istom duljinom unutar aktivnog mjesta. Točnije, duljina od aminokiselinskog dijela (tj. serina/serin-hidroksamata) do fosfatnog dijela je različita (tj. sulfamoilnog/fosfatnog).

Način vezanja dvaju adenilatnih analoga unutar pukotine aktivnog mjesta je sličan. Bogata mreža vodikovih veza indicira snažno i specifično vezanje u slučaju obje molekule. Četiri svojevrsne zone aktivnog mjesta SerRS uključene su u vezanje, od kojih svaka sadrži ostatke visoko očuvane u sintetaza razreda II. Purinski prsten adenozina stupa u interakcije slaganja s Phe275 (aminokiselina motiva 2) te, na suprotnoj strani, u van der Waalsove interakcije s Arg386 (smještenog unutar motiva 3). Specifičnost prema adenozinu je osigurana vodikovim vezama koje specifične aminokiseline ostvaruju s dušikovima atomima purinskog prstena (v. slika 2.11).[c]

[a] $^{+}H_3N$-HCR-CO-N(H)OH, gdje je R serinski bočni ogranak.

[b] Berhali i suradnici[69] između ostalog navode kako je aktivirani SerHx (odn. SerHx-AMP) supstrat za drugi korak reakcije aminoacilacije tj. transfer na $tRNA^{Ser}$, pri čemu se pozivaju na neobjavljene podatke. No, da stoji upravo suprotno, Gruić-Sovulj i sur. pokazali su 2010. godine, tj. SerHx se *ne* prenosi na $tRNA^{Ser\ 163}$.

[c] Interesantno je da takav način prepoznavanja postoji i kod sintetaza razreda II; kod TrpRS, kod kojeg Ile, a kod GlnRS Leu, igraju istu ulogu kao Val272 SerRS-a. Ove nepolarne aminokiseline pružaju specifičnost za ATP. S druge strane, takve interakcije nedostaju kod MetRS i TyrRS.



Slika 2-11. Prepoznavanje seril-AMP analoga unutar aktivnog mjesta na primjeru riješenih struktura 1SES (lijevo) i 1 SET (desno). Vodikove veze iscrtkane su zeleno.

Ribozni prsten adenilata nalazimo u C3'-*endo* konformaciji. Hidroksilne skupine riboze enzim specifično prepoznaje preko aminokiselinskih ostataka Thr346 (prepoznaje 2'-hidroksilnu skupinu) i Glu345 (stvara vodikove veze s 3'-OH skupinom riboze). Spomenuti glutamat je očuvan u svih aaRS razreda II. Unutar aktivnog mjesta uočljiv je još jedan apsolutno očuvani ostatak karakterističan ta motiv 2 – Arg256 (slika 2.11). Taj argininski ostatak neuređen je u odsustvu supstrata, dok inače stupa u interakciju s fosfatnom skupinom aa-AMP intermedijera (odn., u strukturi TtSerRS 1SES sa sulfamoilnom grupom analoga).

Prepoznavanje serina ostvaruje se uz pomoć ostataka Thr225, Glu227, Glu279 i Thr380. Hidroksilna skupina serina stvara vodikove veze s Glu279 (aminokiselina smještena unutar motiva 2) i Thr380 (smještenog u motivu 3). Amino-skupina serina stabilizirana je pak vodikovim vezama s Thr225, Glu227 te (ponovo) Glu279. Vezanje dvaju analoga unutar aktivnog mjesta vrlo je slično; razlika uključuje postojanje dodatne vodikove veze između karbonilne skupine SerHx[a] i Thr225 u SerHx-AMP kompleksu (slika 2.11). Superponiranje adenilatnog dijela SerHx-AMP i Ser-AMS može se zapaziti da se spomenuta dodatna veza (-P-ON(H)- u SerHx-AMP u odnosu na –S-N(H)- u Ser-AMS) akomodira uz relativno mali pomak fosfatne skupine čime je adenozinski i serinski dio ostavljen u istim položajima.

Specifičnost prema serinu je dakle osigurana dvjema vodikovim vezama s hidroksilnom skupinom bočnog ogranka. Dodatno, i veličina veznog džepa regulira prepoznavanje pripadne aminokiseline, budući da se veća aminokiselina sterički ne može prihvatiti. Treonin 380 u motivu 3 nije potpuno očuvan kod seril-tRNA-sintetaza; u *E. coli* na tom se mjestu nalazi serin (Ser391 u EcSerRS), koji doduše zadržava istu funkcionalnost. Unutar veznog džepa za serin, jedina druga aminokiselina koja bi mogla stvarati slične polarne kontakte je treonin. S

[a] SerHx, kao što je spomenuto, ne posjeduje primarnu karboksilnu skupinu, već se na tom mjestu nalazi karbonilna skupina i skupina –N(H)OH.

druge strane, jedine aminokiseline koje se, pored treonina, mogu smjestiti unutar ovog veznog mjesta jesu glicin i alanin, no njihovo vezanje bi bilo relativno nepovoljno zbog odsutnosti vodikovih veza koje hidroksilna skupina serina normalno stvara s očuvanim ostacima aktivnog mjesta.

Diskriminacija prema treoninu regulirana je općenitom hidrofilnošću veznog mjesta za aminokiselinu. Nadalje, dodatna metilna skupina koju Thr posjeduje u odnosu na Ser smješta se na udaljnosti od 2,5 Å (ili manje) od karbonilnog kisika glavnog lanca na položaju Ser348 te bočnog ogranka Asn378.

Za potpuno objašnjenje mehanizma aktivacije serina potrebne su dodatne informacije o inicijalnim veznim mjestima i konformacijama ATP-a, magnezija i aminokiseline. U radu u kojem je pokazana struktura kompleksa TtSerRS s pripadnom tRNA[67] autori opisuju i konformaciju ATP-a kojim su kristali naknadno bili natapani[a]. Pritom trifosfatni dio ATP-a zauzima izduljenu konformaciju s β-fosfatom u položaju koji je nekompatibilan sa simultanim vezanjem serina. No, Berhali i suradnici[81] pokazali su da TtSerRS veže ATP u svinutoj konformaciji kada je vezanje izvedeno u prisustvu Mn^{2+}-iona. Konformacija ATP-a stabilizirana je interakcijama s očuvanim argininskim ostacima te ionima mangana. Unutar kristalnog pakiranja, enzim je ostao aktivan: po natapanju kristala slobodnog enzima serinom, ATP-om i Mn^{2+}-ionima, TtSerRS bio je sposoban katalizirati nastanak seril-adenilata. U oba slučaja vezna mjesta za katione mangana bila su ista: kation se koordinira aminokiselinskim ostacima aktivnog mjesta te α-fosfatom vezanog ATP-a, odn. Ser-AMP-a. Stoga su svinuta konformacija ATP-a i položaj serina indikativni i konzistentni s S_N2 mehanizmom gdje nukleofilni napad kisika iz serinske karboksilne skupine na α-fosfat ATP-a dovodi do otpuštanja anorganskog pirofosfata[b].

2.4.5 Opće topološke značajke metanogenih seril-tRNA-sintetaza

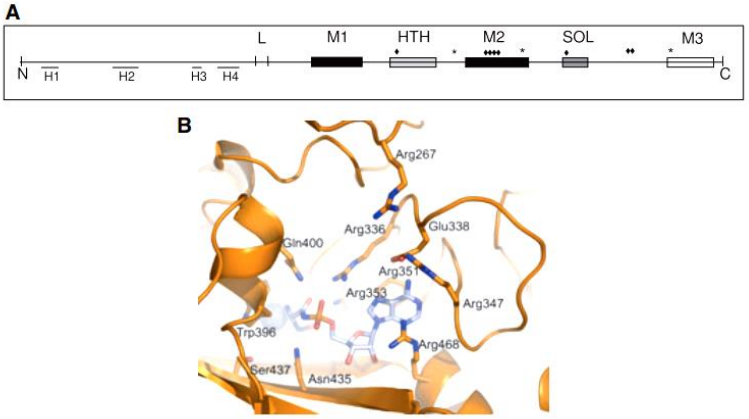
Poput SerRS bakterijskg tipa, i metanogene SerRS posjeduju homodimernu građu u kojoj je svaki monomer razlučiv na dvije distinktne domene, C-terminalno smještenu katalitičku i N-terminalno smještenu, tRNA-veznu domenu[7]. Relativni smještaj ovih domena sličan je onome viđenome kod bakterijskog tipa SerRS. S aspekta tih generalnih topoloških značajki, metanogena SerRS ne razlikuje se od bakterijskog tipa iste[63,70–72]. Na prvi pogled ta dva tipa

[a] Koordinate ovakvog ternarnog kompleksa nisu unesene u PDB te se tekst referira isključivo na podatke iz citiranog rada.

[b] Aminoacil-tRNA-sintetaze mogu sintetizirati i glasničku molekulu diadenozin-tetrafosfat (Ap4A). Kod SerRS, druga molekula ATP-a može se vezati sa svojim γ-fosfatom u istoj poziciji u kojoj je β-fosfat originalne molekule ATP-a. Ovaj pak može napasti ser-AMP s posljedičnim nastankom Ap4A uz idntični in-line mehanizam u suprotnom smjeru.

SerRS razlikuju se s obzirom na oblikovanje N-terminalne domene, koja kao što je rečeno, u bakterijske SerRS oblikuje karakterističnu helikalnu ruku (struktura uzvojite zavojnice[69,72]). Kod metanogenog tipa ova domene značajno je veća i kod SerRS iz arheje *Methanosarcina barkeri* (PDB-kodovi 2CJB, 2CIM, 2CJA i 2CJ9) sačinjena od šesterolančane antiparalelne β-ploče prekrivene skupinom od tri α-zavojnice. Za građu domene karakterističan je dodatni heliks (H3 kod MbSerRS) koji je smješten okomito na ravninu spomenute skupine zavojnica. Katalitička domena se pak sastoji od osmerolančane β-ploče okružene α-zavojnicama. Ovakav raspored zapravo je vrlo sličan onome već viđenom kod bakterijskog tipa ove sintetaze [63,68,69,71].

Nekoliko insercija prisutno je kod metanogenog tipa (u odnosu na bakterijski). Poravnanje primarnih sljedova seril-tRNA-sintetaza metanogenog tipa otkriva postojanje insercije između motiva 1 i 2. Struktura koju ovi ostaci formiraju uključuje nabor zavojnica-okret-zavojnica (eng. *helix–turn–helix fold*, HTH), motiv koji je kritičan za interakcije između katalitičkih domena individualnih monomera unutar dimera[82]. Druga insercija smještena je također unutar katalitičke domene i nalazi se između motiva 2 i 3. S obzirom na sličnost s fleksibilnom treoninskom omčom u ThrRS, ova insercija dobila je naziv "*serine ordering loop*" (v. kasnije).



Slika 2-12. (A) Posebnosti metanogene SerRS uzduž primarnog slijeda jednog monomera. Jednoslovnim oznakama H1-4 označene su zavojnice N-terminalne domene, L je regija spojnice (eng. linker), M1, 2 i 3 su položaji motiva karakterističnih za aaRS razreda II; HTH (eng. *helix-turn-helix*) i SOL (eng. *serine ordering loop*) također pripadaju karakteristikama metanogenih SerRS. (B) Građa aktivnog mjesta MbSerRS s vezanim intermedijerom Ser-AMP. Udaljeni cinkov atom prikazan je kao kugla (obojan tirkizno). Preuzeto iz [7].

2.4.6 Građa aktivnog mjesta metanogenih seril-tRNA-sintetaza

Aktivno mjesto mSerRS sadrži ion cinka koordiniran bočnim ograncima dvaju cisteinskih ostataka (Cys306 i Cys461), glutamatom (Glu355) te molekulom vode. Čini se da je ovakav

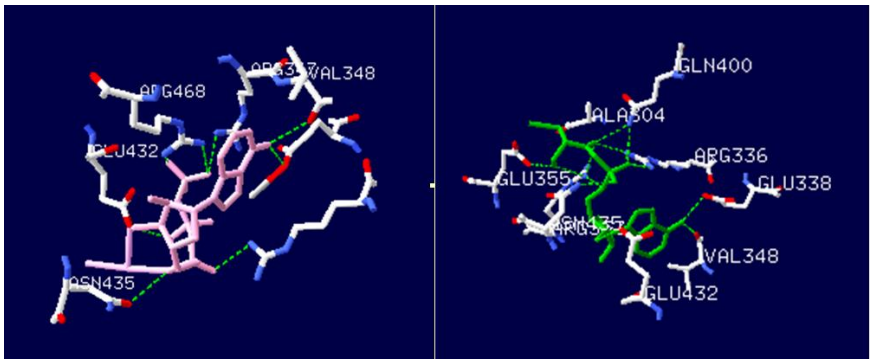
način vezanja cinka očuvan kod mSerRS, budući da su navedeni ostaci striktno očuvani kod *svih* metanogenih seril-tRNA-sintetaza.[a]

U strukturi SerRS iz *M. barkeri* SerRS u kompleksu s ATP (PDB ID 2CJA) vidljivo je da je način vezanja tog malog liganda karakterističan za aaRS razreda II i da zapravo dosta naliči onome opisanom kod bakterijskog tipa SerRS[81]. Unutar kompleksa mSerRS:ATP, purinski prsten ATP-a stupa u interakcije slaganja s aromatskim prstenom Phe351 te gvanidinijskom skupinom Arg468. Obje aminokiseline pripadaju potpuno očuvanim aminokiselinama motiva 2 i 3. Nadalje, ATP se dodatno stabilizira interakcijama s ostacima Val348 i Glu338. Riboza se, kao i kod bakterijskog tipa SerRS, nalazi u 3'-*endo*-konformaciji. Njena 3'-hidroksilna skupina stvara vodikovu vezu s očuvanim glutamatom na položaju 432, a 2'-OH skupina s karbonilnim kisikom fenilalanilnog ostatka (Phe433). Molekulu ATP-a nalazimo u svinutoj konformaciji, s β- i γ- fosfatima usmjerenim unazad prema purinskom prstenu. Ovakav položaj ponovo upućuje na S_N2 mehanizam aktivacije aminokiseline karakterističan za bakterijski tipa SerRS, odn. za aaRS razreda II. Svijanje ATP-a postiže se direktnim interakcijama s bočnim ograncima enzima, ali i vezanim ionima Mg^{2+}, što je konzistentno s ranije spomenutim zapažanjima u bakterijskom sustavu[81].

Po vezanju serina, koordinacija iona cinka ostaje ista s aspekta interakcije s bočnim ograncima enzima. No, molekula vode napušta aktivno mjesto mSerRS te biva zamijenjena amino-skupinom serina[b]. Amino-skupina serina se stabilizira stvaranjem vodikovih veza s kisikom glavnog lanca na položaju alanina 304. Glutamat na položaju 355 (očuvan i kod bakterijskog i metanogenog tipa SerRS) obnaša svoju kanonsku funkciju, tj. stupa u interakciju s hidroksilnom skupinom serina (v. ranije). No, kod mSerRS, ta aminokiselina posjeduje dodatnu ulogu: pored prepoznavanja serina, ova aminokiselina interreagira i s ionom cinka.

[a] Sintetaze koje također sadrže ion cinka u aktivnom mjestu jesu ThrRS i CysRS. Aminokiseline koje vežu cink iod ThrRS (Cys334, His385 te His511 kod ThrRS *E. coli*) posjeduju ekvivalentan položaj unutar primarnog slijeda kao kod mSerRS.

[b] Time cink zadržava početnu tetraedarsku koordinaciju koju posjeduje u slobodnom obliku. Drugim riječima, vezanjem serina ne dolazi do promjene koordinacije iona cinka.



Slika 2-13. (lijevo) Struktura aktivnog mjesta mSerRS s vezanim ATP-om (ružičasto; PDB ID 2CJ9). (desno) Struktura aktivnog mjesta mSerRS s vezanim analogom Ser-AMP (prikazan zeleno; PDB ID 2CJA).

Vezanje serina mijenja konformaciju ranije spomenute omče SOL. Ista je uneređena kada aminokiselina nije vezana[a], a po vezanju serina zauzima helikalni oblik na svom N-kraju. Konformacijska promjena po vezanju serina dovodi ovu strukturu u neposredno blizinu cinkovog iona te joj omogućava direktni kontakt s glutamatom na položaju 400 i karboksilnim[b] kisikom serinskog supstrata. Unutar binarnog kompleksa (PDB ID 2CJB) Trp396 pakira se iznad amino-skupine serina. Položaj ove aminokiseline sterički osigurava protiv vezanja nepripadnih aminokiselina koje bi potencijalno mogle "urediti" omču SOL (tj. dovesti ju u aktivnu konformaciju). Ovaj "čuvar" veznog džepa za serin kod drugih metanogenih enzima SerRS ponekad je zamijenjen drugom aromatskom aminokiselinom koja, najvjerojatnije, obnaša istu ulogu[83]. Ovakva inducirana strukturna promjena karakteristična je za metanogeni tip, jer u bakterijskog tipa nije niti potrebna. Ekvivalentna regija je u bakterijskih SerRS značajno kraća (za točan mehanizam prepoznavanja serina v. ranije).

2.4.7 Modularnost seril-tRNA-sintetaza - domena UNE-S

Modularna topologija aminoacil-tRNA-sintetaza ranije je spomenuta na primjeru kvaščevih i bakterijskih MetRS te nesintetaznog proteina Arc1p (poglavlje 2.2.4). Osim domena poput EMAP II kakve nalazimo kod raznorodnih aaRSs ili njihovih pratećih faktora, postoje sljedovi ili čitave domene koje su nastale kod specifičnih (najčešće eukariotskih) aaRS, a koje ne pokazuju neku određenu sličnost s tipičnim strukturnim modulima. Drugim riječima, takve domene su jedinstvene i, uglavnom, prisutne samo kod jedne specifične aaRS. Zbog takve ekskluzivnosti i jedinstvenosti dobivaju naziv UNE-X, pri čemu X stoji za jednoslovnu skraćenicu aminokiseline za koju je dotična sintetaza specifična.

[a] Otud i naziv.
[b] Karbonilna skupina analoga Ser-AMS.

Najmanja takva domena, odn. UNE-S motiv[a] nalazi se na C-kraju SerRS kralješnjaka. Ovaj motiv ključan je za razvoj krvožilnog sustava[84]. Uklanjanje ovog elementa ima malo utjecaja na aminoacilacijsku aktivnost SerRS, ali njeno uklanjanje dovodi do nastanka nenormalnih žila kod modelnog organizma *Danio rerio*[85,86]. Unutar UNE-S motiva nalazi se i lokalizacijski signal za jezgru, odgovoran za pojavu unosa značajne količine SerRS u jezgre humanih endotelnih stanica. Istovremeno, humana SerRS regulira ekspresiju faktora VEGF (prema eng. *vascular endothelial growth factor*). Obje ove funkcije nevezane su za kanonsku aktivnost SerRS te se dade zaključiti kako je dodavanje UNE-S-modula važno za obnašanje nekanonskih funkcija kod SerRS kralješnjaka.

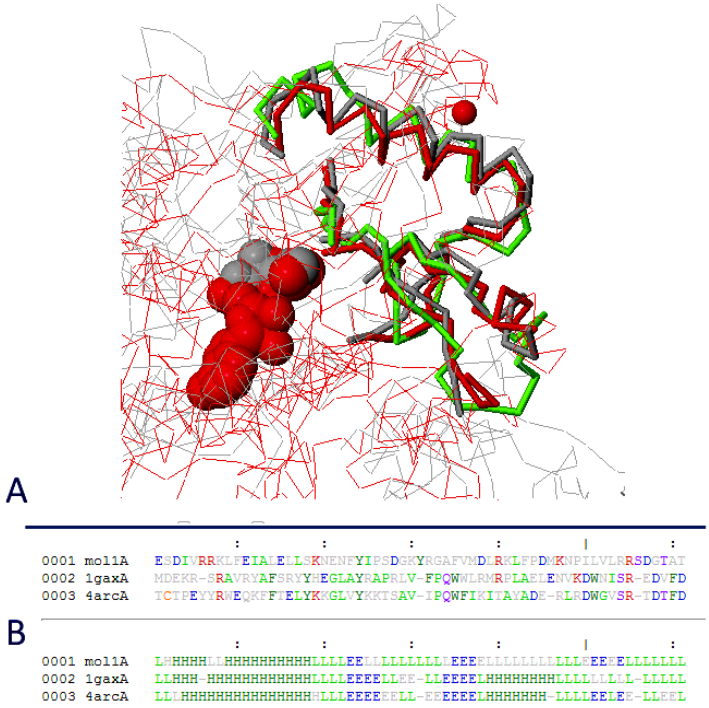
2.5 Arginil-tRNA-sintetaza

2.5.1 Opće topološke značajke arginil-tRNA-sintetaze

Općenita topologija arginil-tRNA-sintetaze uključuje specifičnu N-terminalnu domenu (Add1-domena prema eng. *additional*[87]), katalitičku domenu s Rossmannovim naborom te C-terminalno smještenu domenu za prepoznavanje antikodonskog dijela tRNA (Add2-domena; terminologija je preuzeta iz[87]). Specifična Add1-domena postoji kod svih ArgRS i odgovorna je za prepoznavanje D-omče $tRNA^{Arg}$. Zanimljiva je njena dvoslojna α/β topologija[b], karakteristična za proteine koji specifično vežu RNA. Tu uključujemo, primjerice, ribosomski protein S4 [88] i specifični modul prisutan kod ThrRS *E. coli*[89]. Konno i suradnici sugeriraju kako srž ove domene stupa u slabe interakcije s domenom za prepoznavanje antikodona.

Domena predodređena za vezanje antikodona tRNA (α-helikalni kavez) topološki je oblikovana poput one iz LysRS i nekih GluRS. Zapravo je ova domena na razini tercijarne strukture dobro očuvana kod nekih aaRS razreda I (što uključuje ArgRS, CysRS, MetRS, ValRS, IleRS te LeuRS). Karakteristična CP1-domena (koja je kod IleRS, ValRS i LeuRS predodređena za popravak pogreške nakon prijenosa) kod ArgRS je prisutna kao mali strukturni modul (slika 2.14).

[a] Duljine je svega tridesetak aminokiselina pa onda i nije prava domena, već motiv.
[b] Ista uključuje karakterističnu srž od antiparalelne β-ploče s tri α-zavojnice na N-kraju i jedne duge koja ovaj strukturni modul povezuje s katalitičkom domenom.

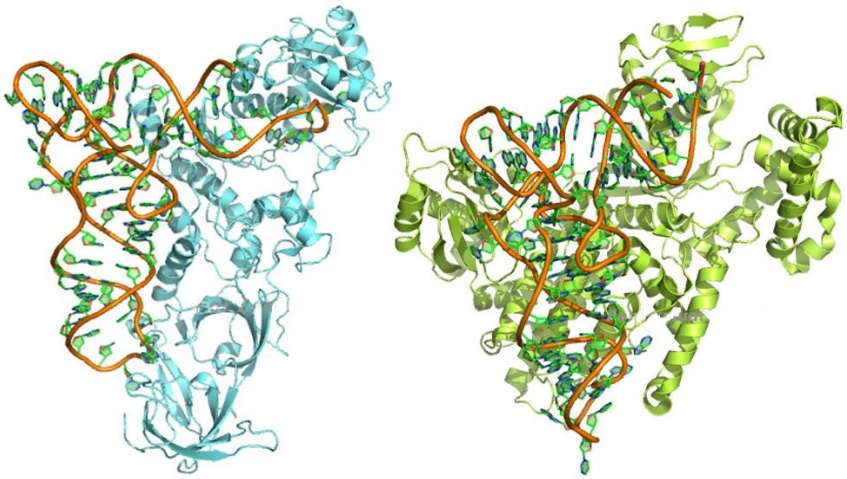


Slika 2-14. Trodimenzionalno sravnjenje CP1-domene iz ArgRS *P. horikoshii* ArgRS pomoću servera DaliLite[90]. Prikazana je usporedba CP1-domene kod PhArgRS (PDB ID 2ZUE), ValRS (PDB ID 1GAX) i LeuRS (PDB ID 4ARC).

2.5.2 Prepoznavanje tRNA^{Arg}

Sučelje arginil-tRNA-sintetaze i pripadne tRNA^{Arg} proteže se duž 3000 Å^2 [9192] pri čemu se kontaktna površina može podijeliti na 3 definirana dijela: domena Add2 i antikodon tRNA^{Arg} čine jednu zonu, domena Add-1 te D-ruka tRNA drugu, dok interakcije akceptorske peteljke s katalitičkim centrom ArgRS oblikuju treću definiranu zonu. Domene Add1 i Add2 kooperativno prepoznaju tRNA.

Cjelokupno je način prepoznavanja pripadne tRNA sličan onome kod GlnRS[93]. Konkretno, u kompleksu je varijabilna omča tRNA usmjerena ka otapalu, katalitički centar enzima komunicira s malim utorom akceptorske peteljke tRNA, a CCA-kraj tRNA zauzima konformaciju okret-ukosnica (eng. *hairpin turn*) kako bi dosegao aktivno mjesto enzima (slika 2.15). No, iako je konformacija zadnjih dvaju nukleotida kod tRNA^{Arg} i tRNA^{Gln} slična, prilikom vezanja na pripadnu aaRS do stabilizacije regije ukosnice dolazi različitim mehanizmima.



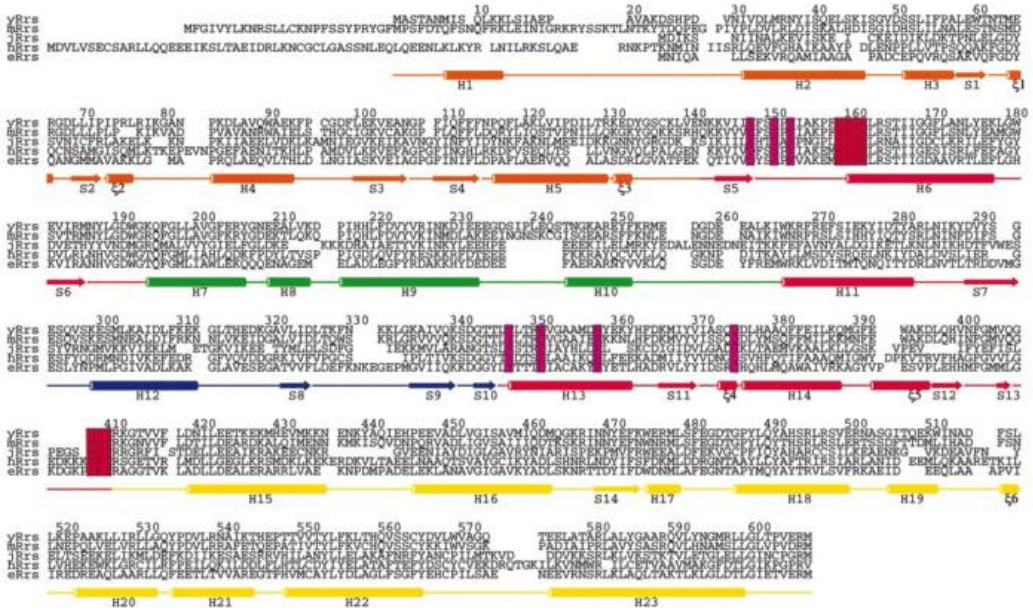
Slika 2-15. Vezanje tRNA u sustavu GlnRS (lijevo, PDB ID 1GTR) i ArgRS (desno, PDB ID 1F7V).

U strukturi arginil-tRNA-sintetaze iz kvasca *S. cerevisiae* (PDB ID 1F7V) može se uočiti da se enzim u području antikodonske peteljke približava pripadnoj tRNA sa strane malog utora, dok se antikodonska omča veže u džep oblikovan α-zavojnicama domene Add-2. Antikodonska omča pritom prolazi kroz značajnu strukturnu promjenu u odnosu na pretpostavljenu konformaciju slobodne antikodonske omče [91a]. Naime, kod kvaščevog kompleksa ArgRS:tRNA^{Arg} konformacija antikodonske omče posjeduje ispupčeni adenozin na položaju 38 te adenozin na položaju 37 interkaliran između gvanozina 31 i citozina 39 (zadnji par baza antikodonske peteljke). Prve dvije baze antikodona (ovdje I34 i C35), kao i susjedna U33, strše prema otapalu.[b]

Središnja baza antikodona, citozin 35, najjači je identitetni element tRNA^{Arg} [94]. Neobično je da kvaščeva arginil-tRNA-sintetaza prepoznaje ovu determinantu nespecifično, tj. uz pomoć atoma polipeptidne okosnice. Kao dodatni osigurač u prepoznavanju pojavljuje se očuvani triptofanski ostatak (Trp569) koji stupa u interakcije slaganja (eng. *stacking interactions*) s I34 i C35, do čega dolazi uslijed interkalacije aromatskog prstena ovog ostatka između spomenutih baza antikodona. Nekoliko aminokiselina[c] koje su strogo očuvane[d] u primarnim sljedovima arginil-tRNA-sintetaza odgovorno je za upravljanje konformacijom antikodonske omče[91].

[a] Delagoutte i suradnici pretpostavljaju konformaciju antikodonske omče kakva postoji u slobodnih tRNA^{Asp} i tRNA^{Phe}.
[b] ScArgRS specifično prepoznaje C35 i stupa u interakciju s G36 i A38, ali ne stupa u interakciju s U33.
[c] Primjerice Tyr491, Arg495, Arg501, Tyr565 i Met607 kod ScArgRS.
[d] Zapravo se kod relativno velikog broja arhejskih organizama na tom mjestu nalazi prolin koji bi, teoretski mogao također participirati u interakcijama slaganja s bazama antikodona.

Posljednja aminokiselina Met607 ključna je za prepoznavanju antikodonske omče. Smatra se da je na C-kraj ovog proteina izvršen jaki evolucijski pritisak budući da svi dosad poznati sljedovi ArgRS završavaju metioninom (slika 2.16).



Slika 2-16. Poravnanje sljedova arginil-tRNA-sintetaza iz različitih izvora. Preuzeto iz[87].

Iako Met607 stupa u iterakciju s posljednjom bazom antikodona te adenozinom na položaju 38 (čime se stabilizira opisana konformacija antikodonske omče)[91] on to čini preko atoma okosnice proteina. Stoga nije posve jasno iz kojeg razloga je krajnji, C-terminalno smješteni Met očuvan kod svih primarnih sljedova ArgRS.

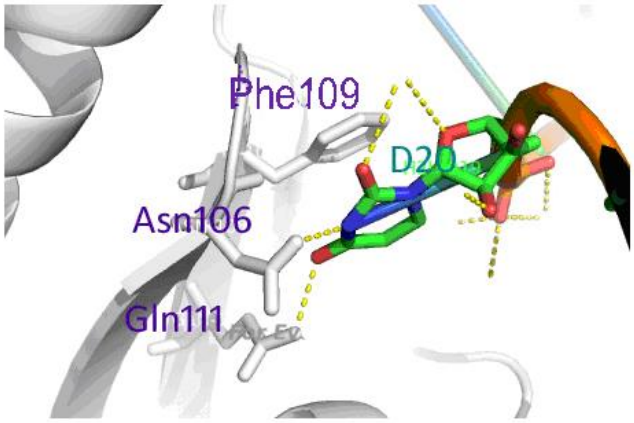
Unutar binarnog kompleksa ArgRS:$tRNA^{Arg}_{CCU}$ iz arheje *P. horikoshii*, središnja baza antikodona (C35) smještena je unutar hidrofobnog džepa oblikovanog bočnim ograncima Tyr587 te Ile517, Pro591, Val592 i Leu593. Prva baza antikodona (C34) ne stupa u interakciju s proteinom, dok je posljednja (U36) okružena bočnim ograncima aminokiselina Tyr509, Ala512 te Ser516. Uridin 36 također komunicira s krajnjim metioninom, no ponovo je taj kontakt nespecifičan (u interakciju stupa preko primarne NH-skupine i C-terminalne karboksilne skupine). Adenozin na položaju 37 složen je na par C31-G39, dok je baza C32 složena na njega. Različitosti u oblikovanju tercijarne strukture $tRNA^{Arg}$ kod kvasca i *P. horiskohii* bit će detaljno opisane i obrazložene kasnije.

Jedan strukturni motiv, nazvan Ω-omča (kod kvasca aminokiseline 480–485)[87], također predstavlja dio sučelja za prepoznavanje $tRNA^{Arg}$. Smještena je taman ispod veće zone ArgRS odgovorne za vezanje srži tRNA, u poveznici između dvije zavojnice te oblikuje izbočeni motiv na površini proteina. Budući da je smještena prema strani velikog utora peteljke antikodona igra dvostruku funkcionalnu ulogu. Istovremeno, ovaj element izgrađuje

„poklopac" ranije opisanog džepa za prepoznavanje adenozina 38 (čime se, ponovo, stabilizira aktivnu konformaciju $tRNA^{Arg}$), ali i zatvara svojevrsnu pukotinu u tercijarnoj strukturi $tRNA^{Arg}$ koja se vezanjem otvara između nukleotida G25 i C39. Za rad ove omče čini se da je ključan glicin (na položaju 483), budući da bi neki drugi bočni ogranak na ovom položaju priječio navedeni smještaj tRNA. Biokemijski je (eksperimentima *in vivo*) pokazano da je mutacija Gly483Ser letalna za stanice kvasca[95].

Nukleotidna determinanta A20 (unutar D-omče) jedinstvena je za argininski sustav. Iznimka je u tom slučaju kvasac *S. cerevisiae*, s dihidrouridinom (rjeđe citozinom) na položaju 20 (također determinanta). Slično kao kod serinskog sustava, 6 kodona odgovorno je za jedinstvenu aminokiselinu arginin. U ovom slučaju antikodoni izoakceptora $tRNA^{Arg}$ posjeduju jednu zajedničku bazu (središnji citozin). Kao što je to kod serinskog sustava duga varijabilna ruka, nukleotidna determinanta A20 smještena unutar D-ruke predstavlja adaptaciju argininskog sustava na heterogenost argininskih (anti)kodona.

Biokemijska istraživanja u argininskom sustavu *E. coli* i *T. thermophilus* pokazala su da su najvažnije interakcije s enzimom povjerene nukleotidima C35 (zajednički svim izoakceptorima za arginin) te A20[96,97]. Unutar kristalne strukture binarnog i ternarnog kompleksa ArgRS s $tRNA^{Arg}_{ICG}$ iz kvasca vidljiva je interakcija enzima s bazom D20 unutar D-omče. Ovaj dihidrouridin smješten je u neposrednoj blizini bočnih ogaranaka Asn106, Phe109 i Gln111 u karakterističnoj N-terminalnoj domeni enzima (slika 2.17)[91].



Slika 2-17. Prepoznavanje dihidrouridina na poziciji 20 kod kvasca (PDB ID 1F7V).

Konfliktna informacija dolazi iz biokemijskih istraživanja u kojima je pokazano kako su k_{cat} i K_m za $tRNA^{Arg}_{ICG}$ i $tRNA^{Arg}_{UCU}$ kod kvaščevih mutantnih proteina ScArgRSAsn106Ala, ScArgRSPhe109Ala i ScArgRSGln111Ala isti u odnosu na divlji tip enzima[98]. Stoga neki autori smatraju kako ova interakcija N-terminalne domene enzima s dihidrouridinskom determinantom na položaju 20 nije važna za vezanje $tRNA^{Arg}$ tijekom reakcije aminoacilacije!

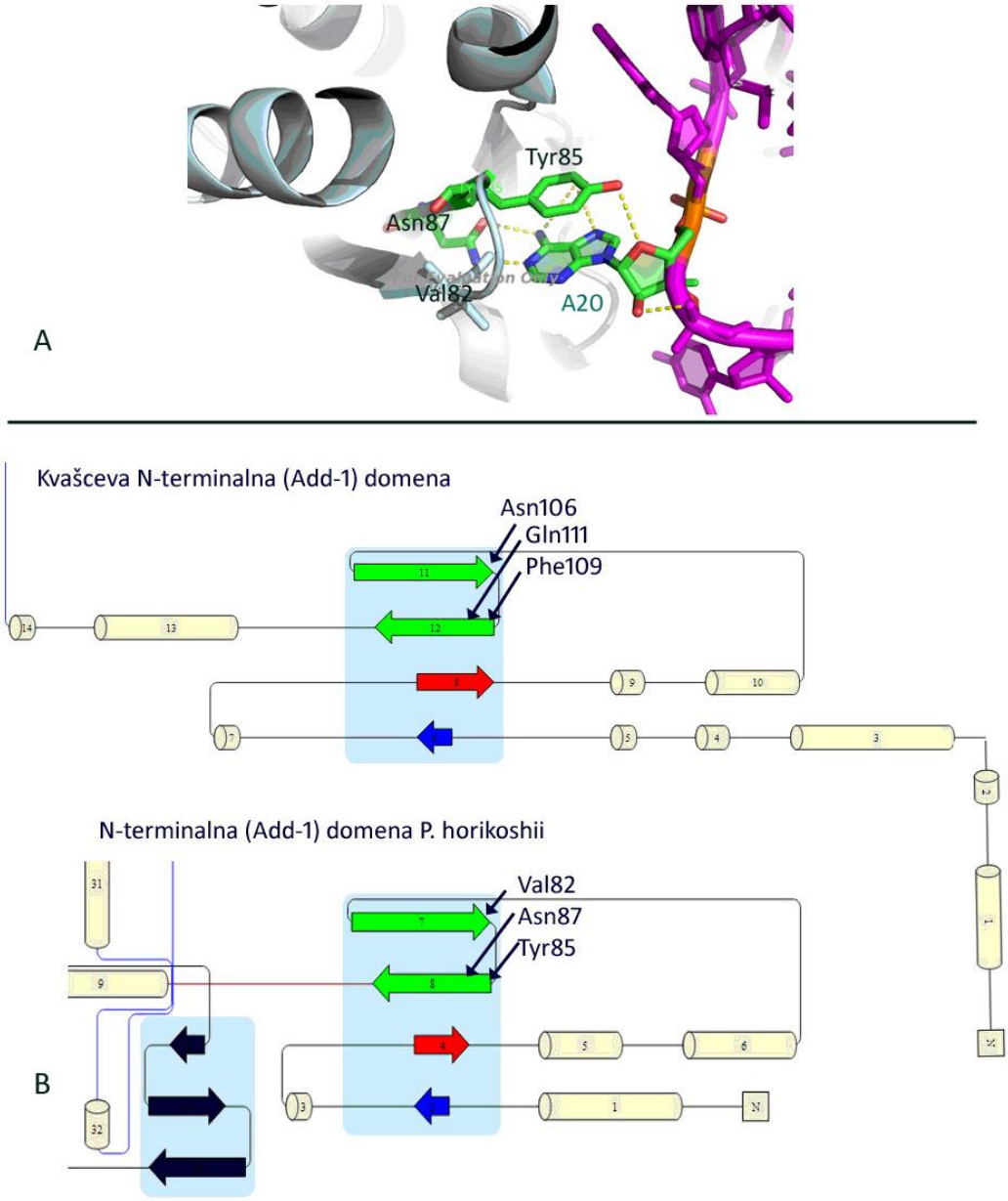
Kristalna struktura ArgRS iz bakterija *T. thermophilus* dostupna je kao slobodni enzim, ali u kompleksu s tRNA još nije riješena[96]. Kod enzima *T. thermophilus* mutacije Tyr77Ala i Asn79Ala (ovi položaji odgovaraju onima Phe109 i Gln111 kod ArgRS *S. cerevisiae*) ipak dovode do zamjetnog povećanja K_m za $tRNA^{Arg}$ i velikog pada V_m.

Kvasac posjeduje četiri argininska izoakceptora, od kojih jedan posjeduje citozin na položaju 20. S obzirom na (predloženi) mehanizam prepoznavanja dihidrouridina 20 u strukturi kompleksa ScArgRS:$tRNA^{Arg}$, može se pretpostaviti da prepoznavanje citozina ponovo uključuje ostatke Gln111 i Asn106. Pritom mora doći do izmjene donorsko-akceptorskih parova u mreži vodikovih veza kakvi su vidljivi u prepoznavanju Asn106-D20-Gln111. Originalno je karbonilni kisik bočnog ogranka Asn106 akceptor vodikove veze koju ostvaruje s imino-skupinom dihidrouridina (atom *N*3, slika 2.17); istovremeno, amino-skupina bočnog ogranka Gln111 donor je vodikove veze prema karbonilnom kisiku na *C*4-atomu D20. Zamjenom dihidrouridina citozinom dolazi do izlaganja potencijalnog akceptora vodikove veze na položaju N3 te donora vodikove veze (amino-skupina) na položaju karbonilnog kisika *C*4-atoma. Zamjenom uloga (u odnosu na prepoznavanje D20) Asn106 i Gln111, obrazac prepoznavanje se može zadržati, zajedno s rasporedom vodikovih veza.

Fenilalanin na poziciji 109 visoko je očuvan u sljedovima ArgRS; izuzetno se kod pojedinih vrsta sinonimno zamjenjuje tirozinom. Ne čudi stoga da je ova aminokiselina uključena u interakcije slaganja s nukleotidnom determinantnom na poziciji 20. Dihidrouridin 20 specifičan je za kvaščevu $tRNA^{Arg}$, jer, kao što je ranije naglašeno na tom položaju mnogo češće se zatiče adenozinski ostatak. Glutamin na položaju 111 relativno dobro je očuvan kod različitih sljedova ArgRS; sinonimna zamjena u asparagin na tom mjestu također je prisutna (v. sliku 2.15).

Delagoutte i suradnici[91], oslanjajući se na poravnanje primarnih sljedova danom u ranijem radu[87] spekulirali su kako se Asn106, u vrsta kod kojih je umjesto D20 prisutna determinanta A20 nužno mora zamijeniti nekom malenom aminokiselinom (pooput alanina, v. poravnanje u [87]) kako bi se dozvolila akomodacija adenozina. Purinski prsten adenozina (u usporedbi s dihidrouridinom) značajno je veći pa bi bilo koji bočni ogranak na odgovarajućoj poziciji (onoj Asn106) priječio vezanje adenozinskog elementa identiteta. No, nakon što je riješena struktura arhejske ArgRS u kompleksu s pripadnom tRNA, postalo je jasno da ta spekulacija ne stoji[92]. U strukturi kompleksa iz *P. horikoshii* vidljivo je da je A20 prepoznat od strane Tyr85 na isti način na koji je to bilo viđeno u kvaščevom sustavu (ondje Phe109). Umjesto Gln (kod kvasca Gln111) nalazimo Asn87 koji stvara dvije vodikove veze (preko karbonilne, odn. amino-skupina bočnog ogranka) s atomima *N*1 i *N*6 adenozina 20. Na mjestu spornog

Asn106, u PhArgRS nalazi se valinski ostatak. Budući da orijentacija bočnog ogranka valina ne naliči na onu Asn106 u kvasca, ovaj bočni ogranak ni nakoji način ne priječi vezanje/prepoznavanje nukleotidne determinante A20 (slika 2.18).



Slika 2-18. (A) Prepoznavanje i smještaj adenozina 20 kod kompleksa ArgRS:tRNA$^{Arg}_{CCU}$ iz arheje *P. horikoshii* (PDB ID 2ZUE). (B) Raspored elemenata uključenih u prepoznavanje A20 kod kvasca i arheje dan kroz dvodimenzionalni prikaz pripadajućih struktura. Diskutirane aminokiseline su označene.

Prepoznavanje akceptorske peteljke kod ScARgRS uključuje elemente insercije Ins2, drugu polovicu Rossmannovog nabora te element koji su Delagoutte i suradnici nazvali

„platformom za sidrenje tRNA"[91].[a] Aktivno mjesto kvaščeve arginil-tRNA-sintetaze stupa u interakciju s malim utorom akceptorske peteljke $tRNA^{Arg}$. Interakcije s prve četiri baze akceptorske peteljke uglavnom su posredovane vodom. Lokalizirane su s jedne strane uzvojnice RNA te uključuju samo „jedan lanac"[b] opisane uzvojnice (odn. baze G69 do A72). Krajnji nukleotid na 5'-strani $SctRNA^{Arg}_{ICG}$ je pseudouridin te je u riješenoj strukturi povezan vodikovim vezama s bazom A72

Terminalni CCA-kraj zauzima konformaciju ukosnice, slično kao u slučaju kompleksa GlnRS:$tRNA^{Glu}$. Posljednje dvije baze (C75 te A76) također posjeduju sličnu konformaciju. No, ova konformacija (koja je potrebna za katalizu!) stabilizira se različitim mehanizmima, tj. različitim načinom interakcije s enzimom[c]. Svijanje CCA-kraja kod $tRNA^{Arg}$ stabilizira se vodikovim vezama između amino skupine citozina na položaju 75 i kisika fosfatne okosnice na položaju 72. Strukturu ukosnice kod CCA-kraja $tRNA^{Arg}$ dodatno stabilizira sam enzim uspostavom specifičnih interakcija s bazama C74 i A76.

Zanimljivo je spomenuti da kod kvasca direktnih interakciju između nukleotidnih determinanti i enzima ima razmjerno malo (tu naravno ubrajamo dihidrouridin 20 unutar D-omče, antikodon i 3′-CCA-kraj). Glavnina interakcija posredovana je molekulama vode. Nije isključeno da ova pojava korelira s velikom varijabilnošću sljedova koja ja prisutna kod argininskih izoakceptora kvasca.

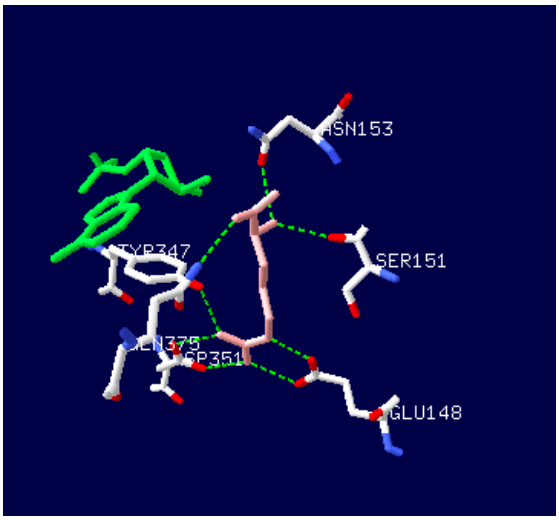
2.5.3 Aktivno mjesto ternarnog kompleksa

Usporedba ternarnog kompleksa ScArgRS:$tRNA^{Arg}$:arginin (PDB ID 1F7V) i binarnog (ScArgRS:arginin, PDB ID 1BS2) otkriva da je vezanje arginina identično u oba slučaja[91]. Unutar ternarnog kompleksa arginin se nalazi neposredno ispod terminalnog adenozina (A76). Ispravno pozicioniranje ovog A76 kontroliraju tri aminokiselinska ostatka: Glu294, Tyr347 i Asn153, a koji su strogo očuvani u svih arginil-tRNA-sintetaza. Atomi bočnog ogranka Asn153 stvaraju vodikove veze s 2′-hidroksilnom skupinom riboze adenozina Ade76, dok, istovremeno, 3′-OH-skupinu veže spomenuti glutamat na položaju 294 (slika 2.19).

[a] Spomenuta „platforma za sidrenje tRNA" strukturni je motiv karakterističan za ScArgRS[87,91]. Oblikuju je dva β-lanca [kod kvasca su to S13 (ak 402–406) i S14 (ak 468–473)]. Smještena iza druge polovice Rossmannovog nabora. Ova regija odgovorna je za interakciju s kutom „slova L" $tRNA^{Arga}$. No, slična platforma postoji i kod kompleksa GlnRS:$tRNA^{Gln93}$. Unutar platforme, sučelje dviju makromolekula je visoko hidrirano, a protein komunicira s tRNA dominantno na nespecifičan način, tj s atomima fosfodiesteske okosnice.

[b] Naravno da je čitava tRNA jedan jedinstveni lanac; ovdje se pod terminom jedan lanac misli na izolirani dvolančani segment koji se raspravlja.

[c] Kod $tRNA^{Gln}$, nukleotidna determinanta G73 uključena je u interakciju slaganja s C75 i A76. Istovremeno, formiranjem vodikovih veza s 2-amino skupinom i kisikovim atomom fosfata nukleotida 72 stabilizira svijanje 3′-terminalnog CCA-kraja. Kod $tRNA^{Arg}$, interakcije slaganja G73– C75–A76 nisu prisutne.

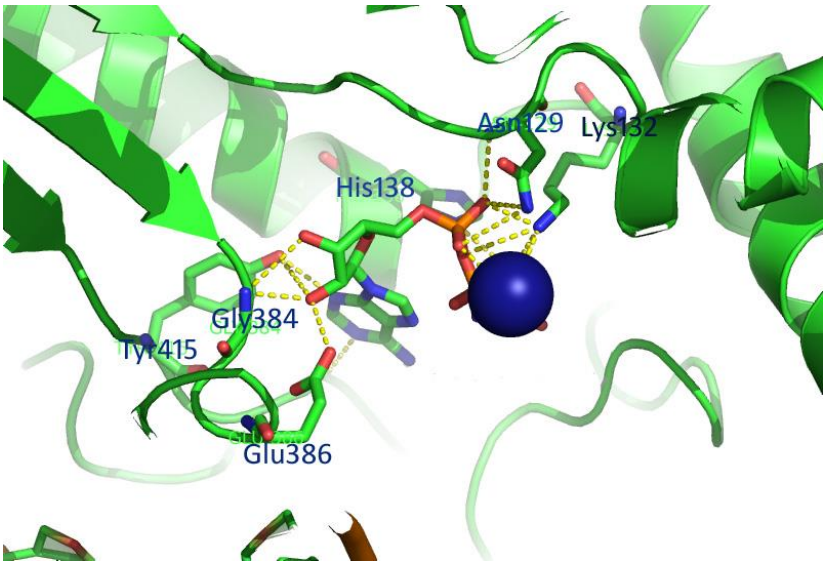


Slika 2-19. Položaj arginina unutar aktivnog mjeta ScArgRS (PDB ID 1F7U). Arginin je prikazan ružičasto, a terminalni adenozin tRNA^{Arg} zeleno.

Slika 2.19 prikazuje način prepoznavanja argininskog supstrata u ternarnom kompleksu s tRNA^{Arg} (1F7V). Interakcije s gvanidinijskom skupinom supstrata su slične kao kod kompleksa slobodnog enzima s aminokiselinskim supstratom. No, Asn153, koji stvara interakcije s α-amino-skupinom i α-karboksilatom arginina, po vezanju tRNA ulazi u interakciju s 2′-kisikovim atomom riboze adenozina 76. Tirozin na položaju 347 (strogo očuvan kod GlnRS, GluRS, TyrRS i TrpRS) sudjeluje u prepoznavanju η-dušikovog atoma vezanog arginina (i u binarnom i u ternarnom kompleksu). Po vezanju tRNA, taj ostatak dodatno stupa u kontakt s purinskim prstenom adenozina 76, nastavljajući tako interakcije slaganja duž osi formirane bazama adenozina 76 te citozina 75.

Niti ATP niti AMP nisu vidljivi u mapi elektronske gustoće kod kristalnih formi kvaščevog sustava, iako su kristali natapani tim molekulama. Kod kristala apo- ScArgRS (dakle, bez tRNA^{Arg}) to se može objasniti neproduktivnom konformacijom omče-potpisa KMSKS. Ova omča uključena je u stabilizaciju prvog koraka reakcije aminoacilacije[8].

Struktura s analogom ATP-a, adenozin-5'-(β, γ-imido)trifosfatom (ANP), riješena je kod arheje *P. horikoshii*. Položaj ATP-a unutar aktivnog mjesta dan je na slici 2.19. Purinski prsten analoga ANP složen je ponad aromatskog prstena ostatka His417, koji je, čini se, specifičan za *P. horikoshii*. Riboza, odn. njena 2'-OH-skupina smješta se u neposrednu blizinu ostataka Gly384 i Glu386 koje su smještene unutar specifičnog okreta. Slična konformacija okosnice zapaža se i kod kvasca *S. cerevisiae* (aminokiseline 372– 375) i bakterije *T. thermophilus.*[92]



Slika 2-20. Aktivno mjesto PhArgRS s analogom ATP-a unutar aktivnog mjesta. Bočni ogranci koji sudjeluju u vezanju su istaknuti. Ion magnezija prikazan je tamnoplavo.

Prepoznavanje D-omče u drugim sustavima

U argininskom sustavu domena Add1 predstavlja strukturni modul odgovoran za prepoznavanje D-omče[91,92]. Kvaščeva ArgRS bila je prvi strukturni primjer sintetaznog kompleksa u kojem je D-omča bila izravno implicirana u prepoznavanje od strane vlastite aaRS. Do danas je poznato da je D-omča element identiteta te da je prepoznata kao ključna i za prepoznavanje kod PheRS[99 a], PylRS[100 b], CysRS[101 c], kao i kod mitohondrijske LeuRS iz čovjeka[102]. Zanimljivo je da je D-omča implicirana u prepoznavanju transamidacijskog faktora kod indirektne biosinteze Gln-tRNA^{Gln}, odn., Asn-tRNA^{Asn}. Kao što je spomenuto ranije, nakon reakcije nediskriminirajuće AspRS/GluRS, misacilirana tRNA (Asp-tRNA^{Asn}/Glu-tRNA^{Gln}) amidira se u reakciji (tRNA-zavisne) amidotransferaze (AdT). Bakterijske GatCAB i GatDE prepoznaju prvi par baza akceptorske peteljke i D-omču svojih tRNA, dok arhejska GatCAB (tercijarnu) srž tRNA[103]. S obzirom da su modificirani nukleotidi prisutni unutar D-omče s jednakom prisutnošću kao kod drugih elemenata tRNA, enzimi odgovorni za te modifikacije prepoznaju ih s visokom specifičnošću[104–106,107]. Enzim odgovoran za dodavanje 3'-terminalnog CCA-kraja tRNA također komunicira s D-omčom tRNA[108].

[a] Humana PheRS prepoznaje bazu antikodona (G34), antikodonsku peteljku (parove G30-C40 i A31-U39) te gvanozin na položaju 20 unutar D-omče kao što je pokazano metodom otiska prsta (eng. *tiophosphate footprinting*). Unutar D-omče pretpostavljene su interakcije s okosnicom.

[b] Analiza otiska prsta pokazala je da PylRS veže tRNA^{Pyl} dominantno uzduž okosnice T-omče, D-peteljke i akceptorske peteljke. Interesantno je spomenuti da kanonski kontakti između T- i D-omče u tRNA^{Pyl} nedostaju (komunikacija između nukleotida na položajima 18 i 56).

[c] Prepoznavanje D-omče kod CysRS je indirektno, tj. enzim prepoznaje oblik fosfodiesterske okosnice, radije nego specifične baze.

2.6 Molekula tRNA i njene uloge izvan translacije

Molekule tRNA jedan su od kritičnih elemenata translacijskog procesa, prisutne su u svim živim stanicama i bez njih je nemoguće zamisliti biosintezu proteina.

U genomu sisavaca postoji veliki broj gena za istovrsne izoakceptore tRNA, tzv. izodekodere. Budući da im je zajednički slijed unutar antikodona (bez obzira na razliku u ostatku slijeda nukleotida), očekivano takve tRNA prepoznaju isti kodon molekule mRNA[109]. Istraživanje Rudinger-Thirion i suradnika[14] pokazalo je da neki od izodekodera tRNA, posebno oni koji su slabiji supstrat za pripadnu aaRS, sudjeluju u procesima izvan translacije, konkretno, u nekim regulacijskim procesima. Primjerice, specifični izodekoder $tRNA^{Asp}$ može modulirati stabilnost molekule mRNA odgovorne za sintezu stanične AspRS, dakle, pripadne aaRS. Regulatorni mehanizam zavisi od direktno vezanja $tRNA^{Asp}$-izodekodera na slijed prisutan na 3'-netranslatiranoj sekvenci mRNA aspartil-tRNA-sintetaze. Interakcija dviju molekula RNA potiče upotrebu alternativnog poliadenilacijskog mjesta, čineći takav transkript mRNA stabilnijim[110].

Uloge tRNA u brojnim procesima izvan translacije uključuju virusnu replikaciju, biosintezu aminokiselina i sl. Tako za započinjanje procesa reverzne transkripcije virus HIV-1, RSV (prema eng. *Rous sarcoma virus*) te Mo-MuLV (prema eng. *Moloney murine leukemia virus*) rabe $tRNA^{Lys}$, tRN^{Trp} i $tRNA^{Pro}$ [111]. Faktori virulencije MprF (prema eng. *Multiple peptide resistance*) kontroliraju permeabilnost stanice prema kationskim antibioticima aminoaciliranjem lipida unutrašnje stanične membrane. Različiti paralozi faktora MprF mogu rabiti Lys-$tRNA^{Lys,}$ ali i Ala-$tRNA^{Ala}$ za modificiranje fosfatidil-glicerola. Neosjetljivi su na mutacije u strukturi tRNA pa im je primarna determinanta aminokiselinski dio molekule aa-tRNA. Korištenjem jednog polarnog i jednog nepolarnog izvora za modificiranje unutrašnje membrane patogeni poput *Clostridium perfringens* sposobni su adaptirati se na širok spektar antibiotika.

Kod Gram-pozitivnih bakterija, *T-box* riboprekidači (eng. *riboswitches*) reguliraju ekspresiju aaRS i drugih proteina u odgovoru na razinu dostupne aminoacilirane tRNA pri različitim stanjima dostupnosti nutrijenata. Elementi *T-box* nalaze se unutar 5'-netranslatiranih regija molekula mRNA koje reguliraju te posjeduju dvije očuvane domene. Peteljka I sadrži prepoznajući trinukleotid koji se sparuje s antikodonom pripadne tRNA. U 3'-smjeru od peteljke I, nalazi se domena antiterminatora koja se sparuje s akceptorskom domenom pripadne tRNA te razlikuje da li je vezana tRNA aminoacilirana ili ne.

Sve su češći radovi o ulogama (t)RNA u vantranslacijskim događajima. Ribonukleinska kiselina se sve više razotkriva kao važna regulatorna i signalizacijska molekula unutar stanica u sva tri kraljevstva života. Molekule RNA sposobne su stvarati kompleksne strukture koje, jednako kao i proteini, evolucijski čuvaju svoju arhitekturu. Tercijarna struktura RNA oslanja se na niz stabilizirajućih strategija koje uključuju interakcije slaganja baza, kao i vodikove veze između baza, između baza i fosfodiesterske okosnice te između samih okosnica (najvažnije sile koje rukovode smatanjem). Osim Watson–Crickovih parova baza, baze RNA mogu formirati nekolicinu netipičnih interakcija kao dodatnog seta vodikovih veza. Ovakve nekanonske interakcije dopuštaju strukturnu fleksibilnost potrebnu za različite strategije smatanja i često ih susrećemo unutar baznih tripleta i kvarteta. Nadalje, drugi faktori (poput strukturiranih molekula vode, metalnih iona, posttranskripcijskih modifikacija ili protonacija nukleobaza) mogu utjecati na geometriju i stabilnost specifičnih motiva RNA.

2.6.1 Sazrijevanje tRNA

U ovoj disertaciji primjenjena je proizvodnja željenih (arhejskih) molekula tRNA ($MttRNA^{Arg}$ i $MttRNA^{Ser}$) potaknutom ekspresijom u domaćinu *E. coli* BL21. Dozrijevanje takvog heterolognog transkripta postavlja pitanje mogućnosti dorade stranih nezrelih tRNA u bakterijskim stanicama. Tekst koji slijedi dat će uvid u opće značajke dozrijevanja tRNA te argumentirati mogućnost dorade istih u stranom sustavu (*E. coli*).

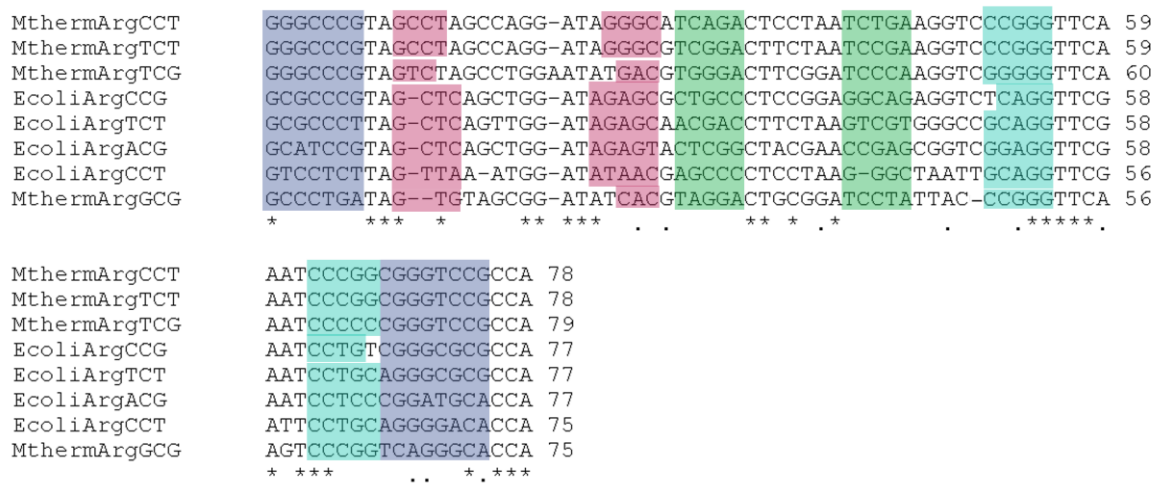
Po transkripciji sazrijevanje tRNA se u stanicama i prokariota i eukariota odvija usklađenim djelovanjem različitih enzima. Naime, sirovi transkripti molekula tRNA nisu prikladni za obnašanje njihove uloge u translaciji. Nakon transkripcije RNA-polimerazom, ovi nascentni produkti moraju proći kroz niz procesirajućih koraka, a koji uključuju uklanjanje introna, uklanjanje 5'-vodećeg i 3'-pratećeg slijeda, dodatak krajnjeg CCA-trinukleotida na 3'-kraj te nekolicinu modifikacija na nukleotidnim bazama i okosnici. Primjerice, u kvasca *S. cerevisiae* više od 60 proteina uključeno je u sazrijevanje tRNA te su isti odgovorni za procesiranje oko 5 milijuna tRNA-molekula po staničnoj generaciji. Zanimljivo je da između enzima uključenih u degradaciju mRNA i sazrijevanje stabilnih RNA (tRNA i rRNA) postoji značajno preklapanje.

Put sazrijevanja tRNA u *E. coli* dosta detaljno je istražen. Procesiranje 5'-strane transkripta obavlja RNaza P. Sazrijevanje 3'-kraja inicira se endonukleolitičkim cijepanjem nizvodno od CCA-kraja[a] po čemu slijedi dalje endonukleolitičko skraćivanje. Dva enzima, RNaza E i RNaza III uključeni su u opisano endonukleolitičko procesiranje. Obje RNaze (slično kao i

[a] U *E. coli*

RNaza P) cijepaju RNA s obzirom na raspored malih primarnih i sekundarnih strukturnih elemenata, a ne s obzirom na pojedini tip RNA. RNaza III prepoznaje dvolančane segmente unutar svojih ribonukleinskih supstrata, dok RNaza E cijepa jednolančane sljedove bogate sljedovima adenin-uracil. Egzonukleolitičko procesiranje na 3′-kraju katalizira jedna od nekoliko mogućih 3′-5′ egzonukleaza. Radi se o 6 mogućih, različitih enzima (RNazi II, BN, D, PH, PNPazi te Rnazi T) koje sve mogu katalizirati spomenutu reakciju. Kao i u slučaju endonukleolitičkog cijepanja, niti jedan od spomenutih enzima nije specifično vezan za sazrijevanje molekula tRNA.

Završna dorada transkripta uključuje uvođenje dodatnih kemijskih skupina na nukleobazama ili šećernofosfatnoj okosnici transkripta. Argininski izoakceptori unutar pojedinog organizma pokazuju dosta visoki stupanj heterogenosti na razini primarnog slijeda. Usporedba sljedova heterolognog MttRNA^{Arg}-transkripta u odnosu na postojeće argininske vrste u *E. coli* otkriva da je različitost između pojedinih izoakceptora istog organizma veća nego u slučaju istovrsnih izoakceptora arheje i bakterije (slika 2.21). Izoakceptori variraju i duljinom što implicira postojanje fleksibilnosti u prepoznavanju određenog dijela tRNA od strane ArgRS: kako prepoznavanje sintetazom ne zavisi samo od nukleotidnih determinantni već i od nespecifičnih kontakata s okosnicom, različita duljine pojedine regije tRNA uvjetuje i njeno različito smatanje, odnosno, različiti mehanizam prepoznavanja sintetazom u odnosu na preostale izoakceptore.



Slika 2-21 Poravnanje primarnih sljedova tDNA različitih argininskih izoakceptora iz arheja *M. thermautotrophicus* i bakterije *E. coli.* Poravnanje je napravljeno pomoću programa Clustal Omega te ručno podešeno s obzirom na participaciju pojedinih nukleotida u specifičnim elementima sekundarne strukture tRNA. Tamno plavo su označeni sljedovi koji formiraju akceptorsku peteljku, ružičasto D-peteljku, zeleno antikodonsku, a tirkizno T-peteljku. Svim sljedovima nadodan je CC-kraj koji je kod *E. coli* prisutan unutar tDNA-slijeda, ali ne i kod *M. thermautotrophicus* (u arhejskom organizmu terminalni trinukleotid dodaje se radom CCA-enzima).

Zbog činjenice da ugradnju arginina u stanične proteine kodira 6 mogućih kodona (i kod *E. coli* i kod *M. thermautotrophicus* susrećemo svega 4 tDNA-gena, odnosno, 4 od 6 mogućih argininskih izoakceptora) postoji poprilična raznolikost u smislu slijeda u području antikodona. Očuvan je samo središnji citozin koji se, kao što je izneseno u Uvodu, specifično prepoznaje preko elemenata smještenih u Add-2-domeni ArgRS. Ostale baze smještene u ovoj omči dobro su očuvane između arhejskog i bakterijskog organizma; izuzetak čini purin na položaju 37, odn. na tom položaju kod oba organizma susrećemo i adenozinski i gvanozinski ostatak.



Slika 2-22 Poravnanje DNA-sljedova koji kodiraju izoakceptor $tRNA^{Arg}_{CCU}$ u *M. thermautotrophicus* i *E. coli*. Bojanje odgovara elementima sekundarne strukture tRNA na istovjetan način kako je to učinjeno kod slike 2.20.

U *E. coli* najučestalije upotrebljavani kodon za arginin je CGU (čitan izoakceptorom $tRNA^{Arg}_{ACG}$[a]), a kod *M. thermautotrophicus* AGG (čitan izoakceptorom $tRNA^{Arg}_{CCU}$). Kod *M. thermautotrophicus* ne postoji dominantni izoakceptor *E. coli*, već se CGU-kodoni čitaju uz pomoć kolebljive baze izoakceptorom $tRNA^{Arg}_{GCG}$. Izoakceptor $tRNA^{Arg}_{CCU}$ kod *E. coli*

[a] Adenin na položaju 34 standardno se kod ovog izoakceptora modificira u inozin.

zadužen je za dekodiranje najslabije zastupljenog kodona u kodirajućim sljedovima tog organizma. Pored standardnih modifikacija unutar TψC-petlje (5-metiluridin i pseudouridin na položajima 54 i 55) i $tRNA^{Arg}_{CCU}$ *E. coli* posjeduje jedinstvenu modifikaciju unutar antikodonske omče - *N*6-treonilkarbamoiladenozin na položaju 37 (t6A).

Modifikacija purina na položaju 37 (dakle, neposredno uz slijed anitkodona) izrazito je česta. Nalazimo ju u 70% slučajeva te se može smatrati očuvanim svojstvom[112,113]. Važno je spomenuti da tip modifikacije korelira s identitetom posljednje baze antikodona (položaj 36)[114]. Hipermodificirani ostatak *N*6-treonilkarbamoiladenozin (i njegovi derivati) stupaju u interakcije slaganja ponad para baza kodona i antikodona A1-U36 unutar ribosoma čime se stabilizira niska entalpija ovog para baza[114]. Pored ovog stabilizirajućeg efekta, strukturne studije na ljudskoj $tRNA^{Lys}_{UUU}$ pokazale su da t6A sprečava stvaranje vodikovih veza unutar omče, a zbog čega bi moglo doći do zatvaranja antikodonske omče[a115].

Antikodoni tRNA koji posjeduju gvanozin na položaju 36 dominantno na poziciji 37 sadržavaju metilirani purin[112]. U većini slučajeva radi se o 1-metilgvanozinu, iako se gdjegdje može naći 2-metiladenozin ili 6-metiladenozin[112]. Povećana stabilnost para kodon-antikodon (C1-G36) smanjuje potrebu za stabilizirajućim interakcijama slaganja sa strane nukleozida na položaju 37. Dapače, male hidrofobne modifikacije (poput opisanih metilacija) sprečavaju pomak translacijskog okvira čitanja[116], a smještaj metilacija sa strane gdje dolazi do Watson-Crick-ovog sparivanja također potcrtava mogućnost da je funkcija ove modifikacije spriječiti pomak okvira.

Enzim TsaD koji je odgovoran za uvođenje modifikacije t6A u *E. coli*, ortolog je eukariotskog/arhejskog enzima Kae1. Radi se o slaboj ATPazi (stvara ADP) koja veže molekule tRNA s adenozinom na položaju 37. Ovaj enzim (TsaD) stvara esencijalnu mrežu s dodatnim proteinima TsaB i TsaE. Zajedno s TsaC ovi proteini formiraju multiproteinski kompleks te vežu ATP, treonin i bikarbonat kao kofaktore te kataliziraju reakciju treonilkarbamoilacije na položaju 37 bakterijskih tRNA zaduženih za dekodiranje ANN-kodona (dakle radi se o kodonima za aminokiseline Ile, Met, Thr, Lys, Asn, Ser i Arg).

Modificirani nukleotid *N*6-treonilkarbamoiladenozin očuvan je u sva tri kraljevstva te je za očekivati da u uvjetima *in vivo* (unutar vlastitog organizma) $MttRNA^{Arg}$ posjeduje modificirani adenozin 37.

[a] Antikodonska omča mora sadržavati omča 7 nesparenih nukleotida kako bi došlo do ispravnog načina sparivanja s kodonom i adekvatne stabilizacije unutar ribosomskog A-mjesta; nedostatak t6A kod $tRNA^{Lys}_{UUU}$ dovodi do "kompresije" antikodonske omče tako da su slobodna sve tri nukleotida. Drugim riječima, obrazac vodikovih veza koji nastaje bez nadodane modifikacije t6A stimulira nastanak neproduktivne konformacije antikodona i, posljedično, neispravnog dekodiranja.

3 Materijali i metode

3.1 Materijali

3.1.1 Standardne kemikalije

Agaroza (*Sigma*), akrilamid (*Sigma*), 2-amino-2-hidroksimetilpropan-1,3-diol, Tris (*Sigma*), amonijev klorid (*Zorka*), amonijev persulfat, APS (*Serva*), β-merkaptoetanol (*Sigma*), borna kiselina, $B(OH)_3$ (*Kemika*), 1,4-di[2-(5-feniloksazolil)]benzen, POPOP (*Calbiochem*), 2,5-difeniloksazol, PPO (*Merck*), ditiotreitol, DTT (*Sigma*), dušična kiselina, HNO_3, w = 65 % (*Kemika*), etanol, EtOH, φ = 96 % (*Kemika*), etidijev bromid (*Sigma*), etilendiamintetraoctena kiselina, EDTA (*Kemika*) , fenilmetilsulfonil-fluorid, PMSF (*Sigma*), fenol (*Kemika*), formaldehid (metanal), HCHO (*Sigma*), glicerol, $\varphi \approx 100\%$ (*Gram-Mol*), glicin (*Sigma*), imidazol (*Sigma*), kalijev dikromat, $K_2Cr_2O_7$ (*Kemika*) , klorovodična kiselina, HCl, w = 36 % (*Kemika*), kloroform, $CHCl_3$ (*Kemika*), magnezijev acetat, $Mg(OAc)_2$ (*Fluka*), magnezijev klorid, $MgCl_2$ (*Kemika*), metanol, CH_3OH (*Carlo Erba*), *N*, *N'*-metilenbisakrilamid (*Sigma*), *N*, *N*, *N*', *N'*-tetrametiletilendiamin, TEMED (*Sigma*), *N*-(2-hidroksietil)piperazin-*N*'-2-etansulfonska kiselina, Hepes (*Sigma*), 2-(*N*-morfolino)etansulfonska kiselina, Mes (*Sigma*), natrijev acetat, NaOAc (*Kemika*), natrijev dodecil-sulfat, SDS (*Merck*), natrijev karbonat, Na_2CO_3 (*Kemika*), natrijev klorid, NaCl (*Gram-Mol*), ledena octena kiselina, HOAc (*Kemika*), polietilenglikol, PEG 6000 (*Sigma*), srebrov(I) nitrat, $AgNO_3$ (*Kemika*), toluen (*Zorka*), triklorooctena kiselina, TCA (*Kemika*), Tween20 (*Sigma*), ureja (*Kemika*).

3.1.2 Aminokiseline i nukleotidi

Arginin-hidroklorid (*Sigma*), aspartat (*Sigma*), glicin (*Sigma*), serin (*Sigma*), [^{14}C]arginin, [^{14}C]Arg (*PerkinElmer*), [^{14}C]serin, [^{14}C]Ser (*PerkinElmer*), smjesa deoksinukleozid-5'-trifosfata, dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (*Sigma*), adenozin-5'-trifosfat, ATP (*Sigma*).

3.1.3 Enzimi i ostali proteini

Albumin goveđeg seruma, BSA (prema eng. *bovine serum albumin*, *BioLabs*), *Taq* DNA-polimeraza i *Pfu* DNA-polimeraza s pripadajućim reakcijskim puferima (*Fermentas*), restrikcijske endonukleaze s pripadajućim reakcijskim puferima (*BioLabs*), ribonukleaza A iz goveđe gušterače (*USB Corporation*), T4 DNA-ligaza s pripadajućim puferom (*Fermentas*), primarna monoklonska anti-pentahistidinska antitijela proizvedena u mišu (*Sigma*), sekundarna poliklonska antitijela na antitijela iz miša konjugirana peroksidazom iz hrena

proizvedena u zecu (*Sigma*), primarna poliklonska anti-GST antitijela proizvedena u kozi (*Sigma*), sekundarna poliklonska antitijela na antitijela koze konjugirana s peroksidazom iz hrena (Sigma), ukupna tRNA iz *E. coli* (*Roche*), ukupna tRNA iz pivskog kvasca (*Roche*).

3.1.4 Boje

Bromfenol-plava, BPB (*Serva*), ksilencijanol-fluorofosfat, XCFF (*Serva*), toluidinsko modrilo (*Sigma*), *Coomassie Brilliant Blue R-250* (*Sigma*), Ponceau S (*Sigma*).

3.1.5 Sastojci tekućih i krutih hranjivih podloga za uzgoj *E. coli*

Agar (*Sigma*), ampicilin (*Sigma*), natrijev klorid, NaCl (*Gram-Mol*), ekstrakt kvasca (*Difco*), glukoza (*Kemika*), izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid, IPTG (*Fermentas*), kanamicin-sulfat (*Sigma*), kloramfenikol (*Sigma*), tripton (*Sigma*).

3.1.6 Sojevi i plazmidi *E. coli*

Sojevi *E. coli*: *E. coli* DH5α (genotip *sup*E44 *ΔlacU*169(Φ80 *lacZ*ΔM15) *hsd*R17 *rec*A1 *end*A1 *gyr*A96 *thi*-1 *rel*A1), *E. coli* BL21 (DE3)[a] (genotip F^- *dcm ompT* $hsdS_B(r_B^- m_B^-)$ *gal dcm* (DE3)), *E. coli* Rosetta™ (genotip F^- *dcm ompT* $hsdS_B(r_B^- m_B^-)$ *gal dcm* (DE3) te ekstrakromosomski materijal na plazmidu pRARE[b]).

Plazmidni vektori: pET28b, pET21a, pET3a (svi *Novagen*), pGEX6P2 (*GE Healthcare*), pProEx-Htb (*Invitrogen*).

Sustav pET-vektora jedan je od najmoćnijih i najraširenijih sustava za kloniranje i ekspresiju rekombinantnih makromolekula (primarno proteina) u bakteriji *E. coli*. Princip rada ovog sustava bazira se na sinhroniziranom djelovanju domaćina *E. coli* BL21 lizogeniziranim fagom DE3 te plazmidnog vektora u kojemu je gen od interesa pod kontrolom T7 promotora. Lizogeni soj (dakle, *E. coli* BL21 (DE3)) sadrži kopiju T7 RNA polimeraze ugrađenu u vlastiti genom. Poticanjem ekspresije T7 RNA polimeraze potiče se i ekspresija gena od interesa, budući da nastala RNA- polimeraza prepoznaje vlastiti promotor te započinje transkripciju s tog mjesta. Metodu su originalno razvili Studier i suradnici[117].

Vektor pET28b posjeduje inducibilni promotor T7lac te omogućuje dobivanje rekombinantnog proteina sa ili bez histidinskog privjeska na N- ili C-kraju, zavisno o mjestu

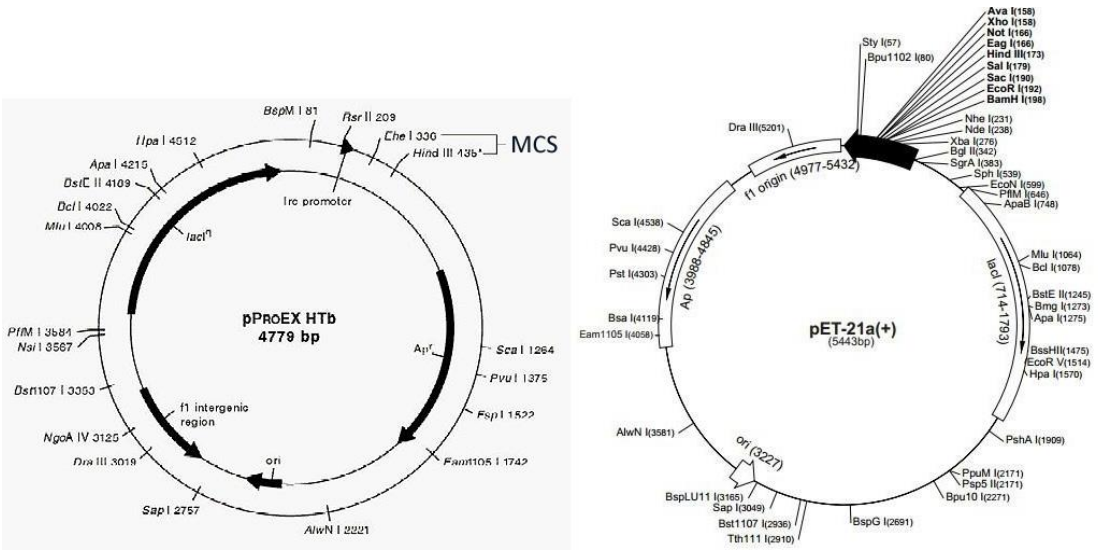
[a] Izvorišni soj za sve oblike *E. coli* BL21 je B834. Ovaj domaćin auksotrof je za metionin i dozvoljava visoko specifično obilježavenje proteina s ^{35}S-metioninom i selenometioninom što se koristi u kristalografiji.

[b] Plazmid nosi gene za tRNA koje prepoznaju kodone AUA, AGG, AGA, CUA, CCC te GGA, kao i gen za kloramfenikol-acetiltransferazu. Snabdijevanjem stanice izoakceptorima odgovornima za prepoznavanje rijetkih kodona omogućuje se gotovo „univerzalan" translacijski proces, koji bi, u suprotnom, bio ograničen preferentnom upotrebom određenih kodona u *E. coli*.

ugradnje i prisutnosti stop-kodona. Nosi gen koji omogućuje rezistenciju stanica domaćina na kanamicin[a], smještenom u suprotnoj orijentaciji od gena koji se želi eksprimirati. Vektor pET21a također posjeduje inducibilni promotor T7lac, C-terminalno smješteni slijed za heksahistidinski privjesak te T7-privjesak smješten na N-kraju. Sadrži signalnu sekvencu za izvoz eksprimiranog proteina u periplazmu te gen *bla* koji kodira za β-laktamazu[b]. Plazmid pET3a također posjeduje gen *bla*, T7 promotor i T7 privjesak. Ovdje je korištena modificirana inačica ovog plazmida u kojemu je izbačeno dvostruko *Eco*RV mjesto.

Plazmid pGEX-6P2[118], poput vektora pET-serije posjeduje višestruka mjesta za kloniranje željenog gena, a koja dozvoljavaju jednosmjernu inserciju kodirajućeg slijeda u vektor. Fuzijski protein koji nastoje sadrži glutation-S-transferazu smještenu na N-kraju. Takav protein se dalje lako može pročistiti afinitetnom kromatografijom na GST-sefarozi. Globularni privjesak može se ukloniti radom komercijalno dostupne PreScission proteaze koja se također proizvodi kao fuzijski protein s GST-privjeskom (dakle, po proteolitičkoj razgradnji smjesa rekombinantnog, nativnog, odn. proteina bez privjeska, rezanog GST-a i proteaze može se razdvojiti u drugom kromatografskom koraku na istoj afinitetnoj smoli).

Ugradnja gena od interesa u plazmidni vektor pProEx-Htb omogućuje proizvodnju produkta tog gena u fuziji s N-terminalno smještenim heksahistidinskim privjeskom. Transkripcija gena odvija se s tac-promotora smještenog ispred mjesta ugradnje gena. Plazmid je dugačak 4779 nukleotida te nosi gen *bla* (v. ranije)



Slika 3-1. Mape vektora pProEx-HTb (lijevo) i pET-21a (desno). Skraćenica MCS stoji za eng. *multi-cloning site* (višestruko mjesto za kloniranje), Ap^r je gen *bla* s kojeg se sintetizira enzim odgovoran za rezistenciju na ampicilin, ori mjesto ishodišta replikacije. Duljina (u parovima baza) dana je ispod imena plazmida.

[a] Rezistenciju na kanamicin pruža neomicin fosfotransferaza II, iako se to unutar priručnika pET -sustava ne navodi izrijekom.

[b] Odgovorna za rezistenciju na ampicilin.

3.1.7 Ostale kemikalije i komercijalni kompleti

Kompleti za rad s nukleinskim kiselinama: *QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)* za izolaciju plazmidne DNA iz *E. coli*, *QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)* za pročišćavanje DNA iz reakcijskih smjesa lančane reakcije polimeraze, *QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)* za izolaciju fragmenata DNA iz agaroznih gelova. Kompleti i kemikalije za *Western*-analizu: mlijeko u prahu (*Dukat*), Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (*GE Healthcare*), otopina razvijača (*GBX developer and replenisher*, Kodak), otopina fiksira (*GBX fixer and replenisher*, Kodak).

3.1.8 Kromatografske kolone i punila

Punila za afinitetnu kromatografiju: Ni-NTA agaroza (*Qiagen*), GST-sefaroza[a] (*GE Healthcare*). Kolone za ionsku izmjenu: HiPrep DEAE FF 16/10 (*GE Healthcare*), MonoQ HR 10/10 (*Pharmacia*), MonoS HR 5/5 (*Pharmacia*). Kolone za gel-filtraciju: Superdex 200 HR 10/30 (*GE Healthcare*) i Superdex 75 10/30 (*GE Healthcare*). Kolona za kromatografiju obrnutih faza: Jupiter C4 (*Phenomenex*).

3.1.9 Elektroforetski i neki kromatografski puferi

Elektroforetski pufer za agaroznu elektroforezu: pufer TA, sastav Tris (c = 25 mmol dm^{-3}), octena kiselina (c= 25 mmol dm^{-3}), pH 6,8.

Elektroforetski pufer za nativnu elektroforezu na poliakrilamidnom gelu: pufer TAE, sastav Tris (c = 40 mmol dm^{-3}), octena kiselina (c = 20 mmol dm^{-3}), EDTA (c = 1 mmol dm^{-3}), pH 6,4.

Elektroforetski pufer za denaturirajuću elektroforezu nukleinskih kiselina na poliakrilamidnom gelu: pufer TBE, sastav Tris (c = 90 mmol dm^{-3}), borna kiselina (c = 90 mmol dm^{-3}), EDTA (c = 2 mmol dm^{-3}), pH 8,0.

Puferi za denaturirajuću elektroforezu proteina na poliakrilamidnom gelu:

pufer za razdvajanje, sastav Tris (c = 375 mmol dm^{-3}), SDS (γ= 1 g dm^{-3}), pH 8,8,

pufer za sabijanje, sastav Tris (c = 125 mmol dm^{-3}), SDS (γ = 1 g dm^{-3}), pH 6,8,

elektroforetski pufer, sastav: Tris (c = 25 mmol dm^{-3}), glicin (c = 192 mmol dm^{-3}), SDS (c = 3,5 mmol dm^{-3}).

Svi puferi titrirani su klorovodičnom kiselinom do navedenog pH. Titracija svih otopina izvršena je uz pomoć pH-metra MP220 (*Mettler Toledo*).

[a] Sefaroza: komercijalni naziv za umreženi oblik agaroze. Ponekad se dodaju jodoacetilne skupine za selektivno vezanje cisteinskih bočnih ogranaka. Ime potječe od eng. *Separation-Pharmacia-Agarose.*

Pufer za prijenos proteina na membranu (*Western*-analiza), sastav Tris (c = 25 mmol dm^{-3}), glicin (c = 192 mmoldm^{-3}), φ (EtOH) = 20 %.

Pufer TBS, sastav c (Tris) = 25 mmol dm^{-3}, c (NaCl) = 150 mmol dm^{-3} (pH 7,6).

Pufer TBS/Tween20, sastav c (Tris-HCl, pH 7,5) = 25 mmol dm^{-3}, c (NaCl) = 150 mmol dm^{-3}, φ(Tween20) = 0,05 %.

Kromatografski puferi za pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom:

pufer A, sastav Tris-HCl (c = 25 mmol dm^{-3}, pH 7,6), NaCl (c = 500 mmol dm^{-3}), imidazol (c = 10 mmol dm^{-3}, pH 7,6), glicerol (φ = 5 %), PMSF (c = 0,5 mmol dm^{-3}), β-merkaptoetanol (c = 5 mmol dm^{-3}),

pufer B, sastav Tris-HCl (c =25 mmol dm^{-3}, pH 7,6), NaCl (c = 500 mmol dm^{-3}), imidazol (c = 30 mmol dm^{-3}, pH 7,6), glicerol (φ = 5 %), PMSF (c = 0,5 mmol dm^{-3}), β-merkaptoetanol (c = 5 mmol dm^{-3}),

pufer C, sastav imidazol (c = 250 mmol dm^{-3}, pH 7,6), NaCl (c = 500 mmol dm^{-3}), glicerol (φ = 5 %,) PMSF (c = 0,5 mmol dm^{-3}), β-merkaptoetanol (c = 5 mmol dm^{-3}).

Kromatografski puferi za pročišćavanje proteina i supročišćavanje kompleksa aaRS:tRNA gel-filtracijom, sastav Tris-HCl (c = 25 mmol dm^{-3}, pH 7,2), NaCl (c = 150 mmol dm^{-3}, $MgCl_2$ (c = 5 mmol dm^{-3}), DTT (c = 0,5 mmol dm^{-3}) ili β-merkaptoetanol (c = 5 mmol dm^{-3}).

Svi kromatografski puferi pripravljeni su u redestiliranoj vodi i sterilizirani filtriranjem kroz filtere s promjerom pora 0,2 μm. Degaziranje istih provedeno je pomoću ultrazvučne kupelji Elmasonic (*Elma*).

3.1.10 Čipovi za metodu rezonancije površinskih plazmona

Sensor Chip NTA (*Biacore Inc., Uppsala*), Sensor Chip CM5 (*Biacore Inc., Uppsala*).

3.2 Metode

3.2.1 Bioinformatički alati

Za poravnanje proteinskih sljedova korišteni su alati Clustal Omega[119] i T-Coffee[120]. Za predviđanje svojstava istraživanih proteina korišteno je bioinformatičko oruđe ProtParam[121] koje dozvoljava računalno predviđanje fizičkih i kemijskih parametara proteina pohranjenih u bazama podataka Swiss-Prot[122] ili TrEMBL[123] ili pak za ručno unesenu sekvencu. Računati parametri uključuju molekulsku masu, teorijski pI, aminokiselinski i atomski sastav, ekstinkcijski koeficijent, predviđeno vrijeme poluživota u različitim domaćinima itd. Za pristupanje sljedovima tRNA i raspored sekundarnih struktura korištena je baza podataka

GtRNAdb[124]. Za poravnanje i modeliranje molekula tRNA korišten je server ModeRNA[125]. Za pretragu potencijalnih modifikacija u bakteriji *E. coli* korištena je baza MODOMICS[126].

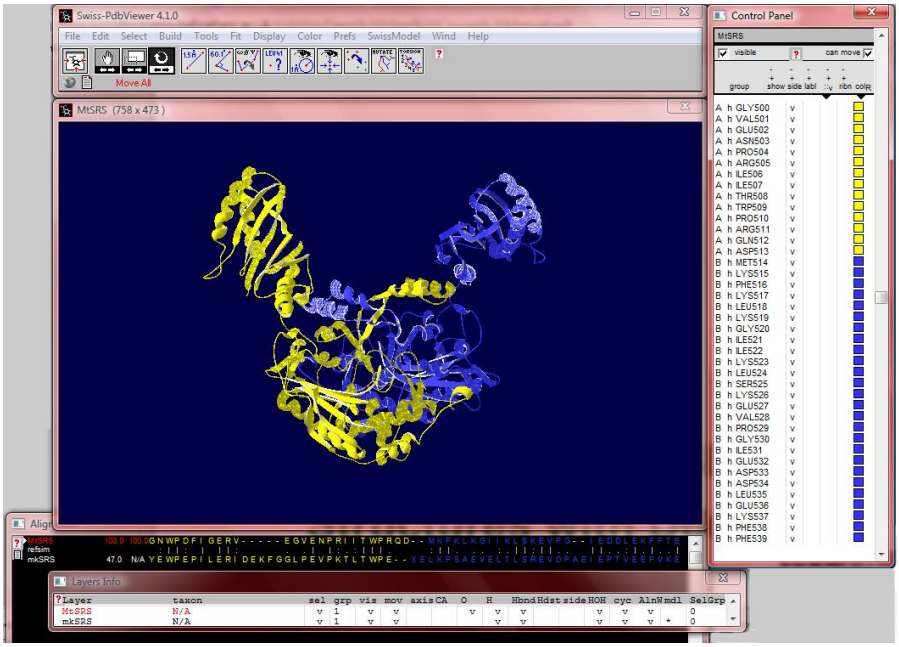
Modeliranje enzima MtArgRS i MtSerRS izvršeno je uz upotrebu arginil-tRNA-sintetaze iz *Pyrococcus horikoshii* kao kalupa, (za MtArgRS, PDB ID 2ZUE_A, skraćenica PhArgRS) i seril-tRNA-sintetaze iz *Methanopyrus kandleri* kao kalupa (za MtSerRS, PDB ID 3W3S_A, skraćenica MkSerRS). Kalupi su identificirani unutar virtualnog radnog mjesta (eng. *workunit*) pri serveru SWISS-MODEL[127]. Automatsko modeliranje napravljeno je korištenjem programa EsyPred3D[128], Phyre[129] te SWISS-MODEL[127]. Pritom prva dva programa od korisnika traže samo aminokiselinski slijed u formatu FASTA te PDB identifikacijski broj kalupa. U slučaju automatskog modeliranja pri radnoj jedinici SWISS-MODEL korisnik prilaže željeno poravnanje sljedova, bilo višestruko, bilo samo između modeliranog proteina i proteina kalupa (eng. *alignment based homology modeling*). Kvaliteta struktura provjerena je unutar iste radne jedinice na lokalnoj razini (ANOLEA[130] za provjeru kvalitete pakiranja, GROMOS[131] za analizu konformacije, QMEAN6 funkciju za analizu geometrije[a]), globalnoj razini (DFire[132]), stereokemijski (Procheck[133]) te s obzirom na prisutnost karakterističnih strukturnih motiva (Promotif[134]).

Program SWISS PDB Viewer[127] po potrebi je korišten za manualno ugađanje/prilagođavanje regija s niskim QMEAN-vrijednostima, kao i za izgradnju dimera MtSerRS.

Kao što je spomenuto, za izgradnju dimera MtSerRS korištena je struktura SerRS arheje *M. kandleri* (PDB ID 3W3S_A) u kompleksu s $tRNA^{Ser}$ bakterije *A. aeolicus* (dalje $AatRNA^{Ser}$). Iako MtSerRS pokazuje reciprocitet po pitanju supstrata i proteinskog partnera u odnosu na MbSerRS, s MkSerRS dijeli veći stupanj sličnosti na razini primarnog slijeda (47,8% u odnosu na 34% prema MbSerRS) te je donekle bolje vidljiva u mapi elektronske gustoće. Za postupak modeliranja dimera, struktura MkSerRS:$AatRNA^{Ser}$ preuzeta je s RCSB kao biološki kompleks (eng. *biological assembly*, format .pdb1), očišćena od slobodnih skupina (npr.SO_4^{2-}), adenilata, cinka i tRNA te je po preimenovanju lanaca (lanci dimera moraju biti pohranjeni kao A, odn. B) sačuvana kao nova datoteka. Jednoslovna aminokiselinska sekvenca MtSerRS sačuvana je u FASTA-formatu, pri čemu su raspisana oba lanca (odvojena interpunkcijom ";"). Unosom ove datoteke u program SWISS PDB Viewer, aminokiselinski slijed se automatski prikazuje kao vrlo duga α-zavojnica. Po unosu koordinata kalupa (očišćena datoteka s koordinatama MkSerRS) komandom "fit > fit raw seq", sirova

[a] Vrijednost QMEAN6 govori o ispravnosti supersekundarne strukture. Radi se o funkciji koja predstavlja linearnu kombinaciju 6 strukturnih kvaliteta uz korištenje statističkih potencijala, npr. lokalna geometrija se analizira preko potencijala torzionih kutova duž triju susjednih aminokiselina.

aminokiselinska sekvenca MtSerRS provizorno se prianja na peptidnu okosnicu MkSerRS. Program SWISS PDB Viewer[127] omogućuje manualno poravnavanje sljedova u zasebnom okviru. Potencijalne probleme (steričko sudaranje, aminokiseline koje leže izvana dopuštenog područaja prema Ramachandranovom grafu isl.) moguće je podesiti ručno. Za dobivanje finalnog modela, čitavi projekt unosi se na radnu jedinicu SWISS-MODEL za krajnju doradu.



Slika 3-2. Sučelje programa SWISS PDB Viewer[127] tijekom izgradnje dimera MtSerRS korištenjem očišćenog kalupa 3W3S_A.

Strukturna sučelja i polarni kontakti ispitivani su korištenjem programa ENTANGLE[135]. Slike su napravljene ili s programom Pymol[136] ili pomoću programa SWISS PDB Viewer[127].

3.2.2 Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina određivana je ili metodom po Bradfordu ili uz korištenje teorijskih ekstinkcijskih koeficijenata dobivenih uz pomoć programa ProtParam (v. ranije, tablica 3.1).

Tablica 3-1. Vrijednosti ekstinkcijskih koeficijenata za istraživane proteine računati uz pomoć programa ProtParam.

protein	ekstinkcijski koeficijent (svi Cys oksidirani) / (10^3 $cm^{-1}mol^{-1}dm^3$)	ekstinkcijski koeficijent (svi Cys reducirani) / (10^3 $cm^{-1}mol^{-1}dm^3$)
Δ21-MtArgRS	51,925	51,800
Δ39-MtArgRS	51,925	51,800
Δ43-MtArgRS	51,925	51,800
Δ53-MtArgRS	51,925	51,800
Δ89-MtArgRS	50,435	50,310
ΔNtot-MtArgRS	47,455	47,330
ΔCtot-MtArgRS	34,840	34,840
ΔNtotΔCtot-MtArgRS	28,880	28,880
MtArgRS	53,415	53,210

Metoda po Bradfordu koristi pomak apsorpcijskog maksimuma boje *Coomassie Brilliant Blue* G-250 a koji se dešava po vezanju iste na proteinski supstrat u kiselom mediju. Slobodna boja posjeduje apsorpcijski maksimum pri 465 nm, a u vezanom obliku pri 595. Tijekom oblikovanja kompleksa boje i proteina dešavaju se dva tipa interakcija: crveni (kationski) oblik boje *Coomassie* donira slobodni elektron skupinama proteina koje se mogu ionizirati zbog čega dolazi do slamanja nativnog oblika proteina i izlaganja hidrofobne unutrašnjosti istog. Sada izloženi hidrofobni džepovi nekovalentno vežu nepolarni dio boje van der Waalsovim silama, pozicionirajući pozitivne amino-skupine u blizinu s negativno nabijenim dijelom boje. Vezanje se dodatno ojačava ionskim interakcijama između veznih partnera. Vezanje proteina stabilizira plavi (ionizirani odn. anionski) oblik boje zbog čega količina kompleksa boja:protein u otopini predstavlja mjeru koncentracije proteina i može biti procijenjena očitanjem apsorbancije (pri 595 nm). Ovaj reagens relativno je neosjetljiv na prisutnost drugih reagensa u uzorku, s izuzetkom detergenata[137].

Koncentracija ispitivanog proteina računa se pomoću baždarnog pravca konstruiranog mjerenjem apsorbancije otopina s različitim koncentracijama proteinskog standarda. Kao standard rutinski se rabi goveđi serumski albumin (BSA, prema eng. *bovine serum albumine*), u rasponu masenih koncentracija 20-160 μg mL^{-1}. Na 0,1 mL standarda dodaje se 1 mL Bradfordovog reagensa (vodena otopina sastava: *Coomassie Brilliant Blue* G-250 0,1 g dm^{-3}, volumni udio etanola 5 % i fosforne kiseline 8,5 %). Po inkubaciji uzoraka od 20-30 minuta, mjerena apsorbancija uzoraka pri λ = 595 nm daje linearni odziv pomoću kojeg se može izračunati koncentracija ispitivanog proteinskog uzorka.

3.2.3 Snimanje fluorescencijskih spektara

Fluorescencijski spektri divljeg tipa ArgRS te krnjih oblika istog umjereni su na luminiscencijskom spektrofotometru LS 50 B (*PerkinElmer*). Promjer ekscitacijskih i emisijskih otvora iznosio je 5 nm. Koncentracija uzoraka iznosila je 0,4 μmol dm^{-3}. Pobuđivanje triptofanskih bočnih ogranaka (ekscitacija) enzima izvršeno je pri 295 nm te je fluorescencija izmjerena pri 20 °C u rasponu od 300 do 500 nm.

3.2.4 Snimanje spektara cirkularnog dikroizma

Krivulje mekšanja za MtArgRS (divlji tip i sve skraćene inačice) stvorene su praćenjem promjena u elipticitetu pri 220 nm na spektropolarimetru *J-715* (*JASCO*). Korištena je kvarcna kiveta optičkog puta 0,1 cm. Pročišćeni uzorci enzima otopljeni su u puferu sastava *c* (Tris-HCl) = 20 mmol dm^{-3}, *c* (NaCl) = 150 mmol dm^{-3}, *c* (EDTA) = 0,1 mmol dm^{-3}, pH 7,4, a koncentracija istih iznosila je 0,2 – 0,4 μg μL^{-1}. Otopine proteina zagrijavane su u temperaturnom rasponu od 4 do 95 °C brzinom od 30 °C h^{-1}.

3.2.5 Elektroforetske metode

3.2.5.1 Elektroforeza na gelu agaroze

Horizontalna elektroforeza na gelu agaroze korištena je za analizu smjesa nukleinskih kiselina u postupcima poput restrikcijske analize DNA, određivanje veličine stvorenih DNA-fragmenata u lančanoj reakciji polimeraze, izolacije RNA iz stanica i sl. (v. kasnije). Maseni udio agaroze u korištenim gelovima iznosio je 1% (2% za analizu prilikom izolacije tRNA), a gelovi su pripravljeni otapanjem agaroze u mikrovalnoj pećnici u puferu TAE s prethodno dodanim interkalatorom etidij-bromidom (finalna koncentracija 0,5 mg dm^{-3}). Sastav elektroforetskog pufera bio je isti kao za otapanje agaroze. Elektroforeza se odvijala pri 120 V tijekom 25 do 30 minuta na sobnoj temperaturi (izvor napona EPS 600, *Pharmacia Biotech*). Za uspješnije nanašenje uzoraka u jažice korištena je smjesa glicerola i organskih boja (glicerol φ = 50 %, bromfenol-plavo *w* = 0,4 %, ksilencijanol-fluorofosfat *w* = 0,4 %) do 1/10 konačnog volumena. Organske boje imaju ulogu praćenja migracije (nevidljivog) uzorka u gelu, budući da se u 1%-agaroznom gelu bromfenol-plavo kreće kao 300 parova baza duga dvolančana nukleinska kiselina, a ksilencijanol-fluorofosfat kao ona dužine 4 kb. Po završetku elektroforeze, vrpce DNA/RNA vizualizirane su pomoću interkaliranog etidij-bromida. Ovaj aromatski spoj posjeduje heterocikličku srž koja je izomer akridina. Apsorpcijski maksimumi etidij-bromida u vodenoj otopini nalaze se pri 210 nm i 285 nm, a

kao rezultat ekscitacije pri ovim valnim duljinama, isti emitira narančasto svjetlo duljine 605 nm. Ugradnjom etidij-bromida između parova baza dvolančane nukleinske kiseline (tj. ulaskom u hidrofobni okoliš) uklanjaju se molekule vode vezane na njegov nabijeni dio. Kako voda prirodno gasi fluorescenciju, interkalacija etidij-bromida između parova baza omogućuje selektivno zapažanje fluorescencije samo na onim mjestim gdje je isti ugrađen, tj. na području vrpci molekula DNA/RNA. Vizualizacija vrpci vrši se promatranjem gela na transiluminatoru, pod UV-svjetlošću valne duljine 312 nm. Za snimanje agaroznih gelova korišten je aparat MiniBIS Pro (*Bio-Imaging Systems*).

3.2.5.2 Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u prisustvu SDS-a

Na razdvajanje makromolekula u električnom polju dominantan utjecaj imaju masa, naboj i topologija tih molekula. Za razliku od nukleinskih kiselina koje posjeduju uniformni naboj, proteini posjeduju brojne funkcionalne skupine koje pri određenom pH proteinu daju bilo negativni (gibanje prema anodi) bilo pozitivni *netto* naboj (gibanje prema katodi)[a]. Iz tog razloga se za razdvajanje proteina u električnom polju, a na temelju mase, koristi metoda elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u prisustvu SDS-a (SDS-PAGE). Radi se o denaturirajućoj vrsti elektroforeze u kojoj se anionski detergent natrij-dodecilsulfat (SDS) jednoliko veže na prisutne proteinske vrste u uzorku. Vezanje SDS-a ne samo da uzrokuje denaturaciju proteina, već dovodi do toga da sve proteinske vrste posjeduju isti omjer naboja i mase. Denaturacijom se dokida sekundarna, tercijarna i kvaterna struktura zbog čega je ukinut i topološki faktor tijekom gibanja prilikom elektroforeze. Uslijed jednakog omjera mase i naboja omogućena je procjena relativnih molekulskih masa proteina na temelju njegove pokretljivosti u gelu. Ova je vrsta elektroforeze korištena za detekciju proteina prilikom prekomjerne ekspresije u stanicama domaćina, tijekom kromatografskih koraka te za analizu frakcija sakupljenih u metodi afinitetnog supročišćavanja.

Tijekom elektroforeze, uzorci se gibaju kroz gel koji se sastoji od dvije zone. Sastav zona gela je sličan, a razlikuje se prema umreženju te vrijednosti pH. Kako je jedna od glavnih ionskih vrsta u elektroforetskom puferu aminokiselina glicin, gibanje kompleksa protein:SDS uvjetovano je (i) nabojnim stanjem iona glicina. Unutar gela za sabijanje pH iznosi 6,8 što je blizu izoelektrične točke glicina; iz tog razloga negativno nabijeni kompleksi proteina i SDS-a *sabijaju* se između (relativno) mirujućih molekula glicina. Tako sabijen uzorak dolazi do gela za razdvajanje gdje pH iznosi 8,8 i unutar kojeg nema zapreke kretanju denaturiranih proteinskih micela (glicin je dominantno u negativnom obliku).

[a] Ili ukupni naboj 0, ukoliko je pH jednak vrijednosti pI za dani protein.

Čitavi gel za SDS-PAGE izlijeva se na sljedeći način. Između stakalaca za elektroforezu (sendvič-konstrukcija) izlije se smjesa gela za razdvajanje (*w* (akrilamid-biskarilamid u masenom omjeru 29:1) = 9 %, pufer za razdvajanje u volumenu koji čini ¼ ukupnog volumena gela, γ (APS) = 0,7 μg cm^{-3}, *w* (TEMED) = 0,05 %) koji čini (po prilici) tri četvrtine ukupnog gela, a smješten je bliže anodi. Prilikom polimerizacije, smjesu se natkriva slojem destilirane vode čija je funkcija spriječiti inhibiciju polimerizacije atmosferskim kisikom, kao i ravnomjernije slijeganje gela. Po polimerizaciji, voda se uklanja, a nanosi gel za sabijanje. Potonji (*w* (akrilamid-biskarilamid u masenom omjeru 29:1) = 4 %, pufer za sabijanje u volumenu koji čini ¼ ukupnog volumena gela, γ (APS) = 0,7 μg cm^{-3}, *w* (TEMED) = 0,05 %) se izlije do kraja slobodnog volumena dostupnog između stakala te se umetne češalj koji služi oblikovanju jažica. Po završetku polimerizacije gel je spreman za upotrebu.

Analizirani uzorci miješaju se s puferom za nanošenje (γ (SDS) = 50 g dm^{-3}, γ (BPB) = 0,1 g dm^{-3}, φ (glicerol) = 30 %, φ (β-merkaptoetanol) = 8 %, *c* (Tris-HCl, pH 6,8) = 250 mmol dm^{-3}) u volumnom omjeru 3:1. Neposredno pred nanašanje na gel, čitava se smjesa dodatno termički denaturira pri 100 ºC u trajanju od 3 do 5 minuta. Zavisno od veličine češlja, na gel se može nanijeti 15-25 μL analiziranog uzorka. Elektroforeza se provodi pri stalnom naponu *U* = 120 V tijekom putovanja uzoraka kroz gel za sabijanje te pri 180 V prilikom gibanja kroz gel za razdvajanje. Sastav elektroforetskog pufera korištenog dan je ranije. Za vizualizaciju proteina u gelu nakon elektroforeze korištena je otopina boje *Coomassie Brilliant Blue* R-250 (γ (*Coomassie Brilliant Blue* R-250) = 2,5 g dm^{-3}, *c* (HOAc) = 1,67 mol dm^{-3}, φ (CH_3OH) = 45 %). Gel se inkubira s navedenom bojom uz potresanje tijekom 10-15 minuta. Uklanjanje nespecifično vezane boje postiže se uranjanjem gela u kipuću destiliranu vodi tijekom sljedećih 5-10 minuta. Za crno-bijele slike obojenih gelova korišten je aparat MiniBIS Pro (*Bio-Imaging Systems*), dok je za slike u boji korišten skener (*Canon* iR1018).

3.2.5.3 *Western*-analiza

Ova analitička metoda omogućava specifičnu detekciju iznimno male količine proteina na temelju interakcije istog s primarnim antitijelima. Potonja prepoznaju specifični epitop (slijed/strukturu) prisutan u analiziranoj/detektiranoj molekuli. Kako se u laboratoriju rutinski proizvode rekombinantni proteini u fuziji s afinitetnim privjescima (a čija je funkcija olakšati i ubrzati izolaciju tako priređenih polipeptida) komercijalno su dostupna primarna antitijela koja prepoznaju slijed karakterističan za pojedini privjesak. U ovom radu *Western*-analizom praćena je prisutnost rekombinantnih proteina s heksahistidinskim i GST-privjeskom s ciljem

dokazivanja prisutnosti takvih proteina prilikom ekspresije te prilikom titracije proteinskim partnerom u metodi afinitetnog supročišćavanja. Pritom su uzorci bili najprije razdvojeni metodom SDS-PAGE ili nativnom elektroforezom na poliakrilamidnom gelu te potom preneseni na membranu za *Western*-analizu.

Po provedenom razdvajanju uzoraka elektroforezom gel se tipično fiksira upotrebom pufera za prijenos i to inkubacijom na sobnoj temperaturi u trajanju od 15 minuta. Za prijenos uzoraka na nitroceluloznu membranu korištena je aparatura za polusuhi prijenos 2117 Multiphor II (*Pharmacia LKB*). Konstrukcija za prijenos sastavlja se na sljedeći način: na anodnu ploču postave se dva-tri lista filter-papira (*Whatman 3MM*) natopljenog puferom za prijenos te na njih nitrocelulozna membrana (*Hybond-C Extra, Amersham Biosciences*) izrezana prema dimenzijama koje odgovaraju veličini gela s analiziranim uzorcima. Po smještanju gela povrh membrane, isti se preklapa s dva-tri lista natopljenog filter-papira. Cijela se konstrukcija dodatno natopi puferom za prijenos, a mjehurići zraka (koji mogu ostati zarobljeni u konstrukciji te prekidati protok električne struje) istisnu upotrebom staklene epruvete. Montiranjem katodne ploče povrh opisane konstrukcije prijenos molekula s gela na membranu inicira se propuštanjem struje konstantne jakosti. Potrebna jakost struje računa se prema formuli $I = 0{,}8\ \text{mA cm}^{-2}\ A$ (gdje A označava površinu gela). Prijenos se tipično vrši u trajanju od 60 do 90 minuta. Po završetku prijenosa, membrana se inkubira u otopini nemasnog mlijeka u prahu ($\gamma = 50\ \text{g dm}^{-3}$) u puferu TBS/Tween20. Ovaj korak služi sprječavanju nespecifičnog vezanja antitijela na membranu u daljnjim koracima. Inkubacija se obavlja pri sobnoj temperaturi tijekom 1 h ili preko noći 4 ºC, uz potresanje. Neposredno prije ovog koraka učinkovitost prijenosa moguće je provjeriti reverzibilnim bojenjem membrane otopinom boje Ponceau S (0,1 % (w/v) Ponceau S, 5 % (v/v) octene kiseline).

Po inkubaciji membrane u otopini mlijeka slijedi inkubacija iste u otopini odgovarajućih primarnih antitijela (anti-pentahistidinskih ili anti-GST, zavisno o konstruktu). Primarna antitijela proizvedena su u specifičnom domaćinu (anti-pentahistidinska u mišu, odn. anti-GST u kozi). Komercijalna antitijela otope se u puferu TBS u volumnom omjeru 1:3000. Membrana se uroni u ovu otopinu i inkubira tijekom 1 h, uz potresanje. Po završetku inkubacije, membrana je potrebno detaljno isprati puferom TBS kako ne bi došlo do nespecifičnog vezanja sekundarnih antitijela u sljedećem koraku. Stoga se membrana ispire tri puta u trajanju od 5-10 minuta. Po ispiranju membrana se inkubira s otopinom sekundarnih anti-mišjih antitijela, koja se dobiva razrjeđivanjem komercijalno dostupnih antitijela u volumnom omjeru 1:10000 u puferu TBS. Na sekundarna antitijela kovalentno je vezana peroksidaza iz hrena koja omogućuje detekciju kompleksa protein:primarno

antitijelo:sekundarno antitijelo (v. dalje). Sekundarna (poliklonska) antitijela proizvedena su u zecu imunizacijom životinje na antitijela miša (*Western*-analiza proteina s histidinskim privjeskom), odn. koze (*Western*-analiza proteina s GST-fuzijom). Vezanje sekundarnih antitijela odvija se ponovo u trajanju od 1 h, uz potresanje. Nakon tri uzastopna ispiranja membrane (jednako kao nakon inkubacije s primarnim antitijelima), položaj proteina na membrani detektira se kemiluminescencijski. Dodatkom luminola i H_20_2 peroksidaza hrena (konjugirana na sekundarna antitijela) katalizira oksidaciju luminola do 3-aminoftalata. Reakciju prati emisija svjetlosti valne duljine od 428 nm. Intenzitet svjetlosti je razmjerno nizak, ali se može pojačati u prisutnosti određenih reagensa, primjerice *p*-jodofenola (povećava emisiju oko 1000 puta). Luminol, vodikov peroksid i pojačivač kemiluminiscencije sastojci su kompleta za detekciju Amersham ECL (*GE Healthcare*) koji je u svrhu detekcije rabljen u ovom radu. Otopine peroksida i luminola iz navedenog kompleta potrebno je pomiješati u volumnom omjeru 1:1. Konačni volumen ove otopine pritom treba prilagoditi veličini membrane kako bi se omogućila optimalna detekcija (omjer volumena prema površini 0,1 mL cm^{-2}). Membrana se inkubira s navedenom otopinom tijekom 3 minute po čemu se otopina ukloni, a membrana omota prozirnom folijom. Pojavu kemiluminescencije bilježi se prianjanjem fotografskog filma (*BioMaxLight, Kodak*) na obloženu membranu u trajanju od 30 sekundi pa sve do 15 minuta (različita vremena ekspozicije ovise o količini i vrsti analiziranog uzorka). Po završetku ekspozicije, film se uranja u otopinu razvijača do pojave signala, a zatim fiksira (razvijač i fiksir komercijalno su dostupne otopine, v. 3.1.7). Zabilježeni intenzitet emitirane svjetlosti proporcionalan je količini analizirane molekulske vrste u uzorku.

3.2.5.4 Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u prisustvu ureje

Kao što je spomenuto u prethodnom poglavlju, dominantni utjecaj na gibanje makromolekula u električnom polju imaju naboj, masa i topologija. Za analizu mase dvolančanih DNA-fragmenata nativna elektroforeza na gelu agaroze predstavlja adekvatnu metodu. Nedostaci te metode za analizu sastava nukleinskih kiselina u smjesi uključuju slučajeve kada je analizirana molekula malena (tj. kada je potrebna veća rezolucija nego što to agarozni gel dopušta) ili kada molekula posjeduje specifične topološke značajke (posebni elementi sekundarne strukture kao što su ukosnice, petlje i sl. i/ili definirana tercijarna struktura). U tim slučajevima rabi se elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u prisustvu ureje. Ureja stvara vodikove veze s bazama nukleotida analizirane (deoksi)ribonukleinske kiseline čime se dokida uspostavljeni obrazac sparivanja baza u analiziranoj molekuli (a time i sekundarna,

odn. tercijarna strukturu RNA/DNA). Ova je vrsta elektroforeze korištena za ispitivanja pojedinih koraka izolacije rekombinantne tRNA iz stanica bakterije *E. coli*, kao i za analizu frakcija sakupljanih tijekom ionske izmjene te kromatografije obrnutih faza.

Prije samog razdvajanja (tj. prije nanašanja uzoraka) prazni gel (*w*(akrilamid-biskarilamid u masenom omjeru 19:1) = 10 %, pufer TBE, *c* (ureja) = 6 mol dm^{-3}, γ (APS) = 0,7 μg cm^{-3}, *w* (TEMED) = 0,05 %,) spoji se na izvor napona (*U* = 80 V, *t* = 15 min) u trajanju od 20-tak minuta. Jedan od kritičnih parametara kod ovog tipa elektroforeze predstavlja temperatura. Vrlo koncentrirana ureja (6 mol dm^{-3}) za punu aktivnost u denaturaciji zahtjeva temperature iznad 40 °C. Operativna temperatura postiže se opisanom predradnjom, tj. spajanjem elektroforetskog sustava prije samog nanošenja uzoraka. Kao elektroforetski pufer korišten je pufer TBE (za sastav v. 3.1.9). Neposredno prije nanošenja uzoraka, jažice se ispiru elektroforetskim puferom kako bi se uklonili kristali ureje u istima, a koji ometaju nanošenje i jednolični ulazak makromolekula u pore gela. Uzorci tRNA pripreju se miješanjem s otopinom boje (*φ* (glicerol) = 30 %, *w* (XCFF) = 0,5 g dm^{-3}, *w* (BPB) = 0,5 g dm^{-3}, *c* (ureja) = 6 mol dm^{-3}, pufer TAE) u omjeru 1:1. Kao i kod SDS-PAGE, potpuna denaturacija postiže se dodatnim zagrijavanjem ovako pripremljenih uzoraka pri 65 ºC tijekom 3 minute. Elektroforeza se provodi pri naponu od 120 V do izlaska fronte BPB iz gela. Za vizualizaciju većih količina ribonukleinske kiseline korišteno je toluidinsko modrilo (*γ* (toluidinsko modrilo) = 4 g dm^{-3}, *φ* (EtOH) = 50 %, *c* (HOAc) = 1,67 mol dm^{-3}). Gel je bio inkubiran u boji (uz potresanje) tijekom 10-15 minuta te odbojavan u vrućoj destiliranoj vodi u trajanju 3-5 minuta. Za manje količine RNA korištena je tehnika bojanja gelova srebrom (v. 3.2.5).

3.2.6 Bojanje gelova srebrom

Bojanje srebrom jedna je od najosjetljivijih metoda trajnog bojanja proteina i nukleinskih kiselina u poliakrilamidnim gelovima. Princip bojanja uključuje impregnaciju gela (i u njemu prisutnih makromolekula) topljivim ionima srebra (Ag^+). Prilikom ekspozicije, vezani ioni srebra reduciraju se do netopljivog (i vidljivog) oblika Ag^0 čime se omogućuje vizualizacija vrpci u kojima je prisutna makromolekula od interesa.

Protokol bojanja srebrom uključuje nekoliko koraka koji su numerirani u tekstu koji slijedi. Sastav svih otopina dan je u tablici 3.2.

1. *Fiksacija makromolekula*. U ovom koraku gel se tretira kiselinom zbog čega prisutne makromolekule postaju netopljive te ne mogu difundirati iz gela tijekom narednih koraka bojanja. Kemikalije koje su potencijalno prisutne u gelu (tipično ioni elektroforetskog pufera) u ovom koraku se ispiru. Gel se inkubira najprije uz potresanje na tresilici (Mini Rocker MR-

1, *Biosan*) u otopini I tijekom 20 minuta te potom u otopini II narednih 20 minuta (ili preko noći).

2. *Modifikacija makromolekula s ciljem povećanja osjetljivosti prema srebru*. Gel se inkubira s otopinom kalijevog dikromata. Kisela otopina dikromata oksidira potencijalno prisutan reducens u uzorku (redukcija srebrovih(I) iona mora se dešavati kontrolirano, tj. prilikom ekspozicije gela). Gel se potresa u otopini tijekom 3 do 5 minuta po čemu poprima izrazito žuto obojenje. Uklanjanje nespecifično vezanog dikromata obavlja se ispiranjem redestiliranom vodom do ponovnog bezbojnog izgleda gela.

3. *Impregnacija srebrom.* U ovom koraku gel se inkubira s otopinom srebrovog(I) nitrata u trajanju od 20-30 minuta. Tijekom ovog koraka dolazi do vezanja Ag^+-iona na negativno nabijene funkcionalne skupine prisutnih makromolekula.

4. *Ekspozicija.* U ovom dijelu procesa dodaje se reducens, formaldehid. Reakcija redukcije Ag^+-iona dešava se samo pri visokom pH te iz tog razloga otopine predrazvijača i razvijača sadrže natrijev karbonat (održava pH 12). Po odsisavanju otopine srebrovih iona (prethodni korak), nespecifično vezani ioni srebra mogu se ukloniti ili malom količinom redestilirane vode ili korištenjem predrazvijača (otopina niže koncentracije reducensa u odnosu na razvijač. Po dodatku predrazvijača dolazi do brzog stvaranja taloga metalnog srebra koje je potrebno trenutačno ukloniti odsisavanjem. Po dodatku otopine razvijača gel se potresa do pojavljivanja vrpci, a reakcija zaustavlja dodatkom otopine III.

5. *Zaustavljanje i pohrana.* Octena kiselina u otopini III reagira s formaldehidom te zaustavlja reakciju. Ponekad se otopini III dodaje glicerol čija je zadaća spriječiti pucanje gela prilikom dehidracije. U staklenim petrijevkama ovako bojani gelovi mogli su se (u otopini III, dakle, bez glicerola) čuvati i do nekoliko mjeseci.

Tablica 3-2. Sastav otopina korištenih u procesu bojanja poliakrilamidnih gelova srebrom.

Sastav otopina za bojanje poliakrilamidnih gelova srebrom		
korak	naziv otopine	sastav
1. fiksacija	otopina I	φ (EtOH) = 48 % c (HOAc) = 2,05 mol dm^{-3}
	otopina II	φ (EtOH) = 9,6 % c (HOAc) = 0,856 mol dm^{-3}
2. povećanje osjetljivosti	zakiseljena otopina kalijevog dikromata	c ($K_2Cr_2O_7$) = 3,4 mmol dm^{-3} c (HNO_3) = 2,8 mmol dm^{-3}
3. impregnacija srebrom	Otopina srebrovog(I) nitrata	c ($AgNO_3$) = 12 mmol dm^{-3}
4. ekspozicija	Predrazvijač	c (Na_2CO_3) = 280 mmol dm^{-3} c (HCHO) = 1,16 mol dm^{-3}
	Razvijač	c (Na_2CO_3) = 280 mol dm^{-3} c (HCHO) = 4,24 mol dm^{-3}
5. zaustavljanje redukcije i pohrana	otopina III	c (HOAc) = 170 mmol dm^{-3}

3.2.7 Metode rekombinantne DNA

3.2.7.1 Lančana reakcija polimeraze

Lančana reakcija polimeraze (PCR prema eng. *polymerase chain reaction*) korištena je za umnažanje gena prilikom kloniranja te detektiranje nukleotidnih sljedova od interesa u pojedinim koracima kloniranja. Reakcija se tipično odvijala u ukupnom volumenu od 25 μL, odn. 50 μL prema potrebi (veći volumeni za vjerno umnažanje slijeda od interesa u svrhu kloniranja, odn. manji za potvrdu prisustva slijeda od interesa u npr. transformiranim bakterijskim stanicama). Sastav smjese i reakcijski uvjeti mijenjani su ovisno o konkretnom slijedu, namjeni i upotrijebljenoj DNA-polimerazi. Reakcija je izvedena u uređaju Primus (MWGBiotech), a tipično je sadržavala 1 μmol dm^{-3} napredne i povratne početnice, 0,5 mmol dm^{-3} dNTP-ova, 2,0-2,5 mmol dm^{-3} $MgCl_2$ te 0,1 do 0,2 U μL^{-1} *Taq* ili *Pfu* DNA-polimeraze. Kao reakcijski pufer korišten je komercijalno dostupni pufer za pripadnu polimerazu. Količina kalupa varirala je s obzirom na vrstu istog pa je tako za umnažanje slijeda s plazmida upotrebljavano 100 ng, a za PCR s genomske DNA svega 1 ng DNA-kalupa.

Za postupke kloniranja korišten je tzv. *touchdown* PCR kako bi se izbjeglo/umanjilo umnažanje nespecifičnih sljedova. U toj inačici metode PCR, inicijalna temperatura prianjanja početnica na slijed prisutan na kalupu DNA nešto je viša od one koja se teorijski može predvidjeti. Točka taljenja za set početnica definira gornju granicu temperature pri kojoj se provodi prianjaje (sparivanje) sa slijedom na DNA-kalupu. Pri temperaturama malo nižim od temperature taljenja dolazi do stvaranja manjeg broja vrlo specifičnih sparivanja baza između

početnice/a i kalupa. Pri nižim pak temperaturama, početnice se mogu vezati manje specifično (dozvoljavaju se nesparene regije isl.). Nespecifično vezanje početnica (bilo s kalupom, bilo između sebe) ometa napredak reakcije PCR, jer nespecifični sljedovi na koje se početnice vežu u ranim koracima umnažanja brojčano istiskuju specifične u narednim koracima umnažanja (eksponencijalni učinak). Metoda *touchdown* PCR-a eliminira ovaj problem na način da se prvih nekoliko ciklusa lančane reakcije odvija uz relativno visoke temperature prianjanja (eng. *annealing*), tj. sa svakim idućim ciklusom ta temperatura pada (za željeni interval, ovdje 0,2 °C) do dosizanja željenog minimuma. Dakle, u prvim ciklusima početnice prianjaju vrlo specifično. Nastali fragmenti DNA dalje se amplificiraju u idućim koracima pri nižim temperaturama te kompetiraju s nespecifičnim vezanjem koje je pri nižim temperaturama moguće. Metoda povećava specifičnost reakcije pri višim i učinkovitost umnažanja pri nižim temperaturama umnažanja/polimerizacije.

Tablica 3-3. Raspored koraka te pripadne temperature i trajanja za metodu *touchdown* PCR upotrijebljenom u ovom radu.

korak	temperatura / °C	trajanje koraka / min	broj ciklusa
početna denaturacija	94	3	1
denaturacija	94	0,5	10
vezanje početnica na kalup	55/46 (-0,2)	0,67 - 0,75	10
produljenje lanaca	72	1,5	10
denaturacija	94	0,5	25
vezanje početnica na kalup	43	0,67-0,75	25
produljenje lanaca	72	1,5	25
završno produljenje	72	10	1

Za umnažanje slijeda *argS* iz arheje *M. barkeri* korištene su početnice s mjestima za restrikcijske endonukleaze *Bam*HI i *Xho*I, a za konstrukciju mutantnih varijanti MtArgRS, početnice s *Nde*I- i *Xho*I-mjestima (tablica 3.4). Restrikcijsko mjesto za endonukleazu *Nde*I, pogodno je zbog postojanja start-kodona (ATG) unutar heksamernog palindroma koji dotična endonukleaza prepoznaje (5'-ATGCAT-3'). Oblikovanje krnjih varijanti skraćivanjem enzima MtArgRS s N-kraja dolazi do uklanjanja početnog metionina. Uvođenje takvog slijeda u plazmidni vektor koji sadrži kodirajući (fuzijski) slijed na N-kraju ne predstavlja problem jer se početni ATG (prvi nakon slijeda *Shine-Dalgarno*) nalazi se u kodirajućem slijedu samog vektora. No, prilikom unosa skraćenih varijanti gena za MtArgRS u vektor pET21 (opet unutar slijeda koji prepoznaje endonukleaza *Nde*I), početni metioninski kodon mora biti onaj koji se nalazi unutar originalnog slijeda mutiranog enzima MtArgRS. Kako bi se izbjeglo

suvišno dodavanje aminokiselinskog slijeda u konstruktima MtArgRS bez privjeska, kao prvi kodon za metionin iskorišten je prvi triplet palindromskog slijeda enzima *Nde*I.

Tablica 3-4. Slijed početnica upotrijebljen za oblikovanje krnjih varijanti MtArgRS. Kao početnica suprotnog usmjerenja korištena je T7 povratna (za varijante skraćene s N-kraja), odn. T7 napredna početnica (za varijante skraćene s C-kraja). Potcrtani su sljedovi koje prepoznaje upotrijebljena restrikcijska endonukleaza.

mutant	početnica	komplementarnost
ΔN21MtArgRS	5’ GCGCCATATGGGTATAAAGGTACCCCCTG 3’	5’-kraju gena
ΔN39MtArgRS	5’ GCGCCATATGGGGGACCTTGCATCCACAG 3’	5’-kraju gena
ΔN43MtArgRS	5’ GCGCCATATGTCCACAGTATCCTTCGAAC 3’	5’-kraju gena
ΔN89MtArgRS	5’ GCGCCATATGTACGGCAGATTCTCCAGCAG 3’	5’-kraju gena
ΔN_{tot}MtArgRS	5’ GCGCCATATGGATGAGAGGGTGATCCTGCA 3’	5’-kraju gena
ΔC_{tot}MtArgRS	5’ GCGCCTCGAGCTACCGCCGCTTTTTAAC 3’	3’-kraju gena

Dodatni nukleotidi smješteni posve na 5'-, odn. 3'-kraju početnica, omogućuju pravilno prepoznavanje i cijepanje PCR-produkta od strane restrikcijskog enzima. Endonukleazama tipično treba 4-6 nukleotida s obje strane (dakle, i 5'- i 3'-) palindromskog slijeda kako bi isti mogle efektivno vezati. Adekvatnost konstruiranih početnica provjeravana je lančanom reakcijom polimeraze uz *Taq* DNA–polimerazu kojoj nedostaje 3'-5'-egzonukleazna aktivnost Odgovarajuća veličina nastalih produkata određena je pomoću elektroforeze na agaroznom gelu. Vjerno umnoženi DNA-fragmenti od interesa (proizvedeni radom *Pfu* DNA-polimeraze koja posjeduje 3'-5'-egzonukleaznu aktivnost) za potrebe kloniranja izolirani su iz gela upotrebom staničevine ili, ukoliko je prisutnost nespecifičnih vrpci bila zaista malena, pomoću *QIAquick PCR Purification Kit* (*Qiagen*).

3.2.7.2 Razgradnja DNA restrikcijskim endonukleazama

Ugradnja željenog slijeda DNA u plazmidni vektor najčešće se vrši stvaranjem tzv. ljepljivih krajeva na molekulama željenog slijeda, kao i na molekuli vektora. Ljepljivi krajevi stvaraju se radom restrikcijskih endonukleaza. U radu upotrijebljeni plazmidi pET21a, pET28b i pProExHtb najprije su umnoženi u stanicama *E. coli* DH5α te izolirani korištenjem kompleta *QIAprep Spin Miniprep Kit* (*Qiagen*) prema uputama proizvođača. Korespondirajući plazmidi i pročišćeni produkti PCR-reakcije podvrgnuti su cijepanju istovjetnim parom restrikcijskih endonukleaza. Uvjeti cijepanja prilagođeni su prema napomeni proizvođača i uz odgovarajući reakcijski (komercijalno dostupni) pufer.

3.2.7.3 Pročišćavanje DNA-fragmenata iz gela

Produkti PCR-reakcije te cijepani plazmidni vektori moraju se pročistiti od kontaminirajućih molekulskih vrsta (izrezani nukleotidni sljedovi, dimeri početnica iz reakcije PCR, sastojci upotrijebljenih reakcijskih pufera za reakciju polimerizacije etc.) prije započinjanja reakcije ligacije. U tu svrhu najčešće je rabljena izolacija fragmenata iz gela. Uzorak je najprije podvrgnut elektroforezi na agaroznom gelu. Vrpca odgovarajuće veličine vizualizirana je na transiluminatoru te izrezana iz gela. Izrezani komadić gela s DNA od interesa obavije se komadićem staničevine i smjesti u tubicu zapremnine 500 μL. Dno tubice za probuši i čitava konstrukcija montira unutar tubice veće zapremnine (1,5 ili 2 mL). Filtracija uzorka kroz pore staničevine vrši se centrifugiranjem sklopljene konstrukcije. Dobiveni filtrat sadrži DNA od interesa otopljenu u elektroforetskom puferu. Kako isti sadrži etidijev bromid (interkalacijom mijenja topološka svojstva DNA) smjesu je potrebno ekstrahirati otopinom fenol-kloroforma u volumnom omjeru 1:1. Pritom etidij bromid odlazi u donju, organsku fazu, dok se DNA raspoređuje u gornjoj, vodenoj. Za reakciju ligacije važno je postići odgovarajuću (relativno visoku) koncentraciju DNA zbog čega se ekstrahirani filtrat tipično taloži dodatkom 2,7 volumena etanola (φ = 96%) i inkubacijom uzorka na ledu tijekom 30-120 minuta. Po centrifugiranju (30 minuta pri 10 000 g), talog je najčešće resuspendiran u redestiliranoj vodi ukupnog volumena 10 μL.

3.2.7.4 Ligacija DNA pomoću T4 DNA-ligaze

Ligacija razgrađenog plazmidnog vektora i ciljanih DNA-inserata provodi se inkubacijom reakcijske smjese na 16° C tijekom dva sata u ukupnom volumenu od 10 μL. Omjer masa inkubiranih vektorskih i genskih sljedova po potrebi se podešava od 2:1 do 4:1 u korist inserta. Reakcija se odvijala u komercijalno dostupnom puferu optimalnom za rad T4 DNA-ligaze. Pufer sadrži ATP koji je kofaktor u reakciji T4 DNA[a]. Koncentracija enzima iznosila je 0,4 U μL^{-1}. Po inkubaciji, ligacijske smjese podvrgnute su temperaturi od 65°C tijekom 10 minuta kako bi se inaktivirala T4 DNA-ligaza. T4 DNA-ligaza kovalentno povezuje komplementarne ljepljive krajeve genskih odsječaka DNA i plazmidne DNA nastalih djelovanjem restrikcijskih endonukleaza. T4 DNA- ligaza najmanja je poznata DNA-ligaza (41 kDa) i porijeklom je iz istoimenog bakteriofaga.

[a] Zanimljivo je da ova ligaza porijeklom iz bakteriofaga rabi ATP slično kao one eukariotih izvora. Za razliku, prokariotske (bakterijske i arhejske) DNA-ligaze kao kofaktor rabe NAD^+.

3.2.7.5 Priprema kemijski kompetentnih stanica *E. coli*

Ova vrsta stanica koristi se za umnažanje rekombinantnih plazmida te se, iako su komercijalno dostupne, mogu pripremiti i vlastoručno. Kompetentne stanice pripremljene su na sljedeći način. Iz prekonoćne kulture, volumena 10 mL, izdvojeno je 5 mL i inokulirano u 500 mL LB medija. Stanice su uzgajane na 37 °C, uz aeraciju potresanjem pri 200 rpm, dovoljno dugo da vrijednost OD_{600} dosegne vrijednost 0,300 - 0,500. Optička gustoća u tom intervalu vrijednosti odgovara veličini bakterijske populacije u ranoj eksponencijalnoj fazi rasta. Nakon što je ta vrijednost dosegnuta, stanice su stavljene na led 15 do 20 minuta. Ohlađene stanice potom su istaložene centrifugiranjem stanica pri 4 000 g, na 4 °C i u trajanju od 15 minuta. Stanični talozi su potom resuspendirani u 20 mL otopine za resuspendiranje (φ (PEG4000) = 1%, φ (DMSO) = 5 %, c ($MgCl_2$) = 10 mmol dm^{-3}, c ($MgSO_4$) = 10 mmol dm^{-3}, otopljeno u LB-mediju) i razdijeljeni u alikvote od 0,5 mL. Valjanost ovako proizvedenih stanica DH5α i BL21 provjerena je nasađivanjem 40 µL suspenzije na ploče s LBAmp medijem kako bi se eliminirala mogućnost da su neke od proizvedenih stanica otporne na antibiotik. Ovako pripremljene stanice zadržavaju željena svojstva najviše 6 mjeseci, a čuvaju se na - 80 °C.

3.2.7.6 Transformacija kompetentnih stanica

Transformacija je postupak unošenja strane plazmidne DNA u bakterijsku stanicu. Unos DNA u stanicu provođen je na dva načina: metodom temperaturnog šoka ili elektrotransformacijom. Umnažanje rekombinantnih pET-28b plazmida izvršeno je u stanicama *E. coli* BL21(DE3). U tu su svrhu stanice *E. coli* BL21(DE3) transformirane elektroporacijom. Ohlađenim kompetentnim stanicama (volumena 40 µL) dodano je 1 µL rekombinantnog plazmida (γ = 0,05-0,25 µg μL^{-1}) ili 2 µL ligacijske smjese te su potom bile ostavljene na ledu tijekom jedne minute. Zatim su prebačene u ohlađenu kivetu za elektroporaciju. Elektroporacija je potom bila izvedena na uređaju MicroPulser (*Biorad*) izlaganjem suspenzije električnom pulsu od 12,5 kV cm^{-1}. Elektroporiranim stranicama je zatim bio dodan 1 mL LB-medija, te su inkubirane na 37 °C u trajanju od jednog sata. Sto mikrolitara transformiranih stanica nasađeno je na LB-ploče s odgovarajućim antibiotikom kada se radilo o čistom plazmidu; takve stanice ostavljene su rasti preko noći na temperaturi od 37 °C. U slučaju transformacije stanica ligacijskom smjesom, stanice su najprije istaložene centrifugiranjem, resuspendirane u LB-mediju te potom nasađene na ploče s antibiotikom. Alikvotu od 100 µL odmrznute suspenzije prethodno priređenih kemijski kompetentnih stanica *E. coli*, soj DH5α ili BL21

Rosetta (DE3) dodavano je 2 μL čiste plazmidne DNA ili 10 μL ligacijske smjese te 98, odnosno, 90 μL otopine za kemijsku transformaciju (*c* (KCl) = 0,1 mol dm^{-3}, *c* ($CaCl_2$) = 0,03 mol dm^{-3}, *c* ($MgCl_2$) = 0,05 mol dm^{-3}). Nakon kratkog resuspendiranja stanica i navedene otopine, smjesa je inkubirana 5 minuta na ledu. Nakon inkubacije, bakterijske stanice podvrgnute su temperaturnom šoku na 42 °C u trajanju od jedne minute te je neposredno nakon toga dodano 700 μL tekuće podloge LB. Transformirana bakterijska kultura inkubirana je jedan sat na 37 °C uz miješanje, nakon čega je poželjni volumen bakterijske kulture (v. ranije) nasađen na odgovarajuću krutu hranjivu podlogu. Podloge na koje su nasađene stanice *E. coli* Rosetta (DE3) suplementirane su, pored odgovarajućeg antibiotika i kloramfenikolom, budući da te stanice nose dodatni plazmid (v. ranije).

3.2.7.7 Određivanje nukleotidnog slijeda DNA – sekvenciranje

Kako bi se potvrdilo da je DNA ugrađena u plazmidni vektor u ispravnom okviru čitanja, proveden je postupak sekvenciranja. U 13 μL otopine koja je sadržavala 500 ng plazmida u redestiliranoj vodi ili puferu niske ionske jakosti, dodan je 1 μL početnice (3,2 μmol dm^{-3}) za sekvenciranje. Sekvenciranje je provedeno na sekvenatoru ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*) u DNA-servisu Instituta Ruđer Bošković pod vodstvom dr. sc. Helene Četković.

3.2.7.8 Određivanje koncentracija DNA i RNA

Koncentracije obje molekule određene su spektrofotometrijski, mjerenjem apsorbancije pri 260 nm, uz korištenje odnosa da 1 mL otopine koja sadrži 50 μg DNA, odnosno, 40 μg RNA, ima vrijednost apsorbancije A_{260} = 1.

3.2.8 Metode rada s proteinima

3.2.8.1 Prekomjerna ekspresija rekombinantnih proteina

S krute hranjive podloge obogaćene odgovarajućim antibiotikom tipično je odabirana jedna jasno definirana bakterijska kolonija. Ista je inokulirana u 5 mL LB-medija uz odgovarajući antibiotik i ostavljena rasti na 37 °C preko noći, uz potresanje pri 200 rpm. Takva prekonoćna pretkultura idući je dan inokulirana u 500 mL LBAmp medija. Tijekom rasta bakterijske kulture praćena je optička gustoća suspenzije, OD_{600}, s ciljem određenja faze rasta bakterijske populacije. Kod vrijednosti OD_{600} 0,400-0,450 kulturi stanica BL21 s pET28-MtSerRS-vektorom dodan je $ZnCl_2$ do konačne koncentracije od 1 mmol dm^{-3}. Metanogeni tip SerRS

sadrži cink u aktivnom mjestu te je prilikom indukcije stanica BL21 potrebno obogatiti hranjivi medij cinkovim ionima kako bi sve molekule nastalog MtSerRS sadržavale funkcionalni ion cinka. Kod vrijednosti OD_{600} 0,600-0,650, kulturi stanica bio je dodan izopropil-β-D- tiogalaktopiranozid (*c* (IPTG) = 0,3 mmol dm^{-3}). Ekspresijski sojevi *E. coli* BL21(DE3) i Rosetta (DE3), lizogenizirani su bakteriofagom DE3 koji nosi fragment DNA s genom za T7 RNA-polimerazu. Isti fragment uključuje i gen *lacI* te promotor *lacUV5*. Ovaj fragment je umetnut u gen *int* čime se onemogućuje ugradnja faga DE3 u ili izrezivanje istog iz kromosoma domaćina u odsustvu faga pomoćnika. Jednom kada je DE3-lizogen formiran, jedini promotor koji usmjerava transkripciju T7 RNA-polimeraze jest pomotor *lacUV5* koji se može inducirati (alo)laktozom ili njenim analogom (poput IPTG). Dodatak IPTG-a rastućoj kulturi lizogeniziranih stanica inducira T7 RNA-polimerazu koja zauzvrat prepisuje ciljnu DNA u plazmidu. Stoga se dodatkom IPTG-a kulturi *E. coli* BL21(DE3) (i derivata BL21 kao što je soj Rosetta) stanice potiču na proizvodnju rekombinantnog proteina. Po dodatku IPTG-a, kultura je tipično puštena rasti tijekom 2,5-3,5 sati na 37 °C, uz potresanje pri 200 rpm. U tom vremenskom periodu stanice usporavaju s rastom, a gomila se produkt gena potaknutog na ekspresiju (ovdje MtSerRS te divljeg tipa ili mutantnih oblika MtArgRS). Taloženje stanica, po završetku indukcije IPTG-om, izvođeno je centrifugiranjem u trajanju od 10 minuta na 5 000 g, u kivetama kapaciteta 400 mL i kod 4 °C; nakon centrifugiranja supernatant je uklanjanjn, a talog čuvan na -20 °C (ukoliko procedura pročišćavanja nije odmah nastavljena).

3.2.8.2 Otvaranje stanica soniciranjem

Izdvajanjem iz stanice protein može biti izdvojen i od bioloških molekula koje pomažu u stabilizaciji njegove nativne strukture zbog čega se može povećati sklonost proteina denaturaciji. Iz tog su razloga izolacija i pročišćavanje proteina provedeni pri sniženoj temperaturi unatoč tome što je protein porijeklom iz termofilnog organizma. Stanice u kojima je potaknuta nadekspresija (Rosetta (DE3) transformirane odgovarajućim rekombinantnim vektorima) resuspendirane su u minimalnom volumenu pufera A (pufer za afinitetnu kromatografiju, v. 3.1.9), pri čemu je suspenzija hlađena na ledu. Bez uklanjanja s leda, suspenzija stanica sonicirana je pomoću sonde Vibra Cell 72446 (*Bioblock Scientific*) u intervalima od po jedne minute s jednom minutom prekida između dva kontinuirana pulsa radi sprječavanja pretjeranog zagrijavanja uzorka. Nakon centrifugiranja pri 4 ºC na 10 000 g tijekom 1 h (Centrifuge 5430 R, *Eppendorf*), supernatant (sadrži stanične proteine uključujući

i rekombinantni protein od interesa) je prenesen u čistu tubicu (*Falcon*) i pohranjen na ledu do početka idućeg koraka pročišćavanja.

3.2.8.3 Afinitetna kromatografija

U cilju postizanja specifičnog vezanja željenog proteina na stacionarnu fazu s imobiliziranim niklovim(II) ionima (Ni-NTA-agaroza), na N-terminalni kraj proteina dodan je heksahistidinski privjesak prilikom manipulacije genom za MtArgRS u vektoru pET28b, tj. na razini DNA. Za razliku od kromatografskih tehnika navedenih u daljnjem tekstu, ova je kromatografija provođena pri atmosferskom tlaku.

Prije provođenja same metode, iz kolone je ispuštena vodena otopina etanola (φ = 20 %) uobičajeno korištena za čuvanje Ni-NTA-agaroze (*Qiagen*), te je dotični volumen stacionarne faze ispran s 10 puta većim volumenom redestilirane vode. Ni-NTA-smola potom je uravnotežena u puferu A, nakon čega je kroz kolonu postepeno propušten sav supernatant dobiven centrifugiranjem sonicirane suspenzija stanica (v. 3.2.8.2). Stacionarna faza potom je isprana s prosječno 25 mL pufera A. Nadalje je kolona isprana s 10 mL pufera B. Elucija proteina izvršena je s 10 mL pufera C (pufer s 10 puta većom koncentracijom imidazola u odnosu na pufer A, v. 3.1.9). Sakupljene su frakcije dobivene ispiranjem stacionarne faze puferom A, B te frakcije dobivene samim propuštanjem uzorka kroz kolonu s ciljem analize sastava istih metodom SDS-PAGE. Tijekom ispiranja puferom C eluat je frakcioniran, odnosno sakupljane su frakcije od po 2 mL. Kromatografija je provedena pri temperaturi od 4 °C zbog smanjenja mogućnosti denaturacije proteina tijekom postupka, a analiza frakcija napravljena je naknadno metodom SDS-PAGE (v. 3.2.4.1). Frakcijama pročišćenih proteina koncentracija je povećana ultrafiltracijom pomoću membrana (*Milipore*) dvostruko niže vrijednosti MWCO (engl. *molecular weight cut off)* od relativne molekulske mase proteina. U toku ultrafiltracije pufer u kojemu su proteini pročišćeni (pufer C) izmijenjen je puferom za pohranu (v. 3.1.6) te je čitava preparacija izoliranog proteina pohranjena na – 80 ºC.

3.2.8.4 Pročišćavanje rekombinantnih proteina u nativnom obliku

Za razliku od pET28b, vektor pET21a omogućava dobivanje proteina bez ikakvih dodatnih elemenata. Kao što je ranije spomenuto, jedini vektorom kodirani element je početni metionin koji vuče porijeklo iz dijela slijeda koji prepoznaje restrikcijska endonukleaza *Nde*I. U ovom radu postupcima rekombinantne DNA proizvedeni krnji derivati divljeg tipa MtArgRS klonirani i u vektor pET21a. Ekspresijom s ovog vektora nastaju produkti bez fuzijskog privjeska. Pročišćavanje takvih proteina izvedeno je tekućinskom kromatografijom na

anionskim izmjenjivačima te gel-filtracijom. Proteinski ekstrakt priređen je razaranjem stanica bakterija (vidi poglavlje 3.2.6.2) u puferu za lizu (c (Tris) = 25 mmol dm^{-3}, c (NaCl) = 50 mmol dm^{-3}, φ (glicerol) = 10%, titrirano HCl-om do pH 8,0). Ekstrakt je zatim centrifugiran pri 10 000 g pri 4 °C u trajanju od jednog sata. Supernatant je potom nanesen na slabi anionski izmjenjivač HiPrep DEAE FF 16/10 (*GE Healthcare*), a koji je prethodno uravnotežen u puferu START (tablica 3.5). U ovom koraku se ne postiže dostatna rezolucija na razini proteinskih komponenata, ali dolazi do izdvajanje nukleinskih kiselina i komponenti koje se vrlo čvrsto vežu na anionske izmjenjivače. Većina bakterijskih staničnih proteina (zajedno s heterolognim, rekombinantnim proteinima) veže se na kromatografski matriks. Dio bakterijskih proteina uklanja se ispiranjem kolone uz 10, odn. 20% pufera FIN te razlučivanjem heterolognih proteina u gradijentu 20-100% pufera FIN.

Tablica 3-5. Kromatografski puferi upotrijebljeni pri radu na kolonama HiPrep DEAE FF 16/10 (*GE Healthcare*) i MonoQ HR 10/10 (*Pharmacia*).

Kromatografski puferi za pročišćavanje na slabom i jakom anionskom izmjenjivaču; za pročišćavanje proteina	
pufer START	pufer FIN
Tris-HCl (c = 25 mmol dm^{-3}, pH 8)	Tris-HCl (c = 25 mmol dm^{-3}, pH 8)
NaCl (c = 50 mmol dm^{-3})	NaCl (c = 700 mmol dm^{-3})
β-merkaptoetanol (c = 5 mmol dm^{-3})	β-merkaptoetanol (c = 5 mmol dm^{-3})

Pročišćavananje proteina na anionskom izmjenjivaču MonoQ također je provedeno tekućinskom kromatografijom pod visokim tlakom, na automatiziranom sustavu pri 4°C. Kolona anionskog izmjenjivača Mono Q HR 5/5 uravnotežena je puferom za kromatografiju ionskom izmjenom (pufer START, tablica 3.5). Prije nanošenja na kolonu MonoQ potrebno je uzorak (sakupljen pri visokim koncentracijama soli u prethodnom kromatografskom koraku) odsoliti i prevesti ga u pufer za ekvilibraciju (pufer START). To je učinjeno razrjeđivanjem uzorka puferom sastava c (Tris-HCl) = 25 mmol dm^{-3}, φ (glicerol) = 10%, pH 8,0. Zavisno od volumena sakupljenog uzorka razrjeđivanje se izvodi do dostizanja koncentracije soli manje od 100 mmol dm^{-3}. Povećanje volumena uzorka ne utječe na učinkovitost razdjeljivanja proteina na ionskim izmjenjivačima. Nanašanje (injektiranje) volumena većih od 1 mL izvodi se upotrebom tzv. super-omče (eng. superloop, *GE* Healthcare). Vezani proteini eluiraju se linearnim gradijentom NaCl. U ovom koraku eluirani proteini sakupljani su u frakcije malog volumena (0,5 mL) kako bi se postigla čim veća čistoća finalnog uzorka. Tijekom cijelog postupka protok pufera iznosio je 2,5 – 3,5 $mLmin^{-1}$. Za pročišćavanje nativnog oblika proteina MtSerRS nakon kromatografije na slabom anionskom izmjenjivaču HiPrep DEAE FF upotrebljavan je jaki kationski izmjenjivač MonoS

HR 5/5 (*Pharmacia*, tablica 3.6). Proces pročišćavanja izveden je na isti način kao što je to opisano u prethodnom pasusu.

Tablica 3-6. Kromatografski puferi upotrijebljeni pri radu na MonoS HR 10/10 (*Pharmacia*).

Kromatografski puferi za pročišćavanje proteina na jakom kationskom izmjenjivaču	
pufer START	pufer FIN
Mes-NaOH (c = 25 mmol dm^{-3}, pH 6,2)	Mes-NaOH (c = 25 mmol dm^{-3}, pH 8)
NaCl (c = 50 mmol dm^{-3})	NaCl (c = 700 mmol dm^{-3})
β-merkaptoetanol (c = 5 mmol dm^{-3})	β-merkaptoetanol (c = 5 mmol dm^{-3})

3.2.8.5 Gel-filtracija

Gel-filtracija je provedena pomoću kolona Superdex 200 HR 10/300 i Superdex 75 HR 10/300 (obje *GE Healthcare*). Prva gel-filtracijska kolona pogodna je za razdvajanje makromolekula relativne molekulske mase 10^4 - $6 \cdot 10^5$, a druga $3 \cdot 10^3$ - $7 \cdot 10^4$. Gel-filtracija korištena je za dodatno pročišćavanje proteina, tRNA, supročišćavanje kompleksa, prevođenje makromolekula u željeni pufer i potvrdu oligomerizacijskih stanja izoliranih molekula.

Prilikom dodatnog pročišćavanja, otopine proteina (čuvane pri temperaturi od – 80 ºC) postepeno su otapane na ledu, a gel-filtracijska kolona je uravnotežena u pogodnom puferu (v. 3.1.6, pufer za dodatno pročišćavanje proteina gel-filtracijom). Uzorak pojedine otopine proteina centrifugiran je tijekom 10 minuta pri 4 ºC i 12 000 g u cilju uklanjanja precipitata, a 200 μL supernatanta je naneseno na kromatografsku kolonu. Tijekom gel-filtracije praćene su apsorbancije pri valnim duljinama od 260 nm i 280 nm. Frakcije koje sadrže protein su potom ukoncentrirane pomoću membrana pogodne (minimalno dvostruko niže) vrijednosti MWCO i čuvane su na – 20 ºC. Koncentracije proteina određene su spektrofotometrom ND–1000 (*NanoDrop*) na temelju poznavanja dekadskih molarnih apsorpcijskih koeficijenata pojedinih proteina (tablica 3.1).

3.2.9 Metode rada s tRNA

3.2.9.1 Izolacija RNA iz stanica domaćina

Stanice BL21(DE3) s prikladnim vektorom (pETΔ3a-MttRNA$^{Arg}_{CCU}$ i pETΔ3a-MttRNA$^{Ser}_{GGA}$) resuspendirane su u minimalnom volumenu acetatnog pufera (c (NaOAc) = 0,3 mol dm^{-3}, titrirano octenom kiselinom do pH 5,2) te je dodan jednak volumen zasićene vodene otopine fenola. Nakon žustrog miješanja tijekom 5 minuta i centrifugiranja na 4 000 g pri 10 ºC tijekom približno 5 minuta dolazi do razdvajanja faza: gornja (vodena) faza sadrži nukleinske kiseline i ugljikohidrate, a donja faza (fenolna) denaturirane proteine. Također se

javlja međusloj koji čine denaturirani proteini te kompleksi proteina i nukleinskih kiselina. Vodena faza je izdvojena i izmućkivana tijekom daljnjih 5 minuta s jednakim volumenom smjese fenola i kloroforma. Faze su ponovno razdvojene centrifugiranjem, te je fenol zaostao iz prethodnog koraka u vodenoj fazi dodatno ekstrahiran kloroformom. Nakon centrifugiranja i odvajanja faza, vodena je faza prebačena u čistu tubicu te joj je dodan trostruko veći volumen hladnog etanola (φ = 96 %). Takva smjesa je ostavljena na – 20 ºC tijekom 1 sat ili preko noći. Tijekom taloženja etanolom dolazi do taloženja nukleinskih kiselina i staničnih ugljikohidrata.

3.2.9.2 Odvajanje tRNA od nukleinskih kiselina većih molekulskih masa

Talog stvoren u prethodnom koraku (poglavlje 3.2.7.1) oboren centrifugiranjem (4 000 g pri 4 ºC tijekom 1 h), nakon čega je ispran etanolom (φ = 80 %) i ponovo centrifugiran daljnjih 1 h. Etanol je potom odliven, a otvor tubice prekriven je parafilmom (*Pechiney Plastic Packaging*) na kojem su izbušene rupice. Etanol je uparen iz taloga u DNA120 Speedvacu (*Thermo Savant*). Posušenom talogu je dodana minimalna količina redestilirane vode potrebna za njegovo potpuno otapanje. Tako dobivenoj otopini dodane su otopine Tris-a i NaCl-a (do konačnih koncentracija c (Tris) = 0,25 mol dm^{-3} i c (NaCl) = 1 mol dm^{-3}, pH 8,4). Dobivena je otopina inkubirana 1 h pri 37 ºC u termobloku (*Grant Bio*). Ovi blago bazični uvjeti omogućuju hidrolizu esterskih veza uzrokujući deacilaciju aminoaciliranih molekula tRNA. Deaciliranim uzorcima dodane su otopine PEG 6000 i $MgCl_2$ (do konačnog masenog udjela w(PEG) = 8 %, odnosno koncentracije c ($MgCl_2$) = 10 mmol dm^{-3}) radi taloženja nukleinskih kiselina većih molekulskih masa. Smjesa je centrifugirana 20 minuta na 12 000 g, nakon čega je supernatant odvojen te mu je dodan jednak volumen otopine natrijevog acetata (c = 2,68 mol dm^{-3}) i trostruko veći volumen hladnog etanola (φ = 96%). Taloženje je izvršeno kao ranije (– 20 ºC tijekom 1-24 h). Talog je potom oboren centrifugiranjem (1 h pri 4 ºC i 4 000 g), osušen u Speedvacu te otopljen u redestiliranoj vodi.

3.2.9.3 Kromatografija ionske izmjene

Kolona slabog anionskog izmjenjivača (HiPrep DEAE FF 16/10) korištena je za dodatno pročišćavanje molekula tRNA od kontaminirajućih vrsta korištenjem automatiziranog sustava Äkta Purifier 10. Kod ove se metode vezanje molekula na stacionarnu fazu temelji na elektrostatskim interakcijama. Kroz kolonu je propušten pufer FIN (tablica 3.7) radi vezanja kloridnih iona na dietilaminoetilne ostatke. Kolona je potom postupnim povećanjem volumnog udjela pufera START prevedena u potpunosti u pufer START. Na kolonu je

nanesen 1 mL sirovog uzorka koji sadrži tRNA od interesa (ali i ugljikohidrate, ostatake PEG-a i neistaloženih nukleinskih kiselina većih molekulskih masa). Elucija je izvršena postupnim povećanjem volumenog udjela pufera FIN, tj. gradijentom soli. Prilikom kromatografije praćena je apsorbancija pri λ = 260 nm. Frakcije sakupljene prilikom provođenja ove metode analizirane su elektroforezom na poliakrilamidnom gelu u prisustvu ureje.

Tablica 3-7. Sastav kromatografskih pufera za razdvajanje nukleinskih kiselina na ionskom izmjenjivaču.

Kromatografski puferi za pročišćavanje na slabom i jakom anionskom izmjenjivaču; za pročišćavanje heterologne tRNA iz smjese	
pufer START	pufer FIN
natrijev acetat (c = 50 mmol dm^{-3} pH 4,5)	natrijev acetat (c = 50 mmol dm^{-3} pH 4,5)
NaCl (c = 100 mmol dm^{-3})	NaCl (c = 1 mol dm^{-3})

3.2.9.4 Kromatografija obrnutih faza

Metoda RPC temeljena je na hidrofobnim efektima između molekula i nepolarne stacionarne faze te je korištena za razdvajanje različitih vrsta tRNA iz smjese. Za kromatografiju obrnutih faza ukupne tRNA *E. coli* obogaćene heterologni MttRNA^{Arg} i MttRNA^{Ser} transkriptima korištena je kolona Jupiter C4 (*Phenomenex*).

Kromatografska kolona uravnotežena je u puferom START (tablica 3.8). Analizirani uzorak tRNA (injektirani volumen iznosio je maksimalno 100 µL) prethodno je pročišćen kromatografijom anionske izmjene (v. ranije). U svrhu elucije postepeno je povećavan volumni udio etanola (prisutan u puferu FIN, tablica 3.8), a tijekom kromatografije je praćena apsorbancija pri λ = 260 nm. Eluirane frakcije ukoncentrirane su uparavanjem pomoću Speedvaca te potom precipitirane dodatkom etanola (do finalnog udjela 70 %). Prisutnost i udio MttRNA^{Arg}, odn. MttRNA^{Ser} dokazivana je reakcijom aminoaciliranja, tj. određivanjem akceptorske aktivnosti tRNA. Frakcije su također analizirane na poliakrilamidnom gelu u prisustvu ureje. Izdvajanje pojedinih varijanti MttRNA^{Arg} do homogenosti detaljnije je opisano u poglavlju Rezultati.

Tablica 3-8 Kromatografski puferi za pročišćavanje heterologne tRNA kromatografijom obrnutih faza.

Kromatografski puferi za pročišćavanje heterologne tRNA kromatografijom obrnutih faza	
pufer START	pufer FIN
amonijev acetat (c = 40 mmol dm^{-3}, pH 5,1) magnezijev acetat (c = 20 mmol dm^{-3}) NaCl (c = 400 mmol dm^{-3})	amonijev acetat (c = 40 mmol dm^{-3}, pH 5,1) magnezijev acetat (c = 20 mmol dm^{-3}) NaCl (c = 400 mol dm^{-3}) φ (EtOH) = 30 %.

3.3 Detekcija nekovalentnih kompleksa aaRS:tRNA

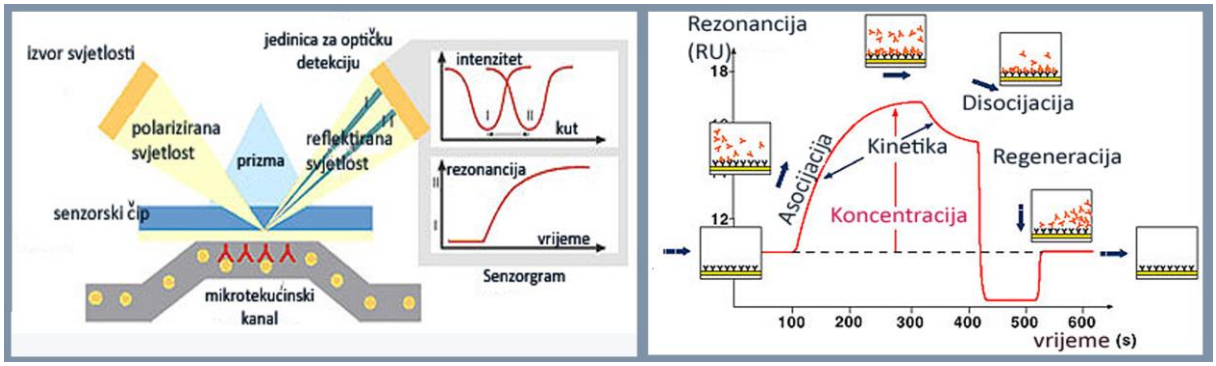
3.3.1 Nativna elektroforeza na poliakrilamidnom gelu

Ova je elektroforetska metoda korištena za ispitivanje stabilnosti nekovalentnih kompleksa MttRNA^{Arg} s divljim tipom MtArgRS te istraživanim krnjim inačicama istog te analizu izoliranih kompleksa MtArgRS:MttRNA^{Arg} nakon supročišćavanja gel-filtracijom.

Kompleksi sintetaze i pripadne tRNA pripravljeni su inkubacijom proteina i prethodno renaturirane tRNA u odgovarajućem puferu pri 41 ºC tijekom 10 minuta (pufer za divlji tip enzima: c (Hepes) = 25 mmol dm^{-3}, c (NaCl) = 100 mmol dm^{-3}, c ($MgCl_2$) = 10 mmol dm^{-3}, c (DTT) = 1 mmol dm^{-3} (pH 7,0); pufer za detekciju nekovalentnih kompleksa krnjih varijanti s pripadnom tRNA: c (Hepes) = 25 mmol dm^{-3}, c ($MgCl_2$) = 10 mmol dm^{-3}, c (DTT) = 1 mmol dm^{-3} (pH 7,0)). Renaturacija tRNA provođena je zagrijavanjem otopine tRNA tijekom 3 minute na 83 ºC, što uzrokuje narušavanje strukture dvolančanih dijelova molekule. Po vađenju uzoraka iz termobloka dodana je otopina $MgCl_2$ do konačne koncentracije 10 mmol dm^{-3}. Ovako pripravljen uzorak ostavljen je na sobnoj temperaturi kako bi se postepenim hlađenjem potakla renaturacija prisutnih molekula tRNA. U uređaju za vertikalnu elektroforezu Mini Protean II (*Bio-Rad*) kroz poliakrilamidni gel (w(akrilamid-biskarilamid u masenom omjeru 29:1) = 9 %, TA pufer, katalizator APS (γ (APS) = 0,7 μg cm^{-3}) i inicijator polimerizacije TEMED (w (TEMED) = 0,05 %)) je propuštena struja stalnog napona (U = 120 V) tijekom 30 minuta radi uspostavljanja podnaponske ravnoteže iona u gelu prije samog nanošenja uzoraka. Kao elektroforetski pufer korišten je pufer TA. Uzorcima je nakon inkubacije dodana boja za nanošenje uzoraka (φ (glicerol) = 4,7 %, γ (BPB) = 3 g dm^{-3}) u volumnom omjeru 1:12. Uzorci su naneseni na gel te je provođena elektroforeza pri naponu U = 120 V tijekom približno 1 h, tj. do istjecanja uzorcima dodane boje iz gela.

3.3.2 Detekcija metodom rezonancije površinskih plazmona

Metoda rezonancije površinskih plazmona moćna je analitička metoda za praćenje makromolekulskih interakcija u otopini bez potrebe za obilježivačem. Tipično se koristi za ispitivanje kinetike interakcija i određivanja ravnotežnih konstanti. Ekscitacija površinskih plazmona (dakle kolektivnih oscilacija elektrona do kojih dolazi na granici površine između metala i dielektrika) bazirana je na totalnoj unutrašnjoj refleksiji kada ulazna zraka *p*-polarizirane svjetlosti udari u električki vodljivu zlatnu površinu (točnije sloj) na sučelju staklenog senzora s visokim refraktivnim indeksom i vanjskog medija (tekućine) s niskim refraktivnim indeksom. Pri određenom kutu, dolazi do ekscitacije plazmona što rezultira smanjenim intenzitetom reflektirane svjetlosti. Vrlo mala promjena na sučelju (npr. promjena uslijed nastanka sloja nanometarskih dimenzija) dovodi do promjene u SPR-signalu, čime se omogućuje praćenje nastanka molekulska interakcija u realnom vremenu.



Slika 3-3. Shema rada instrumenta (lijevo; objašnjenje u tekstu). Shematski prikaz generirane krivulje s ilustracijom pojedinih mjerenih koraka tijekom oblikovanja kompleksa (makro)molekula.

Ispitivanje vezanja divljeg tipa MtArgRS i skraćenih varijanti izvršeno je pri 25°C korištenjem SPR-instrumenta BIACORE T100 (*Biacore Inc.*). Korišteni proteini posjedovali su N-terminalno smješteni heksahistidinski privjesak te su pomoću istog nekovalentno vezane na površinu Ni-NTA-čipa (Sensor Chip NTA, *Biacore Inc.*). Pufer za analizu sadržavao je *c* (Hepes) = 20 mmol dm^{-3}, *c* (NaCl) = 0,12 mmol dm^{-3}, *c* ($MgCl_2$) = 6 mmol dm^{-3} te φ (surfaktant P20) = 0.005%. Protok je ugođen na 10 µl min^{-1}. Neposredno pred mjerenje, renaturacija molekula $MttRNA^{Arg}$ provedena je kako je opisano ranije za istraživanje nekovalentnih kompleksa metodom retardacijske gel-elektroforeze. Po disocijaciji, preostali analit uklanjan je dodatkom otopine EDTA (0,1 mol dm^{-3}).

Zabilježeni odzivi predstavljaju razlike u SPR-signalu između ćelija s imobiliziranim proteinom od interesa i referentne ćelije bez istog. Podaci su analizirani pomoću programa *Biacore T100 evaluation software*.

3.4 Detekcija nekovalentnih kompleksa MtSerRS:MtArgRS

3.4.1 Metoda afinitetnog supročišćavanja

Afinitetno supročišćavanje korišteno je za procjenu stabilnosti kompleksa krnjih varijanti MtArgRS s proteinskim partnerom MtSerRS te za detekciju kompleksa višeg reda (kompleksi s pripadnim reakcijskim prekursorima). U svim slučajevima izvršeno je na sljedeći način. U tubicama za PCR 30 μL Ni-NTA-smole (*Qiagen*) uravnoteženo je u puferu AP (*c* (Tris) = 25 mmoldm^{-3} (pH 7,6), *c* (NaCl) = 150 mmoldm^{-3}, *φ* (glicerol) = 5%, *c* (imidazol) = 10 mmol dm^{-3} (pH 7,6), *c* (β-merkaptoetanol) = 5 mmoldm^{-3}). Enzim s histidinskim privjeskom (250 μg) inkubiran je s uravnoteženom smolom i potom ispran istim puferom. Proteinski partner bez privjeska (ili s GST-fuzijom) je potom dodan i inkubiran pri sobnoj temperaturi uz povremeno potresanje. Inkubacija je trajala 15-20 minuta. Po centrifugiranju (2 minuta na 500 g), nevezani proteini su sakupljeni i sačuvani za kasniju analizu na gelu. Dalja ispiranja napravljena su u puferu BP (sastava identičnog puferu AP, ali uz imidazol koncentracije 40 mmoldm^{-3} (pH 7,6). Ispiranje u obrocima od 100 μL vršeno je do dosizanja apsorbancije A_{280} ≈ 0. Elucija je izvršena uz pufer CP (*c* (imidazol) = 150 mmol dm^{-3} (pH 7,6), *c* (NaCl) = 150 mmoldm^{-3}, *φ* (glicerol) = 5%, *c* (β-merkaptoetanol) = 5 mmoldm^{-3}).

Za identifikaciju ternarnih kompleksa proces je bio identičan opisanomu. Mali ligandi su dodani u koncentracijama koje simuliraju visokoenergetske uvjete u stanici (100 – 150 μmol dm^{-3} aminokiseline te 9 mmoldm^{-3} ATP), a molekule tRNA tako da stehiometrijski odgovaraju količini analiziranog proteina.

3.4.1.1 Određivanje ravnotežne konstante za interakciju [SerRS:tRNA^{Ser}] s proteinskim partnerom ArgRS korištenjem afinitetnog supročišćavanja

Za određivanje afiniteta binarnog kompleksa SerRS:tRNA^{Ser} prema enzimu ArgRS kompleks sintetaze i pripadne tRNA izoliran je najprije gel-filtracijom. Arginil-tRNA-sintetaza eksprimirana kao fuzija glutation-S-transferaze imobilizirana je na odgovarajućoj smoli (GST-sefaroza, *GE Healthcare*). Po imobilizaciji, smola s proteinom inkubirana je sa serijskim razrjeđenjima izoliranog kompleksa SerRS:tRNA^{Ser} u puferu sastava *c* (Tris-HCl) = 50 mmol dm^{-3} (pH 7,4), *c* (NaCl) = 75 mmol dm^{-3}, *φ* (glicerol) = 5%, *c* (DTT) = 0,5 mmol dm^{-3}. Kompleksi su inkubirani kako je opisano za supročišćavanje binarnih i ternarnih kompleksa na stacionarnoj fazi Ni-NTA. Ispiranje je izvršeno uz isti pufer kao za uravnoteženje i inkubaciju. Po eluciji (pufer sastava (*c* (Tris-HCl) = 100 mmol dm^{-3} (pH 8,0), *c* (NaCl) = 75 mmol dm^{-3}, *c* (DTT) = 0,5 mmol dm^{-3}, *c* (reducirani glutation, GSH) = 10

mmol dm^{-3}), sakupljene frakcije nanesene su na gel za SDS-PAGE. Nakon elektroforeze uzorci su preneseni na membranu te je napravljena *Western*-analiza. U paraleli, isti eksperiment je izvršen za interakciju slobodnih proteina MtArgRS i MtSerRS.

Količina detektiranog kompleksa u pojedinoj točki titracije kvantificirana je uz pomoć programa ImageJ 1.47[138]. Svaki signal koji pripada eluiranom kompleksu SerRS:$tRNA^{Ser}$ korigiran je za pozadinski signal (oduzet je odziv u prvoj, praznoj jažici). Izmjereni signali upareni su s vrijednostima inicijalnih koncentracija kompleksa SerRS:$tRNA^{Ser}$ (kao i slobodne SerRS) inkubiranih s imobiliziranim proteinom. Za dobivanje vrijednosti disocijacijskih konstanti nelinearna regresija dobivenih podataka provedena je programom GraphPad Prism 6.

3.4.2 Metoda rezonancije površinskih plazmona

Za ispitivanje afiniteta mutiranih varijanti MtArgRS prema proteinskom partneru MtSerRS potonji je kovalentno imobiliziran na površini CM5-senzor čipa (*Biacore Inc.*). Čip (povrh zlatnog sloja) posjeduje sloj karboksimetiliranog dekstrana. Ovaj organski sloj ima dvostruku ulogu: nabijene skupine služe ukoncentriravanju proteina od interesa na njegovoj površini, a aktivacijom karboksimetilnih skupina pomoću 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimida (EDC) i N-hidroksisukcinimida moguće je kovalentno vezati isti protein. Reagens EDC reagira s karboksilnim skupinama formirajući intermedijer *O*-acilizoureu koji može regirati s prisutnim amino-skupinama proteina i formirati amidnu vrzu. S ciljem imobilizacije MtSerRS je najprije razrijeđen u natrijevom acetatu (c = 10 mmol dm^{-3} (pH 5,0)), injektiran i potom kovalentno vezan na aktiviranu površinu čipa. Kao i kod detekcije nekovalentnih interakcija ArgRS i $tRNA^{Arg}$ za bilježenje signala potrebna je jedna mjerna i jedna referentna ćelija. Tijekom imobilizacije MtSerRS na mjernu ćeliju, referentna je jednako aktivirana dodatkom EDC i sulfo-NHS, ali bez injektiranja proteina. Preostala reaktivna mjesta na čipu blokiraju se dodatkom etanolamina (reagira svojom amino-skupinom), a nekovalentno adherirane molekule MtSerRS uklanjaju se ispiranjem čipa otopinom natrijevog hidroksida (c = 50 mmol dm^{-3}). Enzim MtSerRS bio je imobiliziran pri 800 RU (jedinice rezonancije, skraćenica prema eng. *response units*). Pufer za analizu sadržavao je c (Hepes) = 20 mmol dm^{-3}, c (NaCl) = 0,12 mmol dm^{-3}, c (DTT) = 2 mmol dm^{-3} te φ (surfaktant P20) = 0.005%. Vrijednost pH iznosila je 7,2. Vezanje je praćeno pri protoku 30 μl min^{-1}. Pufer za analizu korišten je i za razrjeđivanje analita. Pri istim uvjetima testirana je i potencijalna interakcija kompleksa MtArgRS:$MttRNA^{Arg}$ s proteinskim partnerom MtSRS. Po disocijaciji, preostali analit je uklanjan dodatkom otopine KCl (3 mol dm^{-3}).

3.5 Enzimski testovi

Praćenje aktivnosti aminoacil-tRNA-sintetaza tipično se može izvršiti tzv. filter-testom: sintetazi od interesa ponude se supstrati potrebni za reakciju te radioaktivni aminokiselinski prekursor. Alikvoti reakcijske smjese (u kojoj je reakcija započeta!) nanašaju se na listiće filter-papira te potom uranjaju u otopinu trikloorooctene kiseline. Otopina TCA istovremeno prekida reakciju te taloži tRNA. Ukoliko se reakcija aminoacilacije odvija dolazi do taloženja radioaktivne aminokiseline zajedno s molekulama tRNA na koju je ista prenesena. U testu je važno koristiti slijepu probu jer pojedine aminokiseline mogu nespecifično adherirati na listiće filter papira i/ili enzim (kojeg TCA također taloži).

Reakcija aminoacilacije za divlji tip MtArgRS te MtSerRS tipično se odvijala pri 48 °C te uz [^{14}C]-obilježenu aminokiselinu (c = 70 μmol dm^{-3}) u puferu sastava c (DTT) = 4 mmol dm^{-3}, c (Tris-HCl, pH 7,6) = 60 mmol dm^{-3}, c ($MgCl_2$) = 10 mmol dm^{-3}, c (ATP) = 5 mmol dm^{-3}, γ(BSA) = 0,4 g dm^{-3}, c (NaCl) = 150 mmol dm^{-3}. Krnji oblici ispitivani su pri nižoj temperaturi reakcije (42-43 °C) i ionskoj jakosti (c (NaCl) = 50 mmol dm^{-3}).

3.5.1 Određivanje akceptorske aktivnosti tRNA

Reakcijske smjese kod određivanja udjela MttRNA^{Arg} u ukupnoj tRNA (tj. određivanja akceptorske aktivnosti tRNA) sadržavale su uzorak renaturirane tRNA (c = 2 μmol dm^{-3}), [^{14}C]Arg ili [^{14}C]Ser (c = 10 μmol dm^{-3}), enzim (c = 1 μmol dm^{-3}) u puferu za reakciju aminoaciliranja (c (DTT) = 4 mmol dm^{-3}, c (Tris-HCl, pH 7,6) = 60 mmol dm^{-3}, c ($MgCl_2$) = 10 mmol dm^{-3}, c (ATP) = 5 mmol dm^{-3}, γ (BSA) = 0,4 g dm^{-3}, c (NaCl) = 150 mmol dm^{-3}). Enzim je dodan posljednji i time je započeto mjerenje vremena reakcije. Otopina je potom inkubirana u termobloku pri 48 ºC. Ukupni volumen reakcijske smjese iznosio je 40 μl. Količina ugrađenog radioaktiviteta izmjerena je potapanjem polovice ukupnog volumena reakcije nanesenog na označene komadiće filtrirnog papira (*Whatman* 3MM) nakon 20 i 35 minuta u hladnu otopinu trikloroctene kiseline (γ (TCA) = 100 g dm^{-3}). Otopina TCA potresana je na ledu na rotirajućoj platformi (*Gerhardt*) tijekom idućih 10 minuta. Ispiranje listića izvršeno je potapanjem još dva puta u trajanju od po pet minuta otopinom TCA (γ (TCA) = 50 g dm^{-3}). Radi lakšeg sušenja, papirići su potom potresani tijekom tri minute u otopini etanola, nakon čega su sušeni u inkubatoru (BTE-S, *Termo-medicinski aparati*) tijekom 30 minuta pri 80 ºC. Suhi filtrirni papirići uronjeni su u 2,5 mL scintilacijske otopine (γ (PPO) = 5 g dm^{-3} i γ (POPOP) = 0,3 g dm^{-3} u toluenu) i postavljeni u scintilacijski brojač Tri-Carb 2900TR (*PerkinElmer*) gdje su kao rezultat dobivene količine zabilježenog radioaktiviteta u cpm (eng. *counts per minute*, broj otkucaja u minuti pri scintilacijskom

mjerenju radioaktivnosti). Radi određivanja množine radioaktivno obilježene tvari koja je dala prethodno navedeni odziv, također je bilo potrebno izraditi baždarni pravac. Stoga su na komadiće filtrirnog papira pipetirane poznate količine [^{14}C]Arg, papirići su posušeni, uronjeni u scintilacijsku otopinu i postavljeni u scintilacijski brojač. Ovisnost tako izmjerenih cpm o množini [^{14}C]Arg korištena je kao baždarni pravac. Prilikom svakog eksperimenta izrađen je novi baždarni pravac.

3.5.2 Određivanje kinetičkih parametara K_m i k_{cat} za tRNA^{Arg}

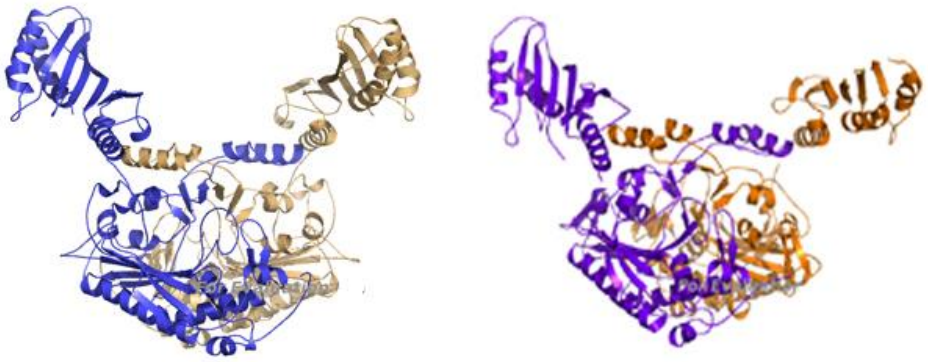
Kinetički parametri određeni su kinetikom ustaljenog stanja također uz korištenje radioaktivno obilježene aminokiseline. Reakcijske smjese su pripravljane slično onima opisanim u sklopu prethodnog podnaslova. Serijska razrjeđenja renaturirane MttRNA^{Arg} zamiješana su u reakcijskom puferu uz dodatak [^{14}C]Arg (70 μmol dm^{-3}) . Reakcija je započeta dodatkom enzima (c (MtArgRS) = 16,5 nmol dm^{-3}). Koncentracija tRNA varirana je u rasponu od približno 0,125 · K_m do 2 · K_m. Koncentracija enzima kod određivanja kinetičkih parametara za krnje varijante iznosila je 50 nmol dm^{-3}. Alikvoti reakcijskih smjesa od po 9 μL uzimani su svakih 30 sekundi od početka reakcije. Za svaku reakciju sakupljeno je po četiri točke. Nagib pravca dobivenog iz ovisnosti ugradnje nastalog produkta Arg-tRNA^{Arg} u vremenu jednak je početnoj brzini reakcije. Programom GraphPad Prism 6 napravljena je nelinearna regresija čime su dobiveni parametri V_{max} i K_m iz jednadžbe Michaelis-Menten. Obrtni broj je izračunat dijeljenjem maksimalne brzine reakcije s (poznatom) ukupnom množinskom koncentracijom enzima koji je sudjelovao u reakciji.

4 Rezultati

4.1 Stvaranje strukturnih modela i uvod u pristup istraživanju

Informacija o tercijarnoj strukturi istraživane molekule važna je kako za dizajn biokemijskih pokusa, tako i za evaluaciju dobivenih rezultata. U sklopu ove disertacije pokušalo se odrediti doprinose pojedinih elemenata arginil-tRNA-sintetaze iz arheje *M. thermautotrophicus* u prepoznavanju proteinskog partnera MtSerRS uklanjanjem pojedinih dijelova enzima ArgRS. Informacija o smještaju tih elemenata unutar strukture enzima govori o načinu na koji se istraživana binarna čestica oblikuje. Također, mogućnost ugradnje pripadnih molekula tRNA u kompleks višeg reda (dakle, ArgRS:SerRS:tRNA) indirektno govori o topološkim odrednicama koje rukovode nastankom sintetaznog kompleksa te u tom slučaju znanje o strukturi pripadnih kompleksa ArgRS:tRNA^{Arg} i SerRS:tRNA^{Ser} postaje od važnosti.

Izgradnja dobrog modela zahtjeva makar jednu eksperimentalno određenu trodimenzionalnu strukturu, a koja može poslužiti kao kalup. Drugim riječima, između strukture (kalupa) i istraživanog slijeda mora postojati dovoljno značajna sličnost na razini primarnog slijeda. Arginil-tRNA-sintetaza iz arheje *M. thermautotrophicus* istraživana u sklopu ove disertacije posjeduje 42,26 % identičnih ostataka u odnosu na odabrani kalup – riješenu strukturu arginil-tRNA-stinetaze iz arheje *P. horikoshii* (PDB ID 2ZUE_A). Istraživana pak seril-tRNA-sintetaza *M. thermautotrophicus* s istoimenim enzimom iz arheje *Methanopyrus kandleri* (MkSerRS) dijeli 47,83 % sličnosti, zbog čega je isti odabran kao kalup prilikom modeliranja strukture MtSerRS (slika 4.1 a).

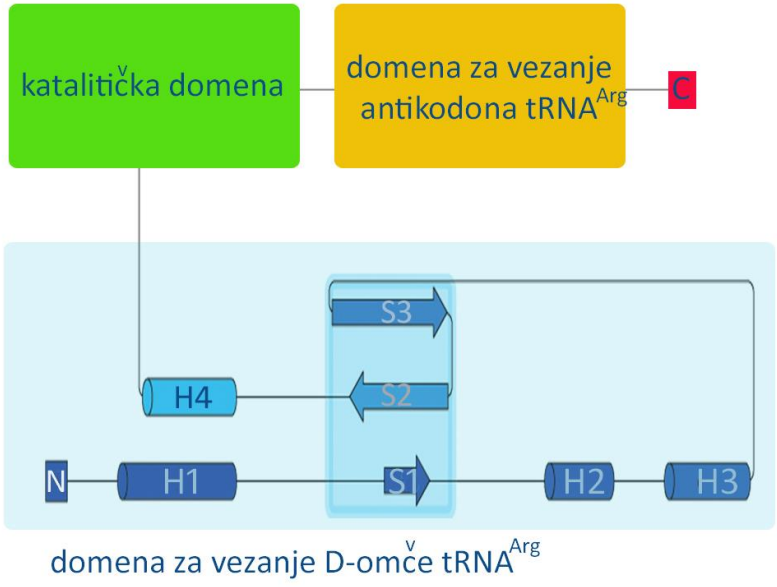


Slika 4-1 Model seril-tRNA-sintetaze iz *M. thermautotrophicus* određen pomoću kalupa 3W3S_A (lijevo). Seril-tRNA-sintetaza iz *M. barkeri* (PDB ID 2CJB) čiju tRNA^{Ser} MtSerRS prepoznaje i aminoacilira te koja je sposobna (heterologno) prepoznati proteinskog partnera MtArgRS (desno). U oba slučaja, identične podjedinice (homo)dimera obojane su različitim bojama.

U laboratoriju Zavoda za biokemiju ranije je određena kristalna struktura SerRS iz *M. barkeri*[7] s kojom MtSerRS dijeli samo 32% identičnih ostataka. Bez obzira na to, MtSerRS sposobna je vezati i aminoacilirati $tRNA^{Ser}$ *M. barkeri*, a MbSerRS sposobna je prepoznati MtArgRS, odn. proteinskog partnera MtSerRS[13]. Dakle, bez obzira na relativno nisku sličnost enzima MtSerRS i MbSerRS na razini primarne strukture reciprocitet u prihvaćanju pripadnog supstrata i proteinskog partnera sugerira da su ključni elementi tercijarne strukture očuvani između ovih enzima. Razlog ovom razilaženju između očuvanja primarne i tercijarne strukture leži u evolucijskom značaju aaRS: kao esencijalni stanični enzimi te kao enzimi odgovorni za uspostavu ispravnog čitanja genetičkog koda, aminoacil-tRNA-sintetaze pokazuju jasnu strukturnu homologiju čak i unutar pojedinog razreda[a], a posebno unutar obitelji[23]. Ova izrazita strukturna homologija odnosi se na katalitičku domenu i specifične dijelove odgovorne za prepoznavanje tRNA-supstrata unutar pojedine obitelji, a zasebni strukturni moduli koji se mogu pojaviti zavisno od evolucijske linije danog organizma nadodaju se opisanoj osnovnoj strukturnoj srži[b]. I kod seril-tRNA-sintetaze i kod arginil-tRNA-sintetaze strukturna srž[c] dobro je očuvana, a varijacije nalazimo na površini proteina u vidu nadodanih fleksibilnih petlji i aminokiselinskih supstitucija koje osiguravaju poželjna svojstva enzima s obzirom na citosolni milje određenog organizma (halofilnost, (hiper)termofilnost, psihrofilnost itd.). Primjerice, da je tercijarna strukura arginil-tRNA-sintetaze zaista visoko očuvana vidljivo je iz usporedbe primarnih i tercijarnih sravnjenja enzima iz mezofilnog eukariota *S. cerevisiae* s istoimenim enzimom iz termofilne bakterije (*T. thermophilus*): u primarnoj strukturi te dvije sintetaze dijele svega 24 % identičnih ostataka, ali strukturno sravnjenje otkriva da se preko 50% aminokiselina[d] može poravnati uz RMSD-vrijednost od 1,49 Å. Prokariotske pak arginil-tRNA-sintetaze arhejskog (*P. horiskohii*) i bakterijskog (*T. thermophilus*) izvora mogu se sravniti uz RMSD od svega 1,33 Å duž više od 70% ukupnog aminokiselinskog sastava. Pritom je glavni razlog za nedostatak dobrog sravnjenja u preostalih 30% aminokiselina funkcionalni pomak tog dijela enzima prilikom vezanja tRNA – naime, sravnjene strukture iz *P. horiskohii* te *T. thermophilus* riješene su u slobodnom obliku (potonja, bakterijska) te u kompleksu s pripadnom tRNA (prva, arhejska).

[a] Sintetaze različitih razreda nisu strukturno srodne.
[b] Zbog čega se kaže da aaRS posjeduju modularnu građu.
[c] Tj. katalitička domena i prateće tRNA vežuće domene (N-terminalna domena SerRS, odn. Add-1 i Add-2 domena ArgRS).
[d] Točnije njihovi αC-atomi.

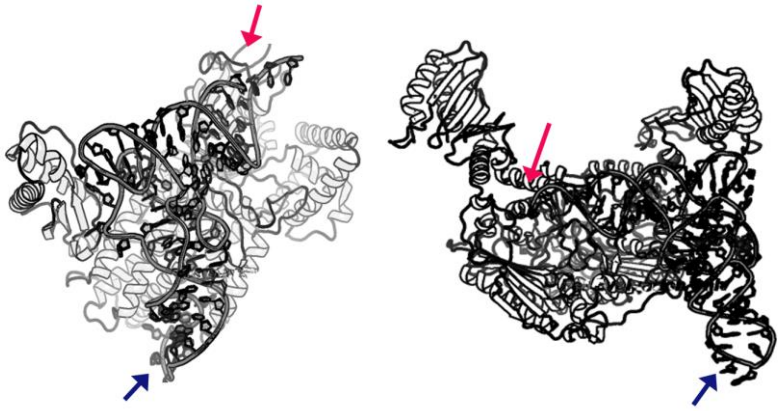
Krnje varijante arginil-tRNA-sintetaze iskorištene za ispitivanje interakcije s proteinskim partnerom MtSerRS napravljene su na osnovu stvorenog modela uz pomoć PhArgRS (tj. ArgRS iz arheje *P. horikoshii*)[92] kao kalupa te pomoću automatskog modeliranja programom EsyPred3D. Kao što je navedeno u poglavlju Materijali i metode, modeliranje oba proteina, MtArgRS i MtSerRS, napravljeno je pomoću različitih programa, a odabran je onaj model koji je pokazivao najbolje vrijednosti s aspekta stereokemije, geometrije i konformacije[a]. Arginil-tRNA-sintetaze monomerne su sintetaze razreda I, karakteristične po tome da za je nastanak arginil-adenilata potrebna $tRNA^{Arg}$, odn. aktivna konformacija arginil-tRNA-sintetaze postiže se tek uzajamnim konformacijskim usklađivanjem između ArgRS i $tRNA^{Arg}$. Protein je građen od 3 individualne cjeline: domene za prepoznavanje D-omče tRNA smještene na N-kraju (tzv. Add-1 domena, v. Uvod), centralne katalitičke domene (sadržava aktivno mjesto) i domene za prepoznavanje antikodona $tRNA^{Arg}$ (smještene C-terminalno). Domena Add-1 posjeduje karakterističnu topologiju, βαβ-motiv u kojemu se, kako smo ime kaže, elementi α-zavojnice umeću između dviju niti β-ploče (zavojnice H2, H3 umetnute između β-niti S1 i S2; slika 4.2). Motiv je okružen s još dvije zavojnice, H1 i H4. Pritom zavojnica H1 formira svojevrsnu bazu Add-1 domene te se smata sa suprotne strane od veznog sučelja za tRNA, a zavojnica H4 predstavlja dio fleksibilne poveznice ove globularne domene s katalitičkom regijom enzima.



Slika 4-2 Shema organizacije arginil-tRNA-sintetaze *M. thermautotrophicus* s naglaskom na organizaciju N-terminalne, Add-1 domene. Zasebne domene označene su na slici, kao i N-, odn. C-kraj enzima. Elementi sekundarne strukture unutar Add-1 domene istaknuti su, pri čemu "H" stoji za α-zavojnicu, a "S" za β-nit. Redni broj pojedinog elementa pridodan je s obzirom na poredak istog počev od N-kraja enzima.

[a] Ne treba zaboraviti da se pritom kvaliteta modela djelomice nasljeđuje od samog kalupa.

Modeli molekula tRNA (MttRNA^{Arg} i MttRNA^{Ser}) napravljeni su pomoću programa ModeRNA, a na osnovu ručno napravljenog poravnanja primarnog slijeda: naime, za stvaranje modela važnije je staviti naglasak na ispravno smještanje nukleotida s obzirom na (buduću) konformaciju fosfodiesterske okosnice, nego na broj poravnatih identičnih baza tRNA. Stoga su sljedovi poravnati na način da se nukleotidi pojedinog elementa (peteljke ili omče) nalaze na istim položajima kod kalupa i stvaranog modela. Model MttRNA^{Arg} generiran je na osnovu PhtRNA^{Arg} (PDB ID 2ZUE_B), a model MttRNA^{Ser} na osnovu MktRNA^{Sec} (PDB ID 3W3S_B) kao kalupa. Potonji kalup, tRNA selenocisteinskog identiteta supstrat je seril-tRNA-sintetaze u organizama koji sintetiziraju selenoproteine. Kao što je spomenuto u poglavlju Literaturni pregled, tRNA^{Sec} izrazito naliči tRNA^{Ser}, iako je njena duga varijabilna ruka nešto dulja od one tRNA^{Ser}. Specifično pakiranje tercijarne srži kojom se omogućuje usmjeravanje ovog dugog varijabilnog elementa isto je u oba slučaja, a "vidljivost" ove tRNA u mapi elektronske gustoće daleko bolja, nego što je to slučaj s bakterijskom TttRNA^{Ser} (v. Literaturni uvod). Iz tog razloga, tRNA^{Sec} je uzeta kao bolji model za izgradnju MttRNA^{Ser}.



Slika 4-3 Prikaz modeliranih kompleksa MtArgRS:MttRNA$^{Arg}_{CCU}$ (lijevo) i MtSerRS:MttRNASer$_{GGA}$ (desno). Plava strelica pokazuje u smjeru antikodona tRNA: vidljivo je da se kod MtArgRS taj dio specifično prepoznaje putem elemenata domene Add-2, dok je kod serinskog sustava antikodon izložen otapalu (glavni element prepoznavanja je duga varijabilna ruka). Ružičastom strelicom određen je položaj CCA-kraja molekule: kod serinskog sustava tRNA se tijelom veže duž jedne podjedinice homodimera, dok njezin 3'-kraj ulazi u aktivno mjesto druge podjedinice.

4.2 Proizvodnja rekombinantnih proteina metodom rekombinantne DNA

U sklopu ovog rada korišteni su oblici arginil- i seril-tRNA-sintetaze s različitim kombinacijama privjesaka te krnji oblici ArgRS (tablica 4.1). U svim slučajevima, uključujući i tRNA, makromolekule od interesa umnožene su prekomjernom ekspresijom u stanicama *E. coli* BL21 uz pomoć inducibilne T7 RNA-polimeraze. Ova polimeraza prisutna je u genomu

spomenutog soja *E. coli*, a pod kontrolom je *lac* promotora[a]. Dodatkom IPTG-a (analoga (alo)laktoze) potiče se transkripcija T7 RNA-polimeraze. Nastala polimeraza prepoznaje vlastiti (jedini dostupni) promotor, a koji se nalazi uzvodno od slijeda gena od interesa (unutar rekombinantnog vektora). Kod proteina koji su eksprimirani s vektora pGEX-6P2 (MtArgRS) i pProEx-Htb (MbArgRS) poticanje ekspresije također se vrši dodatkom IPTG-a, ali se transkripcija gena od interesa obavlja radom bakterijske RNA-polimeraze, budući da vektori sadržavaju promotore *trc*, odn. *tac*[b]. U tim slučajevima IPTG direktno potiče transkripciju gena od interesa, budući da je isti stavljen pod kontrolu *lac* elemenata. Proizvodnja svih proteina bila je poticana dodatkom 0,3 mmol dm^{-3} IPTG-a bakterijskoj kulturi, a proizvodnja rekombinantnih tRNA dodatkom 1 mmol dm^{-3} IPTG. Nakon 3-4 sata po dodatku IPTG-a bakterijska kultura s prekomjerno eksprimiranom molekulom od interesa oborena je centrifugiranjem te isprana destiliranom vodom kako bi se uklonio višak hranjivog medija. Stanice su potom otvorene soniciranjem (za rekombinantne proteine) ili dodatkom fenol-vode (za rekombinantne tRNA).

Proizvodnja rekombinantnih enzima s privjeskom olakšava izdvajanje takvog proteina iz smjese budući da se takav protein iz te smjese može izdvojiti u jednom kromatografskom koraku (afinitetna kromatografija). No, ponekad dodatak privjeska ima izraziti utjecaj na aktivnost izolirane molekule (otežava vezanje supstrata ili katalizu, potiče umjetnu dimerizaciju, samostalno ostvaruje interakcije s bakterijskim proteinima itd.) pa je dobro posjedovati i neki drugi oblik tog proteina (nativni ili s drugačijim privjeskom). S druge strane, pročišćavanje nativnih oblika zahtijeva nekoliko kromatografskih koraka (v. kasnije) što je dugotrajnije, skuplje te potiče denaturaciju proteina (primjerice, za korak ionske izmjene protein je potrebno najprije odsoliti kako bi ga se imobiliziralo na stacionarnu fazu nakon čega se izlaže gradijentu soli - oboje može biti pogibeljno ukoliko je protein osjetljiv na promjenu ionske jakosti). Oba pristupa (proizvodnja nativnog proteina te proizvodnja proteina s privjeskom) potrebno je kritički razmotriti te odvagnuti prednosti i nedostatke jednog i drugog.

U sklopu ove disertacije istraživane su interakcije između dvaju proteina te između proteina i tRNA. Tipična metoda za procjenu interakcije dvaju proteina je metoda afinitetnog supročišćavanja kod koje se jedan od potencijalno interreagirajućih proteina (tzv. protein-

[a] Zapravo se radi o *lacUV5* promotoru, modificiranom *lac* promotoru koji je neosjetljiv na regulaciju CAP-cAMP-kompleksom te isti stoga nije potreban za vezanje RNA-polimeraze na promotor.

[b] Ovi promotori kombinacija su *trp* i *lac* (bakterijskih) promotora. Kako *lac* promotor sadrži 2 različita nukleotida u svojim (-35)- i (-10)-sljedovima u odnosu na kanonske promotorske sljedove *E. coli*, to u određenim slučajevima rezultira neaktivnim promotorom. Kombinacija triptofanskog (u dijelu (-35)) i laktoznog (u dijelu (-10)) promotora daje otvoreniji promotor i naposljetku rezultira boljim prinosom proteina.

mamac) imobilizira na stupcu afinitetne stacionarne faze. Njegov (potencijalni) proteinski partner može ostati zadržan na stacionarnoj fazi jedino ukoliko stupi u interakciju s imobiliziranim proteinom budući da ne nosi (istovjetni) privjesak. Dobro je pritom provjeriti postoji li mogućnost nespecifičnog zadržavanja proteina-partnera na proteinu-mamcu. Jedan od tipičnih načina jest zamjena položaja istraživanih proteina. Drugim riječima, originalno testirani protein-partner sada se imobilizira na stacionarnoj fazi (postaje protein-mamac), a nekadašnji protein-mamac nanaša se i testira za vezanje, budući da se više ne može vezati na stacionarnu fazu.

Da bi ovakva vrsta kontrole bila moguća, proteini su (tehnikama rekombinantne DNA) proizvedeni u nekoliko varijanti.

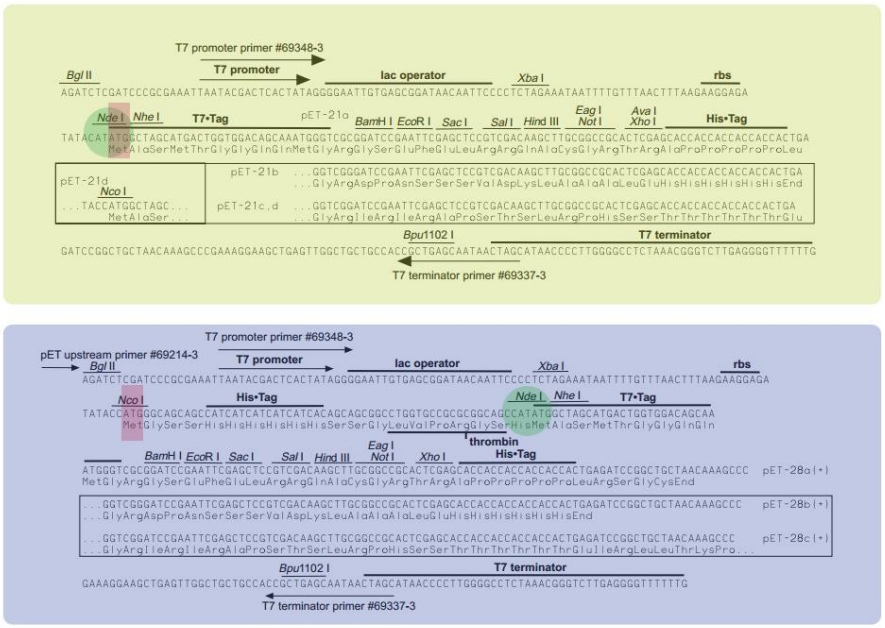
Tablica 4-1 Rekombinantni oblici enzima upotrijebljeni u ovom radu.

enzim	skraćenica	privjesak	vektor	proizvedeno
arginil-tRNA-sintetaza iz *M. thermautotrophicus*	MtArgRS-his$_6$	heksahistidinski	pET28	ranije[13]
	GST-MtArgRS	GST	pGEX-6P2	ranije[13]
	MtArgRS	nema	pGEX-6P2	nije konstrukt
krnja arginil-tRNA-sintetaza iz *M. thermautotrophicus*	Δ21-MtArgRS-his$_6$	heksahistidinski	pET28	u ovom radu
	Δ21-MtArgRS	nema	pET21	u ovom radu
	Δ39-MtArgRS-his$_6$	heksahistidinski	pET28	u ovom radu
	Δ39-MtArgRS	nema	pET21	u ovom radu
	Δ43-MtArgRS-his$_6$	heksahistidinski	pET28	u ovom radu
	Δ43-MtArgRS	nema	pET21	u ovom radu
	Δ89-MtArgRS-his$_6$	heksahistidinski	pET28	u ovom radu
	Δ89-MtArgRS	nema	pET21	u ovom radu
	ΔN_{tot}-MtArgRS-his$_6$	heksahistidinski	pET28	u ovom radu
	ΔC_{tot}-MtArgRS-his$_6$	heksahistidinski	pET28	u ovom radu
arginil-tRNA-sintetaza iz *M. barkeri*	MbArgRS-his$_6$	heksahistidinski	pProEx-Htb	u ovom radu
	GST-MbArgRS	GST	pGEX-6P2	u ovom radu
seril-tRNA-sintetaza iz *M. thermautotrophicus*	MtSerRS-his$_6$	heksahistidinski	pET28	ranije
	MtSerRS	nema	modificirani pET28	u ovom radu

Za identifikaciju općih topoloških odrednica kompleksa MtArgRS:MtSerRS ciljano su (tehnikama rekombinantne DNA) uklonjeni elementi arginil-tRNA-sintetaze te su potom takve krnje varijante testirane u vezanju proteinskog partnera MtSerRS. Skraćeni oblici MtArgRS proizvedeni su lančanom reakcijom polimeraze na kalupu pET28-*argS*. Početnice korištene za dobivanje odgovarajućeg skraćenog oblika MtArgRS dane su u poglavlju Materijali i metode. Prelimenarna potraga za zonom interakcije kod enzima MtArgRS uključivala je odstranjenje cjelovitih domena Add-1 (N-terminalna domena, kod arginil-tRNA-sintetaze tipično uključena u prepoznavanje identiteta A20 smještenog u D-omči $tRNA^{Arg}$, v. Uvod) i Add-2 (domena za prepoznavanje antikodona $tRNA^{Arg}$). Budući da su

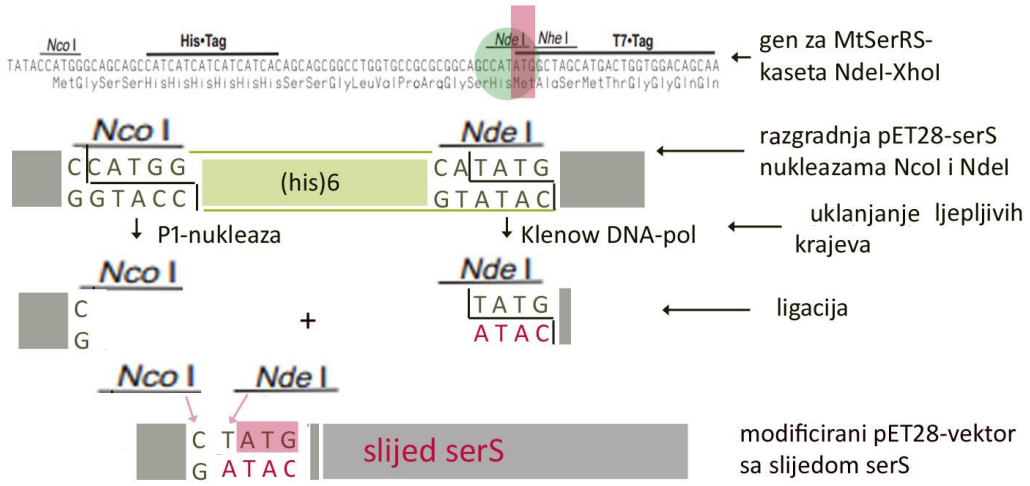
odstranjene čitave domene takvi krnji oblici nazvani su ΔN_{tot}-MtArgRS (uklonjena Add-1), odn. ΔC_{tot}-MtArgRS (uklonjena Add-2 domena). Nakon što je Add-1 domena identificirana kao jedna od zona važnih za ostvarenje interakcije arginil-tRNA-sintetaze s MtSerRS, stvorene su i varijante s manjim kraćenjima na N-kraju. Kako bi se proizvele varijante ovih skraćenih proteina i u nativnom obliku i s afinitetnim privjeskom[a] uzvodnom slijedu početnica (koji definira početak amplifikacije gena *argS* te, posljedično skraćenje enzima na tom kraju) nadodan je slijed koji prepoznaje restrikcijska endonukleaza *Nde*I. Ugradnjom amplificiranog DNA-slijeda u vektor pET28 kodirajući slijed gena nadodaje se slijedu kodiranom unutar vektora, a koji po translaciji rezultira dodatkom heksahistidinskog privjeska na N-kraj stvorenog proteina (slika 4.5)). Istovremeno, isto restrikcijsko mjesto i isti okvir čitanja može se iskoristiti za ugradnju gena u vektor pET21a pri čemu metionin amplificiranog slijeda postaje ujedno i početni metionin generiranog rekombinantnog proteina (N-kraj varijante osim metionina nema ništa drugo nadodano). Vektori pET21-serije u (+1)-okviru čitanja posjeduju nizvodno[b] smješteni kodirajući slijed čijom translacijom nastaje heksahistidinski privjesak na C-kraju rekombinantno priređenog proteina (heksahistidinski privjesak bi se dodao ugradnjom gena od interesa u vektro pET-21b, a ne pET-21a). No, kako je gen *argS* ugrađen unutar okvira čitanja (0) u odnosu na *Nde*I-restrkcijsko mjesto heksahistidinski privjesak čitao bi se kao heksaprolinski slijed. No, ni taj (heterologni) vektorom kodirani slijed se *ne* ugrađuje u krnje varijante MtArgRS budući da gen *argS* posjeduje vlastiti stop-kodon[c]. Drugim riječima, ovaj dio vektora se u stanici ne translatira. Stoga, kao posljedica ekspresije varijanti MtArgRS s rekombinantnog pET21-vektora dolazi do nastanka "nativnih" proteina, točnije proteina bez rekombinantno dodanog privjeska.

[a] Dva oblika omogućuju testiranje afinitetnim supročišćavanjem u obje "orijentacije", tj. uz imobilizaciju MtSerRS-his_6 i testiranje supročišćavanja ΔNx-MtArgRS te imobilizaciju ΔNx-MtArgRS-his_6 i supročišćavanje MtSerRS bez privjeska.
[b] Nizvodno od višestrukog mjesta za kloniranje, MCS (eng. *multicloning site*)
[c] Iz istog razloga se u sustavu pET28 ne prepisuje C-terminalno smješteni privjesak.



Slika 4-4 Prikaz višestrukog mjesta za kloniranje kod vektora pET21a-d(+) (gore), odn. pET28a-c(+), s karakterističnim dodatnim elementima (promotor, operator, terminator). RBS, prema eng. *ribosome binding site* stoji za Shine-Dalgarno slijed. Zaokružena su mjesta koje prepoznaje restrikcijska endonukleaza *Nde*I i pomoću koje su generirani ljepljivi krajevi varijanti MtArgRS prilikom ugradnje u oba vektora. Ugradnja u mjesto *Nde*I ima različite posljedice prilikom ugradnje u jedan ili drugi vektor. Početni metionin budućeg genskog produkta označen je crvenim pravokutnikom: kod pET21a-vektora to je metionin kodiran drugom polovicom palindromskog slijeda *Nde*I, dok je to kod plazmida pET28 vektorom kodirani metionin (dio *Nco*I mjesta). Iz tog razloga kod translacije s vektora pET28 krnji produkti *argS*-gena sadrže histidinski privjesak na N-kraju. Kazeta krnjih varijanti sadrži uzvodno *Nde*I-te nizvodno *Xho*I-mjesto. Potonjem prethodi genom kodirani stop-kodon tako da ne dolazi do translacije nizvodno (u odnosu na mjesto *Xho*I) smještenog kodirajućeg slijeda vektora.

Mogućnost stvaranja dva različita konstrukta uz pomoć iste kasete (jednog bez i jednog sa privjeskom) izrazito je praktična jer smanjuje cijenu (potrebne su samo dvije početnice za dva konstrukta) i vrijeme potrebno za izvođenje postupka ugradnje u vektor (reakciju amplifikacije PCR-reakcijom nije potrebno uhodavati za dva seta početnica, razgradnja endonukleazama može se odvijati u jednoj reakciji te razdijeliti na dva alikvota za ugradnju u jedan, odn. drugi vektor). No, u trenutku kada je u sklopu ovog rada generiran nativni oblik MtSerRS bez privjeska vektor pET21 nije bio dostupan. Stoga je heksahistidinski privjesak kodiran vektorom unutar konstrukta pET28-*serS* uklonjen enzimski (slika 4.6).



Slika 4-5 Prikaz enzimskog izbacivanja polihistidinskog privjeska iz rekombinantnog vektora pET28-*serS*. Originalna kaseta sadržavala je gen za MtSerRS ugrađen unutar *Nde*I-mjesta (označeno zelenim krugom). Početni metionin uokviren je crvenim pravokutnikom. Razgradnja rekombinantnog vektora endonukleazama *Nco*I i *Nde*I stvara ljepljive krajeve koji se mogu učiniti tupima uz pomoć enzima P1-nukleaze i Klenow DNA-polimeraze. Ligacija stvorenih tupih krajeva rezultira vektorom pET28-*serS* kojemu je uklonjen slijed za histidinski privjesak, a nekadašnji početni metionin (nekad dijelom *Nco*I-mjesta) sada potječe od ispunjenog *Nde*I mjesta. Broj nukleotida između promotora, odn. Shine-Dalgarno-slijeda je očuvan (za položaj Shine-Dalgarno v. sliku 4.1).

Originalni vektor pET28 s ugrađenim genom za MtSerRS proizveden je ranije u laboratoriju Zavoda za biokemiju. Gen je ugrađen kao *Nde*I-*Xho*I-kaseta u odgovarajuća mjesta vektora. Prilikom izbacivanja uzvodno (na razini proteina N-terminalno) smještenog kodirajućeg slijeda za histidinski privjesak iskorišteni su položaji na kojima cijepaju endonukleaze *Nco*I i *Nde*I. Razgradnjom vektora tim endonukleazama nastaje kratki fragment koji sadržava slijed za privjesak, a koji se od ostatka lineariziranog vektora može odvojiti pročišćavanjem iz gela. No, cijepanje vektora jednom, odn. drugom endonukleazom izvršeno je u zasebnim koracima, budući da linearizirani vektor s genom za MtSerRS posjeduje 5'-viseće (ljepljive) krajeve na oba mjesta koje zasijecaju navedene restrikcijske endonukleaze, a svaki od ta dva kraja se željelo tretirati na različiti način (*Nco*I-mjesto skratiti za slobodni 5'-kraj, a *Nde*I-mjesto ispuniti komplementarnim slijedom, v. dalje). Naposljetku je vektor bilo potrebno cirkularizirati tako da se dobije modificirani pET28 vektor s genom od interesa, ali kojemu sad nedostaje kodirajući segment za privjesak. Pritom se vodilo računa o tome da udaljenost od Shine-Dalgarno-slijeda[a] ostane ista kao u nemodificiranom vektoru, budući da ta udaljenost može utjecati uspješnost translacije genskog produkta ugrađenog u vektor.

[a] Ovaj slijed je odgovoran za točno pozicioniranje transkripta na ribosom prilikom translacije. Na slijedovima vektora tipično st označava kao „RBS“, odn. vezno mjesto za ribosom (velika podjedinica ribosoma asocira s malom te k nakon što je mRNA preko svog Shine-Dalgarno slijeda stvorila interakcije s 16 S rRNA male podjedinice.

Viseći 5'-kraj nastao radom *Nde*I-endonukleaze (cijepa slijed CA'TTAG na položaju označenom apostrofom) ispunjen je u reakciji polimerizacije koju katalizira veliki fragment DNA-polimeraze I (tzv. Klenow-fragment). Ovaj dio DNA- polimeraze I, proteolitički je produkt koji zadržava polimerizacijsku i 3'→ 5' egzonukleaznu aktivnost, ali mu nedostaje 5'→ 3' egzonukleazna djelatnost. Stoga ovaj enzim zadržava vjernost prilikom polimerizacije DNA-regije od interesa, ali ne razgrađuje 5'-krajeve. Ispuna *Nde*I-mjesta po ovoj reakciji rezultira slijedom TATG (slika 4.2), pri čemu je potcrtani kodirajući slijed za metionin željeni start-kodon u budućem konstruktu (v. dalje).

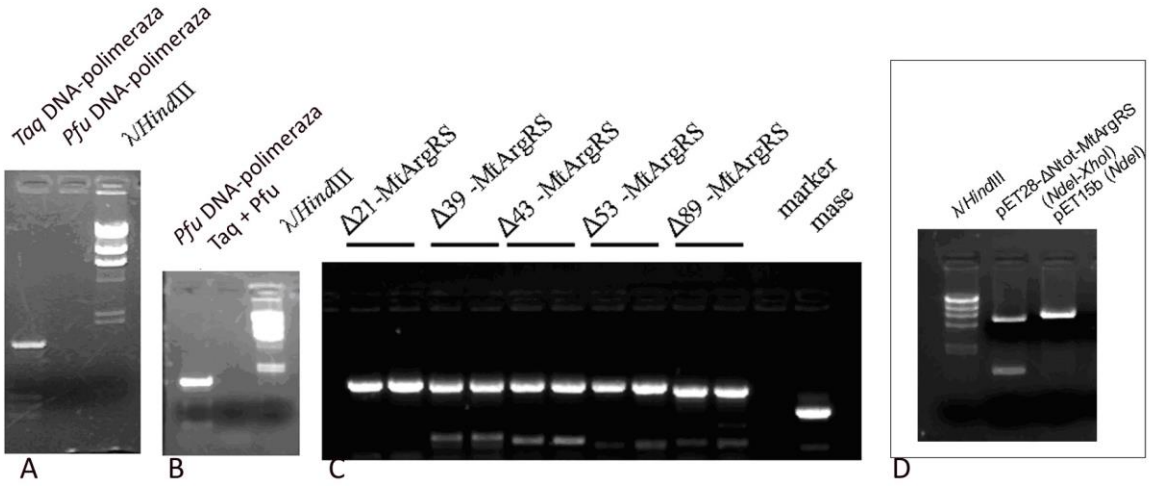
Originalni metionin (u nemodificiranom pET28-*serS* konstruktu dio je *Nco*I-mjesta (slijed CCATGG), tj. ATG-kodon nalazi se na položajima 3, 4 i 5 tog palindroma. Cijepanjem ovog mjesta nastaje 5'-viseći kraj koji je uklonjen pomoću P1-nukleaze. Ovaj enzim djeluje na jednolančanoj DNA i RNA te cijepa na svakom slobodnom (jednolančanom) položaju ostavljajući 5'-monofosfat na završetku dvolančane regije (na koju ne može djelovati).

Reakcije cijepanja i ispuna izvršene su redom: razgradnja pomoću *Nde*I (originalni vektor lineariziran, 5'-viseći krajevi), ispuna pomoću Klenow DNA-polimeraze I (vektor lineariziran, tupi, odn. ispunjeni 5'-krajevi), razgradnja pomoću *Nco*I (nastaju 2 DNA-fragmenta, linearizirani vektor koji završava tupim *Nde*I-krajem 5'-visećim krajem na položaju *Nco*I-endonukleaze te kratki DNA-fragment koji sadržava kodirajući slijed za heksahistidinski privjesak), skraćivanje 5'-visećih krajeva nukleazom P1 (oba DNA fragment završavaju tupim krajevima). Po pročišćavanju i izolaciji većeg fragmenta (modificirani vektor s genom *serS*), linearizirani (i modificirani) vektor cirkulariziran je pomoću T4 ligaze. Kao rezultat, heksahistidinski privjesak je izbačen, a početni metionin nalazi se u hibridnom *Nco*I-*Nde*I-mjestu (CTATG). Udaljenost od Shine-Dalgarno mjesta je identična kao u originalnom vektoru, ali kodirajući slijed na N-kraju započinje metioninom nekadašnjeg *Nde*I-mjesta. Shematski su ovi pokusi prikazani na slici 4.5.

Pregled pojedinih postupaka tijekom kloniranja dan je na slici 4.6. Početnice su rutinski provjeravane PCR-reakcijom uz *Taq*[a] DNA-polimerazu. Ova polimeraza ne posjeduje lektorirajuću aktivnost te je korištena samo za provjeru početnica. Za umnažanje željenog slijeda koji će se koristiti u kloniranju korištena je komercijalno dostupna *Pfu*[b] DNA-polimeraza. Za razliku od *Taq, Pfu* DNA-polimeraza posjeduje 3'→5'-egzonukleaznu aktivnost te može ispraviti unesenu pogrešku. Ponekad se koristi kombinacija tih dviju

[a] Skraćenje prema *Thermus aquaticus*.
[b] Skraćenica prema *Pyrococcus furiosus*.

polimeraza[a] pri čemu *Taq* pridonosi brzinom (sposobna je amplificirati 1 kb u manje od minute, dok *Pfu* umnaža slijed dvostruko sporije), a *Pfu* točnošću (ova polimeraza griješi s učestalošću od $1{,}3 \cdot 10^{-6}$, dok *Taq* DNA-polimeraza ugrađuje pogrešni nukleotid za red veličine češće, $2{,}2 \cdot 10^{-5}$). Svaka polimeraza posjeduje optimum kod drukčijih uvjeta i različito je osjetljiva na kvalitetu korištenih početnica. Slika 4.6 (a i b) prikazuje uhodavanje PCR-reakcije za deletant ΔN_{tot}-MtArgRS: u ovom slučaju koncentracija uzvodne početnice optimalne za reakciju *Taq* DNA-polimerazom (1 μmoldm^{-3}) niju prikladna za umnažanje željenog slijeda *Pfu* polimerazom (slika 4.6 a). Također, promjena uvjeta rezultira nastankom željene DNA u reakciji *Pfu* polimeraze (smanjenje uzvodne početnice na 0,5 μmoldm^{-3}), ali ne i u reakciji s tzv. "mješavinom visoke vjernosti" (kombinacija polimeraza *Taq* i *Pfu* u omjeru 1:9 u korist *Taq* DNA-polimeraze[b]).



Slika 4-6. Pregled koraka tijekom kloniranja. (A i B) Uhodavanje reakcijskih uvjeta za lančanu reakciju polimeraze kod mutanta ΔN_{tot}MtArgRS. Identični uvjeti u reakciji *Taq* polimeraze i *Pfu* DNA-polimeraze dovode do izostanka umoženog slijeda kod lektorirajuće polimeraze (A). Promjenom uvjeta moguće je potaknuti *Pfu* DNA-polimerazu, no isti uvjeti ne vrijede za tzv. "mješavinu visoke vjernosti", odn. kombinaciju *Taq* i *Pfu* DNA-polimeraze (v. tekst). (C) Rezultat lančane reakcije lektorirajućom polimerazom kod istaknutih mutanata. Može se zapaziti varirajuća količina dimera početnica (eng. *primer dimer*) pri dnu gela. Marker mase je linearna DNA duga 800 pb (D) Provjera uspješnosti ugradnje skraćenog slijeda u ekspresijski vektor. Razgradnja stvorenog pET28-ΔN_{tot}-MtArgRS endonukleazama *Nde*I i *Xho*I uzrokuje izbacivanje umetnute kasete. Za kontrolu nanesen je prazni vektor pET15b linearizirani radom endonukleaze *Nde*I. Na svim slikama oznaka λ/*Hind*III stoji za linearizirani genomsku DNA faga λ restrikcijskom endonukleazom *Hind*III. Veličina tako generiranih fragmenata iznosi redom 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 i 125 parova baza. Potonje dvije vrpce se zbog male veličine[c] ne vide niti na jednom od gelova.

[a] Doduše, stopa greške u mješavini *Taq* i *Pfu* DNA polimeraza ispostavlja se da je 3-4 puta manja nego stopa greške same *Taq* DNA polimeraze, ali 3–4-fputa veća nego kod same *Pfu* DNAimeraze[162].

[b] Omjer se odnosi na omjere jedinica aktivnosti, a ne stehiometrijski odnos budući da proizvođači koncentracije enzima koji se koriste pri postupcima kloniranja iskazuju putem jedinica, a ne množinskih koncentracija.

[c] Manji broj nukleotida ugrađuje manji broj molekula etidij-bromida. Mali fragmenti se mogu stoga vizualizirati ukoliko se nanose u većoj koncentraciji na gel.

4.3 Proizvodnja rekombinantnih makromolekula heterolognom ekspresijom u E. coli

Arheja *M. thermautotrophicus* pripada skupini termofilnih, halotolerantnih organizama. Općenito, enzimi termofilnih organizama predstavljaju izvrsne kandidate za strukturna istraživanja (posebice kristalizaciju) budući da su tijekom postupaka pročišćavanja i tijekom samog trajanja kristalizacije manje podložni denaturaciji. Stoga ne čudi da broj sljedovnih i strukturnih informacija za proteine iz (hiper)termofilnih izvora daleko nadmašuje broj onih iz mezofilnih organizama. Ovdje istraživani enzimi MtSerRS i MtArgRS također su pokazali izvjesnu robusnost koja je, primjerice, omogućila pročišćavanja tih proteina na temperaturama između 10 i 25 °C.

Postoji dosta veliki broj faktora (na razini primarne i tercijarne strukture) koji doprinose visokoj unutrašnjoj termalnoj stabilnost proteina iz termofilnih izvora. Najuočljiviji je zasigurno nedostatak otapalu izloženih omči/petlji na površini proteina. Tipična je i povećana pojavnost hidrofobnih aminokiselina s razgranatim bočnim ograncima, kao i veća količina (nabijenih) polarnih aminokiselina u odnosu na nepolarne. Elektrostatske interakcije poput ionskih mostova i mreža takvih mostova kod termofilnih proteina doprinose inherentnoj stabilnosti. Razgranate nepolarne aminokiseline ojačavaju hidrofobnu srž takvih proteina. Nedostatak površinskih petlji smanjuje konformacijsku entropiju što dodatno povećava stabilnost takvih polipeptida kod visokih temperatura.

Sasvim je jasno da ekstremni uvjeti u kojima, npr., termofilne metanogene arheje žive zahtijevaju i adaptaciju aminokiselinskog slijeda i stabilizaciju metabolitima/kofaktorima i prisustavo šaperona, itd. kako bi se spriječila denaturacija ovih biomakromolekula u ekstremnim uvjetima. No, za rad u laboratoriju dodatni stabilizirajući agensi nisu potrebni: čak i ukoliko se s ovim proteinima radi na sobnoj temperaturi oni pokazuju izuzetnu izdržljivost. Upravo je zbog toga prisutan zaista veliki broj riješenih kristalnih struktura: u slučajevima kada je za eksperiment (poput kristalizacije) potrebno nekoliko dana ili tjedana (ponekad čak i dulje) rezilijentni termofilni proteini predstavljaju izvrsne kandidate.

4.3.1 Pročišćavanje rekombinantnih enzima s privjeskom

U tablici 4.1 navedeni su korišteni oblici arginil- i seril-tRNA-sintetaze, odn. konstrukti gena s različitim kombinacijama privjesaka. U svim slučajevima, enzimi od interesa umnoženi su prekomjernom ekspresijom u stanicama *E. coli* BL21. Iz pregleda različitih konstrukata uočljivo je kako je za heterolognu ekspresiju rekombinantnih proteina u bakteriji *E. coli* u

ovom radu pretežito korišten pET- te, manje, pGEX-ekspresijski sustav. Potonji je pritom korišten isključivo za proizvodnju fuzijskog oblika GST-ArgRS koji olakšava vizualizaciju ovog proteina u testu supročišćavanja (v. kasnije).

Jedan od (neželjenih) izazova koji proteini arhejskog izvora ipak predstavljaju jesu njihovi nukleotidni sljedovi. Naime, kod različitih ogranizama postoji različita "pristranost prema kodonu" (eng. *codon bias*), u skladu s kojim je prilagođena i količina pripadajućih izoakceptora tRNA. Stoga, prilikom heterologne ekspresije zbog nedostatka/nedovoljne zastupljenosti određenog tRNA-izoakceptora, translacija heterologne mRNA može dovesti do ribosomskog zastajkivanja (eng. *ribosome stalling*) što bakterijski domaćin lako prepoznaje te usmjerava takav polipeptidni slijed na razgradnju[a]. Osim pristranosti kodonu, kod arheja postoji razmjerno česti start-kodon UUG (umjesto normalnog AUG). Kodon UUG se kod *E. coli* čita kao leucin te se, čak i ako sinteza polipeptida uspije započeti s nekog metioninskog ostatka kodiranog unutar vektora, na kraju dobiva (neželjeno) mutirani protein. Za izbjegavanje ovakvih fenomena može se rabiti tzv. *codon harmonization* (izmjena "problematičnih" kodona onima koji su česti kod domaćina u kojemu će se ekspresija odvijati) ili, jednostavnije, sojevi domaćina s genima za dodatne izoakceptore tRNA. U ovom radu rabljen je soj BL21 *Rosetta* koji na na dodatnom plazmidu nosi gene za rijetke argininske (AGG/AGA, CGG), izoleucinske (AUA), leucinske (CUA), prolinske (CCC) i glicinske (GGA) izoakceptore. Upotreba ovog soja omogućila je proizvodnju divljeg tip enzima MtArgRS s vektora pET28b, a koji se u soju *E. coli* BL21 uopće nije sintetizirao.

Prekomjerna ekspresija svakog proteina u stanicama *E. coli* BL21 *Rosetta* odvijala se na identičan način: stanicama je dodan željeni antibiotik (ampicilin za konstrukte ugrađene u pET21, pProEx-Htb i pGEX-vektore te kanamicin za konstrukte ugrađene u pET28 vektor) do finalne masene koncentracije od 50 μg mL^{-1} (ampicilin), odn. 25 μg mL^{-1} (kanamicin) te antibiotik kloramfenikol do finalne masene koncentracije od 17 μg mL^{-1}. Kloramfenikol potiče zadržavanje ekstrakromosomskog elementa na kojemu se nalaze smješteni geni za rijetke izoakceptore tRNA, a ampicilin ili kanamicin zadržavanje vektora na kojemu je smješten gen s ugrađenim *argS*- ili *serS*-genom. Navedene koncentracije antibiotika predstavljaju dvostruko manju koncentraciju od one uobičajene što je standardni postupak u slučajevima kada se rabi kombinacija nekoliko antibiotika. Proizvodnja proteina potaknuta je dodatkom IPTG-a do finalne koncentracije od 0,3 mmol dm^{-3}, u trenutku kada je bakterijska kultura dosegla optičku gustoću od 0,45 - 0,6.

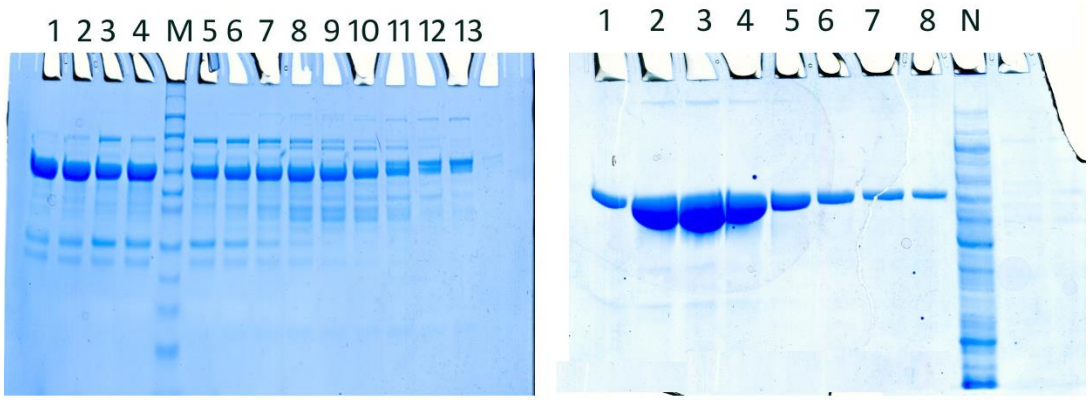
[a] Npr. u sustavu tmRNA obilježeni protein razgrađuje se proteazom ClpXP.

S obzirom na tip upotrijebljenog konstrukta, po umnažanju rekombinantnog proteina pristupalo se pročišćavanju istog metodama afinitetne kromatografije (proteini s privjeskom) ili ionske izmjene (nativni oblik rekombinantnog proteina). Prilikom pročišćavanja proteina s heksahistidinskim afinitetnim privjeskom za postupak lize stanica korišten je istovjetni pufer kao za vezanje proteina na smolu (za točan sastav v. Materijali i metode). Ovaj pufer sadržavao je visoku koncentraciju soli (0,5 mol dm^{-3}) čime se olakšava otvaranje stanica i sprečava agregacija proteina, malu količinu glicerola (tipično oko 5 %) koji služi povećanju topljivosti proteina te imidazol u koncentraciji 10 mmol dm^{-3} kojemu je zadaća umanjiti nespecifično vezanje staničnih proteina na stacionarnu fazu.

Slika 4.7 lijevo ilustrira rezultat pročišćavanja proteina MtArgRS-his_6. Po nanašanju staničnog lizata s MtArgRS-his_6, stupac je najprije ispran puferom niske koncentracije imidazola (10 mmol dm^{-3}). Puferom nešto više koncentracije imidazola (30 mmol dm^{-3}) potom su uklonjeni oni proteini u smjesi koji posjeduju nešto više histidina u svom sastavu, a koji se mogu relativno dobro vezati za niklene ione stacionarne faze. Naposljetku, elucija istraživanih proteina (ovdje MtArgRS-his_6) izvršena je dodatkom pufera s visokom koncentracijom imidazola (250 mmol dm^{-3}). Slobodni imidazol kompetira za vezanje na Ni^{2+}-ione te istiskuje rekombinantni protein. U puferu za eluciju nije dodavan Tris-HCl, budući da sami imidazol ovdje funkcionira kao puferirajući agens i održava fiziološki pH otopine. Na slici 4.7 dan je rezultat SDS-PAGE s frakcijama u kojima se nalazi eluirani rekombinantni enzim MtArgRS-his_6. Kromatografija na Ni-NTA-agarozi ovdje je napravljena uz pomoć komercijalno pakirane afinitetne smole. Iako se takav sustav lako može automatizirati (montiranjem kolone na peristaltičku pumpu ili HPLC-uređaj), bez iznimke je preparacija proteina slabije pročišćena, nego kada se pročišćavanje izvodi s ručno pakiranim kolonama (stacionarna faza nanesena unutar plastičnog stupca uz protok uvjetovan gravitacijom). Vjerojatni razlog tomu je nemogućnost prilagođavanja volumena pretpakirane kolone količini rekombinantno protizvedenog proteina; naime, čistoća preparacije pozitivno je korelirana sa stupnjem zasićenosti Ni-NTA-smole rekombinantnih proteinom koji lakše i bolje istiskuje nespecifično vezane celularne proteine negoli slobodni imidazol[a]. S obzirom na pokretljivost proteinskih standarda (jažica M, marker masa) vidi se da dominantna vrpca u eluiranim frakcijama sadrži protein od približno 65 kDa (što je masa MtArgRS-his_6). Također, uočljiva je pozamašna količina bakterijskih proteina koji su se uspjeli zadržati na afinitetnoj smoli do

[a] A koji je standardno prisutan u puferima za pročišćavanje na Ni-NTA-agarozi upravo zbog smanjivanja nespecifičnog vezanja prisutnih proteina domaćina.

trenutka elucije. U ovakvim slučajevima pristupalo se dodatnom kromatografskom koraku (tipično izmjeni na anionskom izmjenjivaču, slika 4.7 desno).



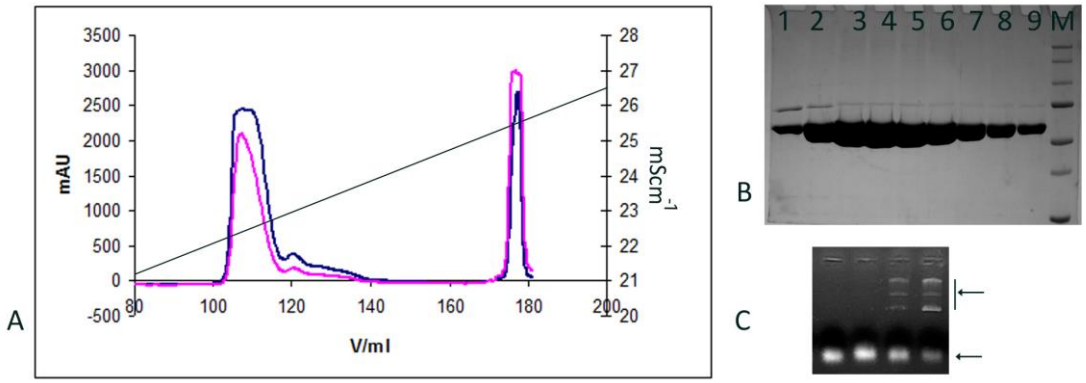
Slika 4-7 Pročišćavanje MtArgRS-his$_6$ afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozi (lijevo) te na jakom anionskom izmjenjivaču MonoQ (desno). Brojevi se podudaraju s rednim brojem frakcija tijekom elucije. M, marker; N-nevezana frakcija, Gelovi su obojani bojom *Coomassie Brilliant Blue*.

Desni dio slike 4.7 prikazuje taj dodatni kromatografski korak: pročišćavanje na jakom ionskom izmjenjivaču MonoQ. Svi proteini rabljeni u ovom radu su kiseli, s pI oko 5. Stoga se mogu stabilno vezati na anionski izmjenjivač te se eluiraju kasno u gradijentu soli prilikom pročišćavanja. To uvelike potpomaže njihovo pročišćavanje, budući da je velika većina bakterijskih proteina (tj. proteina domaćina *E. coli*) također kisela, ali manje nego istraživani proteini.

Za eksperimente u kojima je istraživana dinamika sklapanja binarnog kompleksa MtArgRS:MtSerRS u prisustvu pripadnih supstrata kontaminacija molekulama tRNA predstavlja značajan problem. Analizom pročišćenih proteina MtArgRS i MtSerRS nakon kromatografije na Ni-NTA-smoli na nativnom poliakrilamidnom gelu moguće je zapaziti da se dio proteina izolira u kompleksu s bakterijskom tRNA (nije prikazano). Naime, jedno od obilježja istraživanih enzima MtSerRS i MtArgRS je i relaksirana specifičnost u prepoznavanju tRNA^{Ser}, odn. tRNA^{Arg}. Obje sintetaze sposobne su vezati i aminoacilirati bakterijske tRNA serinske/argininske specifičnosti[14] te iz tog razloga dolazi do supročišćavanja endogene bakterijske tRNA^{Ser}/tRNA^{Arg} tijekom afinitetne kromatografije. Slika 4.8 prikazuje kromatografiju MtSerRS na jakom anionskom izmjenjivaču uz praćenje apsorbancije pri 280 (detekcija aromatskih bočnih ogranaka u proteinu, dominantno Trp i Tyr) te 260 nm (detekcija nukleinskih kiselina, preciznije njihovih baza). Osim dominantnog apsorpcijskog maksimuma s dominantnom apsorbancijom pri 280 nm[a], na kraju gradijenta soli zapaža se dodatna populacija molekula s visokim omjerom 260/280. Elektroforeza na

[a] Na slici se zapravo ne može uočiti da je A_{280} veći od A_{260} jer je 3000 mAU u blizini praga detekcije UV-detektora HPLC-uređaja. Stoga dolazi do "rezanja" maksimuma apsorbancije te on više naliči platou.

agaroznom gelu otkriva da je u tim frakcijama prisutna tRNA te nešto nukleinskih kiselina veće molekulske mase.



Slika 4-8 Endogena bakterijska $tRNA^{Ser}$ veže se na MtSerRS i kopurificira tijekom afinitetne kromatografije. (A) Pročišćavanje MtSerRS-his_6 na jakom anionskom izmjenjivaču MonoQ. Plavom bojom zabilježena je apsorbancija pri 280, a ružičastom pri 260 nm. Prvi dominantni maksimum na gradijentu soli posjeduje svojevrsni plato koji je posljedica prekoračenja apsorbancije na 280 nm iznad praga detektora. (B) Analiza SDS-PAGE sakupljenih frakcija ispod prvog dominantnog maksimuma (V_e između 100-120 mL). Redni broj frakcija podudara se s kronološkim redoslijedom elucije unutar tog raspona volumena. Gel je obojan bojom *Coomassie Brilliant Blue*. (C) Analiza frakcija s visokim omjerom 260/280 nm (posljednji dominantni šiljak u kromatogramu) agaroznom elektroforezom. Najniža strelica upućuje na pokretljivost koja odgovara molekulama tRNA. Tri vrpce slabije pokretljivosti (gornja strelica) najvjerojatnije sadrže 5S i 16 S rRNA te, potencijalno fragmente 23 S rRNA ili čak bakterijske genomske DNA. Uzorci su detekcirani pobudom fluorescencije etidij-bromida.

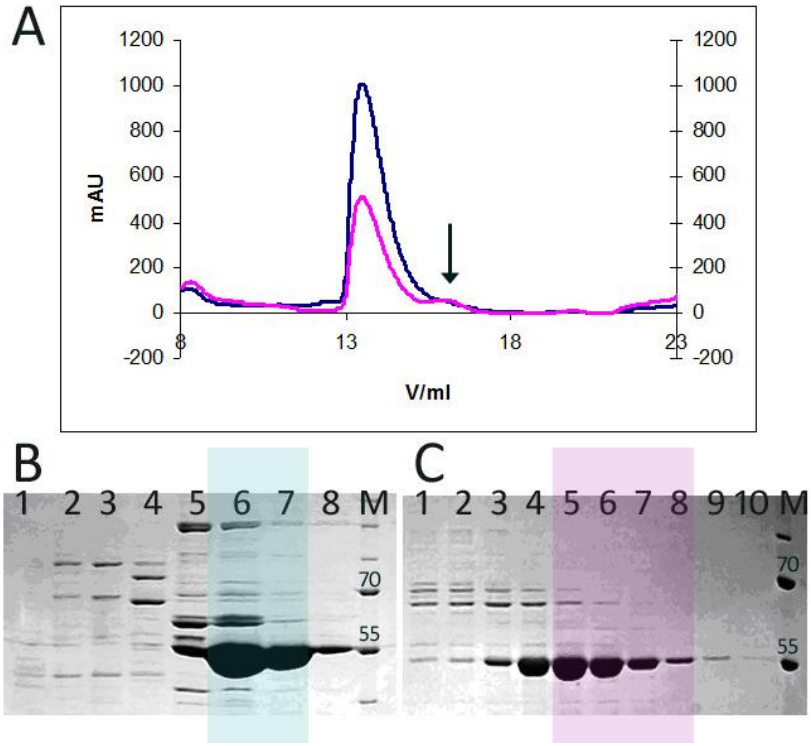
Kao što je ranije spomenuto, krnje varijante MtArgRS proizvedene su s ciljem mapiranja interakcije s proteinskim partnerom MtSerRS. Kako je jedna od najrasprostranjenijih metoda za detekciju protein-protein interakcija metoda afinitetnog supročišćavanja (eng. *pull down*), geni za krnje proteine ciljano su uneseni u vektore pET21 i pET28. Takva ugradnja omogućava heterolognu ekspresiju fuzijskih proteina s N-terminalnom heksahistidinskom sekvencom (pET28), odn. nativnih oblika proteina (bez ikakvog privjeska, pET21). Jednom kada su takve inačice eksprimirane u obje varijante, supročišćavanje s proteinskim partnerom može se provjeriti u obje kombinacije: zadržavanje krnje, nativne varijante MtArgRS na MtSerRS-his_6 imobiliziranom na Ni-NTA-agarozi, i obrnuto, zadržavanje nativnog oblika MtSerRS bilo kojom od inačica MtArgRS-his_6 vezanom na Ni-NTA-smolu.

Pročišćavanje krnjih varijanti i MtSerRS bez privjeska dugotrajnije je nego kod fuzijskih proteina. Tipično je bakterijski lizat s proteinom od interesa najprije razdvojen na slabom ionskom izmjenjivaču DEAE-sefarozi (HiPrep DEAE FF 16/10). U ovom koraku ne može se postići veliko razdvajanje željenog proteina od bakterijskih, ali se moguće riješiti drugih kontaminacija (zapravo svih topljivih komponenti bakterijskog citosola, budući da ih nije moguće ukloniti centrifugiranjem), uključujući i nukleinske kiseline (značajno jače se vežu na

stupac anionskog izmjenjivača zbog velike količine negativnog naboja koji nose). Nakon ovog koraka, analizom SDS-PAGE procijenjen je sadržaj sakupljenih frakcija te su one s željenim proteinom ugušćene ultrafiltracijom na centrikonu i ponovo podvrgnute kromatografiji, ovaj put na jakom anionskom izmjenjivaču (MonoQ HR 5/5). Kako bi se olakšalo nanašanje smjese na ionski izmjenjivač, tj. omogućilo vezanje proteina, stanice su ovaj put lizirane u puferu niske ionske jakosti (tipično je pufer sadržavao 50 mmol dm^{-3} NaCl, detaljnije v. Materijali i metode). Proteini su potom razlučeni u gradijentu NaCl 50 mmoldm^{-3} – 600 mmol dm^{-3}, pri čemu su se nativni oblik MtSerRS, kao i krnji oblici MtArgRS, jednako kao ranije, eluirali pri ili na samom kraju gradijenta soli. Kromatogram pročišćavanja nativnih rekombinantnih oblika nije prikazan, već je samo dana analiza sakupljenih frakcija denaturirajućom elektroforezom SDS-PAGE. Prikazane su samo frakcije sakupljene ispod dominantnog maksimuma, jednako kao ranije. Može se uočiti kako pročišćavanje na jakom ionskom izmjenjivaču još uvijek ne rezultira zadovoljavajućom čistoćom proteina (slika 4.9 B).

S obzirom da uzorak i dalje nije pokazivao dovoljan stupanj čistoće pristupilo se gel-filtraciji. Reprezentativni kromatogram gel-filtracije (ovdje krnji oblik Δ89-MtArgRS) dan je na slici 4.9 A. Analiza sakupljenih frakcija (slika 4.9 C) pokazuje da se na kraju može dobiti dosta čisti protein, i s aspekta proteinskih kontaminacija, ali i onečišćenja u vidu bakterijske tRNA[a]. Niski omjer 260/280 sugerira da je protein lišen kontaminacije nukleinskom kiselinom. Zanimljivo je zapaziti da se pri volumenu elucije od 15 mL nalazi niski maksimum apsorbancije (otprilike 5% glavnog maksimuma apsorbancije, na slici 4.9 A označen strelicom). To je inače isti volumen u kojemu se eluira tRNA što sugerira da i prilikom purifikacije krnjih varijanti dolazi do supročišćavanja endogene, bakterijske tRNA (ovdje sastav tog maksimuma nije dodatno analiziran).

[a] Krnji oblici, jednako kao i MtArgRS, supročišćavaju se s endogenom tRNA *E. coli*.



Slika 4-9. Pročišćavanje nativnog oblika krnjeg oblika MtArgRS, Δ89-MtArgRS. (A) Kromatogram završnog koraka, gel-filtracije. Shema boja dviju apsorbancija ista je kao ranije, plavo za A_{280}, ružičasto za A_{260}. Strelica pokazuje na položaj koji odgovara V_e=15 mL, što je volumen elucije za molekule tRNA. Donji dio panela prikazuje stupanj čistoće rekombinantnog proteina Δ89-MtArgRS prije (B) i nakon (C) gel-filtracijskog koraka. (B) SDS-PAGE analiza sakupljenih frakcija nakon pročišćavanja na MonoQ HR 5/5. Plavo su zaokružene bogate frakcije koje su ugušćene i nanesene na gel-filtracijsku kolonu Superdex 200 HR 10/300. (C) Sakupljene frakcije nakon gel-filtracije na koloni Superdex 200 HR 10/300. Ružičasto zakružene frakcije su one koje su po kromatografiji ugušćene i pohranjene. Brojčane oznake jažica koreliraju s redoslijedom sakupljenih frakcija pri navedenom tipu kromatografije. Oznaka M stoji za marker masa, pri čemu su vrpce koje odgovaraju standardnima masa 55 i 70 kDa dodatno označene.

4.3.2 Pročišćavanje tRNA dobivene uzgojem *in vivo*

Za dobivanje veće količine tRNA u laboratoriju se najčešće ove molekule proizvode transkripcijom *in vitro* (radom T7 RNA polimeraze), nadekspresijom s ekspresijskog vektora u domaćinu poput *E. coli* te, rjeđe, kemijskom sintezom[a]. Pokušaj transkripcije *in vitro* kod $MttRNA^{Arg}$ rezultira neaktivnim transkriptom, vjerojatno zbog nedostatka posttranskripcijskih modifikacija. Modifikacije mogu biti presudne za prepoznavanje od strane pripadne aminoacil-tRNA-sintetaze (dakle, predstavljaju jednu od nukleotidnih determinanti) ili pak mogu biti nužne za ispravno smatanje i/ili stabilnost molekule. U ovom radu primjenjena je proizvodnja željenih tRNA ($MttRNA^{Arg}$ i $MttRNA^{Ser}$) prekomjernom ekspresijom u soju *E. coli* BL21. Tijekom ekspresije proizvedeni se transkript modificira domaćinovom

[a] Kemijskom sintezom se zapravo sintetiziraju polovice tRNA-molekula koje s potom ligiraju T4 ligazom.

modificirajućom mašinerijom. Problem nastaje zbog nemogućnost sinhronizacije rada T7 RNA-polimeraze (koja proizvodi heterologni transkript) u odnosu na enzime zadužene za uvođenje posttranskripcijskih modifikacija. Kao rezultat, producirana populacija željenih molekula tRNA često nije homogena po pitanju modificiranih nukleotida (v. kasnije).

Po nadekspresiji tRNA od interesa, otvaranju stanica i eliminaciji staničnih proteina ekstrakcijom, potrebno je iz smjese izoliranih nukleinskih kiselina izdvojiti tRNA, tj. tRNA od interesa. Nukleinske kiseline veće molekulske mase moguće je istaložiti dodatkom polietilen-glikola do konačnog udjela od 8-10% u prisustvu visoke koncentracije soli. U ovom koraku dolazi i do djelomičnog taloženja tRNA što osiromašuje prinos[a]. Dodatno, u ovom koraku još ima prisutne kontaminirajuće rRNA, poglavito 5S rRNA koja, zbog slične veličine i strukture, predstavlja jedan od glavnih kontaminanata tijekom pročišćavanja. Također, zaostaju i stanični šećeri koje etanol taloži zajedno s nukleinskim kiselinama. Iz tog razloga dobro je primijeniti korak kromatografije na DEAE-sefarozi, čak i ukoliko ta kromatografija neće biti iskorištena za detaljnu separaciju pojedine vrste tRNA. U tom slučaju razdvajanje se može izvršiti u strmom gradijentu soli, tijekom kojeg se uspješno može odvojiti šećere (ne vežu se na stupac), a djelomice i nukleinske kiseline veće molekulske mase (eluiraju se na samom kraju gradijenta).

Kromatografija na DEAE-sefarozi može se izvesti pri različitim vrijednostima pH[b] zbog čega dolazi do različitog redoslijeda eluiranja vrsta tRNA. Ova vrsta kromatografije može dobro razdvojiti pojedine vrste tRNA, ali su za to potrebni izrazito plitki gradijenti i dugo vrijeme izvođenja kromatografije. Prisutnost magnezijevih iona u kromatografskim puferima oslabljuje rezoluciju pa ih je važno izostaviti. Za pročišćavanje veće količine heterologne tRNA, a koja ne mora biti uniformna po pitanju posttranskripcijskih modifikacija, kromatografija na slabom izmjenjivaču DEAE-sefarozi koristila se u paru s gel-filtracijom. Slika 4.10 A prikazuje kromatogram dobiven snimanjem profila apsorbancije tijekom gel-filtracije jedne unaprijed[c] dobro pročišćene preparacije $MttRNA^{Arg}$. Može se zapaziti da se zaostale nukleinske kiseline veće molekulske mase eluiraju pri volumenima elucije od 12, odn. 14 mL. Ukupna izolirana tRNA silazi pak pri V_e=15 mL. Sakupljene frakcije (V_e 14 do 17 mL, slika 4.10B) analizirane su denaturirajućom PAGE u prisustvu ureje. Vidljivo je da je naneseni uzorak sadržavao malu količinu 5S rRNA koja se tijekom gel-filtracije eluira ipak

[a] Taloženje nukleinskih kiselina većih molekulskih masa je to bolje što je udio PEG-a veći, ali s većim udjelom PEG-a taloži i više rekombinantne tRNA. Stoga je najčešće taloženje izvršeno uz 9% PEG, kao kompromis između čistoće i prinosa koji se u ovom koraku pročišćavanja može postići.

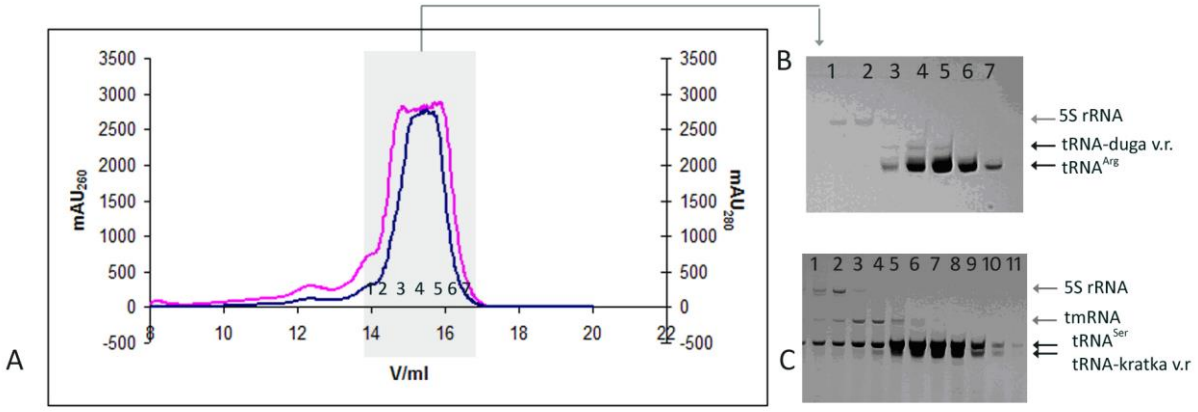
[b] Tipično pri pH 4,5 i pH 7.

[c] Tj. u prethodnom kromatografskom koraku na DEAE-sefarozi.

nešto ranije od tRNA (frakcije 1 i 2, V_e 14, ond. 14,5 mL). Bogate frakcije 4, 5 i 6 (koje sadržavaju redom 64, 81, 88 % $tRNA^{Arg}$) još uvijek su djelomice onečišćene drugim izoakceptorima tRNA što se može uočiti s obzirom na izračunato obogaćenje, ali i prisutnost vrpci drukčije pokretljivosti na denaturirajućem gelu (slika 4.10 B). Molekule $MttRNA^{Arg}$ pripadaju većinskoj skupini tRNA s kratkom varijabilnom rukom, zbog čega se kontaminacija endogenim molekulama tRNA *E. coli* na temelju denaturirajuće PAGE teško može procijeniti[a]. Svejedno, moguće je uočiti tRNA koje posjeduju dugu varijabilnu ruku i čija je vrpca još uvijek vidljiva.

Obogaćenje frakcija iznad 65-70% bilo je dostatno za većinu biokemijskih pokusa te ga se moglo postići dobro tempiranim poticanjem ekspresije, nešto produljenim vremenima ekspresije (4 sata naviše), taloženjem većih nukleinskih kiselina nešto većom koncentracijom polietilen-glikola te plićim gradijentom soli tijekom kromatografije ne DEAE-sefarozi. Da o ugrađanju ovih koraka prije koraka gel-filtracije zavisi konačna čistoća pročišćene heterologne tRNA vidljivo je iz slike 4.10 C. Tu je prikazan rezultat denaturirajuće PAGE sakupljenih frakcije tijekom gel-filtracije uzorka izolirane tRNA obogaćene heterolognim transkriptom $MttRNA^{Ser}$. Tom koraku prethodilo je taloženje uz 7 % polietilen-glikola te kromatografija na DEAE-sefarozi u strmom gradijentu pri pH 5,1. Vidljivo je da je u ranijim frakcijama (1-5) prisutno još dosta 5S rRNA (vršna siva strelica upućuje na tu vrpcu), kao i bakterijske tmRNA (vrste intermedijerne pokretljivosti u odnosu na 5S rRNA i ukupnu tRNA; niža siva strelica). U bogatim frakcijama s $MttRNA^{Ser}$ (frakcije 6-9) još uvijek ima obilna količina neželjene bakterijske tRNA. Stupanj onečišćenja ovdje je lakše procjeniti zbog veće mase $MttRNA^{Ser}$, odn. prisustva duge varijabilne ruke kod te tRNA. Stoga je pri pročišćavanju tRNA na opisani način velika pažnja posvećena postizanju dobre ekspresije te koracima taloženja PEG-om i kromatografiji na slabom ionskom izmjenjivaču (DEAE-sefaroza). Za većinu biokemijskih pokusa ovako proizvedena tRNA bila je dostatnog stupnja čistoće, a u slučajevima kada se težilo postići sasvim homogenu populaciju heterologne tRNA (po pitanju aminokiselinske specifičnosti, ali i količine nadodanih posttranskripcijskih modifikacija) rabljena je kromatografija obrnutih faza.

[a] Osim ukoliko se ne koristi gel izrazito visokog umreženja. No, elektroforeza na gelovima s visokim umreženjem (11-12 % akrilamid-bisakrilamid) traje izrazito dugo (tipično 4 sata naviše) i nije primjenjiva za rutinsku detekciju obogaćenja frakcija molekulama tRNA od interesa.



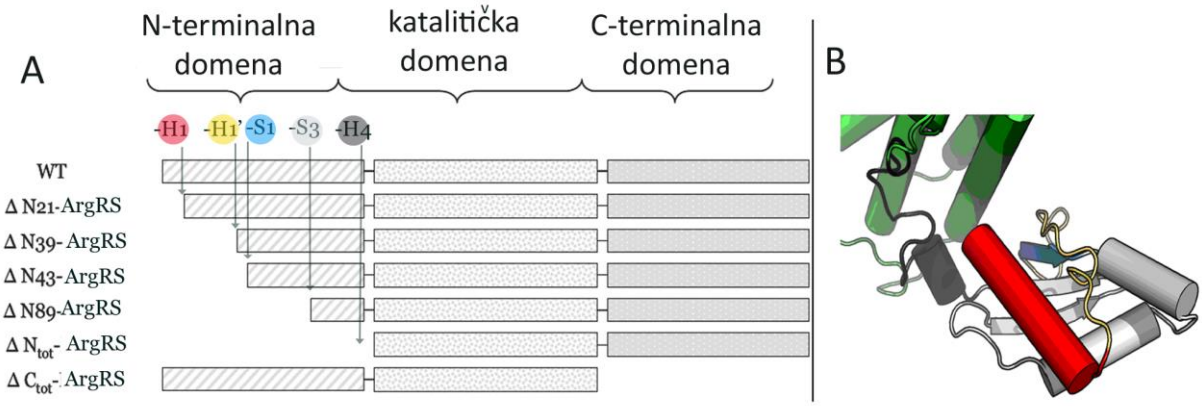
Slika 4-10 (A, B) Pročišćavanje MttRNA^{Arg} uzgojene heterolognom ekspresijom u domaćinu *E. coli* kombinacijom kromatografije na DEAE-sefarozi (nije prikazano) i gel-filtracije (A). (A) Reprezentativni kromatogram dobiven gel-filtracijom na koloni Superdex 200 HR 10/300 uzorka MttRNA^{Arg} ranije pročišćenog na DEAE-sefarozi. Redni broj sakupljenih frakcija indiciran je na kromatogramu; analizirane frakcije apostrofirane su sivim pravokutnikom. (B) Analiza sakupljenih frakcija denaturirajućom PAGE (V_e od 14 do 17 mL). (C) Sakupljene frakcije tijekom identičnog koraka gel-filtracija, ali uz slabije pročišćeni uzorak MttRNA^{Ser} (v. tekst). Strelicama (B i C) te pratećim tekstom označene su molekule tRNA od interesa (MttRNA^{Arg} kod B, MttRNA^{Ser} kod C). Prateća endogena tRNA s kratkom, odn. dugom rukom također je naznačena: skraćenica v.r. stoji za varijabilnu ruku. Gelovi su bojani toluidinskim modrilom.

4.4 Topološke odrednice kompleksa MtArgRS:MtSerRS

U sklopu ovog rada grube topološke odrednice kompleksa MtArgRS:MtSerRS identificirane su uklanjanjem elemenata arginil-tRNA-sintetaze i testiranjem takvih krnjih varijanti u vezanju proteinskog partnera. Potraga za zonom interakcije između makromolekulska partnera vrlo često uključuje ovdje iskorišteni pristup: mutacijom ili uklanjanjem nekog elementa prati se njegov utjecaj na stabilnost istraživane interakcije. Ukupno je generirano 6 krnjih oblika, a koji su kronološki nastajali na osnovu prethodnih rezultata (v. dalje).

Proteini kod kojih je uvedeno najveće skraćenje jesu ΔN_{tot}-MtArgRS i ΔC_{tot}-MtArgRS kojima su odstranjene čitave domene: domena za prepoznavanje D-omče, Add-1 (varijanta ΔN_{tot}-MtArgRS) te domena za prepoznavanje antikodona, Add-2 (varijanta ΔC_{tot}-MtArgRS). S obzirom na procijenjenu participaciju aminokiselina u predviđenim sekundarnim strukturama N-terminalne domene stvoreni su deletanti skraćeni za zavojnicu H1[a] (ΔN21MtArgRS), od N-kraja pa do omče koja slijedi iza prve zavojnice (ΔN39MtArgRS), od N-kraja pa do β-lanca S1 (ΔN43MtArgRS) te od N-kraja do β-lanca S3 (ΔN89MtArgRS). U notaciji broj stoji za broj uklonjenih aminokiselina. Linearna shema i trodimenzionalni položaj delecija prikazan je na slici 4.11.

[a] Kao što je spomenuto ranije, skraćenica H1 stoji za deletant kojemu je uklonjena prva zavojnica s N-kraja; S1 prvi β-lanac s N-kraja itd. Dakle, nakon jednoslovnog skraćenja koje simbolizira strukturu posljednjeg uklonjenog elementa navodi se redni broj te strukture s N-kraja proteina.



Slika 4-11 Linearna shema krnjih oblika MtArgRS testiranih u ovom radu (A) te trodimenzionalni smještaj uklonjenih elemenata Add-1 domene (B). (A) Razmještaj domena s N- prema C-kraju dan je iznad sheme. Kod N-terminalnih deletanata (ΔN21-ArgRS, ΔN39-ArgRS, ΔN43-ArgRS, ΔN89-ArgRS i ΔN_{tot}-ArgRS naznačan je smještaj posljednjeg (tj. najviše C-terminalno smještenog) elementa Add-1 domene koji je odstranjen. Shema boja slijedi onu u trodimenzionalnom prikazu pod B. Svaka oznaka odgovara elementu, jedino je omča uklonjena kod deletanta ΔN39-ArgRS označena s H1', budući da sama ne predstavlja posebni strukturni element, a H1 je jedina zavojnica koja joj prethodi. (B) Položaj uklanjanih elemenata unutar N-terminalne domene MtArgRS. Zavojnica H1 (prvih 21 aminokiselinu) označena je crveno, fleksibilna omča (aminokiseline 22-39) žuto, nit S1 (ostaci 40-43) plavo, elementi koji uključuju aminokiseline 44-89 svijetlo sivo. Posljednja zavojnica (uklonjena kod deletanta ΔN_{tot}-MtArgRS) obojana je tamno sivo. Vidljiv je dio C-terminalne (Add-2) domene u neposrednoj blizini, a s kojom N-terminalna domena ostvaruje slabe interakcije (zeleno).

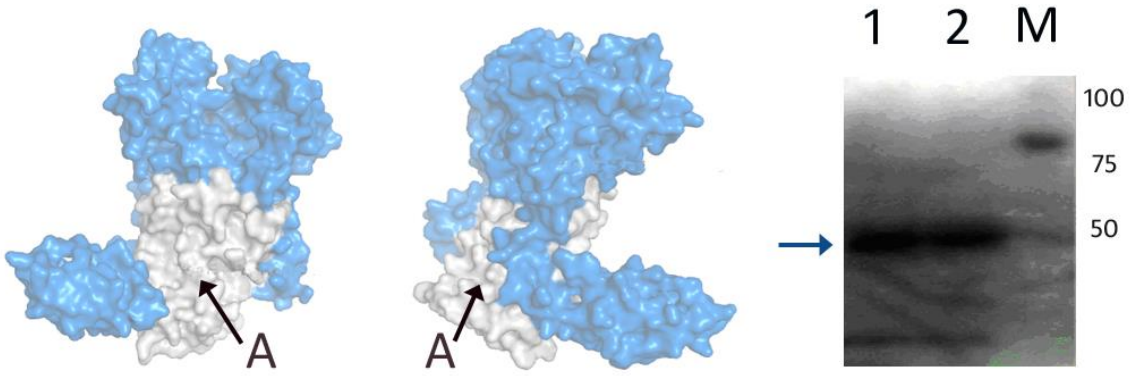
4.4.1 Proizvodnja mutantnih oblika

Skraćeni oblici MtArgRS proizvedeni su lančanom reakcijom polimeraze na kalupu pET28-MtArgRS. Početnice korištene za dobivanje odgovarajućeg skraćenog oblika MtArgRS dane su u poglavlju Materijali i metode. Prelimenarna potraga za zonom interakcije kod enzima MtArgRS uključivala je odstranjenje cjelovitih domena Add-1 (N-terminalna domena, kod arginil-tRNA-sintetaze tipično uključena u prepoznavanje identiteta A20 smještenog u D-omči $tRNA^{Arg}$, v. ranije) i Add-2 (domena za prepoznavanje antikodona). Budući da su odstranjene čitave domene takvi krnji oblici nazvani su ΔN_{tot}-MtArgRS (uklonjena Add-1), odn. ΔC_{tot}-MtArgRS (uklonjena Add-2 domena). Nažalost, uklanjanje helikalne C-terminalne domene imalo je poguban utjecaj na stabilnost danog enzima. Ekspresija se mogla potaknuti kod isključivo pri 37 °C[a], no sav rekombinantni protein deponirao se u inkluzijskim tijelima, budući da ga se po otvaranju stanica moglo zapaziti isključivo u netopljivom staničnom talogu, *Western*-analizom potvrđeno je da do ekspresije zaista dolazi (slika 4.12, desno).

Inkluzijska tijela predstavljaju oblik citosolnih agregata koji nastaju kao rezultat gomilanja djelomično smotanih proteina. Agregacija se temelji na udruživanju parcijalno smotanih proteina koji mogu stupati u uzajamne hidrofobne interakcije budući uslijed denaturacije dolazi do izlaganja dijela njihove hidrofobne srži. Kod ΔC_{tot}-MtArgRS problem moguće

[a] Osim pri 37, ekspresija je testirana pri temperaturama 18, 25 i 30 °C.

denaturacije vidljiv je iz položaja ove domene u tercijarnoj strukturi: za razliku od N-terminalne domene koja se ističe kao nezavisna globula, C-terminalna domena pozicionirana je izravno ispod katalitičke domene kao svojevrsni arhitektonski potporanj. Uklanjanjem ove domene oslobađa se kontaktna površina na granici između katalitičke i C-terminalne domene i vjerojatno je to uzrok nepravilnom smatanju ovakvog krnjeg oblika enzima (slika 4.12 lijevo).



Slika 4-12 (lijevo) Položaj domena kod modela proteina MtArgRS i simulirani efekt uklanjanja C-terminalne domene; uklonjena C-terminalna (Add-2 ili domena za prepoznavanje antikodona) domena prikazana je bijelom bojom te indicirana strelicom i slovom "A", a ostatak enzima plavom. (desno) *Western*-analiza staničnih ekstrakata *E. coli* BL21 kod kojih je potaknuta ekspresija ΔC_{tot}-MtArgRS. Jažica 1 sadrži stanični ekstrakt kulture koja je potaknuta na proizvodnju ΔC_{tot}-MtArgRS uz 0,1 mmol dm^{-3} IPTG, a jažica 2 ekstrakt kulture potaknute dodatkom 0,3 mmol dm^{-3} IPTG. Rekombinantni protein detektiran je pomoću primarnih antitijela koja prepoznaju heksahistidinski privjesak. M, marker molekulskih masa (mase su naznačene s desne strane fotografkog filma).

Nasuprot tomu, uklanjanjem N-terminalne domene dobiven je krnji oblik koji se eksprimirao obilato i u topljivom obliku. U testu afinitetnog supročišćavanja pokazano je da slabo ili nimalo veže MtSerRS. Istovremeno, mutant je oslabljeno vezao pripadnu tRNA i katalizirao arginilaciju oko stotinu puta lošije nego divlji tip.

Na osnovu ovih preliminarnih rezultata kreirani su novi skraćeni oblici s N-kraja (slika 4.11, tablica 4.1). Kako bi se oslabio mogući utjecaj delecija na stabilnost i smatanje skraćenih proteina skraćenja su uvedena na osnovu strukturnog modela MtArgRS. Bez obzira, ispravnost smatanja ovih varijanti arginil-tRNA-sintetaze testirana je snimanjem emisijskih fluorescencijskih spektara te mjerenjem termičke stabilnosti istih metodom cirkularnog dikroizma (v. dalje).

4.4.2 Potvrda ispravnog smatanja krnjih mutanata MtArgRS

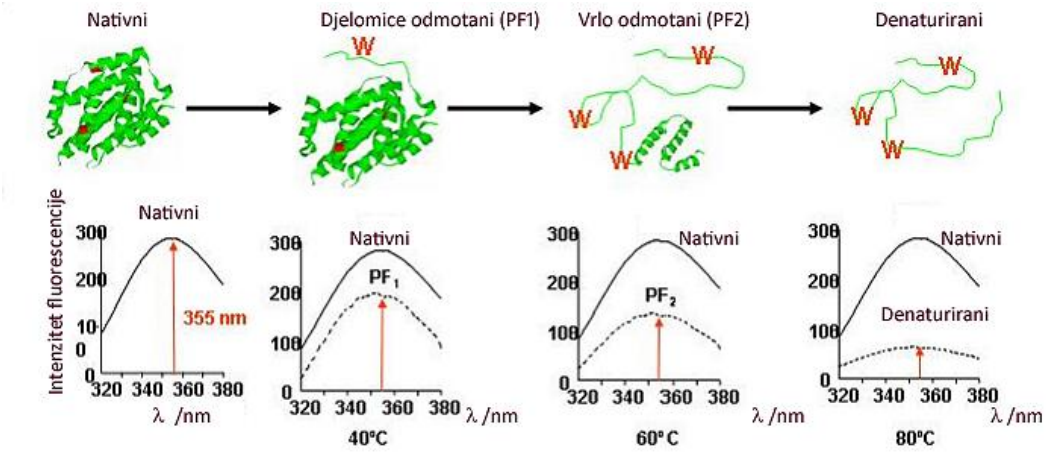
Prilikom istraživanja doprinosa pojedinih elemenata enzima bilo kojem istraživanom svojstvu istog važno je da sama promjena primarne (te posljedično sekundarne i tercijarne) strukture ne potiče denaturaciju proteina. Ukoliko delecija dovodi do kritične promjene konformacijskog

stanja molekule zapažena promjena u svojstvima (npr. afinitetu prema pripadnom ligandu) ne mora biti posljedicom nedostatka elementa zaduženog za prepoznavanje, već nastaje zbog promjene slobodne površine enzima izložene otapalu. U tom je slučaju efekt mutacije indirektan i nije mjera utjecaja uklonjenog elementa na prepoznavanje. Kod korištenih krnjih inačica enzima MtArgRS, tercijarna struktura proteina očuvana je u odnosu na divlji tip enzima ako je suditi prema intrinzičnoj fluorescenciji istih (slika 4.13)

Postoje tri aminokiseline sa svojstvima intrinzične fluorescencije: Phe, Tyr i Trp. Jedino se potonja dva koriste u eksperimentalne svrhe budući da je jedino kod njih kvantni prinos (omjer emitiranih i pobuđenih fotona) dovoljno visok i daje mjerljiv fluorescencijski signal. Dakle, intrinzična fluorescencija ograničena je na proteine koji posjeduju dane aminokiseline u svom primarnom slijedu. Pri ekscitacijskoj valnoj duljini od 280 nm dolazi do ekscitacije obje aromatske aminokiseline. S ciljem selektivnog pobuđivanja isključivo triptofana mora se koristiti valna duljina od 295 nm. Fluorescencija proteina tipično se rabi u studijama smatanja proteina (eng. *folding*) budući da se fluorescencijska svojstva (preciznije kvantni prinos) triptofanskih fluorofora mijenjaju s obzirom na lokalne promjene u "okolišu" (zakapanje/izlaganje otapalu), a koji su posljedica procesa smatanja ili denaturacije.

Tipično se u nativnim (smotanim) stanjima proteina Trp i Tyr nalaze zakopani u hidrofobnoj unutrašnjosti. Kako postepeno denaturacija proteina napreduje, triptofanski ostaci smješteni u unutrašnjosti dolaze na površinu (proteina) te postaju izloženi otapalu.

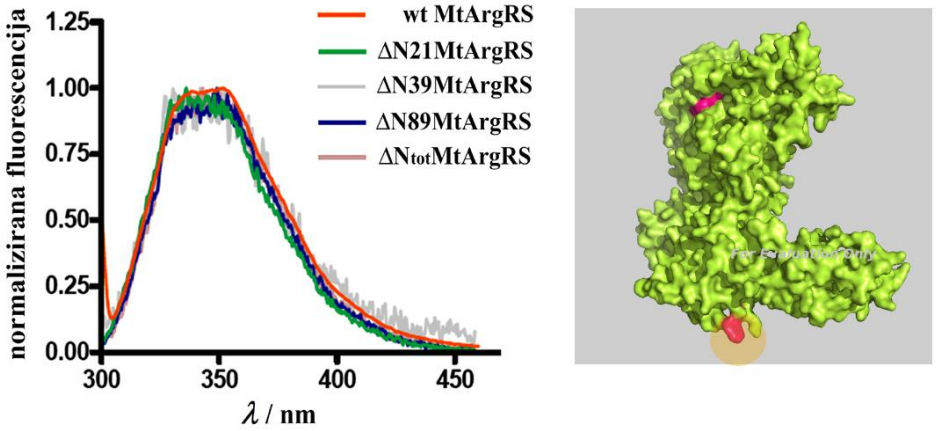
Denaturacijom se mijenja intenzitet fluorescencije (FI), kao i maksimalna valna duljina emisije (λ_{max}) ukoliko se Trp koristi kao praćeni fluorofor (v. slika 4.13). Praćenjem promjene u ovom parametru (FI ili λ_{max}) moguće je napraviti krivulju denaturacije iscrtavanjem ovisnosti FI ili λ_{max}) o temperaturi (ili drugom denaturirajućem reagensu).



Slika 4-13. Shema fluorescencijskih spektara dobivenih tijekom denaturacije proteina s tri zakopana triptofanska ostatka.

Dodatak kiseline ili povišenje temperature dovodi do denaturacije proteina što se, dakle, da razlučiti iz promjene u njihovim fluorescencijskim spektrima, tj. u intenzitetu fluorescencije te maksimalnoj valnoj duljini. Uvođenje mutacija / delecija može također djelovati kao denaturirajući "agens" budući da se uklanjanjem elemenata gube uspostavljene vodikove veze, ionski parovi, van der Waalsove interakcije, tj. niz interakcija evolucijski ugođenih s ciljem stabilizacije danog proteina.

Arginil-tRNA-sintetaza posjeduje četiri triptofanska ostatka a koji se redom nalaze na položajima 171, 256, 434 i 473. Uvedene delecije ne uklanjaju niti jedan od 4 triptofana. Samo jedan od navedenih Trp izložen je otapalu (slika 4.14 desno). Izloženi i zakopani triptofanski ostaci posjeduju jako različit emisijski maksimum (λ_{max}=355 nm kod površinskih, otapalu izloženih Trp, odn. λ_{max}=335 nm za zakopane istoimene ostatke).

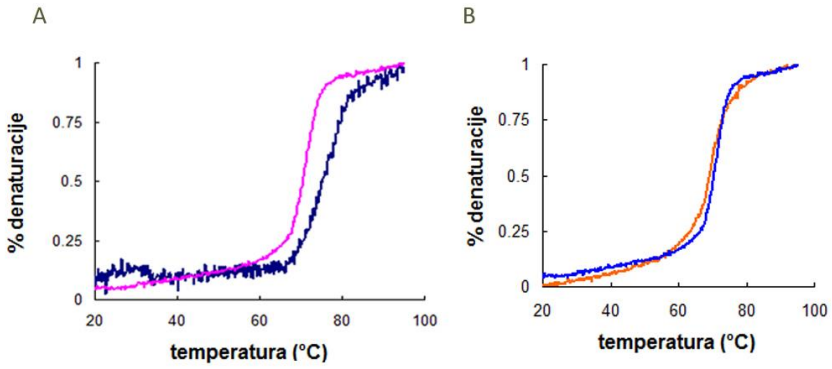


Slika 4-14 Emisijski fluorescencijski spektri MtArgRS i krnjih varijanti (lijevo). Pobuda je izvršena kod 295 nm kako bi se potakla isključivo fluorescencija triptofana. Položaj jedinog izloženog triptofanskog ostatka (u narančastom krugu) kod divljeg tipa MtArgRS (desno).

Uvođenje delecija ne mijenja omjere emisije zakopanih i izloženih triptofana. Na temelju snimljenih emisijskih spektara može se zaključiti kako tercijarna struktura istraživanih varijanti MtArgRS odgovara onoj divljeg tipa enzima.

U skladu s ovim rezultatima je i izmjerena temperatura mekšanja krnjih varijanti arginil-tRNA-sintetaze. Sudeći prema denaturacijskog krivulji dobivenoj snimanjem CD-spektara svih korištenih mutanata, uklanjanje elemenata Add-1-domene nema prevelikog utjecaja na temperaturu mekšanja ovih enzima. Metodom cirkularnog dikroizma praćena je denaturacija proizvedenih krnjih oblika enzima. Temperatura pri kojoj je 50% enzima denaturirano (temperatura mekšanja, T_m) za divlji tip enzima iznosi 70,45. Najznačajnije smanjenje zapaženo je kod najskraćenijeg oblika ΔN_{tot}-MtArgRS te iznosi -1,19 °C (drugim riječima, T_m ovog oblika iznosi 69,26 °C). Temperature mekšanja za varijante Δ39MtArgRS,

Δ43MtArgRS i Δ89MtArgRS usporedive su s onom divljeg tipa enzima, a termička stabilnost mutiranog oblika Δ21MtArgRS čak je povećana te T_m za ovaj oblik iznosi čak 75,44 °C.



Slika 4-15 Krivulje denaturacije praćene metodom cirkularnog dikroizma. (lijevo) Krivulje denaturacije divljeg tipa arginil-tRNA-sintetaze (ružičasto) te skraćenog oblika Δ21MtArgRS (plavo). (desno) Krivulje denaturacije divljeg tipa (plavo) te skraćenog oblika ΔN_{tot}MtArgRS (narančasto).

S obzirom na ove rezultate, može se zaključiti kako uvedene delecije *ne* potiču denaturaciju arginil-tRNA-sintetaze, niti dovode do promjene konformacijskog stanja molekule koja bi potencijalno mogla uvjetovati strukturu otapalu (i ligandima) izložene površine tog enzima.

4.4.3 Interakcija krnjih varijanti s MtSerRS

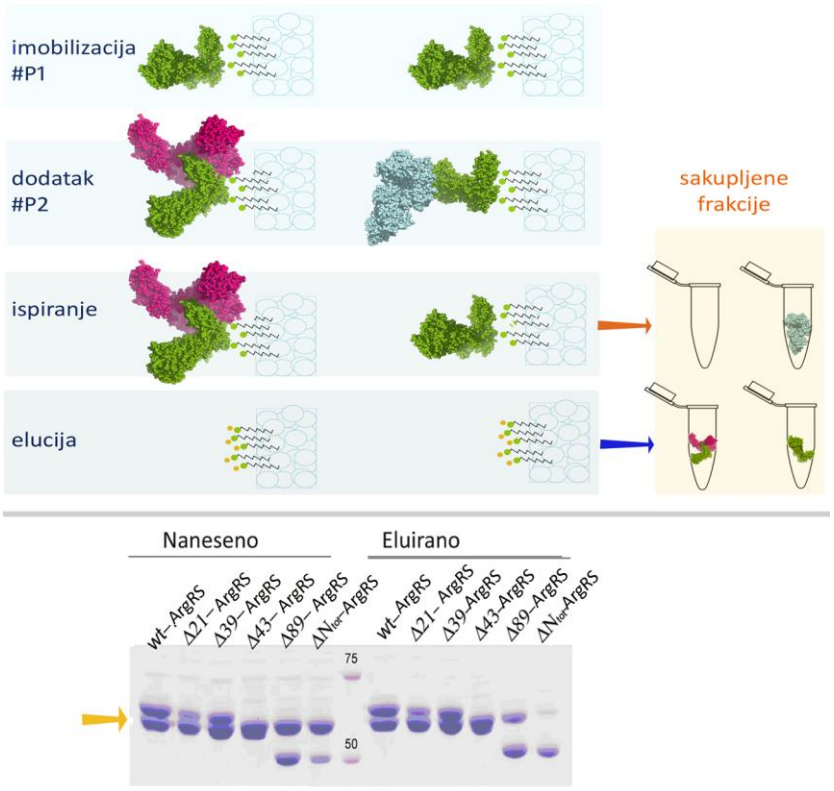
Metoda afinitetnog supročišćavanja rutinska je biokemijska metoda kojom se mogu identificirati relativno stabilne proteinske interakcije. Ovaj test sličan je tehnici imunoprecipitacije, samo što se ovdje kao mamac koristi proteinski partner umjesto antitijela. Tehnika afinitetne kromatografije pritom pruža strukturnu podlogu na kojoj se test može izvesti. U ovom biokemijskom testu, protein-mamac imobilizira se putem nadodanog afinitetnog provjeska. Njegovim izlaganjem (po imobilizaciji uniformno postaje orijentiran prema mobilnoj fazi) stvara se sekundarni afinitetni matriks koji može poslužiti za izolaciju proteina koji s imobiliziranim proteinom stupa u interakciju. Dakle, po imobilizaciji proteina s privjeskom, isti se inkubira s izvorom proteina koji sadrži "protein-plijen". Po ispiranju stacionarne faze s imobiliziranim proteinom mamcom (te, potencijalno, i imobiliziranim proteinom-plijenom) sadržaj frakcija ispiranja te frakcija koje odgovaraju koraku elucije otkrivaju dolazi li do stvaranja interakcije između proteina-mamca i proteina-plijena. Puferi kojima se vrši ispiranje i elucija zavise od afinitetne (primarne) stacionarna faze koja služi za imobilizaciju proteina-mamca te najčešće vrlo naliče onima koji se rabe prilikom pročišćavanja proteina istim tipom kromatografije (v. ranije).

Testiranje interakcije skraćenih varijanti arginil-tRNA-sintetaze s MtSerRS izvedeno je na sljedeći način: skraćeni oblici proizvedeni su s hekshistidinskim privjeskom kako je opisano

ranije te je svaki pojedini iskorišten kao protein-mamac. Na malim alikvotima Ni^{2+}-NTA-smole imobilizirano je oko 100 μg mamaca (uključujući i divlji tip enzima). Potom im je dodano oko 50 μg proteina-plijena, tj. MtSerRS u nativnom obliku (bez privjeska). Ovi maseni omjeri približno odgovaraju množinskom omjeru 1:1. Zrnca Ni-NTA-agaroze, zajedno s proteinima inkubirana su pri 41 °C u termobloku tijekom 5-10 minuta. Od ove inkubacijske smjese uzeti su alikvoti koji su kasnije analizirani na gelu (slika 4.16, donji dio panela, frakcije pod oznakom "Naneseno"). Pufer za inkubaciju pritom je sadržavao imidazol (10 mmol dm^{-3}) kako bi se spriječila adhezija proteina-plijena na slobodne Ni^{2+}-ione. Ispiranje je izvršeno u puferu koji je sadržavao veću koncentraciju imidazola (40 mmol dm^{-3}), opet za uklanjanje nespecifično adheriranog proteina-plijena. Elucija je naposljetku izvršena uz pufer s 250 mmol dm^{-3} imidazola, kako bi se osigurala potpuna elucija proteina – mamca.

Usporedba sadržaja eluiranih proteina (slika 4.16, donji dio panela) pokazuje da do formiranja kompleksa[a] dolazi u svim slučajevima, osim kod oblika ΔN_{tot}-ArgRS. Možda nešto slabije vezanje se dade zapaziti za mutant ΔN89-ArgRS (slika 4.16 dolje).

[a] Naravno kompleksa detektabilne stabilnosti u rasponu karakterističnom za metodu.

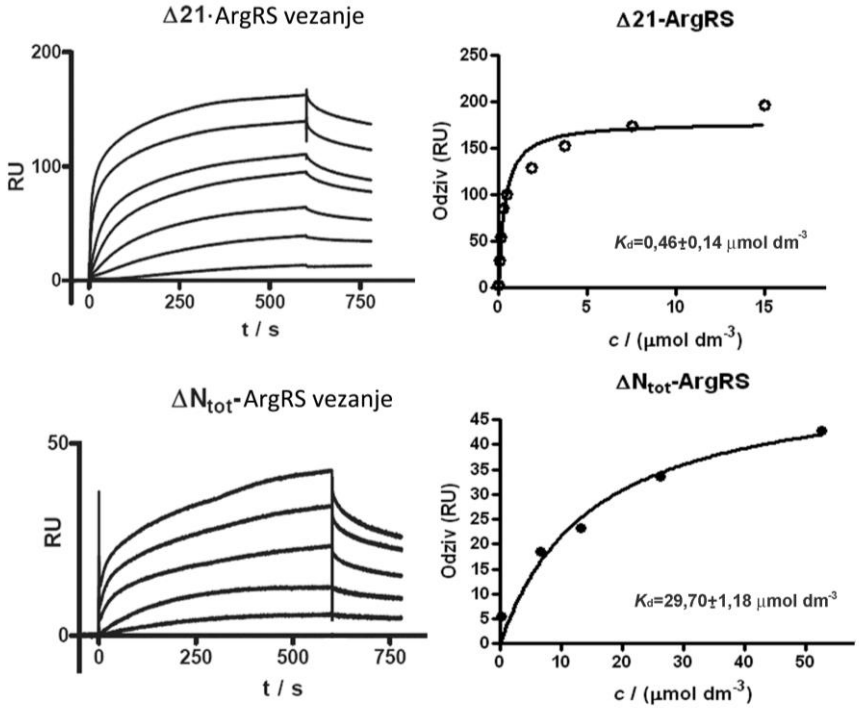


Slika 4-16 (gore) Shema izvođenja eksperimenta afinitetnog supročišćavanja. Prikazani su osnovni koraci poput imobilizacije (prvi red), inkubacije s potencijalnim proteinom-plijenom (drugi red), ispiranje stupca odgovarajućim puferom te sastav sakupljenih frakcija. Zeleno je prikazan protein-plijen koji se putem nadodanog afinitetnog privjeska imobilizira na smoli. U lijevoj koloni prikazana je specifična interakcija s proteinom-plijenom. U desnoj koloni prikazan je jedan od mogućih scenarija-nespecifična adhezija lažnog proteina-plijena na imobilizirani protein-mamac. Broj pojedinih ispiranja zavisi od količine materijala koji se u pojedinom koraku ispire; tj. potrebno je u potpunosti isprati nespecifično vezane molekule kako bi se onemogućila detekcija nespecifičnih vezanja. (dolje) SDS-PAGE analiza frakcija sakupljenih nakon supročišćavanja nativnog oblika MtSerRS s varijantama ArgRS (posjeduju heksahistidinski privjesak) imobiliziranima na Ni-NTA-agarozi. Naziv oblika ArgRS indiciran je iznad jažice s pripadnim uzorkom. Položaj MtSerRS na gelu indiciran je žutom strelicom s lijeve strane gela. Frakcije označene kao "Naneseno" odnose se na sastav inkubacijskih smjesa za svaki od pojedinih proteina-mamaca (odgovara drugom koraku od vrha u shemi više). Frakcije označene kao "Eluirano" odnose se na sastav eluiranih frakcija za svaki od pojedinih proteina-mamaca (odgovara sastavu frakcija prikazanih uz shemu pored koraka broj četiri).

Metoda je napravljena i uz zamjenu identiteta proteina-mamca, odn. proteina-plijena. Pritom su iskorišteni rekombinantni oblici MtSerRS-his$_6$ (mamac) i nativni oblici MtArgRS (plijen), a test je izvršen na identičan način kao što je maloprije opisano. Zanimljivo, zamjena nositelja privjeska nije imala utjecaja na rezultat supročišćavanja. Opisani rezultati sugeriraju da je ključni element Add-1 domene kod prepoznavanja proteinskog partnera MtSerRS zavojnica H4, najudaljeniji element iste domene gledano s N-kraja proteina. Kako bi se interakcija krnjih varijanti arginil-tRNA-sintetaze i MtSerRS preciznije istražila, iskorištena je metoda rezonancije površinskih plazmona. I dok metoda supročišćavanja predstavlja rutinsku i dostupnu metodu, metodom SPR-a na sofisticirani način moguće je točno izmjeriti afinitet između testiranih proteinskih partnera.

Metoda SPR (prema eng. *surface plasmon resonance*) optička je tehnika koja se koristi za detekciju (makro)molekulskih interakcija. Vezanje pokretne molekule (analita) na molekulu imobiliziranu na tankom metalnom filmu (ligand) mijenja refraktivni indeks tog filma. Promjena refraktivnog indeksa detektira se kao odziv (detaljniji opis dan je ranije u poglavlju Materijali i metode). Budući da metoda detektira isključivo masu, nema potrebe za obilježavanjem istraživanih interreagirajućih makromolekula[a]. Ukratko, enzim MtSerRS kovalentno je (preko svojim slobodnih amino-skupina) vezan na senzor-čip te potom izložen otapalu prisutnom u mikrotekućinskom sustavu. Injektiranjem analita (oblika MtArgRS) moguće je u realnom vremenu detektirati interakciju između MtSerRS i varijante MtArgRS.
Metoda rezonancije površinskih plazmona razotkrila je kontinuirani efekt koji progresivno uklanjanje N-terminalnog dijela ArgRS ima na interakciju sa svojim proteinskim partnerom SerRS (slika 4.17, tablica 4.2). Po uklanjanju prvih 39 aminokiselina s N-kraja, interakcija ArgRS i SerRS slabi 10 puta. Ovaj trend polako raste i kulminira po uklanjanju čitave domene Add-1. Oblik ΔN_{tot}-ArgRS pokazuje 100 puta slabiji afinitet (odn. 100 puta veću vrijednost K_d) što je u slaganju s analizom afinitetnog supročišćavanja. Nasuprot tomu, jedina delecija koja ne posjeduje gotovo nikakav utjecaj u vezanju SerRS jest delecija heliksa H1 (mutant ΔN21-ArgRS). Na temelju ovih rezultata može se zaključiti da se prepoznavanje između MtArgRS i MtSerRS dijelom ostvaruje preko N-terminalne domene, pri čemu najveći utjecaj ima zavojnica H4. Jedini element Add-1 domene koji zasigurno ne komunicira s MtSerRS jest zavojnica H1 (slika 4.11).

[a] Čime se elegantno uklanja mogućnost da obilježivač mijenja svojstva istraživane molekule.



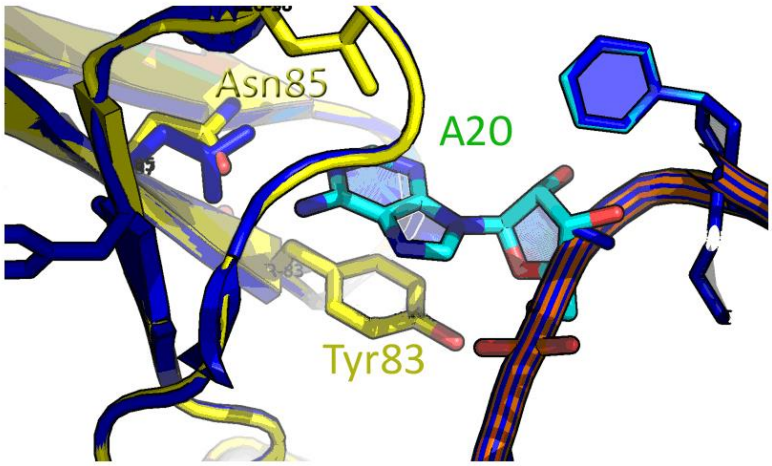
Slika 4-17 Senzorgrami i krivulje vezanja varijanti arginil-tRNA-sintetaze ΔN21-ArgRS i ΔN_{tot}-ArgRS (analiti) na imobilizirani MtSerRS (imobiliziran na čipu). Iskorišten je CM5-čip (*Biacore inc.*), a pufer je sadržavao 25 mmoldm^{-3} Hepes, 120 moldm^{-3} NaCl, 5 mmoldm^{-3} $MgCl_2$ i 0,4 mmol dm^{-3} DTT, pH 7,2. Interakcija je praćena pri protoku od 30 μL min^{-1}. Temperatura pri kojoj je proveden eksperiment iznosila je 25 °C.

4.4.4 Interakcija krnjih varijanti MtArgRS s pripadnom tRNA

Nedostatak utjecaja prve zavojnice s N-kraja arginil-tRNA-sintetaze na stabilnost kompleksa MtArgRS:MtSerRS zanimljiv je sa stajališta da je to jedini strukturni element ove domene koji zasigurno ne participira u direktnim kontaktima s $MttRNA^{Arg}$. Domena Add-1 zaslužna je za prepoznavanje elementa D-ruke argininskih izoakceptora, tj. očuvanog adenozina na položaju 20 (dakle, unutar D-omče). Ovaj element identiteta izostaje kod kvasaca *S. cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe*, kao i kod mitohondrijske $tRNA^{Arg}$ u životinja. U kristalnoj strukturi *P. horikoshii* kompleksa ArgRS:$tRNA^{Arg}_{CCU}$[a] ovu determinantu direktno prepoznaje asparagin na položaju 87. Karboksiamidni kisik bočnog ogranka ove aminokiseline stvara vodikovu vezu s atomom *N*6 adenozina 20, kao i brojne hidrofobne i van der Waalsove interakcije s ostacima Tyr85 i Pro34. Ilustracija vezanja dana je u Literaturnom pregledu (slika 2.17) u sustavu *P. horikoshii.* Ovi ostaci su očuvani kod MtArgRS i aranžirani na identičan način u strukturnom modelu (slika 4.18). Ovakav raspored bočnih ogranaka prisutan je i kod ArgRS iz *T. thermophilus* (PDB ID 1IQ0) gdje je direktno

[a] Za podsjetnik, ovaj kompleks poslužio je kao kalup za modeliranje arginil-tRNA-sintetaze *M. thermautotrophicus*, kao i pripadne $MttRNA^{Arg}_{CCU}$.

prepoznavanje determinante A20 preko spomenutog asparagina pokazano mutagenezom i testiranjem generiranog mutanta u reakciji aminoaciliranja (aminokiselina Asn79 kod *T. thermophilus*).

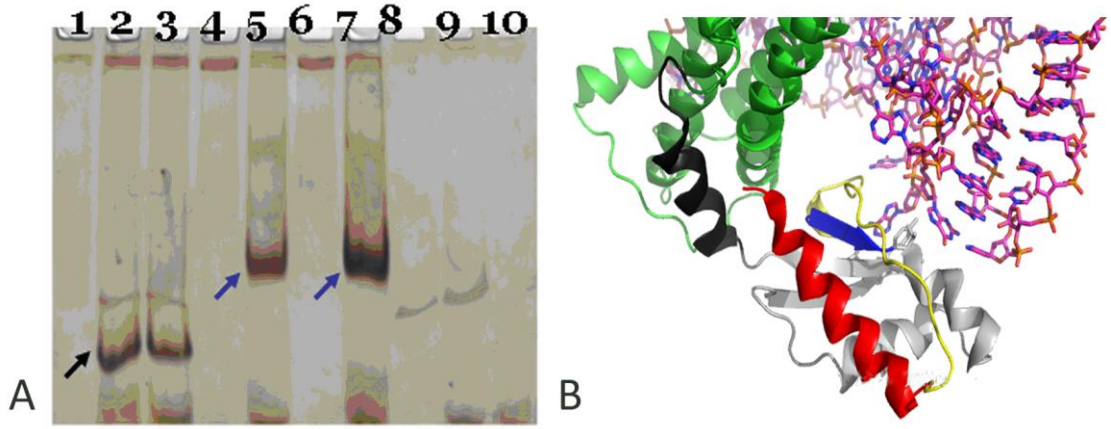


Slika 4-18 Prepoznavanje D-omče kod MtArgRS i MttRNA$^{Arg}_{CCU}$. Usidrivanjem nezavisno modeliranih molekula MtArgRS i MttRNA^{Arg} može se uočiti da je mehanizam prepoznavanja nukleotidne determinante A20 očuvan. Plavom bojom prikazana je okosnica i bočni ogranci PhArgRS i PhtRNA^{Arg}; žutom MtArgRS, tirkiznom MttRNA^{Arg}. Istaknuti su ostaci Asn85 (prepoznaje atomime *N*1 i *N*6 adenozina 20 stvarajući dvije vodikove veze preko karbonilne, ali i amino-skupine svog bočnog ogranka) te Tyr83 (stupa u interakcije slaganja s purinskim prstenom determinantne A20 te stvara vodikovu vezu s *O*4-atomom riboze istog nukleotida).

Preliminarno ispitivanje afiniteta koje istraživani krnji oblici MtArgRS pokazuju prema pripadnoj MttRNA$^{Arg}_{CCU}$ izvršeno je pomoću gel-retardacijske elektroforeze. Ova metoda je jednostavna, jeftina i brza te predstavlja dobar način za inicijalna ispitivanja stabilnosti kompleksa proteina i nukleinskih kiselina. U sklopu ove disertacije kompleksi enzima MtSerRS i MtArgRS (u svim oblicima) rutinski su provjeravani navedenom metodom. Metoda se bazira na činjenici da po formiranju kompleksa između sintetaze i njene pripadne tRNA dolazi do relativnog ubrzanja proteina u električnom polju u odnosu na slobodni oblik istog. I obratno, po formiranju kompleksa dolazi do usporavanja molekule tRNA u električnom polju, u odnosu na slobodni oblik. Dakle, ukoliko nastaje stabilni kompleks, na nativnom gelu na koji su uzorci naneseni zapaža se vrpca intermedijerne pokretljivosti u usporedbi na slobodni protein, odn. tRNA. Tipičan sastav nativnog gela dan je u poglavlju Materijali i metode, kao i ostali uvjeti eksperimenta.

Testiranje osjetljivosti krnjih varijanti na prisustvo soli u inkubacijskoj smjesi s MttRNA$^{Arg}_{CCU}$ otkriva da stabilnost detektiranih kompleksa pada dodatkom soli što ukazuje na mogućnost da su detektirani kompleksi dijelom posljedica nespecifičnog prepoznavanja krnjih proteina i RNA. Kompleksi skraćenih varijanti koji "preživljavaju" uvjete elektroforeze pri koncentraciji soli od 0,1 mol dm^{-3} uključuju varijante Δ21MtArgRS i Δ43MtArgRS (slika

4.19). No, usporedba pokretljivosti kompleksa divljeg tipa i deletanta Δ21MtArgRS (kao i Δ43MtArgRS) otkriva promijenjeni način vezanja pripadne tRNA. Kao što se može vidjeti na slici niže, navedeni kompleksi posjeduju smanjenu pokretljivost u odnosu na kompleks divljeg tipa enzima. Zavojnica H1 je ranije implicirana kao element koji kod arginil-tRNA-sintetaza kvasca *S. cerevisiae* prolazi kroz strukturnu promjenu po vezanju tRNA, ali je ta vjerojatnost odbačena, a pomak zavojnice H1 pripisan kristalnom pakiranju enzima, odn. pakiranju kompleksa enzima i tRNA. S obzirom na umanjenu pokretljivost deletanta MtArgRS kojem nedostaje ta prva N-terminalna zavojnica, moguće je ipak da H1 ciljano prolazi kroz izmjenu orijentacije po vezanju tRNA te da njeno uklanjanje ometa nastanak produktivne (kompaktnije i na gelu pokretljivije) konformacije ArgRS unutar kompleksa.

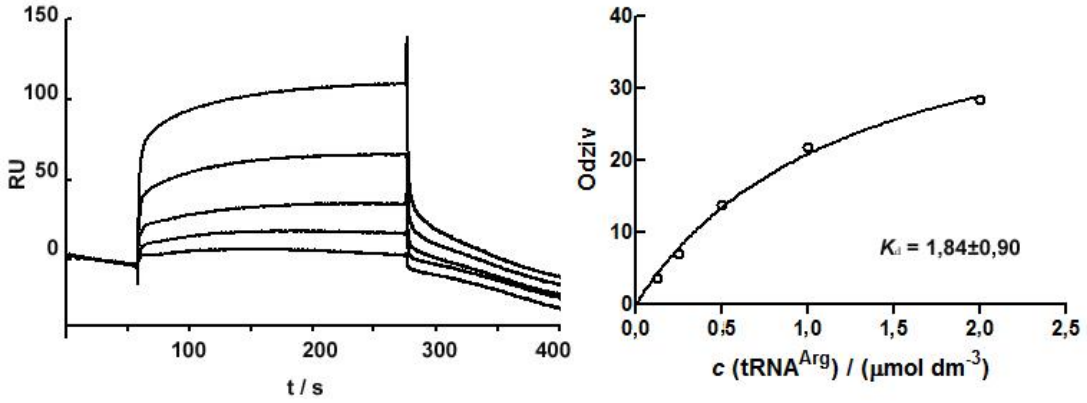


Slika 4-19 lijevo) Gel-retardacijski eksperiment koji pokazuje afinitet varijanti MtArgRS prema pripadnoj tRNA. Slobodni proteini naneseni su u jažice 1 (divlji tip ArgRS), 4 (Δ21MtArgRS), 6 (Δ43MtArgRS) te 8 (Δ89MtArgRS). Isti proteini s ekvimolarnom količinom MttRNA^{Arg} inkubirani su i naneseni u jažice 2, 3 (divlji tip ArgRS), 5 (Δ21MtArgRS), 7 (Δ43MtArgRS) i 9 (Δ89MtArgRS). Slobodna tRNA^{Arg} nanesena je u jažicu 10. Crne i plave strelice indiciraju položaj nativnog i mutiranog proteinskog kompleksa. (desno) Sučelje Add-1 domene MtArgRS i D-omče MttRNA^{Arg}. Molekula tRNA^{Arg} prikazana je ružičasto (prezentacija štapićima). Elementi N-kraja arginil-tRNA-sintetaze slijede istu shemu bojanja kao na slici 4-11: prvih 21 aminokiselinu (zavojnica H1) crveno, omča između aminokiselina 22-39 žuto, aminokiseline 40-43 (nit S1) plavo, aminokiseline 44-89 bijelo te aminokiseline 90-104 (zavojnica H4) tamno sivo.

Po preliminarnom ispitivanju stabilnosti kompleksa MtArgRS:MttRNA$^{Arg}_{CCU}$ nativnom elektroforezom, afinitet kranjih varijanti MtArgRS prema pripadnoj MttRNA$^{Arg}_{CCU}$ izmjeren je pomoću površinske rezonancije plazmona.

Krnje varijante (kao i divlji tip) arginil-tRNA-sintetaze proizvedene su s heksahistidinskim privjeskom te imobilizirane pomoću istog na Ni-NTA čip (*Biacore inc.*). Prednost ovakve imobilizacije sastoji se u mogućnost opetovanog korištenja takvog čipa (protein je moguće ukloniti dodatkom EDTA koja helira niklene ione te na taj način dolazi do disocijacije imobiliziranog proteina s površine čipa). Druga velika prednost sastoji se u mogućnosti dobivanja homogene populacije molekula liganda, a s aspekta relativne orijentacije prema

otapalu (a time i prema prolazećem analitu). Ova prednost može biti i nedostatak, ukoliko se imobilizacijom preko privjeska postiže orijentacija nepovoljna za vezanje testiranog analita[a]. Reprezentativni senzorgram dan je na slici 4.20, kao i pripadna krivulja vezanja.



Slika 4-20 Senzorgram i krivulja vezanja koji opisuju vezanje MttRNA^{Arg} (analit) i krnjeg oblika Δ43-MtArgRS-his$_6$, imobiliziranog na Ni-NTA čipu (ligand).

Dakle, jedna od prednosti imobilizacije rekombinantnog proteina preko fuzijskog dijela, odn. privjeska, uključuje uniformnu orijentaciju imobiliziranih molekula. Kod divljeg tipa enzima N-terminalni polihistidinski privjesak nalazi se (jednako kao i zavojnica H1) na suprotnoj strani od površine preko koje se tRNA^{Arg} veže. No, kod skraćenih inačica, smještaj histidinskog privjeska se mijenja pa ni pretpostavljena orijentacija ovih molekula na čipu nije ista kao za divlji tip enzima. Dakle, iako je N-kraj svih testiranih inačica ArgRS vezan kratkim linkerom za heksahistidinski privjesak, uslijed povezanosti s različito usmjerenim elementima Add-1-domene, ne možemo očekivati da je položaj "lica" ostatka enzima kojim se MttRNA$^{Arg}_{CCU}$ dominantno veže jednako (u svim slučajevima) smješten naprama nadolazećem analitu. U tablici 4.2 sumirane su vrijednosti disocijacijskih konstanti dobivene za interakciju krnjih inačica u usporedbi s divljim tipom enzima. Zanimljivo je zapaziti da opći trend u slabljenju interakcije s MttRNA$^{Arg}_{CCU}$ prati onaj zabilježen za interakciju s proteinskim partnerom MtSerRS.

[a] Rutinska imobilizacija na CM5-čipu (vezanje preko primarnih amina, tj. slobodnog N-kraja i izloženih lizinskih bočnih ogranaka) u slučaju divljeg tipa i skraćenih varijanti ArgRS ovdje se nije mogla koristiti, budući da se pokazalo da tako imobilizirana arginil-tRNA-sintetaza nije sposobna vezati kako pripadnu tRNA, tako ni MtSerRS.

Tablica 4-2 Sumirane vrijednosti disocijacijskih konstanti krnjih oblika MtArgRS s pripadnom tRNA i proteinskim partnerom SerRS. Skraćenica "EMSA" stoji za gel-retardacijsku elektroforezu prema eng. *electrophoretic mobility shift assay.*

inačica MtArgRS	interakcija s MtSerRS	interakcija s $MttRNA^{Arg}$	
	SPR	SPR	EMSA
	$10^6 \cdot K_d$ / (mol dm^{-3})	$10^6 \cdot K_d$ / (mol dm^{-3})	$10^6 \cdot K_d$ / (mol dm^{-3})
divlji tip MtArgRS	0,28±0,02	0,37±0,08	0,425
Δ21MtArgRS	0,46±0,14	0,56±0,01	0,558
Δ39MtArgRS	2,92±1,83	13,44±0,56	1,670
Δ43MtArgRS	3,71±0,17	1,84±0,90	n. o.
Δ89MtArgRS	5,61±0,10	15,2±0,29	0,290
ΔN_{tot}MtArgRS	29,70±1,18	21±3,44	0,628

Uklanjanje prve N-terminalne zavojnice (H1, varijanta Δ21-MtArgRS ne mijenja afinitet enzima niti za proteinski partner MtSerRS, niti za pripadnu $MttRNA^{Arg}_{CCU}$: u slučaju interakcije MtArgRS:MtSerRS, uklanjanjem ovog elementa interakcije slabi manje nego dvostruko, što je slučaj i s interakcijom MtArgRS:$MttRNA^{Arg}_{CCU}$. Značajniji utjecaj na interakciju s MtSerRS postiže se tek po uklanjanju prvih 39 aminokiselina N-kraja arginil-tRNA-sintetaze kada afinitet pada deseterostruko. Kod istog mutanta K_d za pripadnu $MttRNA^{Arg}_{CCU}$ je čak 36 puta veći, nego za divlji tip enzima. Važnost prvih 39 aminokiselina MtArgRS u prepoznavanju $tRNA^{Arg}$ mogla bi se pripisati interakcijama koje očuvani Pro34 ostvaruje s tRNA, no kako iduće skraćenje (prvih 43 aminokiseline, mutant Δ43-MtArgRS) ne pokazuje tako značajan pad u afinitetu prema pripadnoj $MttRNA^{Arg}_{CCU}$ (K_d je svega 5 puta veći u odnosu na divlji tip) velika razlika u disocijacijskoj konstanti za interakciju Δ39-MtArgRS:$MttRNA^{Arg}_{CCU}$ u odnosu na interakciju divljeg tipa enzima s $MttRNA^{Arg}_{CCU}$ najvjerojatnije je kombinacija faktora: realno smanjenog afiniteta ovog skraćenog enzima prema pripadnoj tRNA te relativne orijentacije ovog enzima na čipu, a naprama prolazećem analitu (tRNA).

Visoka disocijacijska konstanta, odn. izrazito oslabljeni afinitet inačice Δ39-MtArgRS prema $tRNA^{Arg}$ možda bi se mogla otpisati kao artefakt uslijed postava pokusa kada ista inačica ne bi pokazivala isto ponašanje u drugom eksperimentalnom postavu (tablica 4.2, zadnja kolona). Titracija skraćenih varijanti MtArgRS rastućom koncentracijom pripadne $MttRNA^{Arg}_{CCU}$ i detekcijom količine formiranog kompleksa u metodi gel-retardacijske elektroforeze otkriva vrlo male razlike u stabilnosti istog. Drugim riječima, s obzirom na rezultate tog testa, efekt

uklanjanja N-terminalnih elemenata ArgRS na afinitet tog enzima prema $MttRNA^{Arg}_{CCU}$ vrlo je mali. No, oblikovanje kompleksa u tom eksperimentalnom postavu moglo se postići jedino izostavljanjem iona soli u inkubacijskoj smjesi čime se favoriziraju nespecifični kontakti sintetaze s molekulama RNA. Kao što se vidi na slici 4.19, izuzev inačica Δ21-MtArgRS i Δ43-MtArgRS (te, naravno, divljeg tipa enzima) vezanje tRNA na enzime Δ89-MtArgRS i ΔN_{tot}-MtArgRS uopće se nije moglo detektirati uz dodatak soli pri koncentraciji od 0,1 mol dm^{-3}. U eksperimentima gdje je afinitet testiran metodom rezonancije površinskih plazmona pufer u kojem je interakcija istraživana sadržavao je 0,12 mmol dm^{-3} NaCl te bi se moglo zaključiti da takvi uvjeti umanjuju nespecifično vezanje te da je izmjerena snaga interakcije vjerodostojnija od one u uvjetima gel-retardacijskog eksperimenta. Ipak je interesantno da i u uvjetima manje specifičnog prepoznavanja deletant Δ39-MtArgRS pokazuje najveći pad u afinitetu prema pripadnoj $MttRNA^{Arg}_{CCU}$ (oko 4 puta, tablica 4.2). Stoga bi se naposljetku moglo zaključiti kako odstupanje od generalnog trenda prema kojemu veći broj uklonjenih aminokiselina Add-1 domene korespondira sa slabljenjem interakcije enzima s $MttRNA^{Arg}_{CCU}$ kod deletanta Δ39-MtArgRS odražava realni fenomen. Razlog tomu može biti nepravilna lokalna[a] stabilizacija elemenata sekundarne strukture koju je, bez obzira na postojanje modela, teško ustvrditi bez dodatnih eksperimentalnih podataka.

Najznačajniji pad u afinitetu prema pripadnoj $tRNA^{Arg}$ pokazuju deletanti Δ89-MtArgRS i ΔN_{tot}-MtArgRS s oko 40, odn. oko 55 višom vrijednosti ravnotežne disocijacijske konstante. Kod oba deletanta uklonjene su dvije iznimno važne (i potpuno očuvane) aminokiseline – Tyr83 i Asn85, a čija se primarna uloga sastoji u prepoznavanju nukleotidne determinante A20 (slika 4.18). Zavojnica H4 (uklonjena kod inačice ΔN_{tot}-MtArgRS, ali ne i Δ89-MtArgRS) posjeduje najveći utjecaj pri prepoznavanju MtSerRS (afinitet u odnosu na divlji tip enzima je 100 puta niži). Taj element ne stvara direktne kontakte s tRNA, već, kako je spomenuto, funkcionira kao linker između globularne Add-1 domene i ostatka enzima. Komunikacija ovog elementa s domenom za vezanje antikodona (Add-2) ostvaruje se direktnim kontaktima s dugačkim heliksom koji sudjeluje u prepoznavanju "tijela" $tRNA^{Arg}$. U tom smislu, nešto niži afinitet prema tRNA koji varijanta ΔN_{tot}-MtArgRS pokazuje u odnosu na enzim Δ89-MtArgRS potencijalno je posljedica ne nedostatka elemenata koji sudjeluju u prepoznavanju tRNA (direktne interakcije) već u oslabljenoj stabilizaciji susjednih elemenata Add-2 domene koji su zaslužni za direktnu interakciju s tRNA.

[a] Računa se da opća tercijarna struktura enzima ipak nije narušena, ako je suditi prema emisijskom spektru i krivulji denaturacije enzima Δ39-MtArgRS.

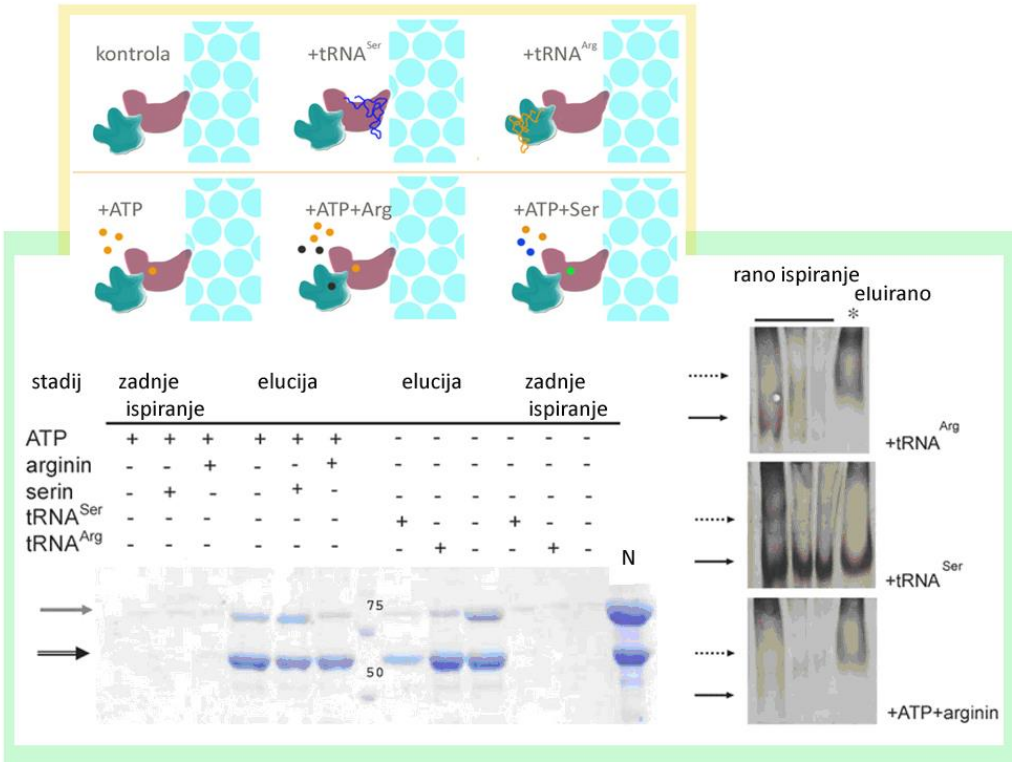
U reakciji aminoacilacije (kinetika ustaljenog stanja) uklanjanje N-terminalnih elemenata MtArgRS oslabljuje katalitičku moć enzima i to dominantno kroz efekte na obrtnom broju (k_{cat}). Mutant ΔN_{tot}MtArgRS posjeduje 20 puta nižu vrijednost k_{cat} u odnosu na divlji tip (0,028 s^{-1} u odnosu na 0,563 s^{-1}). Istovremeno K_m za tRNA raste šesterostruko (7,79 μmol dm^{-3} u odnosu na 1,27 μmol dm^{-3} kod divljeg tipa). Naglašeni efekt elemenata prepoznavanja unutar Add-1 domene na obrtni broj arginil-tRNA-sintetaze zabilježen je i kod TtArgRS te najvjerojatnije reflektira oštećenu komunikaciju između Add-1 domene i distalnog aktivnog mjesta. Krnji oblici MtArgRS pokazali su povećanu senzitivnost na više temperature prilikom aminoaciliranja, iako denaturacijski spektri enzima praćeni cirkularnim dikroizmom nisu otkrili značajan pad u temperaturi mekšanja. Optimalna aktivnost svih mutiranih enzima kretala se između 42-43 °C umjesto 60 °C.

4.5 Dinamika sklapanja kompleksa MtArgRS:MtSerRS: utjecaj reakcijskih intermedijera

Stabilna interakcija MtArgRS i MtSerRS originalno je otkrivena metodom kvaščevih hibrida (v. Uvod). Oba enzima esencijalni su stanični enzimi i očekivano njihova interakcija ne bi trebala pogubno utjecati na njihove kanonske aktivnost. S ciljem oponašanja staničnog ambijenta i istraživanja stabilnosti kompleksa MtSerRS:MtArgRS u tom kontekstu, afinitetno supročišćavanje je izvedeno uz slijedno dodavanje pripadnih supstrata (slika 4.21). U ovom slučaju iskorišten je MtSerRS s heksahistidinskim privjeskom i MtArgRS s fuzijom u vidu glutation-S-transferaze na N-kraju. Imobilizacija je izvršena na Ni-NTA-agarozi, dakle, uz MtSerRS-his_6 kao protein-mamac. Fuzijski oblik MtArgRS (GST-MtArgRS) odabran je radi lakše vizualizacije na SDS-PAGE zbog bliske molekulske mase (65 kDa) u odnosu na monomer MtSerRS (60 kDa).

Mali ligandi (serin, arginin i ATP) dodani su u koncentracijama koje bi trebale simulirati visokoenergetske uvjete u stanici (100 – 150 μmol dm^{-3} aminokiseline te 9 mmoldm^{-3} ATP), a molekule tRNA tako da stehiometrijski odgovaraju količini analiziranog proteina. Inkubacijske smjese s pripadnim molekulama tRNA očekivano sadrže komplekse MtSerRS:MttRNA$^{Ser}_{GGA}$, odn. MtArgRS:MttRNA^{ArgCCU}. Adenozin-trifosfat može se vezati u aktivno mjesto MtSerRS, ali ne i MtArgRS, budući da potonja za oblikovanje veznog džepa za ATP treba MttRNA^{Arg}, točnije promjenu konformacije koju ova uvjetuje (v. Literaturni pregled). Slična je situacija i s uvjetima u kojima je stabilnost kompleksa MtArgRS:MtSerRS testirana na prisustvu aminokiseline i ATP-a: dodatak serina i ATP-a očekivano dovodi do nastanka serilacijskog intermedijera Ser-AMP-a, dok arginil-adenilat ne može nastati, ponovo

zbog nedostatka $tRNA^{Arg}$ u smjesi, odn. neproduktivne konformacije veznog mjesta za ATP na arginil-tRNA-sintetazi. U tim uvjetima, može se vezati isključivo arginin (vezno mjesto za arginin produktivno je i kod slobodnog oblika enzima). Moguća vezanja naznačena su unutar sheme (slika 4.21, gornji dio panela). Način izvođenja eksperimenta supročišćavanja na Ni-NTA-agarozi izveden je na ekvivalentan način kao ranije, odn. u slučaju detekcije interakcije krnjih varijanti MtArgRS s partnerom MtSerRS (poglavlje 4.4.3).



Slika 4-21 Mogućnost ugradnje MtArgRS:MtSerRS uz dodatak prekursora reakcije aminoacilacije ispitana metodom afinitetnog supročišćavanja uz detekciju metodom SDS-PAGE te nativnom PAGE. Dana je shema mogućih kompleksa (gore, žuti okvir): ljubičasto je prikazan imobilizirani MtSerRS, zeleno MtArgRS, $tRNA^{Ser}$ plavo, $tRNA^{Arg}$ žuto. Mali ligandi naznačeni su kružićima: ATP narančastim, arginin crnim, serin zelenim. Seril-adenilat prikazan je zeleno. Ukoliko je vezanje prekursora na enzim moguće isti je naznačen unutar/na obliku koji simbolizira dani enzim. Rezultat pokusa dan je unutar zelenog okvira. Obojani gel rezultat SDS-PAGE (lijevo) prezentiran je uz legendu koja govori o sastavu inkubacijske smjese pripadajuće jažice te o kojem koraku u metodi se radi. S lijeve strane gela siva strelica upućuje na položaj GST-MtArgRS (protein-plijen), a crna na položaj MtSerRS-his_6 (protein-mamac). Središnja (neoznačena) jažica sadrži marker kod kojega su istaknuti položaji proteinskih standarda veličine 50 i 75 kDa. Elektroforeza na nativnom gelu (desno, također unutar zelenog okvira) izvedena je s ciljem ispitivanja stanja eluiranih proteina s aspekta vezanja pripadne tRNA. Prisutnost dodane tRNA ili malog liganda indicirana je s desne strane gelova. Puna strelica s lijeve strane gela indicira položaj kompleksa aaRS:tRNA (dakle, MtSerRS:$MttRNA^{Ser}_{GGA}$, odn. GST-MtArgRS:$MttRNA^{Arg}_{CCU}$).

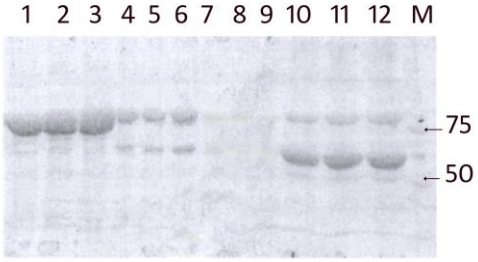
S obzirom na količinu zadržanog GST-MtArgRS, može se uočiti da dodatak reakcijskih prekursora (aminokiseline, ATP-a ili $tRNA^{Ser/Arg}$) različito utječe na integritet kompleksa MtSerRS:MtArgRS. Budući da količina (na gel) nanesenog proteina-mamca (ovdje MtSerRS-

his_6) varira, kvantifikacija zadržanog GST-ArgRS normalizirana je u odnosu na količinu nanesenog SerRS-his_6. Kod inkubacije istraživanih proteina s ligandom $tRNA^{Ser}$ dolazi do izrazitog ispiranja proteina-mamca, tj. MtSerRS. Neposredna blizina okosnice tRNA u odnosu na heksahistidinski privjesak očito ometa vezanje tog segmenta na niklene ione stacionarne faze te je zaključeno da ovakav postav eksperimenta ne odgovara ispitivanju ternarne interakcije MtArgRS:MtSerRS:$MttRNA^{Ser}_{GGA}$. Stoga je utjecaj prisustva $tRNA^{Ser}$ na formiranje kompleksa MtArgRS:MtSerRS ispitan detaljnije u zasebnom pokusu (v. kasnije).

Kvantifikacija zadržanog GST-ArgRS (normalizirana s obzirom na količinu eluiranog proteina-mamca, MtSerRS-his_6) razotkrila je kako dodatak ATP-a, kao i kombinacije serina te ATP-a nemaju većeg utjecaja na interakciju sintetaza. U potonjim uvjetima omogućen je nastanak serilacijskog reakcijskog intermedijera, Ser-AMP. Ovaj rezultat u slaganju je s povoljnim utjecajem koji MtArgRS iskazuje na aminoacilacijsku aktivnost MtSerRS[13]. Metanogeni tip SerRS (kojemu MtSerRS pripada) sadrži posebni element unutar aktivnog mjesta, a koji se strukturira po vezanju serina (tzv. SOL, prema eng. *serine ordering loop*, v. Literaturni pregled). Čini se da ova diskretna promjena ne čini razliku prilikom sklapanja kompleksa MtArgRS:MtSerRS, budući da je količina zadržanog MtArgRS u ternarnom kompleksu [MtSerRS:Ser-AMP]:MtArgRS ekvivalentna binarnom kompleksu MtArgRS:MtSerRS.

Nasuprot tomu, dodatak arginina i ATP-a dovodi do značajnog slabljenja interakcije MtSerRS i MtArgRS. Kao što je rečeno, za razliku od SerRS ArgRS tipično ne katalizira nastanak adenilatnog međuprodukta bez kofaktora $tRNA^{Arg}$ što djelomice ovisi i od činjenice da vezni džep za ATP nije u produktivnoj konformaciji prije negoli se vezanjem pripadne tRNA induciraju strukturni rearanžmani u enzimu. Za razliku od ATP-a, arginin se može vezati u aktivno mjesto (i) prije vezanja $tRNA^{Arg}$. Argininski bočni ogranci putem svojih pozitivno nabijenih gvanidinijskih skupina mogu stvarati višestruke vodikove veze s prisutnim akceptorima na površini proteina, tipično s karbonilnim kisicima okosnice[139] zbog čega postoji mogućnost da arginin suprimira interakciju istraživanih aaRS posve nespecifično, tj. vezanjem (slobodnog) arginina na mjestima površine sintetaza a koje su direktno uključene u interakciju MtSerRS i MtArgRS. Mogućnost da sama slobodna aminokiselina nespecifično, kompetirajući za slobodne donore/akceptore vodikovih veza na površini MtArgRS i MtSerRS dokida interakciju između istih istražena je u nezavisnom koraku afinitetnog supročišćavanja. Jednoj inkubacijskoj smjesi s istraživanim sintetazama dodan je 70 $\mu moldm^{-3}$ arginin (kao potencijalni donor vodikove veze), a drugoj 70 $\mu moldm^{-3}$ aspartat (kao potencijalni akceptor vodikove veze). Količina zadržanog GST-ArgRS uspoređena je s kontrolnom smjesom koja je

sadržavala same proteinske komponente, bez dodatka liganda. Rezultat je prikazan na slici 4.22. Može se zapaziti kako je vezanje GST-ArgRS na imobilizirani MtSerRS-his$_6$ gotovo identično kao u slučaju kontrolnog eksperimenta, tj. supročišćavanja samih proteinskih komponenti GST-MtArgRS i MtSerRS-his$_6$. Stoga arginin *ne* utječe na interakciju nespecifičnom interakcijom s proteinima, ali niti samostalnim vezanjem u aktivno mjesto MtArgRS. Da je za supresiju kompleksa MtArgRS:MtSerRS odgovoran simultani rad dva mala liganda nadalje je pokazano rezonancijom površinskih plazmona (nije prikazano).



Slika 4-22 Ispitivanje afinitetnog supročišćavanja u prisutnosti aminokiselina aspartata i arginina. Frakcije dobivene ispiranjem po inkubaciji nanesene su u jažice 1 (arginin), 2 (aspartat) i 3 (sami proteini MtSerRS i MtArgRS). Rano ispiranje prikazano je u jažicama 4 (arginin), 5 (aspartat) i 6 (sami proteini). Frakcije dobivene elucijom proteina dane su kod 10 (arginin), 11 (aspartat) i 123 (sami proteini MtSerRS i MtArgRS).

Što se tiče utjecaja tRNA^{Arg} na stabilnost kompleksa MtArgRS:MtSerRS iz slike 4.21 vidljivo je da dodatak te tRNA značajno utječe na ispiranje GST-MtArgRS sa stupca s imobiliziranim MtSerRS. Ipak, određena količina GST-MtArgRS-liganda zaostaje na smoli, tj. veže MtSerRS-his$_6$. Dodatno, ovako zadržani oblik može biti prisutan u slobodnom obliku ili u kompleksu s tRNA^{Arg}. Budući da analiza pomoću SDS-PAGE otkriva samo prisutnost proteinskih komponenata, isprani i eluirani uzorci dodatno su ispitani pomoću gel-retardacijske elektroforeze. Eluirani uzorci te frakcije dobivene ispiranjem matriksa u prva dva koraka afinitetnog supročišćavanja ugušćeni su ultrafiltracijom te su bez odsoljavanja[a] naneseni na poliakrilamidni nativni gel. Na ovaj način omogućena je detekcija binarnih kompleksa istraživanih sintetaza s pripadnom tRNA (dakle, GST-MtArgRS:MttRNA$^{Arg}_{CCU}$ te MtSerRS-his$_6$:MttRNA$^{Ser}_{GGA}$. Pomak vrpce koji odgovara binarnom kompleksu GST-MtArgRS:MttRNA$^{Arg}_{CCU}$ vidljiv je samo u početnim frakcijama ispiranja (slika 4.21, gornji dio desnog dijela panela). U frakciji koja odgovara eluiranom enzimu (točnije ko-eluiranom s proteinskim partnerom SerRS) nema pomaka vrpce koji bi nastao vezanjem sintetaze na pripadnu tRNA te se, dakle, GST-ArgRS nalazi u slobodnom obliku. Ako obratimo pažnju na središnji dio desne polovice panela 4.21 vidljivo je kako prilikom testa afinitetnim

[a] Uzroci su dakle bez prethodne inkubacije i izmjene pufera nanesene na nativni gel.

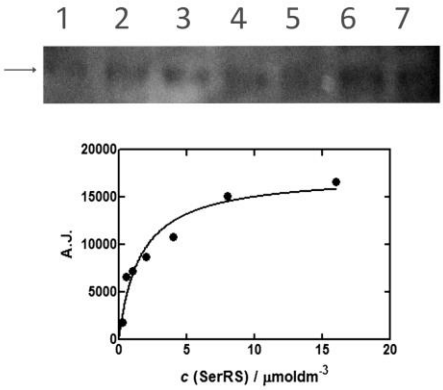
supročišćavanjem SerRS čitavo vrijeme ostaje u kompleksu s $tRNA^{Ser}$. Za razliku, kompleks ArgRS:$tRNA^{Arg}$ ne zadržava se na imobiliziranoj seril-tRNA-sintetazi, a količina zadržanog ArgRS odgovara slobodnom obliku tog enzima.

Kao što je spomenuto, očiti gubitak proteina-mamca (ovdje MtSerRS-his_6) dešava se u uvjetima kada je inkubacijskoj smjesi dodana $MttRNA^{Ser}_{GGA}$. Imobilizacija MtSerRS:$tRNA^{Ser}$ na stupac Ni-NTA daleko je lošija nego u slučaju slobodnog proteina. Moguće je da neposredna blizina tRNA ometa vezanje heksahistidinskog privjeska. Privjesak je kod ovog proteina smješten na N-terminusu, a ista regija dokazano je odgovorna za vezanje pripadne $tRNA^{140}$. Iz tog razloga utjecaj prisustva $tRNA^{Ser}$ na formiranje kompleksa MtArgRS:MtSerRS ispitano je istom metodologijom (afinitetno supročišćavanje), ali uz izmjenu proteina-mamca (sada GST-MtArgRS). S obzirom na izmjenu fuzijskog oblika enzima, kao afinitetna stacionarna faza iskorištena je GST-sefaroza. Rekombinantni GST-MtArgRS imobiliziran je na ovoj afinitetnoj stacionarnoj fazi te potom inkubiran s proteinskim ligandom MtSerRS (prva inkubacijska smjesa, kontrolni eksperiment) i unaprijed[a] izoliranim kompleksom MtSerRS:$MttRNA^{Ser}_{GGA}$ (druga inkubacijska smjesa). Elektroforetska analiza otkrila je proporcionalno zadržavanje i jednog i drugog liganda. Drugim riječima, MtSerRS može participirati u interakciji s MtArgRS bilo kao slobodni enzim ili kao dio binarnog kompleksa MttSerRS:$MttRNA^{Ser}$. Kakav je pritom afinitet binarnog kompleksa MtSerRS:$MttRNA^{Ser}_{GGA}$ prema proteinskom partneru MtArgRS ispitano je mjerenjem količine zadržanog kompleksa (MtSerRS:$MttRNA^{Ser}_{GGA}$) na fuzijskom obliku GST-MtArgRS imobiliziranom na afinitetnom matriksu GST-sefarozi. Afinitetna stacionarna faza uravnotežena je u puferu TBS (v. Materijali i metode) uz dodatak 0,4 mmol dm^{-3} DTT te je na nju vezan GST-MtArgRS. Po ispiranju istim puferom (kako bi se uklonio nevezani GST-ArgRS), suspenzija stacionarne faze i imobiliziranog proteina razdijeljena je u $2 \cdot 8$ tubica (2 seta od po 8 inkubacijskih smjesa). Serijska razrjeđenja MtSerRS odn. MtSerRS:$tRNA^{Ser}$ inkubirana su s imobiliziranim GST-ArgRS na jednaki način kao što je to ranije opisano za detekciju utjecaja reakcijskih prekursora te ispitivanja utjecaja delecija ArgRS na stabilnost binarne interakcije (dakle, otprilike 15 minuta na 41 °C uz povremeno potresanje kako bi se osiguralo miješanje uzorka). Ispiranje nespecifično zadržanog uzorka izvršeno je u obrocima od po 100 μL do dosizanja $A_{280} \approx 0$. Naposljetku su uzorci eluirani dodatkom pufera koji je sadržavao *c* (Tris-HCl)=100 mmol dm^{-3}, pH 8 te *c* (reducirani glutation)=10 mmol dm^{-3}. Eluirane frakcije sakupljene su i podvrgnute denaturirajućoj

[a] Kompleks je izoliran gel-filtracijom na koloni Superdex 200 Hr 10/300.

elektroforezi te *Western*-analizi uz primarna antipentahistidinska antitijela kako bi se detektirala prisutnost MtSerRS (prisutan u obliku s heksahistidinskim privjeskom).

Krivulja vezanja binarnog kompleksa MtSerRS:MttRNA$^{Ser}_{GGA}$ na MtArgRS (koja opisuje nastajanje stabilnog *ternarnog* kompleksa MtArgRS:[MtSerRS:MttRNA$^{Ser}_{GGA}$]) dana je na slici 4.23.



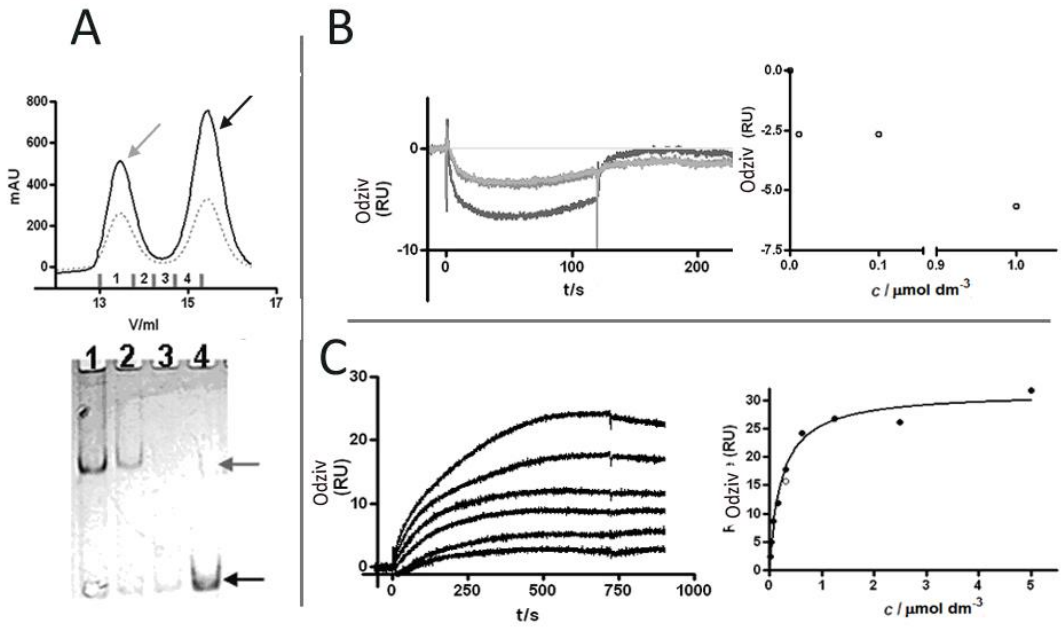
Slika 4-23 Titracija imobiliziranog MtArgRS kompleksom MtSerRS i pripadne tRNA. Količina zadržanog proteina detektirana je *Western*-analizom pomoću anti-his antitijela te kvantificirana pomoću programa ImageJ. Disocijacijska konstanta izračunata je istočkavanjem inkubiranih koncentracija SerRS-kompleksa u odnosu na arbitrarne jedinice (A. J.) dobivene denzitometrijskom izmjerom (izmjera zacrnjenja) u pojedinoj eluiranoj frakciji.

Kvantifikacija vezanog SerRS, odn. SerRS:tRNA^{Ser} otkriva da je afinitet slobodnog i vezanog oblika enzima prema arginil-tRNA-sintetazi sličan. Disocijacijske konstante dobivene ovim pristupom nešto su više nego one dobivene metodom rezonancije površinskih plazmona. Vrijednost K_d za interakciju GST-ArgRS:SRS-his$_6$ iznosi 1,6 μmoldm^{-3} što je oko 7 puta više nego što se dobiva za interakciju istih oblika[a] metodom SPR. Disocijacijska konstanta dobivena titracijom s kompleksom SerRS:tRNA^{Ser} nešto je niža i iznosi 1,4 μmoldm^{-3}. Ovaj mali doprinos ukupnoj stabilnost čestice vjerojatnije je posljedica ograničenja osjetljivosti metode, nego, primjerice, usidrujuće funkcije tRNA^{Ser} ili produktivnije konformacije SerRS unutar ternarnog kompleksa. U sklopu ovog eksperimenta nije dodatno dokazan integritet binarnog kompleksa MtSerRS:MttRNA^{Ser}, već se na održanje istog oslanjalo na ranije pokuse (poput onog danog na slici 4.21). Jedna od mogućnosti uključivala bi nanašanje eluiranih frakcija na nativni gel te detekciju prisutnog MtSerRS unutar vrpci čija pokretljivost odgovara onoj kompleksa MtSerRS:MttRNA^{Ser}. Ovdje se željelo izbjeći tehnički nedostatak takvog koncepta, a koji uključuje trenjem i toplinom potpomognutu disocijaciju izoliranog kompleksa, a koja se neminovno dešava u uvjetima gel-elektroforeze. Bez obzira,

[a] Misli se fuzijskih oblika. Za usporedbu su uzeti podaci dobiveni mjerenjem afiniteta GST-ArgRS prema SerRS-his$_6$ ranije publicirani u [13].

razrjeđivanje izoliranog kompleksa MtSerRS:MttRNA^{Ser} (do kojeg dolazi oblikovanjem serijskih razrjeđenja) definitivno promiče disocijaciju istog te bi nadalje trebalo potvrditi integritet kompleksa MtSerRS:MttRNA^{Ser} kod korištenih koncentracija.

Što se pak tiče preraspodjele MtArgRS između MtArgRS:MttRNA$^{Arg}_{CCU}$ - i MtArgRS: MtSerRS - kompleksa koja je zapažena prilikom ispitivanja supročišćavanja u prisutnosti reakcijskih preteča (slika 4.21) ista je dodatno testirana je metodom rezonancije površinskih plazmona. Ključni koraci tijekom ovog testa dani su unutar panela 4.24. Enzim MtArgRS (rekombinantni oblik s heksahistidinskim privjeskom) najprije je pomiješan je sa (stehiometrijski) trostruko većom količinom pročišćene homologne MttRNA^{Arg} (ukupna akceptorska aktivnost uzorka iznosila je 76%). Uzorak je nanesen na gel-filtracijsku kolonu Superdex 200 HR 10/300 kako bi se odvojio suvišak tRNA, a kompleks MtArgRS:MttRNA^{Arg} izolirao u stehiometrijskom omjeru 1:1 (slika 4.24 A). Integritet ovako izoliranog kompleksa najprije je provjeren nativnom, gel-retardacijskom elektroforezom (slika 4.24 A) te je potom iskorišten za ispitivanje interakcije s MtSerRS u metodi SPR. Enzim MtSerRS bio je imobiliziran na CM5-čipu.

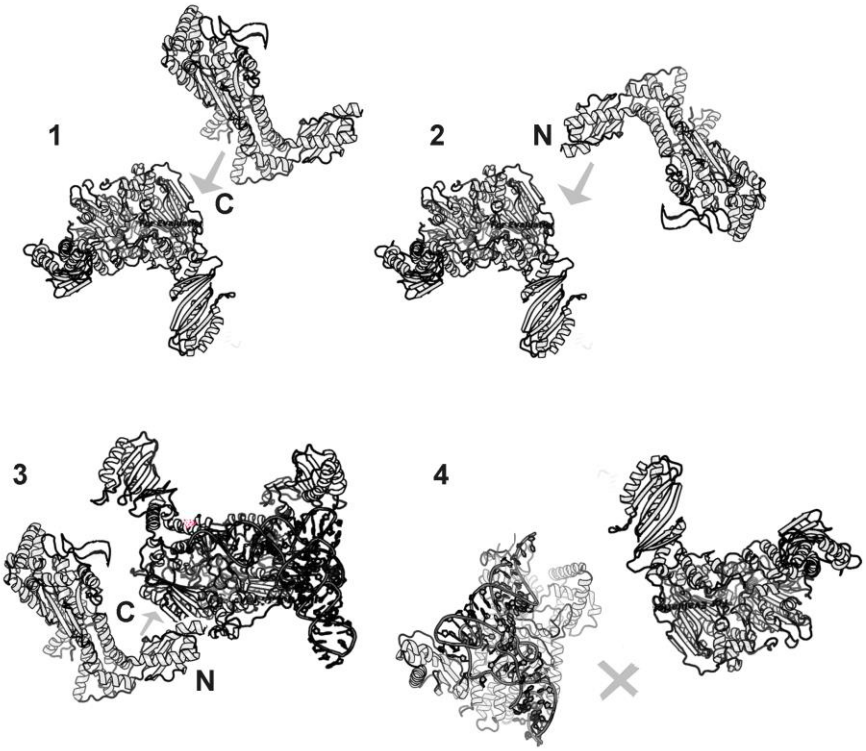


Slika 4-24. (A) Izolacija kompleksa MtArgRS:MttRNA^{Arg} i potvrda integriteta analizom sakupljenih frakcija na nativnom gelu. Sivo obojana strelica upućuje na šiljak koji odgovara kompleksu ArgRS:tRNA^{Arg} unutar kromatograma, kao i na istovrsnu vrpcu na nativnom gelu. Crna strelica u oba slučaja upućuje na nevezanu tRNA. (B) Senzorgam i "krivulja vezanja" za interakciju MtSerRS i preformiranog kompleksa MtArgRS:MttRNA^{Arg}. (C) Provjera rabljenog rekombinantnog oblika divljeg tipa MtArgRS.

Tijekom ispitivanja potencijalne interakcije kompleksa MtArgRS:MttRNA^{Arg} s imobiliziranim MtSerRS nikakvo vezanje nije zabilježeno (slika 4.24 B). Budući da je ranije

objavljeno[13] istraživanje interakcije MtSerRS:MtArgRS u ovom sustavu uključivalo nativni oblik MtArgRS te fuzijski GST-oblik, mogućnost utjecaja heksahistidinskog privjeska na interakciju isključena je titriranjem ovog rekombinanog oblika bez dodatka $tRNA^{Arg}$. Kao što se može zapaziti iz senzorgrama i krivulje vezanja za interakciju MtArgRS-his_6:MtSerRS (slika 4.24 C) pad u afinitetu ne može se pripisati upotrebi rekombinantnog oblika s heksahistidinskim privjeskom. Disocijacijska konstanta za ovaj par vrlo je slična onoj izmjerenoj ranije[13] (283 ± 17 nmoldm^{-3} u odnosu na ranije izmjerenih 253 ± 43 nmoldm^{-3} za nativni oblik MtArgRS). Kao zaključak nameće se da i metoda afinitetnog supročišćavanja, kao i istraživanje uz pomoć SPR-a pokazuju da MtSerRS, MtArgRS i $MttRNA^{Arg}$ ne mogu formirati ternarni kompleks zapazive stabilnosti.

Neovisno o mogućim funkcionalnim posljedicama, (ne)mogućnost ugradnje pripadnih molekula tRNA (dakle, $tRNA^{Ser}$ i $tRNA^{Arg}$) govori nešto o strukturnim odrednicama koje rukovode oblikovanjem kompleksa MtArgRS:MtSerRS. Na osnovu svega izloženog, grube strukturne odrednice kompleksa MtArgRS:MtSerRS dane su na slici 4.25.



Slika 4-25 (1) Metodom kvaščevih hibrida pokazano je da MtArgRS komunicira s MtSerRS pretežno preko katalitičke domene tog enzima[13]. (2) Korištenjem krnjih varijanti MtArgRS pokazano je da se kontakt MtArgRS i MtSerRS dijelom odvija uz pomoć te regije ArgRS. (3) Mogućnost inkorporacije $MttRNA^{Ser}$ u kompleks višeg reda sugerira da je dio katalitičke domene MtSerRS "lice" iste, tj. strana s koje CCA-kraj ulazi u aktivno mjesto prilikom serilacije. (4) Nemogućnost inkorporacije $MttRNA^{Arg}$ u kompleks višeg reda (tj. MtSerRS:[MtArgRS:$MttRNA^{Arg}$] govori u prilog tomu da se kontaktna površina $MttRNA^{Arg}$ i MtSerRS na enzimu MtArgRS barem djelomice podudara. Slovima N i C označene su Add-1 domena ArgRS (N) i katalitička domena SerRS (C).

4.6 Utjecaj SRS na arginilaciju $tRNA^{Arg}$ supstrata različitog stupnja modificiranosti

Naizmjenično sudjelovanje MtArgRS u kompleksima s pripadnom tRNA i sintetaznim partnerom MtSerRS implicira postojanje određenog kontekstualnog faktora koji utječe na vezanje bilo jedne bilo druge makromolekule. Za arginil-tRNA-sintetazu, kao i GluRS, GlnRS i LysRS razreda I (dakle, sintetaze koje za katalizu prvog koraka reakcije aminoacilacije trebaju pripadnu tRNA) se smatra kako *in vivo* uglavnom egzistiraju u vidu kompleksa s vlastitom tRNA. Stoga, ukoliko stabilna interakcija MtArgRS:$MttRNA^{Arg}$ dokida mogućnost nastanka proteinskog kompleksa MtArgRS:MtSerRS, a prvi kompleks predstavlja dominantno stanje ArgRS *in vivo*, pod kojim uvjetima dolazi do prijelaza MtArgRS iz kompleksa s $tRNA^{Arg}$ u kompleks s MtSerRS?

Tijekom ekspresije heterolognog transkripta $MttRNA^{Arg}$ u *E. coli* dolazi do modificiranja ove RNA domaćinovom modificirajućom mašinerijom. Budući da se dodatkom IPTG-a stimulira

nastanak T7 RNA-polimeraze, a koja ciljano prepisuje samo slijed pod kontrolom vlastitog promotora (dakle slijed za heterolognu MttRNA), enzimi zaduženi za uvođenje posttranskripcijskih modifikacija u *E. coli* izloženi su velikoj količini sirovog transkripta. Kao rezultat, nastaje populacija molekula $MttRNA^{Arg}$ koja nije homogeno modificirana, već neke specifije sadrže više, a druge manje modificiranih nukleotida.

Pri standardnim uvjetima potaknute ekspresije (v. poglavlje Materijali i metode), tipično obogaćenje argininskim heterolognim izoakceptorom iznosi 50 do 60 %. Zanimljivo je spomenuti da je više od polovice takvih molekula $tRNA^{Arg}$ prisutno u denaturiranom obliku već nakon inicijalnog ekstrakcijskog koraka. Ta pojava sugerira smanjenu stabilnost nastalih tRNA u smislu ispravnog smatanja[a]. Pročišćavanje *in vivo* nastalog transkripta slabim ionskih izmjenjivačem i gel-filtracijom upotrijebljeno u inicijalnim eksperimentima davalo je zadovoljavajuće obogaćenje $tRNA^{Arg}$-specijama (iznad 80 %), no istovremeno je zapaženo da količina denaturirane tRNA u frakcijama varira. To implicira da u sakupljenom uzorku postoje $tRNA^{Arg}$ različite stabilnosti, odnosno, da se radi o heterogenom uzorku. Iz tog razloga, nakon ionske izmjene upotrijebljen je kromatografski korak u kojemu je izolirana tRNA razdvojena kromatografijom obrnutih faza (RPC prema eng. *reverse phase chromatography*).

Kromatografija obrnutih faza temelji se na adsorpciji hidrofobnih molekula na hidrofobnu čvrstu podlogu unutar polarne mobilne faze. Smanjenjem polarnosti mobilne faze dodatkom organskog otapala smanjuje se snaga hidrofobnih interakcija koje postoje između nanesenih (makro)molekula i stacionarne faze. Stoga dodatak organskog otapala mobilnoj fazi rezultira desorpcijom makromolekula vezanih na stacionarnu fazu. Što je molekula više hidrofobnog karaktera, to dulje biva zadržana na stacionarnoj fazi kolone te se eluira kasnije u gradijentu organskog otapala. Dakle, kromatografija obrnutih faza upotrebljava se za razdvajanje poli/oligonukleotida prema njihovoj hidrofobnosti pri čemu se polinukleotidi s većim stupnjem hidrofobnosti eluiraju sporije u gradijentu organskog otapala (ovdje etanol). Ukupna duljina, prisutnost kemijskih modifikacija i količina sparenih dvolančanih regija (sekundarna struktura) utječu na stupanj hidrofobnosti molekule čime pak utječu na adsorpciju razdvajanih tRNA na stacionarnu fazu.

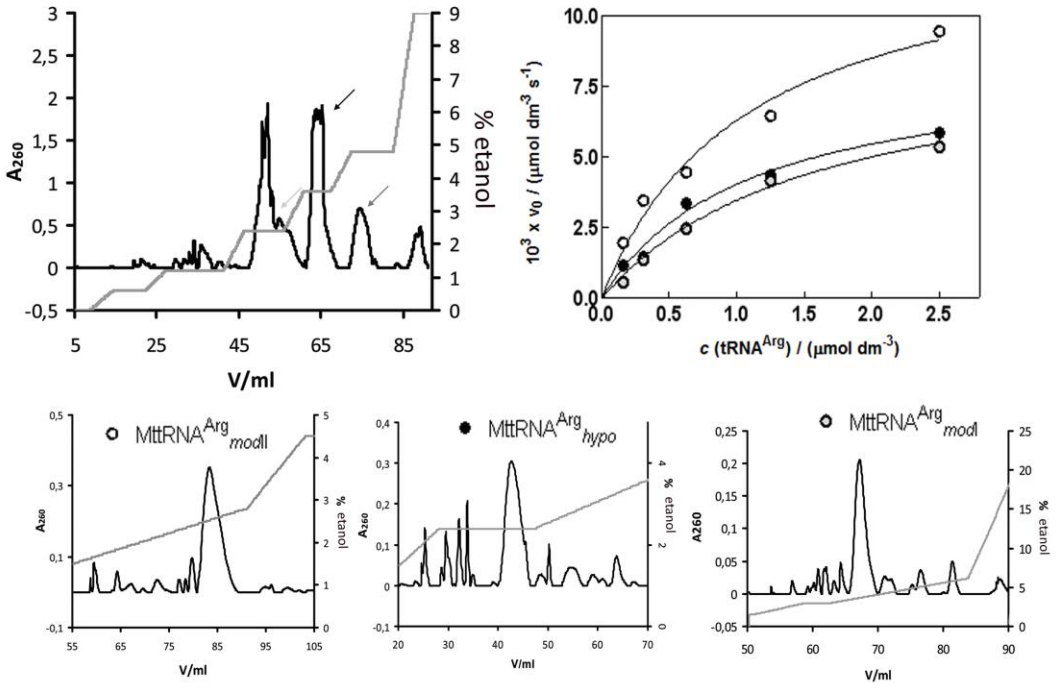
Tijekom separacije tRNA kromatografijom obrnutih faza populacija $MttRNA^{Arg}$ razdvaja se unutar tri karakteristična apsorpcijska maksimuma. U našim rukama, vrijeme elucije za dvije

[a] A koje je potrebno za ispravno prepoznavanje pripadnom sintetazom MtArgRS.

od ukupno tri varijante $MttRNA^{Arg}$ zavisilo je od sastava pufera (količina magnezijevih iona[a]) i renaturaciji izolirane tRNA prije same kromatografije. Bez obzira na to, pojedini tip (odn. varijanta $MttRNA^{Arg}$) bio je prepoznatljiv prema relativnoj zastupljenosti, kinetičkim svojstvima i, najznačajnije, osjetljivosti na dodatak MtSerRS reakciji arginilacije (slika 4.26, tablica 4.3).

Izoakceptori tRNA nositelji su različitih dodatnih funkcionalnih grupa, odn. posttranskripcijskih modifikacija. Iste imaju direktni impakt na ribosomsku biosintezu proteina (najjednostavniji primjer je možda modifikacija adenina na poziciji kolebljive baze u inozin što omogućuje istom izoakceptoru prepoznavanje većeg broja kodona). Sve više se razotkriva kako stupanj modificiranosti tRNA može biti signalom za različita stanična zbivanja i adaptivne procese (v. Diskusija). Navedeno, kao i mogućnost izravnog recikliranja upotrijebljenih $MttRNA^{Arg}$ u blizini ribosoma navelo nas je da ispitamo kakva je osjetljivost ArgRS prema različitim varijantama $MttRNA^{Arg}_{CCU}$, odnosno, prema proizvedenoj $MttRNA^{Arg}_{CCU}$ s različitom količinom uvedenih posttranskripcijskih modifikacija (spomenuta 3 tipa, odn. varijante $MttRNA^{Arg}_{CCU}$). Stimulirajući efekt arginil-tRNA-sintetaze na serilaciju poznat je otprije, a potencijalni upliv MtSerRS na arginilacijsku reakciju istražen je korištenjem različitih varijanti $MttRNA^{Arg}_{CCU}$ u reakciji MtArgRS. Dodatno, znajući kako stabilni kompleks ArgRS:$tRNA^{Arg}$ može dokinuti interakciju sintetaza (tj. formiranje kompleksa MtArgRS:MtSerRS), zanimalo nas je može li SerRS (i pri kojim uvjetima) dokinuti interakciju MtArgRS:$MttRNA^{Arg}$.

[a] Radi se o pomaku najzastupljenijeg tipa $MttRNA^{Arg}$ koji se bez prethodne renaturacije eluira prvi, a uz renaturaciju pomiče na drugo mjesto unutar gradijenta etanola.



Slika 4-26 Kromatografija obrnutih faza uzorka tRNA *E. coli* obogaćenog heterolognim MttRNA^{Arg}-transkriptom. (gore lijevo): Početno razdvajanje uzorka; zapažaju se 3 karakteristična maksimuma apsorbancije koji su aktivni u reakciji aminoacilacije pomoću MtArgRS, a označeni su sivim strelicama različitog tonaliteta (svijetlo sivo MttRNA$^{Arg}_{modII}$, sivo MttRNA$^{Arg}_{modI}$, crno MttRNA$^{Arg}_{hypo}$). (dolje): Ponovljena kromatografija izoliranih frakcija odgovarajućih maksimuma apsorbancije i izolacija homogenih MttRNA$^{Arg}_{CCU}$-varijanti. Kromatogrami su izloženi redoslijedom koji odgovara vremenima eluiranja u početnom kromatogramu, slijeva na desno. (gore desno): Michael-Mentenov prikaz reakcija arginilacije (reakcija MtArgRS) s pojedinim varijantama. Obojenje pojedinih točaka odgovara ranijem kodu za pojedinu varijantu. Uočljivo je da su varijante MttRNA$^{Arg}_{modI}$ i MttRNA$^{Arg}_{hypo}$ podjednako dobri supstrati, dok je MttRNA$^{Arg}_{modII}$ svega dvostruko bolji suptrat u reakciji MtArgRS.

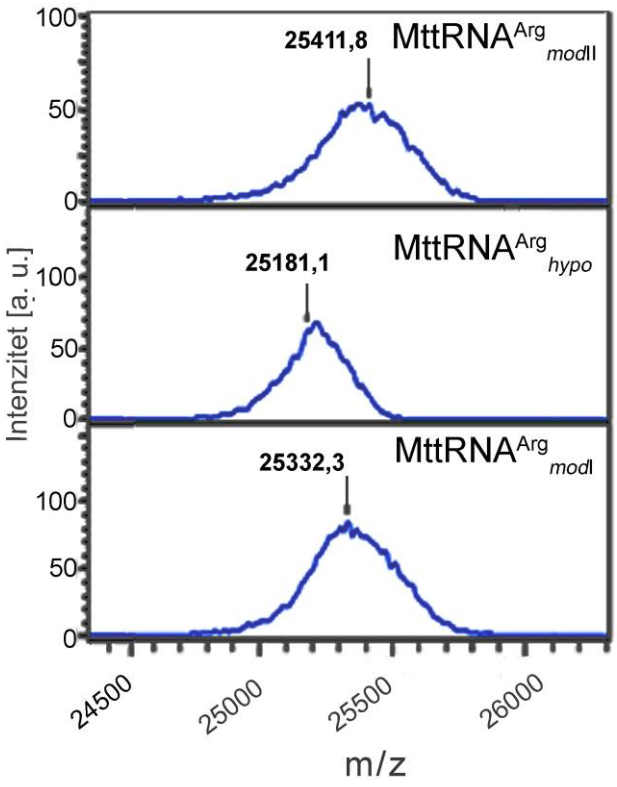
Varijante MttRNA^{Arg} koje korespondiraju s pojedinim maksimumima apsorbancije (a koje su ovdje označene kao tRNA$_{hypo}$, tRNA$_{modI}$ i tRNA$_{modII}$, v. kasnije) posjeduju slična, ali ne i identična kinetička svojstva (slika 4.26 i tablica 4.3). Najslabije zastupljena tRNA (tRNA$_{modII}$) dvostruko je bolji supstrat od najraširenije tRNA$_{hypo}$, kao i od sporo eluirajuće tRNA$_{modI}$.

Tablica 4-3 Kinetički parametri za različite varijante MttRNA$^{Arg}_{CCU}$ te tRNA^{Arg} *E. coli*. Podaci za heterologno arginiliranje EctRNA^{Arg} preuzeti su iz[13].

	k_{cat} / s^{-1}	K_m / (µmol dm^{-3})	(k_{cat} / K_m) / (s^{-1} µmol^{-1} dm^3)	osjetljivost na dodatak MtSerRS
MttRNA$^{Arg}_{hypo}$	0,51±0,01	1,1±0,2	0,464	da
MttRNA$^{Arg}_{modI}$	0,54±0,04	1,60±0,18	0,339	ne
MttRNA$^{Arg}_{modII}$	0,79±0,04	1,08±0,20	0,729	ne
EctRNA$^{Arg}_{tot}$	0,026	4,460	0,006	ne

Relativna količina pojedine varijante MttRNA$^{Arg}_{CCU}$ u preparaciji uglavnom je bila postojana; integriranjem površine ispod maksimuma apsorbancije u inicijalnom kromatogramu kromatografije obrnutih faza (i korigiranjem tih površina za izmjerenu

akceptorsku aktivnost) ispostavlja se da najraširenija $MttRNA^{Arg}_{hypo}$ predstavlja oko 50%, $MttRNA^{Arg}_{modI}$ oko 30, a $MttRNA^{Arg}_{modII}$ oko 20% izoliranih $MttRNA^{Arg}$-specija. Ovakav raspored u skladu je s količinom nadodanih posttranskripcijskih modifikacija. Ukupna masa pojedine varijante izolirane do homogenosti (donji dio panela slike 4.26) a čija je akceptorska aktivnost iznosila blizu ili točno 100 % određena je MALDI-TOF-analizom (slika 4.27).



Slika 4-27 MALDI-TOF analiza izoliranih $MttRNA^{Arg}$ varijanti. Predviđene mase naznačene su na pojedinom spektru zajedno s tipom/varijantom $MttRNA^{Arg}$.

Analiza spektrometrijom masa (MALDI-TOF) otkriva akumuliranje mase od 230,7 Da kod $tRNA_{modII}$ te 151,2 Da za $tRNA_{modI}$, a u odnosu na $tRNA_{hypo}$. Potonji oblik posjeduje masu od 25181,1 što je vrlo blizu teorijskoj monoizotopnoj masi za sirovi transkript od 25180,172.

Tablica 4-4 Modifikacije tRNA^{Arg}-izoakceptora kod domaćina *E. coli*. Za modifikacije nukleotida koji se na istim položajima nalaze u MttRNA^{Arg} navedena je i monoizotopna masa.

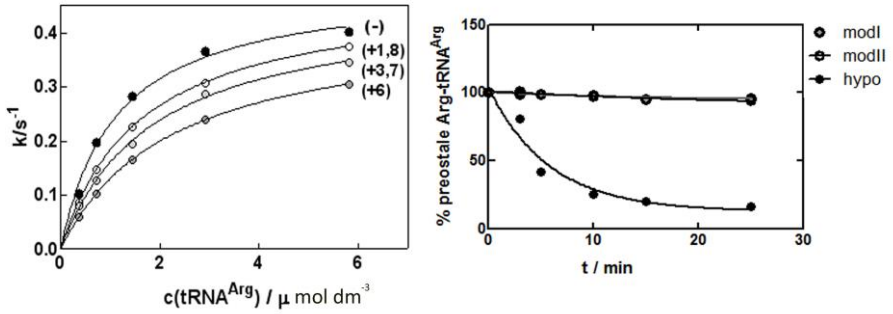
modifikacija	položaj kod EctRNA^{Arg}	izoakceptor	tRNA-element	postoji u MttRNA$^{Arg}_{CCU}$	monoizotopna masa
4-tiouridin	8	ACG	akceptor	Da	15,97716
dihdrouridin	17	ACG, CCG	D-domena	Ne	2,01565
pseudouridin	20A	ACG, CCG	D-domena	Da	0
pseudouridin	40	UCU		Ne	-
pseudouridin	55	svi	T-domena	Da	0
5-metiluridin	54	svi	T-domena	Da	2,01565
3-(3-amino-3-karboksipropil)-uridin	47	ACG	variabilna regija	Da	101,0477
5-metilaminometiluridin	34	UCU	domena antikodona	Ne	-
2-tiocitidin	32	ACG, CCG, UCU	domena antikodona	Da	15,97716
1-metilgvanozin	37	CCG	domena antikodona	Ne	-
7-metilgvanozin	46	ACG, CCG	varijabilna regija	Da	15,02348
2-metiladenozin	37	ACG	domena antikodona	Ne	-
inozin	34	ACG	domena antikodona	Ne	-
*N*6-treonilkarbamoil-adenozin	37	UCU, CCU	domena antikodona	Da	145,0375

Kod domaćina *E. coli* samo dvije modifikacije mogu biti odgovorne za veliki pomak u masi koji je detektiran kod varijanti MttRNA^{Arg}modI i MttRNA^{Arg}modII: *N*6-treonilkarbamoil adenozin (monoizotopne mase od 145,038) te 3-(3-amino-3-karboksipropil)uridin (monoizotopne mase od 101,048, tablica 4.4).

Usporedbom afiniteta MtArgRS prema tri varijante MttRNA^{Arg} (tablica 4.2) vidljivo je da akumulacija posttranskripcijskih modifikacija *ne* utječe na prepoznavanje pripadnom aaRS (barem s aspekta heterolognih modifikacija koje ovaj transkkript može steći procesiranjem u *E. coli*). Mnogo je zanimljivije da MtSerRS može suspregnuti nabijanje najslabije modificirane varijante MttRNA$^{Arg}_{hypo}$.

Ispitivanje učinka SerRS na arginilacijsku reakciju razotkrila je kako prisutnost SerRS u reakcijskoj smjesi uspješno inhibira aciliranje MttRNA$^{Arg}_{hypo}$, dok to nije slučaj s preostale dvije varijante MttRNA$^{Arg}_{CCU}$. Inkubacija ArgRS sa (super)stehiometrijskom količinom SerRS (neposredno pred test aminoaciliranja) rezultira miješanim tipom inhibicije (slika 4.28 lijevo, tablica 4.5).

Test inhibicije arginilacije uz enzim MtSerRS izveden je na sljedeći način: MtArgRS (koncentracije 10 μmol dm^{-3}) inkubiran je u određenom stehiometrijskom odnosu s enzimom MtSerRS te je smjesa inkubirana tijekom 7-10 minuta na 41 °C. Za to vrijeme uzorak za test aminoaciliranja kratko je inkubiran na 48 °C, kako bi se termički uravnotežio prije započinjanja reakcije (tipično oko 1 minute). Neposredno prije dodavanja u reakciju arginilacije, smjesa inkubiranih enzima MtArgRS i MtSerRS razrijeđena je zagrijanim puferom za razrjeđivanje (25 $mmoldm^{-3}$ Hepes, pH 7,2, 150 $mmoldm^{-3}$ NaCl, 0,4 $mmoldm^{-3}$ DTT) tako da koncentracija MtArgRS bude 75 $nmoldm^{-3}$.



Slika 4-28 Inhibicija arginilacije $MttRNA^{Arg}_{hypo}$ (lijevo) te poticanje deacilacije Arg-$MttRNA^{Arg}_{hypo}$ (desno) proteinskim partnerom MtSerRS. Stehiometrijski višak dodanog MtSerRS indiciran je s desne strane grafa prilikom inhibicijskog testa (lijevo), tj. uz 16,6 $nmoldm^{-3}$ MtArgRS inkubirano je 0 (oznaka (-)), 30 $nmoldm^{-3}$ (oznaka (+1,8)), 60 $nmoldm^{-3}$ (oznaka (+3,7)) i 100 $nmoldm^{-3}$ MtSerRS (oznaka (+6)). I u grafičkom prikazu deacilacijskog testa shema tonaliteta ispune krugova jednaka je kao ranije: praznim kružićima prikazana je reakcijska smjesa s $MttRNA^{Arg}_{modII}$, sivim kružićima s $MttRNA^{Arg}_{modI}$ te crnim kružićima smjesa s $MttRNA^{Arg}_{hypo}$.

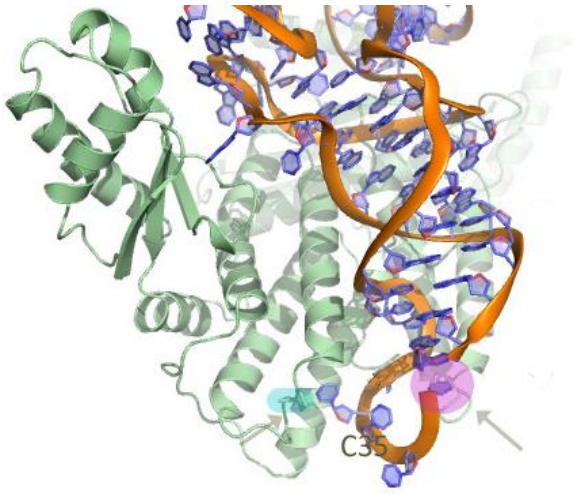
Tablica 4-5 Kinetički parametri za reakciju arginilacije varijante $MttRNA^{Arg}_{hypo}$ bez i u prisutnosti proteinskog partnera MtSerRS.

	omjer MtSerRS:MtArgRS			
	bez MtSerRS	1,8:1	3,7:1	6,0:1
k_{cat} / s^{-1}	0,493	0,481	0,495	0,424
K_m / μmol dm^{-3}	1,127	1,620	1,828	2,254
(k_{cat}/K_m) / (μmol dm^{-3} s^{-1})	0,437	0,297	0,27	0,188

Miješani tip inhibicije koji prisustvo MtSerRS uvjetuje u suglasnosti je sa pretpostavljenim uzajamnim steričkim isključivanjem molekula $MttRNA^{Arg}$ i MtSerRS prilikom vezanja na MtArgRS. No, prilikom pokušaja dodavanja većih količina MtSerRS u reakciju arginilacije zapaženo je da se linearni vremenski tijekovi više ne mogu dobiti, već da koncentracija Arg-$tRNA^{Arg}$ nakon početne akumulacije počinje padati. Moguća sposobnost MtSerRS da potakne deacilaciju arginilirane $tRNA^{Arg}$ istražena je na sljedeći način: potpuno homogena (akceptorska aktivnost 100 %) $MttRNA^{Arg}_{hypo}$ arginilirana je enzimom MtArgRS (koncentracije 30 nmol dm^{-3}) u standardnim uvjetima (v. Materijali i metode), osim što je koncentracija [14C]arginina smanjena na 10 μmol dm^{-3}. Reakcija je puštena da se odvije "do

kraja" (10 minuta) te je potom dodana MtSerRS (koncentracije 100 nmol dm^{-3}). Rezultat je dan na slici 4.28. Gubitak arginilirane tRNA u smjesi ukazuje da bi ovdje zaista moglo biti riječ o enzimskoj deacilaciji Arg-$tRNA^{Arg}_{hypo}$. Ovaj fenomen ne dešava se ukoliko MtSerRS ne postoji u reakciji, niti se dešava sa supstratima Arg-$tRNA^{Arg}_{modI}$ i Arg-$tRNA^{Arg}_{modII}$.

Jedna od kritičnih determinanti u arginilnom sustavu je apsolutno očuvani citozin na središnjem položaju unutar antikodona. Zanimljivo je da se taj citozin djelomice prepoznaje putem interakcija slaganja s očuvanim triptofanskim ostatkom (kod kvasca na položaju 569). U različitih metanogena na tom mjestu susrećemo prolinski ostatak, a koji kod arhejskog enzima PhArgRS ne stupa u interakcije slaganja sa središnjim citozinom antikodona. Prisutnost modifikacija kod argininskih izoakceptora u području antikodona od izrazite je važnosti za ispravno dekodiranje na ribosomu. Na primjeru $tRNA^{Lys}_{UUU}$ pokazano je da prisutnost modifikacije t6A izravno utječe na konformaciju antikodonske omče te je stabilizira unutar ribosomskog A-mjesta. Moguće je da kod dijela arhejskih arginil-tRNA-sintetaza izmjena očuvanog triptofana prolinom uvjetuje djelomično oslabljeno prepoznavanje konformacije antikodona što, s aspekta nastanka slabije modificiranih $tRNA^{Arg}$-vrsta u uvjetima *in vivo* predstavlja određeni hazard u smislu otežane translacije argininskih kodona na ribosomu. Pogotovo u svjetlu mogućeg recikliranja $tRNA^{Arg}$-izoakceptora usidrenjem ArgRS i SerRS na arhejskom ribosomu, imperativ za uspješno dekodirajućom (potpuno modificiranom) vrstom $tRNA^{Arg}$ postaje još jači.



Slika 4-29 Položaj modifikacije t6A, središnje baze antikodona C35 i prolina zaduženog za prepoznavanje istog citozina. Uvođenje modifikacije t6A razultira drukčijom strukturom antikodonskog dijela $tRNA^{Arg}$, budući da se sterički ne može uklopiti ukoliko konformacija ostane onakva kakvu posjeduje nemodificirani transkript $PhtRNA^{Arg}$. Nemogućnost inkorporacije ovdje je ilustrirana prekidom u šećerno-fosfatnoj okosnici tRNA i dodatno potcrtana ružičastim krugom. Citozin na položaju 35 kod nemodificiranog transkripta usmjeren je od enzima, a ključni prolinski ostatak (označen tirkiznim ovalom) smješten u blizini citozina 34 (s kojim opet ne stupa u interakcije slaganja).

5 Rasprava

5.1 Metode istraživanja protein-protein interakcija

Uzajamna udruživanja proteina predstavljaju fenomen karakterističan za svaki biološki proces. Stanična zbivanja poput replikacije DNA, transkripcije, translacije, prekrajanja nezrelih mRNA-molekula (eng. *splicing*), kontrole staničnog ciklusa, prijenosa signala, kataboličkih i anaboličkih reakcija sva uključuju pojavu proteinskih kompleksa, a koji unutar tih procesa funkcioniraju kao ključne komponente. U stanici se susreće i vrlo veliki broj prolaznih interakcija između proteinskih partnera, a čija je uloga kontrola i uskađivanje velikog broja staničnih procesa.

Za identifikaciju proteinskih partnera *in vivo* tipično se rabe metode dvaju kvaščevih hibrida (eng. *yeast two hybrid,* Y2H) ili druge inačice komplementacijskih testova (poput BiFC[a], prema eng. *bimolecular fluorescence complementation*). Interakcija MtArgRS i MtSerRS originalno je otkrivena ovom metodom. Općenito, metoda se sastoji u praćenju transkripcije gena-reportera, a do koje može doći samo ukoliko u stanici dođe do sklapanja segmentiranog transkripcijskog faktora koji je sposoban vezati uzvodni aktivirajući slijed tog gena. Ključ ove metode leži u činjenici da je većina eukariotskih transkripcijskih faktora modularne građe te stoga aktivirajuća domena transkripcijskog faktora i DNA-vežuća domena istog faktora mogu usklađeno djelovati čim su smještene u neposrednu blizinu, a bez potrebe za direktnim (fizičkim) kontaktom. Ukratko, gen od interesa (npr. gen *serS* iz arheje *M. thermautotrophicus*) amplificira se lančanom reakcijom polimeraze i ugradi u tzv. vektor-mamac, posebno konstruiran za metodu kvaščenih hibrida, npr. vektor pDBLeu. Ovaj vektor sadrži kodirajući slijed ekspresijom kojeg nastaje GAL4 DNA-veznu domenu (transkripcijski faktor GAL4). Biblioteka cDNA (npr. biblioteka cDNA arheje *M. thermautotrophicus*) ugradi se u drukčiji vektor, npr. pDEST22, a koji sadrži GAL4 DNA-aktivirajuću domenu. U stanici dolazi do transkripcije i translacije fuzijskih produkata (odn. proteina-mamca fuzioniranog s DNA-vežućom domenom transkripcijskog faktora te fuzije DNA-aktivirajuće domene transkripcijskog faktora s raznim proteinima i proteinskim fragmentima). Ukoliko u stanicama kvasca dođe do interakcije proteina-mamca (MtSerRS-fuzija) s proteinom-plijenom (fragmenti nastali transkripcijom i translacijom cDNA u fuziji s aktivirajućom domenom

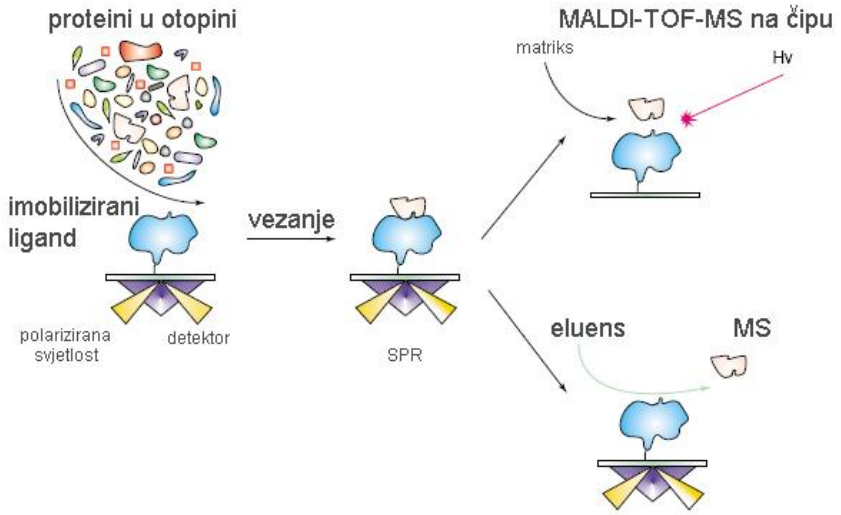
[a] BiFC, bimolekulska fluorescencijska komplementacija (eng. *bimolecular fluorescence complementation*) bazira se na kreiranju fuzija istraživanih proteina s fragmentima fluorescentnog proteina. Interakcija istraživanih proteina (u fuzioniranom obliku) dovodi fragmente fluorescentnog proteina u neposrednu blizinu dozvoljavajući vezanje reporterskog proteina i emisiju fluorescencijskog signala.

GAL4) dolazi do transkripcije gena reportera. U kvaščevom genomu prisutne su jedinstvene kopije triju reporterskih gena (*HIS3*, *URA3* i *lacZ*). Promotorske regije tih gena sljedovno su različite, osim u dijelu na koji se veže transkripcijski faktor GAL4. Ukoliko dolazi do interakcije produkata genskih fuzija prisutnih na rekombinantnim vektorima pDBLeu i pDEST22, dolazi i do transkripcije gena *HIS3*, *URA3* i *lacZ*. Stoga, stanice kvasca koje preživljavaju na čvrstoj hranidbenoj podlozi bez histidina ili uracila pozitivne su na prisutnost proteina-plijena. Dodatkom X-gal takve stanice poprimaju plavo obojenje, jer je u stanicama prisutna β-galaktozidaza (čija je transkripcija također potaknuta sinergističkim vezanjem GAL4-fuzija). Na opisani način identificirana je i arginil-tRNA-sintetaza *M. thermautotrophicus* kao proteinski partner MtSerRS[13]. Glavni problem metode kvaščevih hibrida je relativno visoka stopa identifikacije lažnih pozitiva zbog čega se nužno validira testiranjem identificirane interakcije metodama koimuniprecipitacije i afinitetnog supročišćavanja.

Od metoda *in vitro*, a koje omogućuju široki raspon pretrage (eng. *high throughput*), tipično se rabi metoda tandemskog afinitetnog (su)pročišćavanja (TAP, prema eng. *tandem affinity purification*). Protein-mamac se proizvede tako da posjeduje dva fuzijska, afinitetna privjeska odvojena slijedom koji može prepoznati određena proteaza (nužan uvjet je njena isključiva specifičnost za slijed uveden između privjesaka). Slično kao kod metode afinitetnog supročišćavanja, protein-mamac imobilizira se na afinitetnu stacionarnu fazu preko krajnjeg privjeska (sasvim C- ili sasvim N-terminalno smještenog) te se suspenzija smole i protein-mamca inkubira s proteinima staničnog ekstrakta od interesa. Po inkubaciji i ispiranju smole, dodaje se proteaza koja otcjepljuje krajnji fuzijski privjesak te na taj način "eluira" protein-mamac (zajedno sa svim vezanim interaktorima) sa smole. Sakupljeni uzorak ponovo se imobilizira, ovaj put preko drugog (preostalog privjeska). Po ispiranju uzorka na drugoj stacionarnoj fazi smatra se da će se eluiranjem proteina-mamca sada u uzorko naći samo specifično vezani proteini (plijen). Identifikacija proteina-plijena vrši se tripsinizacijom uzorka i identifikacijom cjelovitih proteina preko mase triptičkih fragmenata analiziranih metodom spektrometrije masa[a].

[a] Originalni postav metode TAP uključuje fuzioniranje TAP-privjeska na C-kraj istraživanog proteina. Privjesak se sastoji od veznog peptida za kalmodulin (CBP, prema eng. *calmodulin binding peptide*) smještenog N-terminalno, zatim mjesta za prepoznavanje/cijepanje TEV-proteazom (TEV prema eng. *tobacco etch virus*) te slijedom Proteina A, smještenog posve C-terminalno. Potonji dio se čvrsto veže na IgG-afinitetni matriks, a CBP na afinitetni matriks s kalmodulinom čime se omogućuje pročišćavanje izoliranog kompleksa u dva koraka afinitetne kromatografije.

Jedna od uzbudljivih novih tehnika za identifikaciju proteinskih partnera na velikom uzorku potencijalnih kandidata[a] uključuje kombinaciju tehnika rezonancije površinskih plazmona (SPR) i spektrometriju masa (MS). Ukratko, protein od interesa imobilizira se na površini čipa. Proteini uzorka (npr. staničnog lizata) prolaskom iznad kovalentno imobiliziranog liganda vežu se na ligand te ostaju "zarobljeni" na površini čipa, tj. ponad izloženog proteinskog liganda prisutnog na njegovoj površini. Detekcija u SPR-u nije destruktivna te se vezani proteini lako mogu eluirati s površine čipa i dalje analizirati spektrometrijom masa (slika 5-1). Kombinacija metoda omogućuje eliminaciju proteina koji bi se mogli nespecifično vezati na organski matriks čipa (usporedba vezanja na praznoj, referentnoj ćeliji) te na ligand (vezanje istog proteina iz staničnog lizata na različite ligande ukazuje na mogućnost nespecifičnog vezanja). Metoda dozvoljava identifikaciju interakcije s proteinskim fragmentima, varijantama istog proteina (npr. posttranslacijski modificiranih i nemodificiranih proteina), proteinskih kompleksa (s drugim proteinima ili drugim vrstama (makro)molekula). Metoda se ponekad naziva i BIA-MS (prema komercijalnom imenu tehnike SPR - Biacore) te je po prvi put izložena 1996.[141]



Slika 5-1 Kombinirana metoda rezonancije površinskih plazmona (SPR) i spektrometrije masa (MS). Ligand je kovalentno vezan na površinu čipa. Otopina koja sadrži ciljani protein propušta se iznad površine te se interakcije proteina (analita) i liganda direktno zapaža SPR-om. Zadržani protein potom može biti analiziran ili (gornji dio) uklanjanjem čitavog čipa po čemu slijedi priprema istog za metodu MALDI-TOF-spektrometrije masa ili (donji dio panela) mikroelucija s površine čipa i sakupljenje eluiranog uzorka za daljnji korak ESI-MS-analizu (ESI prema eng. *electrospray ionization*).

U sklopu ove disertacije metoda rezonancije površinskih plazmona rabljena je u svrhu istraživanja interakcije MtSerRS s krnjim inačicama MtArgRS (poglavlje 4.4.3), ispitivanje nastanka ternarnog kompleksa MtSerRS:MtArgRS s pripadnom tRNA (poglavlje 4.5), te ispitivanje afiniteta MtArgRS (divljeg tipa i krnjih varijanti) prema $MttRNA^{Arg}_{CCU}$ (poglavlje

[a] Kao što je to stanični ekstrakt.

4.4.4). Dakle, čak i na primjeru istraživanja koje je izvršeno u sklopu izrade ove disertacije moguće je demonstrirati prilagodljivost metode SPR-a u istraživanju makromolekulskih interakcija: moguće je analizirati protein-protein, protein-RNA-interakcije, interakcije koje uključuju više interreagirajućih makromolekula itd. Tehnologija je primjenjiva i u slučajevima pretraživanja malih molekula za vezanje na određeni protein pa bi bila prikladna, npr. za mjerenje afiniteta istraživanih sintetaza prema ATP-u[a] (kada bi to bio predmet interesa). Kao što je spomenuto, jedna od velikih prednosti detekcije formiranog kompleksa u ovoj metodi mogućnost rada s neobilježenim (odn. nativnim) makromolekulama. Drugim riječima, fluorescentni ili radioizotopni biljezi[b] ovdje nisu potrebni. Zbog nedostatka zahtjeva za obilježavanjem molekule, SPR-tehnologija prikladna je za istraživanje čitavog spektra bioloških interakcija - od onih koje uključuju male molekule (do 0,5 kDa), peptide, proteine, oligonukleotide, oligosaharide, lipide isl. Moguće je pratiti interakcije čitavih faga, viralnih čestica i stanica. Također, SPR-metoda odlična je za istraživanje od vrlo slabih molekulskih interakcija do onih izrazito jakih (raspon disocijacijskih konstanti 1 mmol dm^{-3} do 1 pmol dm^{-3}), kao i za interakcije karakterizirane kinetičkim konstantama brzine vrlo velikog raspona (moguće je umjeriti brzine unutar raspona k_a od 10^3 do 10^8 mol^{-1} dm^3 s^{-1}, k_d od 1 do 10^{-6} s^{-1})[142]. Dodatna prednost SPR-tehnologije nad drugim metodama za istraživanje interakcije makromolekula uključuje mogućnost direktnog praćenja stabilnosti imobiliziranog liganda – isti čip s imobiliziranom makromolekulom može se opetovano rabiti, a njegova stabilnost ispitati vezanjem prikladne količine poznatog analita[c]. Nadalje, količina materijala potrebna za tipični postav eksperimenta je prilično niska, pogotovo u usporedbi s metodom poput izotermalne titracijske kalorimetrije (ITC, prema eng. *isothermal titration calorimetry*). Primjerice, za interakciju krnje varijante Δ21-MtArgRS i MtSerRS utrošeno je oko 2 μg MtSerRS za imobilizaciju i 180 μg Δ21-MtArgRS za jedan pokus. Dakle, za tipična tri mjerenja potrebno je 0,5 mg proteina-analita te 2 μg proteina-liganda.

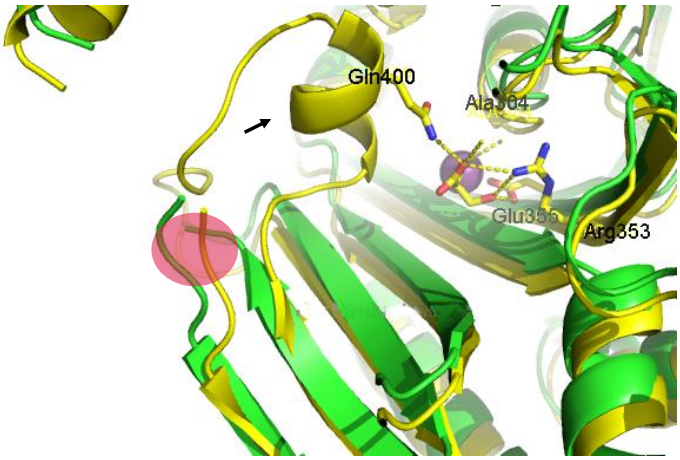
U istraživanju interakcije MtSerRS:MtArgRS u sklopu ovog rada iskorištena je imobilizacija MtSerRS na CM5-čipu (dakle, preko slobodnih amino-skupina, detaljnije v. Materijali i metode). Ovakav način imobilizacije naziva se direktnim, jer je ligand kovalentno pričvršćen na podlogu. Tipično se proteine kovalentno veže na podlogu kemijskom modifikacijom njihovih amino-skupina (slobodni lizinski ostaci i N-kraj enzima) ili tiolnih skupina (cisteinski bočni ogranci). U istraživanju interakcije MtArgRS:$MttRNA^{Arg}_{CCU}$ iskorištena je

[a] Masa ATP-a je na granici detekcije s ukupno 507 Da.
[b] A koji su skupi te često dovode do promjene smatanja istraživane makromolekule.
[c] Također, fizičke promjene u strukturi površine čipa mogu se zamijetiti i praćenjem stabilnosti bazne linije.

indirektna imobilizacija proteina na površinu čipa. Iskorišten je čip supstituiran s ograncima nitrilotrioctene kiseline (NTA) na koju su u individualnom koraku vezani ioni Ni^{2+}. Protein je imobiliziran preko heksahistidinskog privjeska (vežu se na Ni^{2+}-ione). Dobra strana ovakvog pristupa je mogućnost korištenja NTA-čipa za različite proteine eksprimirane s heksahistidinskom fuzijom. Tako je za istraživanje interakcije s $MttRNA^{Arg}_{CCU}$ isti čip iskorišten za imobilizaciju divljeg tipa i svih skraćenih inačica. Uklanjanje imobiliziranog proteina napravljeno je dodatkom EDTA koja helira ione Ni^{2+} te na taj način (indirektno) uklanja i vezani protein. Ispitivanje vezanja na ovakvom čipu moguće je raditi tako da se za svaku testiranu koncentraciju analita (ovdje $MttRNA^{Arg}_{CCU}$) ponovi i imobilizacija liganda (MtArgRS, divlji tip ili skraćena inačica). Ovdje je postojao jedan tehnički problem, a koji je uključivao nereproducibilnu imobilizaciju Ni^{2+}-iona između ciklusa te posljedičnu različitu razinu imobilizacije MtArgRS. Stoga su mjerenja napravljena tako da su, po uspostavi stabilne bazne linije (razina vezanog liganda MtArgRS), rastuće koncentracije $MttRNA^{Arg}_{CCU}$ titrirane na istu populaciju imobiliziranih molekula MtArgRS. Ovo ne bi bilo moguće primijeniti u slučaju interakcija koje zahtjevaju agresivne uvjete regeneracije površine čipa, budući da je nužno da koncentracija liganda ostane identična između pojedinih ciklusa mjerenja. Potencijalno se problem s imobilizacijom Ni^{2+}-iona mogao riješiti na sljedeći način: na CM5-čip moglo se imobilizirati antitijela koja propoznaju histidinski privjesak, a tek potom, propuštanjem MtArgRS-his_6 iznad imobiliziranog antitijela, "zarobiti" taj enzim na površini čipa. Takav princip indirektnog "zarobljavanja" proteina od interesa na površini čipa relativno je prisutan kao metoda imobilizacije, i može se rabiti uz anti-GST-antitijela, anti-$(His)_n$-antitijela, itd. Takav princip mogao se iskoristiti i u slučaju da se željelo zamijeniti položaje sintetaze i tRNA, tj. da je MtArgRS-his_6 testiran kao analit uz $MttRNA^{Arg}_{CCU}$ kao ligand. U tom slučaju tRNA bi trebalo biotinilirati i vezati na čip supstituiran streptavidinom. Za molekule tRNA to nije osobito spretno budući da krajevi koji se mogu biotinilirati jesu slobodni 5'- i 3'-krajevi koji oblikuju akceptorsku peteljku (a koju enzim tipično prepoznaje). U takvim situacijama moguće je konstruirati oligonukleotid kojeg tRNA može vezati vodikovim vezama (pod uvjetom da se isti elementi ne nalaze unutar sučelja s aaRS), biotinilirati takav oligonukleotid te njega učvrstiti na podlogu čipa sa streptavidinom. U svakom slučaju, mjerenje interakcije MtArgRS: $MttRNA^{Arg}_{CCU}$ uz potonju kao ligand, bilo bi mnogo kompliciranije (veći broj individualnih koraka koje je potrebno optimirati) i skuplje (biotinilacije, sinteza oligonukleotida).

U sklopu ove disertacije, metoda rezonancije površinskih plazmona korištena je u paraleli s metodom afinitetnog supročišćavanja. Osim za istraživanje interakcije dvaju ili više proteina,

metoda afinitetnog supročišćavanja često je korištena metoda za istraživanje aktivacijskog stanja molekule. Primjerice, u slučaju proteina koji sadrže posttranslacijski fosforilirane tirozinske ostatke isti se mogu pročistiti uz pomoć imobilizirane SH2-domene koja ciljano veže tako modificirane ostatke staničnih proteina. Jednako tako, enzimi i faktori koji u stanici kruže u aktiviranom i neaktiviranom obliku mogu se izdvojiti uz pomoć partnera kojeg prepoznaju u jednom ili drugom stanju. U sklopu ove disertacije, takav postav korišten je za supročišćavanje MtSerRS i MtArgRS u prisustvu malih liganada (serin, arginin, ATP, v. Rezultati, poglavlje 4.5). U slučaju interakcije MtSerRS:MtArgRS u prisutnosti serina, moguće je (indirektno) zamijetiti da strukturna promjena koja se kod MtSerRS očekivano dešava u prisutnosti pripadnog serinskog supstrata (stabilizacija SOL-elementa, v. slika 5.2) nema utjecaja na interakciju tih dvaju proteina budući da je količina zadržanog GST-MtArgRS ista (Rezultati, slika 4.21). Na temelju toga, možemo zaključiti kako ovaj element (bilo u strukturiranom, bilo u neuređenom stanju ne sudjeluje u direktnom prepoznavanju između MtSerRS i MtArgRS).

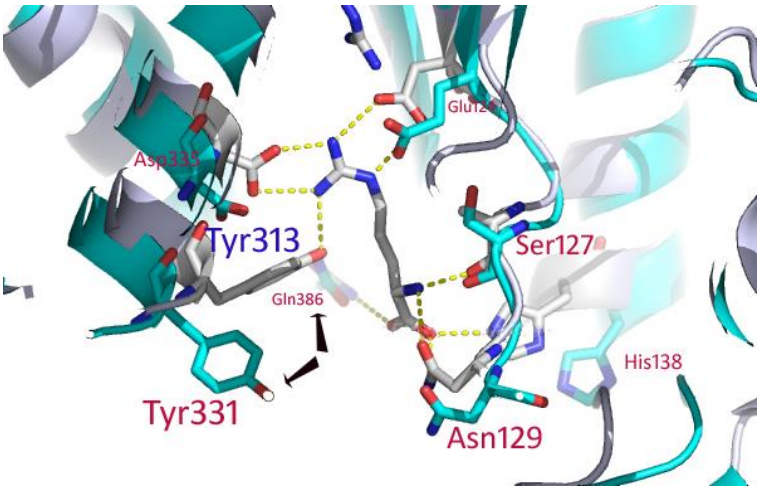


Slika 5-2 Uređenje fleksibilne SOL-omče u prisutnosti serina kod metanogenih SerRS. Preklopljene su strukture MbSerRS u apo-obliku (PDB ID 2CIM, zeleno) i s vezanim serinom u aktivnom mjestu (PDB 2CJB, žuto). Istaknuti su ostaci koji sudjeluju u vezanju serina, uključujući i Gln400 smješten unutar SOL-elementa. Isti je istaknut strelicom. Ružičastim krugom prikazan je prekid u strukturi apo-oblika SerRS, a koji je posljedica neuređenosti SOL-elementa kada serin nije prisutan u aktivnom mjestu. Ion cinka prikazan je ljubičastim krugom.

Što se tiče strukturnih promjena koje se kod MtArgRS potencijalno dešavaju po vezanju malih supstrata (arginin, ATP) teško je zaključivati o istima zbog nedostatka riješenih struktura u apo-obliku i obliku s vezanim argininom[a]. Riješene strukture ArgRS iz bakterije *E. coli* i kvasca *S. cerevisiae* dostupne su u obliku s vezanim argininom, ali ne i bez istoga (apo-oblik). Struktura arginil-tRNA-sintetaze iz bakterije *T. thermophilus* riješena je u obliku bez

[a] Kao što je rečeno u poglavlju Rezultati, očekivano dolazi do vezanja samo arginina, jer bez prisutne $tRNA^{Arg}$ vezni džep za ATP još nije formiran.

ligan(a)da, a struktura arginil-tRNA-sintetaze iz arheje *P. horikoshii* (iskorištena za modeliranje MtArgRS) u oblicima s vezanom PhtRNA^{Arg} te u obliku s istom tRNA i analogom ATP-a. Superponiranjem struktura 2ZUE (PhArgRS) i 4OBY (EcArgRS) može se uočiti da aktivno mjesto možda ne odražava biološki aktivni oblik: naime, očuvani ostatak Tyr331, koji svojim bočnim ogrankom specifično prepoznaje gvanidinijski dio argininskog supstrata, u strukturi PhArgRS s vezanim ATP-om i PhtRNA^{Arg} nije u prikladnoj orijentaciji za uspostavu vodikove veze sa argininom u aktivnom mjestu. To je u skladu s činjenicom da Konno i suradnici (autori rada u kojemu je publicirana navedena struktura) natapanjem kristala argininom nisu uspjeli uočiti dodatnu gustoću u elektronskoj mapi a koja bi korespondirala s argininom u aktivnom mjestu (slika 5-3).



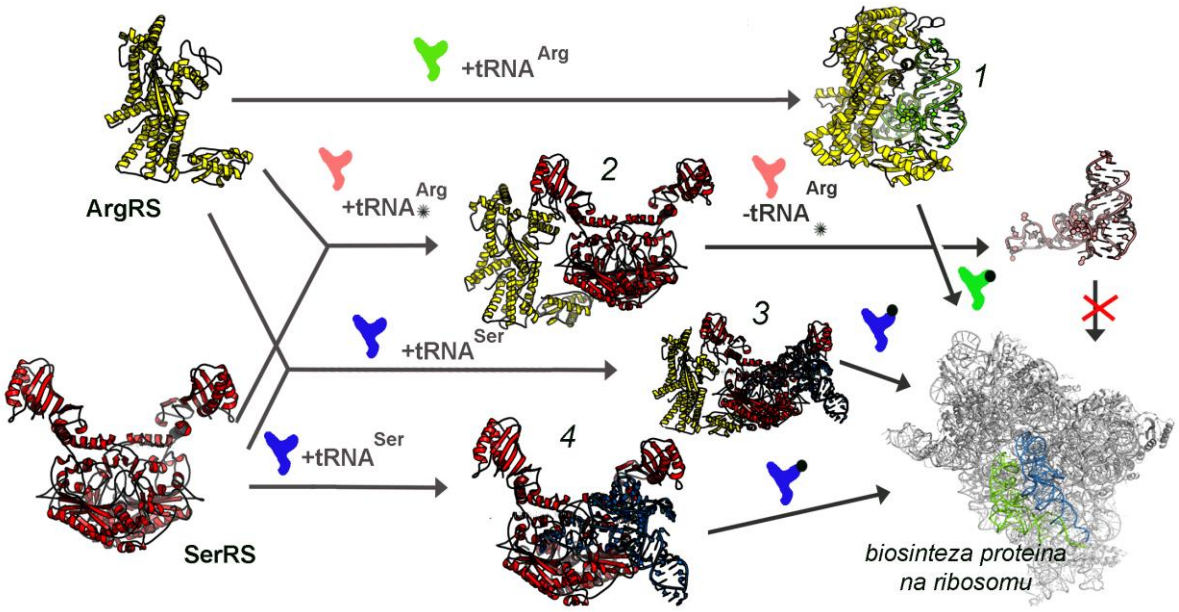
Slika 5-3 Superponirane strukture PhArgRS (PDB ID 2ZUE, plavo) i EcArgRS (PDB ID 4OBY, bijelo). Istaknuti su ostaci PhArgRS koji korespondiraju s ostacima EcArgRS uključenima u vezanje argininskog supstrata (otisnuti crvenom bojom). Označen je Ty 313 koji pripada EcArgRS – zbog razlikovanja otisnut je plavim slovima. Najveće odstupanje od položaja potrebnih za prepoznavanje arginina postoji kod His138, Asp 335 te Tyr331. Strelice pokazuju na drastično različit smještaj očuvanog tirozinskog ostatka kod strukture 2ZUE i 4 OBY. Argininski supstrat prikazan je štapićasto, u bijeloj boji, a vodikove veze indicirane su isprekidanom žutom linijom između funkcionalnih skupina arginina i bočnih ogranaka aminokiselina EcArgRS uključenih u prepoznavanje istog.

5.2 Utjecaj pripadnih tRNA na interakciju MtArgRS:MtSerRS

Protein-protein interakcije najčešće dovode do određenih (mjerljivih) efekata. Tu obrajamo promjenu kinetičkih svojstava proteina, a do kojih može doći uslijed promjene (načina) vezanja supstrata, promjene katalize ili promjene alosteričkih svojstava proteina unutar kompleksa.

Ranije je određeno kako prisutnost MtArgRS u reakciji serilacije enzimom MtSerRS dovodi do simultanog smanjenja K_m, kao i povećanja k_{cat} uz ukupno četverostruko poboljšanje katalitičke učinkovitosti[13]. U istom radu zabilježeno je kako prisutnost MtSerRS u arginilacijskoj reakciji nema utjecaja na kinetička svojstva svog partnera. Važno je spomenuti

da je navedeno istraživanje izvedeno uz tRNA-supstrat porijeklom iz *E. coli*. Kao što je navedeno u poglavlju Rezultati, utjecaj MtSerRS na arginilacijsku reakciju MtArgRS ipak je značajan kada se kao supstrat koristi $tRNA^{Arg}$ iz arheje *M. thermautotrophicus* (bez obzira na proizvodnju heterolognom ekspresijom u *E. coli*). Naime, iako se katalitička svojstva MtArgRS ne mijenjaju u prisustvu MtSerRS kada se reakcija izvodi uz dobro modificirane varijante $MttRNA^{Arg}$ (inačice $MttRNA^{Arg}_{modI}$ i $MttRNA^{Arg}_{modII}$), MtSerRS je sposobna inhibirati nabijanje slabijeg supstrata $MttRNA^{Arg}_{hypo}$. Shematski je kruženje ovih proteinskih partnera u slobodnom, tRNA-vezanom i aaRS-vezanom obliku dano na slici 5-4.



Slika 5-4 Shema oblikovanja kompleksa enzima MtArgRS i MtSerRS u stanici. Individualni proteini naznačeni su na slici, MtSerRS crveno, MtArgRS žuto. Pripadne tRNA naznačene su plavo ($tRNA^{Ser}$), zeleno ($tRNA^{Arg}$) te ružičasto (hipomodificirana $tRNA^{Arg}$). Stabilni binarni i tercijarni kompleksi označeni su brojevima: MtArgRS:$tRNA^{Arg}$ (1), MtArgRS:MtSerRS (2), MtArgRS:MtSerRS:$tRNA^{Ser}$ (3) te MtSerRS:$tRNA^{Ser}$ (4). Za translaciju na ribosomu proslijeđuju se aminoacilirane $tRNA^{Ser}$ i $tRNA^{Arg}$, dok je usmjeravanje arginilirane $tRNA^{Arg}_{hypo}$ zapriječeno djelovanjem SerRS. Pod pojmom $tRNA^{Arg}$ obuhvaćene su adekvatno modificirane vrste iste tRNA.

Metodom afinitetnog supročišćavanja i SPR-a pokazano je kako kompleks MtArgRS:MtSerRS može tolerirati ugradnju pripadne $tRNA^{Ser}$ u kompleks višeg reda (ternarni kompleks, poglavlje 4.5). S druge strane, dodatak $MttRNA^{Arg}$ (uzorak koji sadrži i hipomodificiranu i potpuno modificirana argininska tRNA) dovodi do većinskog ispiranja MtArgRS sa stupca s imobiliziranom MtSerRS, a dio enzima koji ostaje vezan nalazi se u slobodnom obliku. Unaprijed izolirani kompleks MtArgRS:$MttRNA^{Arg}$ ne veže se na

MtSerRS imobiliziran na čipu u metodi SPR. Dakle, za očekivati je da stabilni ternarni kompleks MtSerRS:MtArgRS:MttRNA^{Arg} u stanici *ne* nastaje.[a]

Unutar opisanih multisintetaznih kompleksa (MSC) različite pripadne tRNA participirajućih sintetaza su dosad zabilježene. Dapače, čini se da je aminoaciliranje određenom sintetazom unutar MSC povoljnije nego u slučaju slobodnog oblika enzima. Kao što je spomenuto, u stanicama sisavaca aminoacil-tRNA-sintetaze organizirane su u veliki multisintetazni kompleks. Iste stanice sadržava dva oblika enzima ArgRS, a koji su produkti istog gena. Jedan oblik (veće molekulske mase) prisutan je isključivo kao integralna komponenta MSC te je dokazano nužan za normalnu sintezu proteina bez obzira na prisustvo slobodnog oblika ArgRS koji je sposoban sintetizirati arginiliranu tRNA u dostatnim količinama za normalno preživljenje stanica. Nužnost "težeg" oblika ArgRS objašnjava se hipotezom da je Arg-tRNA stvorena unutar sintetaznog kompleks učinkovitiji prekursor za sintezu proteina nego što je to Arg-tRNA stvorena radom "lakšeg", odn., slobodnog oblika ArgRS[2].

Nadalje, prilikom određivanja trodimenzionalne strukture eukariotskog MSC elektronskom mikroskopijom i istraživanja rasporeda proteina i tRNA unutar srži multisintetaznog kompleksa zapaženo je da se stanične tRNA vežu duž površine ove čestice. Baš je uz pomoć obilježene tRNA^{Leu} (kao obilježivač poslužile su čestice zlata) dokazano je kako su LeuRS i bifunkcionalna GluProRS smještene pri bazi MSC-čestice koja posjeduje oblik asimetričnog slova V[41].

Prilikom udruživanja više sintetaza pojedini segmenti jednog od partnera mogli bi i sami prepoznavati slobodni segment vezane tRNA, tj. dio tRNA specifične za njihovog proteinskog partnera. Moglo bi se primjerice spekulirati kako se olakšano vezanje MttRNA$^{Ser}_{GGA}$ unutar kompleksa [MtSerRS: MttRNA$^{Ser}_{GGA}$]:MtArgRS zbiva stabilizacijom otapalu izloženog dijela MttRNA$^{Ser}_{GGA}$[b] vezanjem na dio RNA-vežuće površine MtArgRS. Zapravo bi za takvu vrstu "prepoznavanja" strane tRNA, arginil-tRNA-sintetaza bila odličan kandidat: ta sintetaza, zbog velike sljedovne raznolikosti koja posjeduje kod argininskih tRNA-izoakceptora veliki dio pripadne tRNA^{Arg} prepoznaje indirektno, odn. putem molekula vode koje čine obilatu mrežu vodikovih veza i mostova unutar ArgRS-tRNA^{Arg}-sučelja (v. Literaturni pregled).

[a] Ipak, prilikom vezanja hipomodificirane tRNA^{Arg} proteinski partner MtSerRS ipak upjeva komunicirati s arginil-tRNA-sintetazom jer je fizička interakcija potrebna za stimulaciju deacilacije arginilirane MttRNA$^{Arg}_{hypo}$. Stoga u nekom trenutku mora doći do tranzijentnog nastanka ternarnog kompleksa s podmodificiranom vrstom tRNA, iako takav kompleks nije zapazive stabilnosti (tj. ne može ga se izolirati, barem pri testiranim uvjetima).

[b] Misli se kada se tRNA nalazi unutar binarnog MtSerRS: MttRNA$^{Ser}_{GGA}$-kompleksa; naravno, ukoliko se takav segment stabilizira vezanjem drugom proteinskom komponentom onda prestaje biti izložen otapalu.

Poznati su primjeri samostalnih polipeptida čija je funkcija olakšati vezanje pripadne tRNA na određenu aaRS. Takav je slučaj nesintetaznog proteina Trbp111 i IleRS[55]. Općenito, udruživanje sintetaza s drugim sintetaznim i nesintetaznim proteinima često za posljedicu ima olakšano vezanje tRNA i/ili poboljšana katalitička svojstva nekog od sintetaznih partnera [14,13,143,144]. Pored svih interakcija koje molekule tRNA ostvaruju s enzimima zaduženima za procesiranje i modificiranje, pripadnim aminoacil-tRNA-sintetazama i elongacijskim faktorom, te molekule često vežu dodatni tRNA-vežući nesintetazni proteini. Oni ne obavljaju nužno neku posebnu katalitičku funkciju, ali mogu biti uključeni u nastanak multienzimskih kompleksa. Primjeri takvih proteina uključuju kvaščev protein Arc1p[51], njegov već spomenuti bakterijski homolog Trbp111[51] te polipeptidne komponente velikog multisintetaznog kompleksa p43, p38 te p18 koje nalazimo kod viših eukariota.

Ono što je interesantno kod ovih proteinskih faktora je jedan opći obrazac prepoznavanja tRNA kao i činjenica da su često strukturno srodni tRNA-vežućim domenama individualnih aaRS. Drugim riječima, nije neosnovano pretpostaviti da su fuzijom takvih općih tRNA-vežućih elemenata nastale pojedine domene modernih (i modularnih) aminoacil-tRNA-sintetaza. U tom smislu, multisintetazna udruživanja kod kojih je pokazana bilo stabilizacija tRNA-molekula specifičnih za interreagirajuće aaRS lako bi mogla sadržavati dodatne kontakte između participirajuće aaRS i nepripadne tRNA (tj. pripadne tRNA sintetaznog partnera).

Protein Arc1p dobar je primjer istovremene specifičnosti i relaksiranosti u prepoznavanju. Taj protein u stanicama kvasca stupa u interakciju s citosolnim sintetazama MetRS i GluRS[a]. Rekombinantni Arc1p sposoban je vezati *in vitro* transkribiranu kvaščevu $tRNA^{Met}$ stupajući u specifične interakcije sa tercijarnom srži tRNA. Dapače, akceptorski miniheliks (sačinjen od TψC-ruke i akceptorske peteljke) dobar je supstrat za Arc1p. Ovaj nekatalitički protein sposoban je prepoznati ne samo opće odrednice tercijarne strukture tRNA (lakat, karakterističan za L-oblik tRNA), već i specifične odrednice pojedinih izoakceptora. Tako je pokazano da Arc1p specifično veže "pripadne" tRNA, odn. $tRNA^{Glu}$ i $tRNA^{Met}$ (tj. tRNA onih sintetaza s kojima sam oblikuje kompleks).

Opis djelovanja Arc1p demonstrira mogućnost prilagođavanja arhitekture RNA-vežućeg proteina u smjeru prepoznavanja višestrukih tRNA-supstrata. Zapravo svaka sintetaza posjeduje mogućnost nespecifičnog (ili smanjeno specifičnog) prepoznavanja supstrata RNA-no takve interakcije su obično slabe i u uvjetima *in vivo* onemogućene na različite načine. No,

[a] Individualno, spomenute sintetaze ne stupaju u međusobnu interakciju

ugradnjom proteina u kompleks višeg reda (npr. MtArgRS:MtSerRS:MttRNA^{Ser}) "doniranje" malog dijela RNA-vežuće površine arginil-tRNA-sintetaze za vezanje slobodnog dijela MttRNA^{Ser} ne bi nužno bilo energetski nepovoljno, budući da se interakcijom s proteinskim partnerom (MtSerRS) može stabilizirati konformacija MtArgRS drukčija od one potrebne za specifično prepoznavanje MttRNA^{Arg} (kako fosfodiesterske okosnice, tako i individualnih identitetnih elemenata).

5.3 Usmjeravanje suptrata u procesu translacije

Protein-protein interakcije predstavljaju uobičajeni mehanizam kojim se u stanici ostvaruje usmjereni prijenos supstrata (v. Literaturni pregled). Također, upošljavanje proteina za novu ulogu unutar staničnog miljea također je posredovano udruživanjem istog s ciljanim proteinskim partnerom.

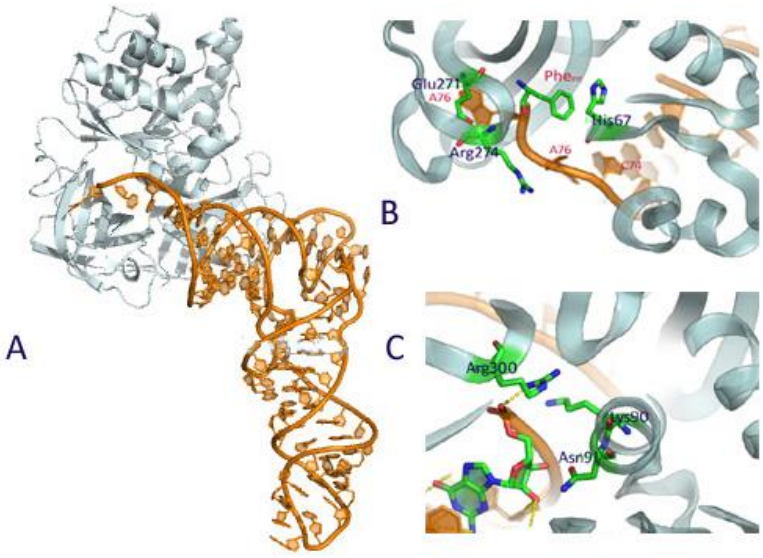
Nedavno je pokazano kako MtArgRS i MtSerRS vežu veliku podjedinicu ribosoma, dominantno kroz interakcije s osi L7/L12[14]. Ovaj segment ribosoma zadužen je za upošljavanje elongacijskih faktora. Kako se glavna zona interakcije MtArgRS i MtSerRS s ribosomom nalazi u neposrednoj blizini A-mjesta[a] vjerojatno se na taj način obogaćuje količina prisutnih aaRS:tRNA-kompleksa, odn. aa-tRNA-supstrata za biosintezu proteina na ribosomu. Bioinformatička analiza pokazala je da kod *M. thermautotrophicus* postoji autokorelacija između parova kodona koje čita istovjetni izoakceptor. Smještaj MtArgRS i MtSerRS u neposrednoj blizini ribosoma olakšao bi ponovnu upotrebu istovjetnog izoakceptora unutar polisoma, bez difuzije istog u okolni citosol.

No, u sklopu istog scenarija arginilacija hipomodificirane tRNA^{Arg} u uvjetima *in vivo* predstavlja rizik u smislu otežane translacije argininskih kodona na ribosomu. Nedostatak kritičnih modifikacija u području antikodona diskutiran je u tekstu koji slijedi. U svjetlu mogućeg recikliranja tRNA^{Arg}-izoakceptora usidrenjem ArgRS i SerRS na arhejskom ribosomu, važnost povećane osjetljivosti MtArgRS prema varijantama posttranskripcijski modificirane MttRNA^{Arg} (a koje MtSerRS omogućuje) postaje od izrazite važnosti.

Naime, ukoliko se u stanicama *M. thermautotrophicus* acilira tRNA$^{Arg}_{hypo}$, sljedeći translacijski faktor koji tu molekulu prihvaća jest elongacijski faktor EF-1α. Prepoznavanje aa-tRNA od strane ovog (arhejskog) faktora analogno je onome kod bakterijskog faktora EF-Tu; oba faktora prepoznaju mali dio ukupnog tijela aminoacilirane tRNA te s antikodonom nemaju doticaja.

[a] Tipično se u ovoj zoni smještaju kompleksi elongacijskog faktora s aminoaciliranom tRNA tijekom pojedinog translacijskog ciklusa

Faktor EF-Tu prepoznaje svojstva koja su zajednička svim molekulama aminoacilirane tRNA. On prepoznaje tRNA na razini njene tercijarne strukture tj. na osnovu svojstva okosnice tRNA. Ovakav način prepoznavanja uvjetovan je zahtjevom za vezanjem svih tRNA izoakceptora danog organizma. U pojedinim slučajevima aminoacilirane minimalne tRNA (tRNA miniheliksi) vežu se na EF-Tu jednako stabilno kao aa-tRNA pune duljine[145].



Slika 5-5 (A) Glavno kontaktno područje između Phe-tRNA^{Phe} i EF-Tu predstavljaju CCA-kraj molekule tRNA s vezanom aminokiselinom, krajnji 5'-fosfat te T-ruka molekule tRNA^{Phe} (PDB ID 1TTT). (B) Vezanje terminalnog adenozina (A76) i esterificiranog fenilalanina (Phe$_{EST}$) u vezni džep EF-Tu. (C) Prepoznavanje 5'-fosfata. Ključne aminokiseline prikazane su štapićima.

Dakle, EF-Tu prepoznaje opća svojstva elongatorskih molekula tRNA (relativni raspored karakterističan za tercijarnu strukturu na osnovu pozicioniranja akceptorskog kraja i T-ruke) te posjeduje vezni džep koji može smjestiti svih 20 (21 uključimo li i Pyl) aminokiselina.

Sve te različite parove aminokiseline i pripadne tRNA (odn. kovalentni spoj istih, molekulu aa-tRNA) faktor EF-Tu veže s vrlo sličnim afinitetom, iako je za pojedinu aminokiselinu, kao i pojedinu vrstu tRNA taj afinitet različit. Ujednačeni afinitet EF-Tu pritom proistječe iz termodinamičke kompenzacije između to dvoje, tj. elemenata tRNA i aminokiselinske skupine na njenom 3'-kraju[146]. Drugim riječima, aminokiseline koje se unutar veznog džepa EF-Tu vežu slabije esterificirane su na pripadnu tRNA koja s EF-Tu ostvaruje snažnije kontakte i obrnuto. Takav reciprocitet između vezanja aminokiselinskog dijela i tijela tRNA (unutar molekule aa-tRNA) najzad rezultira ujednačenim afinitetima koje EF-Tu posjeduje prema svim staničnim aa-tRNA. Nasuprot tomu, EF-Tu veže misacilirane tRNA s raznolikim afinitetima (i jačim i slabijim) što u svakom slučaju otežava njihovo daljnje uključivanje u biosintezu na ribosomu.

Ponekad EF-Tu ipak može vezati misaciliranu tRNA, što je pokazano u slučaju tRNA^{Leu} aminoacilirane neproteinskom aminokiselinom norvalinom (Nva). Iako u uvjetima *in vitro*,

LeuRS vrlo učinkovito popravlja pogrešku prijenosa Nva na $tRNA^{Leu}$, u određenim uvjetima *in vivo* ipak dolazi do ugradnje Nva u stanične proteine. Jedan od potencijalnih razloga za to leži u vrlo sličnom afinitetu koji EF-Tu pokazuje za pripadnu Leu-$tRNA^{Leu}$ i misaciliranu Nva-$tRNA^{Leu}$ [147].

Iz strukture dane na slici 5.5 vidljivo je kako EF-Tu ne stvara nikakve interakcije s antikodonom tRNA; on je dakle (po pitanju vezanja) "slijep" na kemizam baza u tom dijelu molekule, kao i konformaciju njene šećernofosfatne okosnice[a].

No, modifikacije u antikodonu tRNA ipak mogu biti posredno povezane s djelovanjem EF-Tu. Mjerenja interakcija Gln-$tRNA^{Gln}$ unutar ribosomskog A-mjesta pokazuju kako tiouridinski (dakle, modificirani) ostatak povećava afinitet antikodona ove tRNA za glutaminske kodone CAA i CAG. Istovremeno, prisutnost iste modifikacije povećava brzinu hidrolize GTP-a peterostruko kod (na ribosom) vezanoga faktora EF-Tu.[148]

Dakle, jedna od funkcija kompleksa MtArgRS:MtSerRS jest spriječiti aminoaciliranje $MttRNA^{Arg}_{hypo}$ te posljedično prihvaćanje slabo modificirane aminoacilirane $MttRNA^{Arg}_{hypo}$ od strane elongacijskog faktora, budući da isti ne posjeduje mehanizam kojim bi u sklopu vlastite aktivnost razlikovao nadodane posttranskripcijske modifikacije smještene u antikodonskoj omči supstrata Arg-$MttRNA^{Arg}_{hypo}$.

Efekt koji MtSerRS iskazuje prilikom arginilacije lošijih supstrata $MttRNA^{Arg}_{hypo}$ predstavlja mehanizam svojevrsne provjere (eng. *proofreading*) ispravnosti supstrata. Tipično aaRS posjeduju mehanizme popravka za pogrešno aktiviranu ili (u aa-tRNA) ugrađenu aminokiselinu, ali dosad nije zabilježen slučaj provjere stanja tRNA-supstrata na razini posttranskripcijskih modifikacija. Što se tiče popravka pogrešno aktivirane ili pogrešeno prenesene aminokiseline, u pojedinim organizmima postoje specifični, tRNA-zavisni trans-editirajući proteini nalik sintetazama. Srodni su domenama aaRS koje su posvećene popravku pogreške (eng. *editing*), ali ne i ostatku korespondirajućeg enzima. Samostalni homolog editirajuće domene ProRS iz bakterije *Clostridium sticklandii*, specifično i učinkovito hidrolizira progrešno acilirane Ala-$tRNA^{Pro}$. Jednako tako, autonomni polipeptid homologan editirajućoj domeni AlaRS iz arheja *Methanosarcina barkeri* i *Sulfolobus solfataricus* hidroliziraju misacilirane vrste Ser-$tRNA^{Ala}$ te Gly-$tRNA^{Ala}$. [149]

Zanimljivo je zapaziti da opisani faktori (i tRNA vežući i editirajući) koji djeluju *in trans* (te je njihov rad posredovan fizičkom interakcijom s aaRS) dominiraju kod nižih/ranijih evolucijskih oblika te predstavljaju adaptivni odgovor na stanične zahtjeve koji ne postoje u

[a] Ako pretpostavimo da se konformacija antikodonskog dijela *ne* prenosi na ostatak molekula tRNA.

odvedenijih organizama budući da modularna građa (fizička fuzija elemenata koji su ranije bili dostupni kao nezavisni polipeptidni segmenti) njihovih sintetaza ima unaprijed zadano rješenje za pospješivanje sintetske učinkovitosti ili editirajući rad.

5.4 Neke posebnosti prepoznavanja tRNA^{Arg}

Još je u ranim biokemijskim istraživanjima pokazano kako pojedine aaRS izražavaju vrsno-specifično prepoznavanje tRNA. Bakterijske aaRS pretežno su nesposobne acilirati eukariotske tRNA-supstrate. Često je ova barijera između vrsta plodom nedostatka dodatnih domena koje postoje kod eukariotskih, ali ne i prokariotskih aaRS[150]. U drugim slučajevima, vrsno-specifično prepoznavanje temelji se na drukčijem mehanizmu prepoznavanja između aaRS i pripadne tRNA i/ili prisutnosti drugog tipa nukleotidnih determinantni na supstratu. Liu i suradnici[151] ispitali su mogućnost heterolognog aminoaciliranja između eukariotskih/prokariotskih ArgRS/tRNA^{Arg}. Eukariotska kvaščeva sintetaza (ScArgRS) sposobna je acilirati tRNA^{Arg} *E. coli*, iako manje učinkovito nego SctRNA^{Arg}[a]. Nasuprot tomu, bakterijska ArgRS iz *E. coli* može acilirati samo pripadnu (*E. coli*) tRNA, ali ne i SctRNA^{Arg}. No, izmjena identiteta jednog nukleotida (citozina na položaju 20) u SctRNA^{Arg} učiniti ovu tRNA dobrim supstratom za EcArgRS. Mutacijom spomenutog citozina u adenozin (čime nastaje transkript SctRNA^{Arg}C20A) aminoacilacija pomoću ArgRS *E. coli* odvija se milijun puta bolje (drugim riječima, omjer k_{cat}/K_m mijenja se za faktor 10^6) u odnosu na reakciju koju isti enzim katalizira s divljim tipom transkripta SctRNA^{Arg}. Ovi pokusi ukazuju kako determinanta A20 ne samo da predstavlja važan element identiteta u tRNA^{Arg} *E. coli*, nego je i ključni ostatak za izmjenu vrsno-specifične aminoacilacije kod SctRNA^{Arg}. Što se tiče aminoaciliranja transkripta SctRNA^{Arg}C20A kvaščevim enzimom, izmjena citozina na položaju 20 u adenozin dovodi do otprilike trostrukog povećanja u vrijednosti K_m, dok vrijednost obrtnog broja ostaje vrlo slična kao za nemutirani transkript (1,1 s^{-1} u odnosu na 1,2 s^{-1} za neizmijenjenu SctRNA^{Arg}).

Neobična, spontana mutacija postoji kod izoakceptora za arginin kod *E. coli* (tRNA^{Arg}). Mutirana tRNA posjeduje dva dodatna nukleotida smještena unutar antikodonske omče te 10 dupliciranih nukleotida u TψC-omči. Pokusi *in vitro* upućuju na to da se mutantni prekursor procesira normalno, po čemu nastaje zrela vrsta tRNA, 12 nukleotida dulja nego divlji tip iste. Zanimljivo je da zrela (mutirana) tRNA *in vivo* funkcionira kao supresor pomaka okvira čitanja. Postoje slični slučajevi gdje se tRNA-mutanti točno procesiraju; učinkovitost ovog procesiranja varira i uglavnom je manja nego za divlji tip tRNA. Ovi rezultati upućuju na

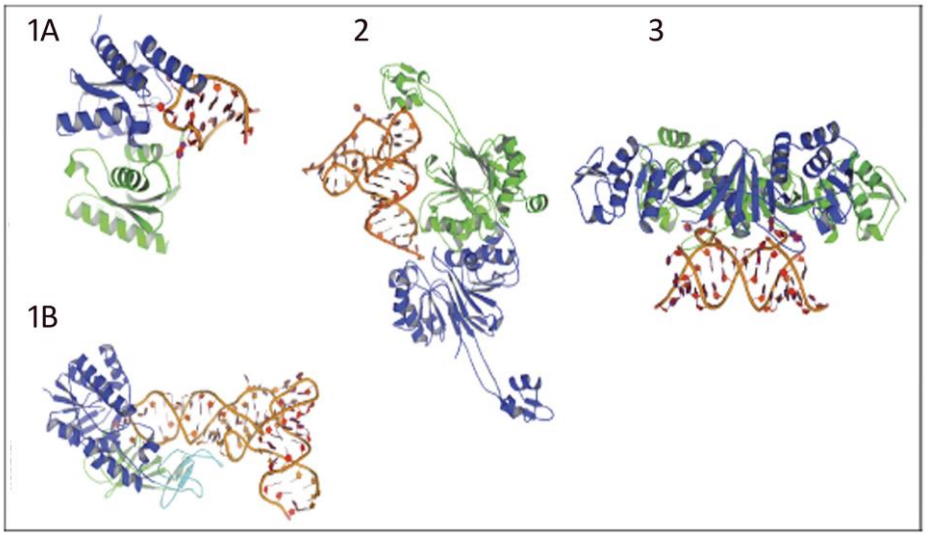
[a] Neovisno o tome je li SctRNA^{Arg} producirana *in vivo* ili *in vitro.*

činjenicu da je i značajno veća tRNA sposobna je funkcionirati u procesu sinteze proteina bez obzira na bjelodano visok stupanj očuvanosti tercijarne strukture te molekule. Isti podaci upućuju na činjenicu i da enzimi tj. mjesta prepoznavanja prekursorskih tRNA mogu biti neočekivano tolerantna za neuobičajeni kontekst (odn. tijelo tRNA, što je najčešće dio koji ne vežu/prepoznaju). Procesirajući enzimi često zavise od specifičnih svojstava tercijarne strukture radije nego na ukupni oblik za točno procesiranje (slika 5-6) [152].

5.5 Heterologno prepoznavanje MttRNA^{Arg} u bakterijskom sustavu-sazrijevanje tRNA-molekula

Za istraživanje izloženo u ovoj disertaciji važan aspekt predstavlja mogućnost proizvodnje dobro procesiranog MttRNA^{Arg}-supstrata u heterolognim uvjetima, tj. u bakteriji *E. coli*. Stoga će ovdje, ukratko biti izložen kratak pregled sazrijevanja tRNA kod *E. coli*.

Introni su prisutni kod malog postotka arhejskih gena za tRNA, dok kod eukariotskih ih susrećemo čak u 25 % slučajeva. Evolucijski očuvane procesirajuće (eng. *splicing*) endonukleaze odgovorne su za prepoznavanje i izrezivanje tih introna iz primarnih transkripata. Ove endonukleaze prepoznaju tercijarnu strukturu[a] radije nego neki konkretan primarni slijed nukleotida. Gen za MttRNA$^{Arg}_{CCU}$ ne posjeduje intronski slijed, a i ugradnja u vektor za heterolognu ekspresiju u takvim slučajevima omogućuje istraživaču da intronski slijed prilikom konstruiranja upotrijebljenih početnica ukloni (tj. da ga ne uklopi u oligonukleotide pomoću kojih će se konstruirati slijed tRNA-"gena" ugrađen u vektor).



Slika 5-6 Strukture nekoliko kompleksa modificirajućih enzima i njihovih tRNA-supstrata. (1A) Bakterijski procesirajući enzim TadA veže antikodonski dio tRNA prilikom prevođenja ciljnog adenozina u inozin (1B) Enzim MnmA također veže samo antikodon tRNA tijekom sulfuracije baza (2) Kompleks tRNaze Z i akceptorskog dijela njenog supstrata kojeg veže prelikom prekrajanja 3'-kraja istog. (3) Kompleks prekrajajuće endonukleaze i tRNA-introna. Preuzeto uz prilagodbu iz [153].

[a] U kojoj su prisutna dva blisko smještena intron-egzon spoja.

U akceptorskoj peteljci slobodna 3'-OH-skupina tRNA predstavlja mjesto za kovalentno vezanje pripadne aminokiseline. Kao što je spomenuto, akceptorska peteljka važan je element za prepoznavanje tRNA od strane pripadne aaRS. Precizna duljina i smještaj nukleotidnih funkcionalnih skupina u ovoj regiji igraju kritičnu ulogu tijekom procesa aminoacilacije te prilikom procesiranja i duljeg pre-tRNA-transkripta ovaj kraj mora biti vrlo precizno izrezan. Enzim tRNaza Z univerzalno je očuvani dimerni enzim koji endonukleolitički skraćuje 3'-kraj tRNA. Slično kao što je to bio slučaj kod prekrajajućih endonukleaza, tRNAza Z ne pokazuje sljednu specifičnost. U kompleksu s tRNA-supstratom, ovi enzimi istovremeno vežu T-peteljku (jedan monomer dimera) i prvi par baza (1:72) te diskriminatorsku bazu na položaju 73 (drugi monomer dimera, v. slika 5.6).

Većina riješenih struktura tRNA-procesirajućih i tRNA-modificirajućih enzima u kompleksu s tRNA-supstratima pokazuje kako se prepoznavanje ovih enzima temelji na vezanju određenog segmenta (domene ili regije tRNA). Na slici 5.6 dan je kompleks enzima TadA[a] u kompleksu s izoliranom antikodonskom omčom pripadnog supstrata. Vidljivo je da TadA djeluje prepoznajući izolirani segment svoje tRNA slično kao što je to slučaj MnmA (ista slika, segment 1.b). U slučaju kada se želi izvršiti heterologna ekspresija neke tRNA (kao što je to slučaj u ovom radu, ali i u svim slučajevima kada je organizam čije se makromolekule istražuje teško uzgojiti), "lokalni" način prepoznavanja nezrelog tRNA-transkripta od strane procesirajuće mašinerije domaćina (ovdje bakterije *E. coli*) predstavlja sretnu okolnost: kako sljedovi strane, unesene tRNA od interesa i tRNA domaćina nisu identični, dobro je da procesirajući enzimi prepoznaju opća strukturna svojstva, radije nego primarni slijed pojedinih izoakceptora tRNA.

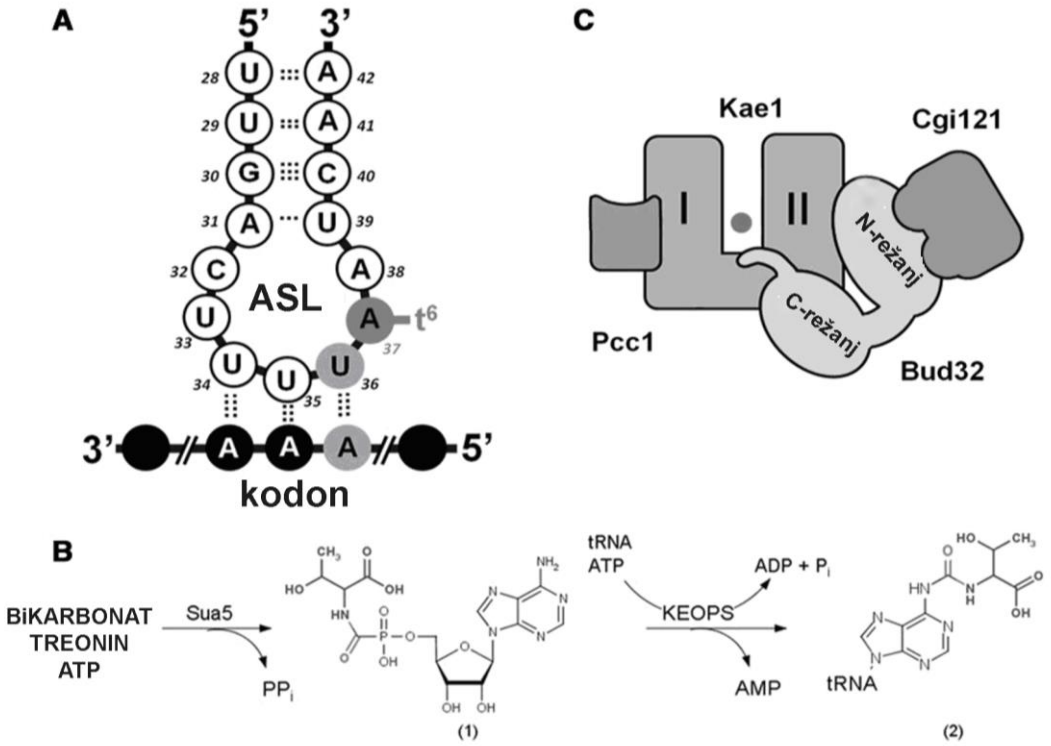
Vezanje tRNA enzima TsaD koji je u sklopu ovog istraživanja zanimljiv zbog uvođenja modifikacije t6A na položaju 37 antikodonske omče heterologno eksprimirane MttRNA^{Arg} dosad nije strukturno okarakterizirano. U organizmu *M. thermautotrophicus* istoimena modifikacija očekivano se nalazi na istom položaju budući da se radi o univerzalnoj modifikaciji koja se javlja unutar sva tri kraljevstva života. Shema nastanka modifikacije kod arheja dana je na slici niže.

U *E. coli* biosinteza modifikacije t6A odvija se koordiniranim radom proteina TsaC (YrdC), TsaD (YgjD), TsaB (YeaZ) i TsaE (YjeE)[154]. Rekombinantno proizvedeni proteini kataliziraju nastanak modifikacije t6A *in vitro*. Kada se kao supstrati ovim enzimima ponude [^{14}C]treonin ili [^{14}C]bikarbonat dobiva se radioaktivno obilježena tRNA. Enzimi specifično

[a] Spomentu je u poglavlju Rezultati u kontekstu procesiranja tRNA^{Arg}-transkripata u *E. coli*; ovaj enzim zadužen je za modificiranje adenozina antidkodona u inozin.

obilježavaju one tRNA kod kojih se na položaju 37 modifikacija t6A očekuje. Igrom slučaja, u istom radu je upotrijebljena $tRNA^{Gln}$ sintetizirana (transkribirana) u uvjetima *in vitro,* a koja je porijeklom iz arheje *M. thermautotrophicus.* Ova tRNA ($tRNA^{Gln}$) iskorištena je za potvrdu specifičnosti rada navedenih enzima budući da u uvjetima *in vivo* prirodno ne sadrži modifikaciju t6A. Očekivano, do ugradnje radioaktiviteta nije došlo kada je ta tRNA bila ponuđena kao supstrat. Nasuprot tomu, nemodificirane transkripti $EctRNA^{Lys}$ i $EctRNA^{Thr}$ (obje prirodno sadrže t6A) kombinacija navedenih enzima sposobna je obilježiti radioaktivnim treoninom/bikarbonatom. Također, navedeni enzimi sposobni su bili uvesti radioaktivnu oznaku i u slučaju kada se kao supstrat ponudila nefrakcionirana tRNA iz kvasca[a] (dakle, iz eukariotskog izvora). Na temelju ovih informacija može se zaključiti da *E. coli* posjeduje enzime potrebne za uvođenje modifikacije t6A te da takva enzimska mašinerija ipak posjeduje djelomice relaksiranu specifičnost, budući da je sposobna modificirati kvaščeve transkripte.

[a] Radi se o tRNA izoliranoj iz soja Δ*sua5*, tj soja u kojemu je uklonjen gen *sua5*, homolog bakterijskog *yrdC*, dakle soj u kojemu se modifikacija t6A ne sintetizira.



Slika 5-7 Biosintetski put kojim nastaje modifikacija t6A u arheja i eukariota. (A) Shematski prikaz antikodonske omče tRNA^{Lys} iz *E. coli*. Modificirani nukleotid *N*6-treonilkarbamoiladenozin (t6A) na položaju 37 prikazan je punim tamnosivim krugom, a glavna determinanta U36 prikazana je svjetlije sivo. Glasnička RNA (mRNA) prikazana je crnim krugovima, a interakcija s antikodonom ispresijecanom linijama. Modifikacija t6A stabilizira strukturu antikodonske omče sprečavanjem uspostave vodikovih veza između baza U33 i A37. (B) Reakcijska shema biosinteze t6A kod arheja i eukariota. Protein Sua5 katalizira nastanak intermedijera l-treonil-karbamoil-AMP (TC-AMP) koristeći bikarbonat, treonin i ATP. Kompleks KEOPS katalizira krajnji korak reakcije u kojemu se l-treonilkarbamoilna grupa prenosi s TC-AMP na adenozin na položaju 37 tRNA-supstrata. (C) Shema arhitekture kompleksa KEOPS. Preuzeto iz [155].

Dakle, pretpostavljena, važna modifikacija adenozina na položaju 37 koja osigurava ispravno čitanje kodona pomoću molekule MttRNA$^{Arg}_{CCU}$ svakako bi trebala postojati kod arheje *M. thermautotrophicus*, a indirektni mehanizam "čitanja" takve posttranskripcijske modifikacije djelovanjem kompleksa MtArgRS:MtSerRS predstavlja realni scenarij koji se moguće dešava u uvjetima *in vivo*.

Činjenica da prilikom prekomjerne ekspresije MttRNA^{Arg} u bakteriji *E. coli* nastaje nekoliko varijanti te tRNA različitog stupnja modificiranosti nije neočekivana. Kao što je spomenuto, s obzirom da T7 RNA-polimeraza brzo sintetizira nove molekule heterologno eksprimirane MttRNA^{Arg}, modificirajuća enzimska mašinerija *E. coli* ne "stiže" ispravno procesirati sav prisutan supstrat (nezrelu tRNA). Ovakvo nastajanje nekoliko varijanti iste tRNA ranije je iskorišteno za istraživanje različitih modifikacija tRNA kao determinanti za prepoznavanje vlastitom sintetazom[156] te za usporedbu važnosti modifikacija u reakciji aminoaciliranja i dekodiranja[157]. Tako transfekcija sintetičkog gena za tRNA^{Phe} u bakterijske stanice domaćina s defektnom PheRS rezultira s prekomjernom ekspresijom unesene tRNA^{Phe}, a kao nuspojava

ovog fenomena podmodificirana $tRNA^{Phe}$ postaje raširena. Glavna karakteristika ove tRNA je nedostatak *N*6-(Δ2-izepentenil)-2-metiltioadenozina, modifikacije koja se smješta direktno uz antikodon[a] (s 3'-strane) svih tRNA kod *E. coli* odgovornih za dekodiranje UNN-kodona. Zanimljivo je da nedostatak ove modifikacije *ne* utječe na aminoacilaciju pripadnom sintetazom, ali ima veliki utjecaj na sprečavanje krivog dekodiranja mRNA unutar ribosoma.

S druge strane, prekomjerna (potaknuta) ekspresija $tRNA^{Glu}$ kod *E. coli* rezultira nastankom više različito modificiranih specija, a koje EcGluRS prihvaća s različitom uspješnošću. Divlji tip modifikacijske varijante $tRNA^{Glu}$ koji je najraširenij u stanici kada ekspresija istog nije potaknuta sadrži 5 modificiranih nukleozida[b]. Uklanjanje nekih od ovih modifikacija dovodi do promjena u tercijarnoj strukturi podmodificirane $tRNA^{Glu}$. Zanimljivo je da nedostatak jedne određene modifikacije (2-tio-skupine kod nukleozida na položaju 34) povećava K_m za ovu varijantu 520 puta. Na temelju ovakve promjene u afinitetu prema $tRNA^{Glu}$ može se zaključiti da ova skupina služi kao determinanta u GluRS-sustavu.

5.6 Veza ribosoma i modificirajuće mašinerije

Dakle, enzimi MtSerRS i MtArgRS trebali bi biti ko-lokalizirani u blizini arhejskog ribosoma direktnim interakcijama s velikom podjedinicom istog, te indirektno, putem uzajamnih interakcija. Ribosomski proteini (preko kojih se ta interakcija uspostavlja) također mogu imati "van-ribosomske" funkcije[158,159].

Neribosomske funkcije ribosomskih proteina dosta su dobro dokumentirane. U kontekstu ispitivane interakcije MtArgRS:MtSerRS, funkcionalnosti njihove interakcije u probiranju boljih dekodirajućih supstrata te kolokalizacije u blizini arhejskog ribosoma zanimljivo je spomenuti vezu potonjeg s tRNA-procesirajućom mašinerijom u stanicama jednog drugog metanogenog, arhejskog organizma. Protein L7Ae podjedinica je arhejske RNaze P, ribonukleoproteinskog enzima koji katalizira sazrijevanje 5'-kraja tRNA-prekursora (v. Literaturni pregled). Prilikom izolacije RNaze P iz stanica arheje *Methanococcus maripaludis* protein L7Ae koeluira se s njome. Rekonstruirani kompleks RNaze P (nastao *in vitro*) veže ribosomski protein L7Ae. Vezanjem L7Ae povećava se optimalna reakcijska temperatura, a omjer k_{cat}/K_m raste skoro 400 puta.

Sveukupno, na temelju rasporeda elemenata MtArgRS uključenih u vezanje seril-tRNA-sintetaze istog organizma, a koji se podudaraju s onima uključenima u prepoznavanje

[a] Slično kao t6A kod $tRNA^{Arg}_{CCU}$.
[b] (ψ13, mnm^5s^2U34, m^2A37, T54 i ψ55)

pripadne MttRNA^{Arg} [a], kao i preraspodjele MtArgRS tijekom afinitetnog supročišćavanja s MtSerRS u prisustvu tRNA^{Arg}, kao i nedostatka vezanja izoliranog MtArgRS:MttRNA$^{Arg}_{CCU}$-kompleksa na imobilizirani MtSerRS u metodi SPR, može se zaključiti kako MtSerRS i MttRNA^{Arg} oboje prepoznaju zajedničke elemente na arginil-tRNA-sintetazi. Drugim riječima, regije MtArgRS odgovorne za prepoznavanje pripadnog supstrata (MttRNA^{Arg}) i proteinskog partnera MtSerRS barem se donekle preklapaju. Ova strukturna poveznica između tih makromolekula omogućuje istovremenu kolokalizaciju u blizini ribosoma, poboljšanje serilacijskih svojstava MtSerRS, ali i mogućnost "popravka" pogrešnog vezanja slabijeg supstrata MttRNA$^{Arg}_{hypo}$. Ovi podaci, kao i rasvjetljavanje uloge ribosomskih proteina u procesu posttranskripcijske dorade tRNA sugerira kako su u (barem u arheja) procesi sazrijevanja tRNA, aminoacilacije tRNA, prijenosa aa-tRNA na ribosom[b], dekodiranja tRNA na ribosomu i recikliranja otpuštene, deacilirane tRNA s ribosoma međusobno usklađeni i koordinirani mrežom interakcija koja postoji između velikog proteinskih komponenti koje sudjeluju u opsežnom procesu translacije.

[a] Radi se o elementima Add-1 domene uključenima u oblikovanje platforme za usidrenje D-omče tRNA^{Arg}, v. Rezultati, posebno poglavlja 4.4 i 4.5)

[b] U arheji *M. thermautotrophicus* zabilježena je komunikacija LeuRS i elongacijskog faktora EF-1α, v. Literaturni pregled.

6 Zaključci

- Prepoznavanje između arginil- i seril-tRNA-sintetaza iz arheje *M. thermautotrophicus* ostvaruje se dijelom preko elemenata prisutnih u N-terminalnom dijelu ArgRS, pri čemu najveći utjecaj posjeduje zavojnica H4; uklanjanje čitave N-terminalne domene dovodi do stostrukog slabljenja afiniteta između istraživanih sintetaza
- Prva zavojnica s N-kraja ArgRS ne sudjeluje u prepoznavanju SerRS što se podudara s njenim smještajem unutar kompleksa ArgRS:tRNA^{Arg}
- Ispitivanjem stabilnosti kompleksa krnjih varijanti ArgRS i tRNA^{Arg} metodom rezonancije površinskih plazmona pokazano je da na vezanje najviše utječu elementi enzima C-terminalno od aminokiseline 89: deletant Δ89-ArgRS posjeduje 40 puta, a ΔN_{tot}-ArgRS oko 60 puta manji afinitet prema pripadnoj tRNA
- Konstruirane varijante enzima ArgRS skraćene s N-kraja osjetljive su na dodatak soli u reakciji arginilacije, kao i na temperaturu optimalnu za rad divljeg tipa enzima; u prilagođenim uvjetima reakcije deletanti Δ89-ArgRS i ΔN_{tot}-ArgRS pripadnu tRNA arginiliraju 40, odn. 120 puta lošije pri čemu je efekt posredovan dominantno padom u vrijednosti k_{cat}
- Prekursori reakcije serilacije nemaju utjecaja na stabilnost kompleksa SerRS:ArgRS, dok prisustvo prekursora reakcije enzima ArgRS dovodi do disocijacije istog
- Molekula tRNA^{Ser} može se ugraditi u ternarni kompleks [SerRS:tRNA^{Ser}]:ArgRS pri čemu je asocijacija binarnog kompleksa SerRS:tRNA^{Ser} s molekulama ArgRS usporedive stabilnosti u odnosu na binarni kompleks SerRS:ArgRS
- Stabilnost kompleksa SerRS:ArgRS osjetljiva je na dodatak smjese transkripata tRNA^{Arg} (nepotpuno i potpuno modificiranih) te dovodi do preraspodjele molekula ArgRS unutar kompleksa ArgRS:tRNA^{Arg} i ArgRS:SerRS
- Prizvodnjom tRNA^{Arg} iz arheje *M. thermautotrophicus* u domaćinu *E. coli* (BL21) moguće je proizvesti nekoliko molekulskih vrsta te tRNA koje se razlikuju prema količini nadodanih posttranskripcijskih modifikacija (varijante)
- Enzim ArgRS aminoacilira varijante usporedivom učinkovitošću, tj. kinetičko razlikovanje varijanti ne postoji ili je zanemarivo malo
- Prisutnost SerRS inhibira arginilaciju lošijeg supstrata, tj. manje modificirane varijante tRNA^{Arg} čime se potencijalno postiže uklanjenje slabije modificiranih tRNA iz procesa translacije

7 Literatura

1. B. S. Negrutskii and M. P. Deutscher, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88** (1991) 4991–4995.

2. S. V Kyriacou and M. P. Deutscher, *Mol. Cell* **29** (2008) 419–427.

3. A. Vartanian, I. Alexandrov, I. Prudowski, A. McLennan and L. Kisselev, *FEBS Lett.* **456** (1999) 175–180.

4. G. Mohr, R. Rennard, A. D. Cherniack, J. Stryker and A. M. Lambowitz, *J. Mol. Biol.* **307** (2001) 75–92.

5. Michael Kron and Michael Härtlein, *Aminoacyl-tRNA Synthetases and Disease*, in: M. Ibba, C. Francklyn and S. Cusack (Eds.) *Aminoacyl-tRNA Synthetases*, Landes Bioscience, Georgetown, 2005, pp. 397-404.

6. H. S. Kim, U. C. Vothknecht, R. Hedderich, I. Celic and D. Söll, *J. Bacteriol.* **180** (1998) 6446–6449.

7. S. Bilokapic, T. Maier, D. Ahel, I. Gruic-Sovulj, D. Söll, I. Weygand-Durasevic and N. Ban, *EMBO J.* **25** (2006) 2498–2509.

8. E. First, *Catalysis of the tRNA aminoacylation reaction*, in: M. Ibba, F. Cristopher and S. Cusack (Eds.) *Aminoacyl-tRNA Synthetases*, Landes Bioscience, Georgetown, 2005, pp. 328–352.

9. C. M. Agapakis, P. M. Boyle and P. A. Silver, *Nat. Chem. Biol.* **8** (2012) 527–535.

10. M. Praetorius-Ibba, C. D. Hausmann, M. Paras, T. E. Rogers and M. Ibba, *J. Biol. Chem.* **282** (2007) 3680–3687.

11. M. Praetorius-Ibba, T. E. Rogers, R. Samson, Z. Kelman and M. Ibba, *J. Biol. Chem.* **280** (2005) 26099–26104.

12. C. D. Hausmann, M. Praetorius-Ibba and M. Ibba, *Nucleic Acids Res.* **35** (2007) 6094–6102.

13. V. Godinic-Mikulcic, J. Jaric, C. D. Hausmann, M. Ibba and I. Weygand-Durasevic, *J. Biol. Chem.* **286** (2011) 3396–3404.

14. V. Godinic-Mikulcic, J. Jaric, B. J. Greber, V. Franke, V. Hodnik, G. Anderluh, N. Ban and I. Weygand-Durasevic, *Nucleic Acids Res.* **42** (2014) 5191–5201.

15. J. M. Ogle, F. V. Murphy IV, M. J. Tarry and V. Ramakrishnan, *Cell* **111** (2002) 721–732.

16. J. M. Ogle, A. P. Carter and V. Ramakrishnan, *Trends Biochem. Sci.* **28** (2003) 259–266.

17. M. V Rodnina and W. Wintermeyer, *Annu. Rev. Biochem.* **70** (2001) 415–435.

18. C.-M. Zhang, J. J. Perona, K. Ryu, C. Francklyn and Y.-M. Hou, *J. Mol. Biol.* **361** (2006) 300–311.

19. M. Ibba, S. Morgan, A. W. Curnow, D. R. Pridmore, U. C. Vothknecht, W. Gardner, W. Lin, C. R. Woese and D. Söll, *Science* **278** (1997) 1119–1122.

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

21. A. Ambrogelly, I. Ahel, C. Polycarpo, S. Bunjun-Srihari, B. Krett, C. Jacquin-Becker, B. Ruan, C. Köhrer, C. Stathopoulos, U. L. RajBhandary and D. Söll, *J. Biol. Chem.* **277** (2002) 34749–34754.

22. C. R. Woese, G. J. Olsen, M. Ibba and D. Söll, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64** (2000) 202–236.

23. P. O'Donoghue and Z. Luthey-Schulten, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67** (2003) 550–573.

24. J. J. Perona and A. Hadd, *Biochemistry* **51** (2012) 8705–8729.

25. L. Li, V. Weinreb, C. Francklyn and C. W. Carter, *J. Biol. Chem.* **286** (2011) 10387–10395.

26. J. Cavarelli, D. Moras and M. D. Cavarelli J1, *FASEB J.* **7** (1993) 79–86.

27. J. J. Perona and I. Gruic-Sovulj, *Top. Curr. Chem.* **344** (2014) 1–41.

28. L.-T. Guo, S. Helgadóttir, D. Söll and J. Ling, *Nucleic Acids Res.* **40** (2012) 7967–7974.

29. M. Ibba and D. Söll, *Genes Dev.* **18** (2004) 731–738.

30. K. Sheppard, J. Yuan, M. J. Hohn, B. Jester, K. M. Devine and D. Söll, *Nucleic Acids Res.* **36** (2008) 1813–1825.

31. H. D. Becker and D. Kern, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95** (1998) 12832–12837.

32. H. Asahara and O. C. Uhlenbeck, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99** (2002) 3499–3504.

33. M. Blaise, M. Bailly, M. Frechin, M. A. Behrens, F. Fischer, C. L. P. Oliveira, H. D. Becker, J. S. Pedersen, S. Thirup and D. Kern, *EMBO J.* **29** (2010) 3118–3129.

34. M. Bailly, M. Blaise, B. Lorber, H. D. Becker and D. Kern, *Mol. Cell* **28** (2007) 228–239.

35. L. Johansson, G. Gafvelin and E. S. J. Arnér, *Biochim. Biophys. Acta* **1726** (2005) 1–13.

36. A. A. Turanov, X.-M. Xu, B. A. Carlson, M.-H. Yoo, V. N. Gladyshev and D. L. Hatfield, *Adv. Nutr.* **2** (2011) 122–128.

37. M. Rother and J. A. Krzycki, *Archaea* **2010** (2010).

38. C.-M. Zhang, C. Liu, S. Slater and Y.-M. Hou, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15** (2008) 507–514.

39. P. S. Ray, A. Arif and P. L. Fox, *Trends Biochem. Sci.* **32** (2007) 158–164.

40. C. D. Hausmann and M. Ibba, *FEMS Microbiol. Rev.* **32** (2008) 705–721.

41. C. L. Wolfe, J. A. Warrington, L. Treadwell and M. T. Norcum, *J. Biol. Chem.* **280** (2005) 38870–38878.

42. M. Guo and X.-L. Yang, *Top. Curr. Chem.* **344** (2014) 89–118.

43. K.-J. Kim, M. C. Park, S. J. Choi, Y. S. Oh, E.-C. Choi, H. J. Cho, M. H. Kim, S.-H. Kim, D. W. Kim, S. Kim and B. S. Kang, *J. Biol. Chem.* **283** (2008) 14032–14040.

44. S. G. Park, K. H. Jung, J. S. Lee, Y. J. Jo, H. Motegi, S. Kim and K. Shiba, *J. Biol. Chem.* **274** (1999) 16673–16676.

45. M. T. Norcum and J. A. Warrington, *J. Biol. Chem.* **275** (2000) 17921–17924.

46. R. Mukhopadhyay, J. Jia, A. Arif, P. S. Ray and P. L. Fox, *Trends Biochem. Sci.* **34** (2009) 324–331.

47. J. M. Han, S. G. Park, B. Liu, B.-J. Park, J. Y. Kim, C. H. Jin, Y. W. Song, Z. Li and S. Kim, *Am. J. Pathol.* **170** (2007) 2042–2054.

48. N. H. Kwon, T. Kang, J. Y. Lee, H. H. Kim, H. R. Kim, J. Hong, Y. S. Oh, J. M. Han, M. J. Ku, S. Y. Lee and S. Kim, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108** (2011) 19635–19640.

49. S. G. Park, H. J. Kim, Y. H. Min, E.-C. Choi, Y. K. Shin, B.-J. Park, S. W. Lee and S. Kim, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102** (2005) 6356–6361.

50. S. G. Park, K. L. Ewalt, K. S and S. Kim, *Trends Biochem. Sci.* **30** (2005) 569–574.

51. M. Frechin, D. Kern, R. P. Martin, H. D. Becker and B. Senger, *FEBS Lett.* **584** (2010) 427–433.

52. K. Galani, H. Grosshans, K. Deinert, E. C. Hurt and G. Simos, *EMBO J.* **20** (2001) 6889–6898.

53. E. Wiltrout, J. M. Goodenbour, M. Fréchin and T. Pan, *Nucleic Acids Res.* **40** (2012) 10494–10506.

54. E. Karanasios, H. Boleti and G. Simos, *J. Mol. Biol.* **381** (2008) 763–771.

55. T. Nomanbhoy, A. J. Morales, A. T. Abraham, C. S. Vörtler, R. Giegé and P. Schimmel, *Nat. Struct. Biol.* **8** (2001) 344–348.

56. M. Kaminska, M. Deniziak, P. Kerjan, J. Barciszewski and M. Mirande, *EMBO J.* **19** (2000) 6908–6917.

57. M. Frechin, B. Senger, M. Brayé, D. Kern, R. P. Martin and H. D. Becker, *Genes Dev.* **23** (2009) 1119–1130.

58. M. Raina, S. Elgamal, T. J. Santangelo and M. Ibba, *FEBS Lett.* **586** (2012) 2232–2238.

59. J. R. Sampson and M. E. Saks, *Nucleic Acids Res.* **21** (1993) 4467–4475.

60. M. Himeno, H; Hasegawa, T; Ueda, T; Watanabe, K; Shimizu, *Nucleic Acids Res.* **18** (1990) 6815–6819.

61. J. Normanly, R. C. Ogden, S. J. Horvath and J. Abelson, *Nature* **321** (1986) 213–219.

62. B. Lenhard, O. Orellana, M. Ibba and I. Weygand-Durasević, *Nucleic Acids Res.* **27** (1999) 721–729.

63. S. Cusack, C. Berthet-Colominas, M. Härtlein, N. Nassar and R. Leberman, *Nature* **347** (1990) 249–255.

64. S. Price, S. Cusack, F. Borel, C. Berthet-Colominas and R. Leberman, *FEBS Lett.* **324** (1993) 167–170.

65. A. Eichert, J. P. Fürste, A. Schreiber, M. Perbandt, C. Betzel, V. A. Erdmann and C. Förster, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **386** (2009) 368–373.

66. S. Chimnaronk, M. Gravers Jeppesen, T. Suzuki, J. Nyborg and K. Watanabe, *EMBO J.* **24** (2005) 3369–3379.

67. V. Biou, A. Yaremchuk, M. Tukalo and S. Cusack, *Science* **263** (1994) 1404–1410.

68. M. Fujinaga, C. Berthet-Colominas, A. D. Yaremchuk, M. A. Tukalo and S. Cusack, *J. Mol. Biol.* **234** (1993) 222–233.

69. H. Belrhali, a Yaremchuk, M. Tukalo, K. Larsen, C. Berthet-Colominas, R. Leberman, B. Beijer, B. Sproat, J. Als-Nielsen and G. Grübel, *Science* **263** (1994) 1432–1436.

70. R. Rocha, P. J. B. Pereira, M. a S. Santos and S. Macedo-Ribeiro, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108** (2011) 14091–14096.

71. Y. Itoh, S. Sekine, C. Kuroishi, T. Terada, M. Shirouzu, S. Kuramitsu and S. Yokoyama, *RNA Biol.* **5** (2008) 169–177.

72. X. Xu, Y. Shi and X.-L. Yang, *Structure* **21** (2013) 2078–2086.

73. C. Vincent, F. Borel, J. C. Willison, R. Leberman and M. Härtlein, *Nucleic Acids Res.* **23** (1995) 1113–1118.

74. I. Weygand-Durasević, B. Lenhard, S. Filipić and D. Söll, *J. Biol. Chem.* **271** (1996) 2455–2461.

75. I. Gruic-Sovulj, I. Landeka, D. Söll and I. Weygand-Durasevic, *Eur. J. Biochem.* **269** (2002) 5271–5279.

76. B. Lenhard, S. Filipić, I. Landeka, I. Skrtić, D. Söll and I. Weygand-Durasević, *J. Biol. Chem.* **272** (1997) 1136–1141.

77. R. Rigler, U. Pachmann, R. Hirsch and H. G. Zachau, *Eur. J. Biochem.* **65** (1976) 307–315.

78. T. Tosa and L. I. Pizer, *J. Bacteriol.* **106** (1971) 972–982.

79. I. Gruic-Sovulj, J. Rokov-Plavec and I. Weygand-Durasevic, *FEBS Lett.* **581** (2007) 5110–5114.

80. H. Ueda, Y. Shoku, N. Hayashi, J. Mitsunaga, Y. In, M. Doi, M. Inoue and T. Ishida, *Biochim. Biophys. Acta* **1080** (1991) 126–134.

81. H. Belrhali, A. Yaremchuk, M. Tukalo, C. Berthet-Colominas, B. Rasmussen, P. Bösecke, O. Diat and S. Cusack, *Structure* **3** (1995) 341–352.

82. S. Bilokapic, N. Ivic, V. Godinic-Mikulcic, I. Piantanida, N. Ban and I. Weygand-Durasevic, *J. Biol. Chem.* **284** (2009) 10706–10713.

83. M. Dulic, J. Pozar, S. Bilokapic, I. Weygand-Durasevic and I. Gruic-Sovulj, *Biochimie* **93** (2011) 1761–1769.

84. X. Xu, Y. Shi, H.-M. Zhang, E. C. Swindell, A. G. Marshall, M. Guo, S. Kishi and X.-L. Yang, *Nat. Commun.* **3** (2012) 681.

85. H. Fukui, R. Hanaoka and A. Kawahara, *Circ. Res.* **104** (2009) 1253–1259.

86. W. Herzog, K. Müller, J. Huisken and D. Y. R. Stainier, *Circ. Res.* **104** (2009) 1260–1266.

87. J. Cavarelli, B. Delagoutte, G. Eriani, J. Gangloff and D. Moras, *EMBO J.* **17** (1998) 5438–5448.

88. C. Davies, R. B. Gerstner, D. E. Draper, V. Ramakrishnan and S. W. White, *EMBO J.* **17** (1998) 4545–4558.

89. V. Cura, D. Moras and D. Kern, *Eur. J. Biochem.* **267** (2000) 379–393.

90. L. Holm and P. Rosenström, *Nucleic Acids Res.* **38** (2010) 545–549.

91. B. Delagoutte, D. Moras and J. Cavarelli, *EMBO J.* **19** (2000) 5599–5610.

92. M. Konno, T. Sumida, E. Uchikawa, Y. Mori, T. Yanagisawa, S. Sekine, S. Yokoyama and S. Yokoyama, *FEBS J.* **276** (2009) 4763–4779.

93. M. A. Rould, J. J. Perona and T. A. Steitz, *Nature* **352** (1991) 213–218.

94. R. Giegé, M. Sissler and C. Florentz, *Nucleic Acids Res.* **26** (1998) 5017–5035.

95. R. Geslain, F. Martin, B. Delagoutte, J. Cavarelli, J. Gangloff and G. Eriani, *RNA* **6** (2000) 434–448.

96. A. Shimada, O. Nureki, M. Goto, S. Takahashi and S. Yokoyama, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98** (2001) 13537–13542.

97. W. H. McClain and K. Foss, *Science* **241** (1988) 1804–1807.

98. R. Geslain, G. Bey, J. Cavarelli and G. Eriani, *Biochemistry* **42** (2003) 15092–15101.

99. I. A. Vasil'eva, E. A. Semenova and N. A. Moor, *Biochem. Biokhimiia* **74** (2009) 175–185.

100. S. Herring, A. Ambrogelly, C. R. Polycarpo and D. Söll, *Nucleic Acids Res.* **35** (2007) 1270–1278.

101. S. Hauenstein, C.-M. Zhang, Y.-M. Hou and J. J. Perona, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11** (2004) 1134–1141.

102. B. Sohm, M. Sissler, H. Park, M. P. King and C. Florentz, *J. Mol. Biol.* **339** (2004) 17–29.

103. A. Nakamura, K. Sheppard, J. Yamane, M. Yao, D. Söll and I. Tanaka, *Nucleic Acids Res.* **38** (2010) 672–682.

104. R. Ishitani, O. Nureki, S. Fukai, T. Kijimoto, N. Nameki, M. Watanabe, H. Kondo, M. Sekine, N. Okada, S. Nishimura and S. Yokoyama, *J. Mol. Biol.* **318** (2002) 665–677.

105. A. Ochi, K. Makabe, K. Kuwajima and H. Hori, *J. Biol. Chem.* **285** (2010) 9018–9029.

106. A. Ochi, K. Makabe, R. Yamagami, A. Hirata, R. Sakaguchi, Y.-M. Hou, K. Watanabe, O. Nureki, K. Kuwajima and H. Hori, *J. Biol. Chem.* **288** (2013) 25562–25574.

107. F. Yu, Y. Tanaka, K. Yamashita, T. Suzuki, A. Nakamura, N. Hirano, T. Suzuki, M. Yao and I. Tanaka, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108** (2011) 19593–19598.

108. Y. Tomari, T. Suzuki and T. Ueda, *Nucleic Acids Res. Suppl.* (2002) 77–78.

109. J. M. Goodenbour and T. Pan, *Nucleic Acids Res.* **34** (2006) 6137–6146.

110. J. Rudinger-Thirion, A. Lescure, C. Paulus and M. Frugier, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108** (2011) 794–802.

111. S. Cen, H. Javanbakht, S. Kim, K. Shiba, R. Craven, A. Rein, K. Ewalt, P. Schimmel, K. Musier-Forsyth and L. Kleiman, *J. Virol.* **76** (2002) 13111–13115.

112. G. T. Chen and M. Inouye, *Genes Dev.* **8** (1994) 2641–2652.

113. P. F. Agris, *Biochimie* **73** (1991) 1345–1349.

114. P. F. Agris, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **53** (1996) 79–129.

115. T. R. Sosnick, *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **11** (2001) 1-10.

116. R. P. Fahlman, T. Dale and O. C. Uhlenbeck, *Mol. Cell* **16** (2004) 799–805.

117. F. W. Studier, A. H. Rosenberg, J. J. Dunn and J. W. Dubendorff, *Methods Enzymol.* **185** (1990) 60–89.

118. S. Harper and D. W. Speicher, *Curr. Protoc. Protein Sci.* **6** (2008) 1-28.

119. F. Sievers and D. G. Higgins, *Methods Mol. Biol.* **1079** (2014) 105–116.

120. C. Magis, J.-F. Taly, G. Bussotti, J.-M. Chang, P. Di Tommaso, I. Erb, J. Espinosa-Carrasco and C. Notredame, *Methods Mol. Biol.* **1079** (2014) 117–129.

121. M. R. Wilkins, E. Gasteiger, A. Bairoch, J. C. Sanchez, K. L. Williams, R. D. Appel and D. F. Hochstrasser, *Methods Mol. Biol.* **112** (1999) 531–552.

122. Universal Consortium, *Nucleic Acids Res.* **42** (2014) 191–198.

123. P. Flicek, M. R. Amode, D. Barrell, K. Beal, K. Billis, S. Brent, D. Carvalho-Silva, P. Clapham, G. Coates, S. Fitzgerald, L. Gil, C. G. Girón, L. Gordon, T. Hourlier, S. Hunt, N. Johnson, T. Juettemann, A. K. Kähäri, S. Keenan, E. Kulesha, F. J. Martin, T. Maurel, W. M. McLaren, D. N. Murphy, R. Nag, B. Overduin, M. Pignatelli, B. Pritchard, E. Pritchard, H. S. Riat, M. Ruffier, D. Sheppard, K. Taylor, A. Thormann, S. J. Trevanion, A. Vullo, S. P. Wilder, M. Wilson, A. Zadissa, B. L. Aken, E. Birney, F. Cunningham, J. Harrow, J. Herrero, T. J. Hubbard, R. Kinsella, M. Muffato, A. Parker, G. Spudich, A. Yates, D. R. Zerbino, S. M. Searle, *Nucleic Acids Res.* **42** (2014) 749–755.

124. P. P. Chan and T. M. Lowe, *Nucleic Acids Res.* **37** (2009) 93–97.

125. M. Rother, K. Rother, T. Puton and J. M. Bujnicki, *Brief. Bioinform.* **12** (2011) 601–613.

126. M. A. Machnicka, K. Milanowska, O. Osman Oglou, E. Purta, M. Kurkowska, A. Olchowik, W. Januszewski, S. Kalinowski, S. Dunin-Horkawicz, K. M. Rother, M. Helm, J. M. Bujnicki and H. Grosjean, *Nucleic Acids Res.* **41** (2013) 262–267.

127. N. Guex, M. C. Peitsch and T. Schwede, *Electrophoresis* **30** (2009) 162–173.

128. C. Lambert, N. Léonard, X. De Bolle and E. Depiereux, *Bioinformatics* **18** (2002) 1250–1256.

129. L. A. Kelley and M. J. E. Sternberg, *Nat. Protoc.* **4** (2009) 363–371.

130. F. Melo, D. Devos, E. Depiereux and E. Feytmans, *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* **5** (1997) 187–190.

131. S. Riniker, C. D. Christ, H. S. Hansen, P. H. Hünenberger, C. Oostenbrink, D. Steiner and W. F. van Gunsteren, *J. Phys. Chem. B* **115** (2011) 13570–13577.

132. H. Zhou, C. Zhang, S. Liu and Y. Zhou, *Nucleic Acids Res.* **33** (2005) 193–197.

133. R. A. Laskowski, J. A. Rullmannn, M. W. MacArthur, R. Kaptein and J. M. Thornton, *J. Biomol. NMR* **8** (1996) 477–486.

134. E. G. Hutchinson and J. M. Thornton, *Protein Sci.* **5** (1996) 212–220.

135. J. Allers and Y. Shamoo, *J. Mol. Biol.* **311** (2001) 75–86.

136. M. Pasi, M. Tiberti, A. Arrigoni and E. Papaleo, *J. Chem. Inf. Model.* **52** (2012) 1865–1874.

137. M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **72** (1976) 248–254.

138. C. A. Schneider, W. S. Rasband and K. W. Eliceiri, *Nat. Methods* **9** (2012) 671–675.

139. C. L. Borders, J. A. Broadwater, P. A. Bekeny, J. E. Salmon, A. S. Lee, A. M. Eldridge and V. B. Pett, *Protein Sci.* **3** (1994) 541–548.

140. J. Jaric, S. Bilokapic, S. Lesjak, A. Crnkovic, N. Ban and I. Weygand-Durasevic, *J. Biol. Chem.* **284** (2009) 30643–30651.

141. J. R. Krone, R. W. Nelson, D. Dogruel, P. Williams and R. Granzow, *Anal. Biochem.* **244** (1997) 124–132.

142. J. Hwang and S. Nishikawa, *J. Biomol. Screen.* **11** (2006) 599–605.

143. T. Kushiro and P. Schimmel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99** (2002) 16631–16635.

144. I. Cestari, S. Kalidas, S. Monnerat, A. Anupama, M. A. Phillips and K. Stuart, *Mol. Cell. Biol.* **33** (2013) 4872–4888.

145. I. A. Nazarenko and O. C. Uhlenbeck, *Biochemistry* **34** (1995) 2545–2552.

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

147. N. Cvetesic, I. Akmacic and I. Gruic-Sovulj, *Croat. Chem. Acta.* **86** (2013) 73–82.

148. A. Rodriguez-Hernandez, J. L. Spears, K. W. Gaston, P. A. Limbach, H. Gamper, Y.-M. Hou, R. Kaiser, P. F. Agris and J. J. Perona, *J. Mol. Biol.* **425** (2013) 3888–3906.

149. I. Ahel, D. Korencic, M. Ibba and D. Söll, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100** (2003) 15422–15427.

150. C. Liu, H. Gamper, H. Liu, B. S. Cooperman and Y.-M. Hou, *Nat. Commun.* **2** (2011) 329.

151. W. Liu, Y. Huang, G. Eriani, J. Gangloff, E. Wang and Y. Wang, *Biochim. Biophys. Acta* **1473** (1999) 356–362.

152. T. M. Tuohy, Z. Li, J. F. Atkins and M. P. Deutscher, *J. Mol. Biol.* **235** (1994) 1369–1376.

153. H. Li, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **17** (2007) 293–301.

154. M. Srinivasan, P. Mehta, Y. Yu, E. Prugar, E. V Koonin, A. W. Karzai and R. Sternglanz, *EMBO J.* **30** (2011) 873–881.

155. L. Perrochia, D. Guetta, A. Hecker, P. Forterre and T. Basta, *Nucleic Acids Res.* **41** (2013) 9484–9899.

156. R. K. Wilson and B. A. Roe, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86** (1989) 409–413.

157. E. Madore, C. Florentz, R. Giegé, S. Sekine, S. Yokoyama and J. Lapointe, *Eur. J. Biochem.* **266** (1999) 1128–1135.

158. D. Singh, S.-J. Chang, P.-H. Lin, O. V Averina, V. R. Kaberdin and S. Lin-Chao, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106** (2009) 864–869.

159. J. R. Warner and K. B. McIntosh, *Mol. Cell* **34** (2009) 3–11.

160. C. Casas, J. Ribera and J. E. Esquerda, *J. Neurochem.* **77** (2001) 904–915.

161. T. Crepin, E. Schmitt, S. Blanquet and Y. Mechulam, *Biochemistry* **41** (2002) 13003–13011.

162. J. Cline, *Nucleic Acids Res.* **24** (1996) 3546–3551.

163. I. Gruić-Sovulj, M. Dulić, J. Jarić, N. Cvetešić, K. Majsec, and I. Weygand-Đurašević, *Croat. Chem. Acta* **83** (2010) 163–169.

8 Popis kratica

aa-AMP - aminoacil-adenilat
aaRS - aminoacil-tRNA-sintetaza
(d)AMP - (deoksi)adenozin-5'-monofosfat
ATP - adenozin-5'-trifosfat
DEAE -sefaroza - dietilaminoetil-sefaroza
DTT - ditiotreitol
DNA - deoksiribonukleinska kiselina
EDTA - etilendiamintetraoctena kiselina
EF-Tu - elongacijski faktor Tu
HPLC - *High-performance liquid chromatography*
IPTG - izopropil -β-D-tiogalaktopiranozid
k_{cat} - obrtni broj
K_d - konstanta disocijacije
K_m - konstanta Michaelis-Menten
mRNA - glasnička ribonukleinska kiselina
MtArgRS - arginil-tRNA-sintetaza iz arheje *Methanothermobacter thermautotrophicus*
Ni-NTA - nikal(II)-nitrilotrioctena kiselina
Δ*N*MtArgRS - arginil-tRNA-sintetaza iz arheje *Methanothermobacter thermautotrophicus* s delecijom *N* aminokiselina počev od N-kraja proteina
$MttRNA^{Arg}$ - tRNA arheje iz *Methanothermobacter thermautotrophicus* odgovorna za prepoznavanje argininskih kodona
PAGE - elektroforeza na poliakrilamidnom gelu
PCR - lančana reakcija polimeraze
PP_i - pirofosfat
RNA - ribonukleinska kiselina
rRNA - ribosomska ribonukleinska kiselina
SPR – metoda rezonancije površinskih plazmona (eng. *surface plasmon resonance*)
$tRNA^{aa}$ – transfer-RNA odgovorna za prepoznavanje kodona aminokiseline aa

Popis dvadeset standardnih aminokiselina i odgovarajuće kratice
alanin, Ala (A)
arginin, Arg (R)
asparagin, Asn (N)
asparaginska kiselina, Asp (D)
cistein, Cys (C)
glutamin, Gln (Q)
glutaminska kiselina, Glu (E)
glicin, Gly (G)
histidin, His (H)
izoleucin, Ile (I)
leucin, Leu (L)
lizin, Lys (K)
metionin, Met (M)

fenilalanin, Phe (F)
prolin, Pro (P)
serin, Ser (S)
treonin, Thr (T)
triptofan, Trp (W)
tirozin, Tyr (Y)
valin, Val (V)

9 Životopis

Rođena sam u Karlovcu 23. studenog 1981. godine, gdje sam završila osnovnu školu i tri razreda Opće Gimnazije. Maturirala sam na Privatnoj Klasičnoj Gimnaziji u Zagrebu 2000. godine. Muzičku Akademiju u Zagrebu-klavirski odjel, upisala sam 1999., a diplomirala 2004. godine. Prirodoslovno-matematički fakultet, upisala sam 2002., a diplomirala 2008. godine s radom naslova Doprinos pojedinih aminokiselina N-terminalne domene seril-tRNA-sintetaze iz *Methanosarcina barkeri* u vezanju $tRNA^{Ser}$. Od 2009. godine zaposlena sam kao znanstveni novak na Zavodu za biokemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta. Neposredni sam voditelj jednog diplomska rada i jednog rada koji je nagrađen Rektorovom nagradom. U svrhu znanstvenog usavršavanja, a u okviru međunarodne suradnje, boravila sam u laboratorijima prof. Michaela Ibbe na Ohio State University (u trajanju od 4 tjedna 2009. godine), prof. Nenada Bana na ETH Zürich (*Eidgenössiche Technische Hochschule,* tijekom 8 tjedana 2009.-2010. te u istom trajanju 2010.-2011. godine) te u laboratoriju prof. Gregora Anderluha (u trajanju od po dva tjedna 2012. i 2013. godine).

Znanstvene publikacije

1. A. Crnković, M. Tkalčić, V. Godinić- Mikulčić, G. Anderluh and I. Weygand-Đurašević, Dynamics of an aminoacyl-tRNA synthetase complex assembly (u pripremi).

2. J. Jaric, S. Bilokapic, S. Lesjak, A. Crnkovic, N. Ban and I. Weygand-Durasevic, Identification of amino acids in the N-terminal domain of atypical methanogenic-type Seryl-tRNA synthetase critical for tRNA recognition, *J. Biol. Chem.* **284** (2009) 30643–30651.

2. B. J. Greber, D. Boehringer, V. Godinic-Mikulcic, A. Crnkovic, M. Ibba, I. Weygand-Durasevic and N. Ban, Cryo-EM structure of the archaeal 50S ribosomal subunit in complex with initiation factor 6 and implications for ribosome evolution, *J. Mol. Biol.* **418** (2012) 145–160.

Sudjelovanja na konferencijama i školama (postersko priopćenje)

1. A. Crnković, M. Tkalčić, V. Godinić- Mikulčić, V. Hodnik, G. Anderluh and I. Weygand-Đurašević, An adaptable aminoacyl-tRNA synthetase complex formation: gathering to improve decoding accuracy, Syntetic Life: Molecules, Cells and Tissues. Rehovot, Isreal, 2013.
2. A. Crnković, V. Godinić-Mikulčić, I. Weygand-Đurašević, The aminoacyl-tRNA complex in Archaea. 10th International Symposium and Summer School on Bioanalysis. Zagreb, Croatia, 2010.
3. J. Jarić, S. Bilokapić, A. Crnković, S. Lesjak, N. Ban, I. Weygand-Durasevic, The role of N-terminal domain of seryl-tRNA synthetase from Methanosarcina barkeri in tRNA

binding. Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology with international participation. Osijek, Croatia, 2008.

4. J. Jarić, S. Bilokapić, A. Crnković, S. Lesjak, N. Ban, I. Weygand-Đurašević, A single amino acid change in helices H2 and H3 affects binding of tRNA by atypical seryl-tRNA synthetase. Scientific Symposium 50 Years of Molecular Biology in Croatia, 2008.

Sudjelovanja na konferencijama (usmeno priopćenje)

1. A. Crnković, M. Tkalčić, V. Godinić- Mikulčić, V. Hodnik, G. Anderluh and I. Weygand-Đurašević. Dynamics of an aminoacyl-tRNA synthetase complex assembly: switching between canonical and ancillary roles. XXIII. Croatian meeting of Chemists and Chemical Engineers. Osijek, Croatia, 2013.