

Mehanizam diskriminacije leucina u mjestu za popravak pogreške leucil-tRNA-sintetaze

Živković, Igor

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:773199>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-31**



Repository / Repozitorij:

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



Igor Živković

**Mehanizam diskriminacije leucina u mjestu za popravak
pogreške leucil-tRNA-sintetaze**

Diplomska radnja

predložena Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog stupnja

magistra struke (kemija)

Zagreb

2016.

Ova diplomatska radnja izrađena je na Zavodu za biokemiju i Zavodu za fizikalnu kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu, pod neposrednim vodstvom dr. sc. Morane Dulić i mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ite Gruić-Sovulj, i izv. prof. dr. sc. Branimira Bertoše.

Zahvale

Od srca hvala...

...mojoj obitelji, sestri, tati i mami, što su uvijek bili tu i vjerovali u mene i kada ja nisam, a prije svega im hvala što su imali razumijevanja tijekom mog odrastanja. Znam da Vam nije uvijek bilo lako, ali bez toga danas ne bih bio ovdje. Hvala Vam za sva odricanja na koja ste bili spremni kako bi meni bilo bolje i kako bih bio sretniji. Ovaj rad je i Vaše djelo. Volim Vas...

...mojim kolegama i prijateljima. Mnogo Vas je koji ste mi pomogli s profesionalne, ali i što je bitnije, s ljudske strane. Kada mi je trebalo uvijek ste bili spremni pružiti mi pomoć, razgovor, smijeh, krov nad glavom... Sve to me izgradilo kao osobu, stoga se nadam da uspijevam vratiti barem toliko u Vaše živote. U strahu da nekoga ne izostavim neću nikoga ni imenovati, ali još jednom hvala Vam svima. Volim Vas...

...Morani, koja me strpljivo učila i radila sa mnom. Možda i najbolje znaš koliko nije bilo lako u nekim trenucima, ali nisi dopustila da izgubim vjeru, a rezultati su u konačnici došli i bit će ih još. Hvala ti na svim razgovorima koje smo vodili, naučila si me mnogo i veselim se što ću imati priliku i dalje raditi uz tebe. Hvala ti...

...profesoru Bertoši. Hvala Vam na svemu što ste me naučili i na svakom radnom satu provedenom u izvrsnoj atmosferi. Hvala Vam što ste krajnje uživiljeno sjedili sa mnom dok smo gledali simulacije i iščekivali rezultate. Na kraju, hvala Vam što ste izvanredan profesor, Vaša predavanja, energija koju u to unosite je prekrasna i moj studij bez Vas svakako ne bi bio isti. Hvala Vam...

...profesorici Gruić-Sovulj. Hvala Vam što ste tako strastveni prema znanosti i prema prenošenju znanja. Slušajući Vas ta strast je prešla na mene, a svakim razgovorom dalje raste i zbog toga sam beskrajno sretan. Najbitnije, neizmjereno sam Vam zahvalan na ukazanom povjerenju i prilici da i dalje učim od i uz Vas. Hvala Vam...

...Zorici. Tijekom cijelog ovog rada bila si uz mene i slušala sve moje tuge i radosti, probleme i rješenja, stoga ti hvala na tome. Bitnije od toga, tijekom svih ovih pet godina si uz mene i pokazala mi da od mene nikada nećeš odustati. Ne postoje riječi kojima ti mogu opisati koliko sam na tome zahvalan. Zato, ovaj rad posvećujem tebi. Volim te...

Zorici...

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Literaturni pregled.....	3
2.1. Prijenos genetičke informacije	3
2.1.1. Transkripcija	3
2.1.2. Translacija.....	4
2.2. Struktura molekula tRNA.....	7
2.3. Aminoacil-tRNA-sintetaze	9
2.3.1. Podjela aminoacil-tRNA-sintetaza.....	9
2.3.2. Mehanizam reakcije aminoacilacije.....	11
2.3.3. Interakcija aminoacil-tRNA sintetaza i tRNA	11
2.3.4. Mehanizmi popravka pogreške u reakciji aminoacilacije.....	12
2.4. Leucil-tRNA-sintetaza.....	14
2.4.1. Strukturni elementi leucil-tRNA-sintetaze.....	14
2.4.2. Interakcije leucil-tRNA-sintetaze i aa-tRNA ^{Leu}	16
2.4.3. Reakcija aminoaciliranja.....	17
2.4.4. Popravak pogreške reakcije aminoaciliranja.....	18
2.4.5. Simulacije molekularne dinamike leucil-tRNA-sintetaze	19
2.5. Usporedba mehanizama specifičnosti prema supstratu enzima koji imaju sposobnost popravka pogreške	20
2.6. Molekularna dinamika	21
3. Materijali i metode	24
3.1. Materijali	24
3.1.1. Standardne kemikalije.....	24
3.1.2. Boje	24
3.1.3. Aminokiseline i nukleotidi.....	24
3.1.4. Enzimi, proteini i nukleinske kiseline.....	24

3.1.5. Markeri veličine	24
3.1.6. Komercijalni kompleti	25
3.1.7. Radioaktivno obilježeni spojevi.....	25
3.1.8. Ostali korišteni materijali.....	25
3.1.9. Hranjive podloge i mediji za uzgoj bakterije <i>E. coli</i>	25
3.1.10. Bakterijski sojevi i plazmidi (<i>E. coli</i>)	25
3.2. Metode rada s bakterijama.....	25
3.2.1. Transformacija bakterijskih stanica elektroporacijom	25
3.3. Metode rada s nukleinskim kiselinama	26
3.3.1. Lančana reakcija polimeraze (PCR)	26
3.3.2. Ciljana mutageneza	26
3.3.3. Agarozna gel-elektroforeza.....	27
3.3.4. Ligacija DNA s pomoću T4-DNA-ligaze	27
3.3.5. Izolacija plazmidne DNA.....	28
3.3.6. Određivanje koncentracije nukleinskih kiselina	28
3.3.7. Analiza nukleotidnih sljedova.....	28
3.4. Metode rada s proteinima	28
3.4.1. Prekomjerna ekspresija rekombinantnih proteina.....	28
3.4.2. Priprema proteinskih ekstrakata.....	28
3.4.3. Afinitetna kromatografija s imobiliziranim metalnim ionima	29
3.4.4. Denaturirajuća poliakrilamidna gel-elektroforeza	29
3.4.5. Ultrafiltracija.....	30
3.4.6. Određivanje koncentracije proteina	30
3.4.7. Gel-filtracija.....	30
3.5. Kinetičke metode.....	31
3.5.1. Ukupna reakcija aminoaciliranja	31
3.6. Simulacije molekularne dinamike	32

4. Rezultati	35
4.1. Simulacije molekularne dinamike	35
4.1.1. Pregled strukture	35
4.1.2. Smještaj adenzinskog dijela supstrata.....	38
4.1.3. Smještaj aminokiselinskog dijela supstrata	40
4.1.4. Katalitička voda	46
4.1.5. Diskriminatorna aminokiselina	46
4.2. Ciljana mutageneza.....	49
4.3. Pročišćavanje mutanata leucil-tRNA-sintetaze	51
4.4. Ukupna reakcija aminoaciliranja	52
5. Rasprava	54
5.1. Diskriminacija leucina u aktivnom mjestu	54
5.2. Uloga diskriminatorne aminokiseline.....	57
6. Zaključak	60
7. Literaturna vrela	61
8. Popis kratica i simbola	64
9. Životopis.....	67

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Diplomska radnja

Kemijski odsjek

Mehanizam diskriminacije leucina u mjestu za popravak pogreške leucil-tRNA-sintetaze

Igor Živković

Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet

Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb

Enzimi leucil-tRNA-sintetaze (LeuRS) kovalentno vežu leucin na tRNA^{Leu}. Osim leucina, LeuRS na tRNA^{Leu} mogu prenositi i nepripadne aminokiseline, pri čemu je najveća prijetnja točnosti te reakcije neproteinogeni norvalin. Iz tog razloga LeuRS posjeduje mehanizme za popravak pogreške. Većina popravka odvija se nakon prijenosa aminokiseline na tRNA u zasebnoj domeni za popravak pogreške. Kako bismo odgovorili na pitanje diskriminira li domena za popravak Leu-tRNA^{Leu} na temelju vezanja, kao što je dosad smatrano, ili kinetike, provedene su simulacije molekularne dinamike (MD) divljeg tipa i mutanta T252A, za koji je poznato da hidrolizira Leu-tRNA^{Leu}, s analogima supstrata leucil- i norvalil-2'-adenozinom u domeni za popravak pogreške. Naši rezultati sugeriraju da vezanje leucina u konformaciji opisanoj torzijskim kutem N-C α -C β -C γ od oko $\pm 180^\circ$ uzrokuje kaskadu događaja koja dovodi do udaljavanja katalitičke vode od veze koja se hidrolizira i do smanjenog vremenskog udjela koji ona provodi u aktivnom mjestu tijekom simulacije. Ovo se ne odvija kod simulacija T252A mutanta, kao ni kod simulacija T252S i T252V mutanata. Kinetički rezultati sugeriraju da mutanti T252S i T252V akumuliraju Leu-tRNA^{Leu} kao i divlji tip enzima, što je donekle u neslaganju s rezultatima dobivenim MD simulacijama.

(67 + XVI stranica, 49 slika, 8 tablica, 66 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici u Zagrebu, Horvatovac 102a

Ključne riječi: leucil-tRNA-sintetaza, *Escherichia coli*, mehanizam popravka pogreške, mehanizam diskriminacije supstrata, simulacije molekularne dinamike, kinetika aminoaciliranja

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

Dr. sc. Branimir Bertoša, izv. prof.

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

Dr. sc. Branimir Bertoša, izv. prof.

Dr. sc. Predrag Novak, prof.

Dr. sc. Biserka Prugovečki, izv. prof.

Rad prihvaćen: 4. srpnja 2016.

ABSTRACT

University of Zagreb

Faculty of Science

Master's thesis

Department of Chemistry

The mechanism of leucine discrimination in the editing site of leucyl-tRNA synthetase

Igor Živković

Department of Chemistry, Faculty of Science

Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb

Leucyl-tRNA synthetase (LeuRS) covalently couples leucine with tRNA^{Leu}. These enzymes can also transfer several non-cognate amino acids on tRNA^{Leu} with the biggest threat to fidelity posed by non-proteinogenic norvaline. To prevent misacylation, LeuRS employs editing. The predominant editing pathway occurs at the separate editing domain following aminoacyl transfer to tRNA. To address the question if the editing domain discriminates leucine based on ground state binding, as anticipated, or based on the kinetics, we employed molecular dynamics (MD) simulation for the wild type LeuRS and the mutant T252A, which hydrolyses Leu-tRNA^{Leu}, with the substrate analogues leucyl- and norvalyl-2'-adenosine in the editing active site. Our results suggest that binding of leucine in a conformation defined by N-C α -C β -C γ torsion angle of approximately $\pm 180^\circ$ triggers a cascade of events that result in distancing of the catalytic water from the susceptible bond and decrease in time the water molecule occupies the active site. This was not observed in T252A, nor in the mutants T252S and T252V. Kinetic results suggest that T252S and T252V accumulate Leu-tRNA^{Leu} wild type alike, which is somewhat in disagreement with MD results.

(67 + XVI pages, 49 figures, 8 tables, 66 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library in Zagreb, Horvatovac 102a

Keywords: leucyl-tRNA synthetase, *Escherichia coli*, proofreading mechanism, substrate discrimination mechanism, molecular dynamics simulation, aminoacylation kinetics

Mentors: Dr. sc. Ita Gruić Sovulj, Assoc. Prof.

Dr. sc. Branimir Bertoša, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. sc. Ita Gruić Sovulj, Assoc. Prof.

Dr. sc. Branimir Bertoša, Assoc. Prof.

Dr. sc. Biserka Prugovečki, Assoc. Prof.

Dr. sc. Predrag Novak, Prof.

Thesis accepted July 4th, 2016

1. Uvod

Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) su enzimi koji kataliziraju nastajanje kovalentne veze između aminokiseline i pripadne tRNA. Reakcija aminoacilacije odvija se u dva koraka; aktivacija aminokiseline i njen prijenos na tRNA.^{1,2} Supstrati prvog koraka su ATP i aminokiselina, a produkt je aminoacil-adenilat (aa-AMP) – aktivirana aminokiselina.^{1,2} U sljedećem koraku aminokiselina se prenosi na 2' ili 3'OH skupinu riboze adenzina koji se nalazi na 3' kraju molekule tRNA (A76) te nastaje aminoacil-tRNA (aa-tRNA).^{1,2} Katalizirajući ovu reakciju aaRS imaju nezamjenjivu ulogu u prijenosu genetičke informacije, konkretno u procesu translacije.³⁻⁵ Točnost u prijenosu genetičke informacije od neizmjerne je važnosti, stoga se od aaRS očekuje velika točnost. Stanica tolerira jednu pogrešku u 10^3 - 10^4 aminokiselina ugrađenih u polipeptidni lanac.⁶ Prepoznavanje pripadne tRNA ne predstavlja problem aaRS s obzirom da su te molekule usporedive veličine te da u kompleksu ostvaruju veliki broj univerzalnih i specifičnih interakcija.⁷ No, aminokiseline su znatno manje od enzima, a neke su međusobno strukturno i kemijski slične, zbog čega prepoznavanje pripadne aminokiseline predstavlja problem nekim aaRS. Stoga su aminoacil-tRNA-sintetaze koje griješe češće od jednom u 10^3 kataliziranih reakcija razvile mehanizme za popravak pogreške.⁸

Leucil-tRNA-sintetaza (LeuRS), enzim koji katalizira prijenos leucina na tRNA^{Leu} jedan je od onih koji pokazuju aktivnost popravka pogreške. Enzimski popravak pogreške može se odvijati prije ili nakon prijenosa aminokiseline.¹ LeuRS pogreške popravljaju gotovo isključivo nakon prijenosa aminokiseline u CP1 (eng. *connective peptide 1*) domeni udaljenoj oko 30 Å od sintetskog aktivnog mjesta.¹⁰ Nakon prijenosa, 3' kraj aminoacilirane tRNA translocira se iz sintetskog mjesta u aktivno mjesto domene za popravak pogreške u kojemu se hidrolizira esterska veza između tRNA i nepripadne aminokiseline.¹¹ Analize *in vitro* pokazale su da LeuRS može pogrešno aktivirati čitav niz aminokiselina: valin, izoleucin, metionin, norvalin, norleucin i α -aminobutirat.¹²⁻¹⁵ Dugo se smatralo kako je izoleucin glavna prijetnja točnosti LeuRS, no nedavna istraživanja pokazala su kako je to zapravo norvalin.⁸ Naime faktor diskriminacije u aktivaciji $[(k_{cat}/K_m)_{pripadna}/(k_{cat}/K_m)_{nepripadna}]$ za izoleucin je oko 31000 dok je za norvalin samo 116.⁸ Važno je napomenuti da iako je norvalin neproteinogena aminokiselina, njegova koncentracija u mikroaerobnim uvjetima uzgoja bakterija može narasti do 1 mmol dm^{-3} .¹⁶

Mjesto za popravak pogreške kod LeuRS pred sobom ima zadatak razlikovati Leu-tRNA^{Leu} i Nva-tRNA^{Leu}. Prema modelu, efikasnost popravka pogreške ovisi o kinetičkoj razdiobi između hidrolize aa-tRNA i njene disocijacije s enzima.⁸ Procijenjena konstanta brzine

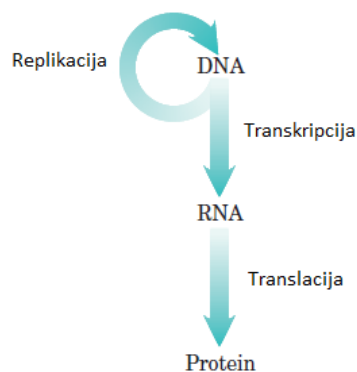
disocijacije Leu-tRNA^{Leu} je $4,9 \text{ s}^{-1}$, a Nva-tRNA^{Leu} $1,5 \text{ s}^{-1}$, dok su pripadajuće brzine hidrolize eksperimentalno određene i iznose $0,098 \text{ s}^{-1}$, to jest 310 s^{-1} .^{8,10} S obzirom da kinetički rezultati govore kako se Leu-tRNA^{Leu} iako sporo, ipak hidrolizira očito je da se i veže u aktivno mjesto domene za popravak pogreške što je u djelomičnom neslaganju s dosad pretpostavljanim „modelom dvostrukog sita“ prema kojemu se pripadna aminokiselina u njega ne može vezati.¹⁷ Stoga, postavlja se pitanje kako domena za popravak pogreške LeuRS razlikuje Leu- od Nva-tRNA^{Leu}. S obzirom da se leucin i norvalin razlikuju samo u jednoj metilnoj skupini jasno je kako to nije nimalo jednostavan zadatak.

Trenutno dostupni kinetički podaci sugeriraju kako je aminokiselina T252, koja se nalazi u aktivnom mjestu CP1 domene, ključna za spomenutu diskriminaciju.^{10,18} Naime, mutacija T252A omogućava hidrolizu Leu-tRNA^{Leu}. Kako bismo dobili odgovor na pitanje kako se zapravo odvija diskriminacija odlučili smo provesti simulacije molekularne dinamike (MD) divljeg tipa (WT) i mutanta T252A LeuRS s analogima supstrata leucil-, odnosno norvalil-2'-adenozinom u hidrolitičkom aktivnom mjestu. Dosad rađene simulacije MD na LeuRS su prekratke i time nedostatne¹⁸⁻²⁰ te su rađene bez znanja o tome da je norvalin najveća prijetnja točnosti LeuRS. Iz tog razloga u ovom radu rađene su simulacije s Nva i na 50 puta dužoj vremenskoj skali, konkretno, svaka simulacija trajala je 61 ns. Izuzev otkrivanja prirode diskriminacije supstrata želja nam je dobiti odgovor na pitanje koja je uloga T252 u tome. Kako bismo to saznali simulirali smo MD mutanata T252S i T252V, budući da je valin strukturno, a serin kemijski sličan treoninu. Simulacije MD napravljene na tim mutantima koje su opisane u literaturi su također prekratke i simulirane su bez supstrata u aktivnom mjestu.¹⁸ U literaturi postoje i podaci o brzini hidrolize aa-tRNA u uvjetima ustaljenog stanja za navedene mutante.¹⁸ Navedena istraživanja imaju nedostatak da ne prate nužno kemijsku reakciju nego najsporiji korak u reakcijskom mehanizmu, a to je u ovom slučaju disocijacija produkta.¹⁰ Stoga je cilj ovog istraživanja započeti detaljnu kinetičku karakterizaciju navedenih mutanata i usporediti ih s računalnim metodama kojima ćemo istražiti mehanizam diskriminacije pripadne aminokiseline u mjestu za popravak pogreške.

2. Literaturni pregled

2.1. Prijenos genetičke informacije

Sav život kakav poznajemo temelji se na prijenosu genetičke informacije. Ona je u velikoj većini slučajeva sačuvana u dvolančanim molekulama DNA u obliku specifičnog slijeda njenih građevnih elemenata – nukleotida. Prilikom diobe stanice genetička informacija prenosi se procesom replikacije DNA tijekom kojeg oba lanca „roditeljske“ DNA služe kao kalupi na temelju kojih se grade novi, njima komplementarni, lanci „kćeri“. Osim samog očuvanja genetičke informacije u obliku prijenosa s generacije na generaciju, jednako su važni i procesi odgovorni za njeno dešifriranje. To su transkripcija i translacija koje su osnova biosinteze proteina, molekula koje obavljaju većinu funkcija neophodnih za život stanice. Sve prethodno navedene procese opisuje „centralna dogma života“ (slika 2.1). Kako se ovaj rad bavi enzimima povezanim s biosintezom proteina veći fokus stavljen je na procese transkripcije i osobito translacije.



Slika 2.1. Shematski prikaz „centralne dogme života“. Preuzeto i prilagođeno iz Nelson D. L., Cox M. M. (2008).⁴

2.1.1. Transkripcija

S obzirom da ne postoji izravan način da iz molekule DNA dobivamo proteine potrebni su nam intermedijeri, to jest molekule glasničke RNA (eng. *messenger* RNA, mRNA). Proces sinteze molekula mRNA kataliziran je enzimima RNA-polimerazama, a naziva se transkripcija.³⁻⁵ Transkripciju općenito možemo podijeliti u tri koraka: inicijacija, elongacija i terminacija. Prilikom inicijacije molekula RNA-polimeraze pronalazi promotorsko mjesto na molekuli DNA iza čega slijedi lokalno odmotavanje dvolančane zavojnice. Nakon odmotavanja, RNA-polimeraza sintetizira komplementarni lanac ribonukleinske kiseline, odnosno mRNA. Sama sinteza odvija se u 5' → 3' smjeru. U konačnici će RNA-polimeraza doći do terminacijskog signala koji uzrokuje prekid sinteze. Kod prokariota tako sintetizirana mRNA spremna je za sljedeći korak, to jest translaciju. Dapače, u većini slučajeva se transkripcija i translacija u

prokariotima odvijaju paralelno. Kod eukariota je situacija nešto složenija. Naime, molekule mRNA prolaze kroz procese posttranskripcijske modifikacije koji najčešće podrazumijeva dodavanje kape na 5' kraju, poli-A repa na 3' kraju i izrezivanje nekodirajućih sljedova – introna. Na taj način dobivamo zrelu molekulu mRNA spremnu za dekodiranje.³⁻⁵

2.1.2. Translacija

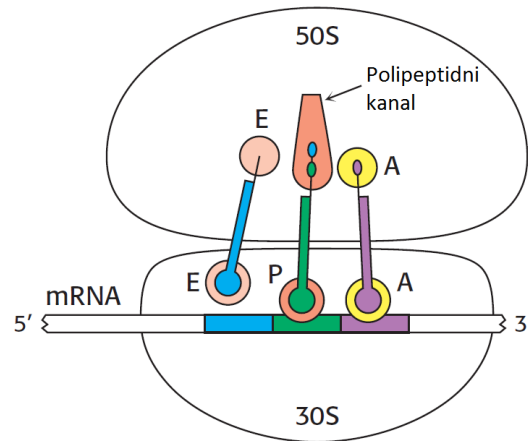
Proces dekodiranja genetičke informacije i izgradnje polipeptidnog lanca naziva se translacija.³⁻⁵ Sama informacija zapisana je u obliku tripleta nukleotida koje nazivamo kodonima. S obzirom da je broj mogućih kodona 64, što je znatno više od 20 proteinogenih aminokiselina, za zaključiti je kako postoji više kodona koji kodiraju istu aminokiselinu. Iz tog razloga kažemo kako je genetski kod degeneriran (slika 2.2). Izuzev kodona za aminokiseline, postoje i tri STOP kodona koji označavaju kraj zapisa u molekuli mRNA. Budući da ne postoji mehanizam kojim bi aminokiseline direktno prepoznavale pripadni im kodon, stanica upotrebljava molekule prijenosne RNA (eng. *transfer RNA*, tRNA).³⁻⁵ One sadrže element za prepoznavanje kodona, odnosno antikodon te donose pripadnu aminokiselinu do ribosoma. Aminokiselina je kovalentno vezana na 3' kraj tRNA. Nastajanje aminoacilirane-tRNA (aa-tRNA) kataliziraju enzimi aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS). Za svaku aminokiselinu postoji jedna aaRS i barem jedna tRNA. Zbog hipoteze kolebljive baze, koja u određenim slučajevima dopušta odstupanje od Watson-Crickovog sparivanja prve baze antikodona i treće baze kodona, nema potrebe za upotrebom 64 različite tRNA.³⁻⁵

LITERATURNI PREGLED

Prva baza 5' kraj	Druga baza				Treća baza 3' kraj
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Stop	Stop	A
	Leu	Ser	Stop	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Slika 2.2. Degeneriranost genetičkog koda. Preuzeto i prilagođeno iz Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L. (2012).³

Proces translacije odvija se na staničnoj mašineriji koju nazivamo ribosomima. Iako oni kod svih organizama obavljaju istu funkciju, postoje neke strukturne razlike između bakterijskih i eukariotskih ribosoma. Bakterijski ribosomi sastavljeni su od tri molekule ribosomske RNA (rRNA) i pedesetak proteina podijeljenih u dvije podjedinice, malu (30S) i veliku (50S). Mala podjedinica sastoji se od 16S, a velika od 5S i 23S molekula rRNA. Eukariotski ribosom je nešto veći, a sastavljen je od četiri molekule rRNA i osamdeset proteina koji su podijeljeni u veliku (60S) i malu (40S) podjedinicu.²¹ Mala podjedinica sastoji se od 18S, a velika od 5S, 28S i 5.8S molekula rRNA. Uloga male podjedinice je čitanje kodona na mRNA dok velika vrši sintezu polipeptidnog lanca. Dekodiranje kodona odvija se u smjeru 5' → 3', a sinteza proteina od N- prema C-kraju. Dodatno valja napomenuti kako se na ribosomu nalaze tri mjesta u kojima se odvija translacija: A, P i E (eng. *aminoacyl*, *peptidyl* i *exit*) (slika 2.3).



Slika 2.3. Prikaz sinteze proteina na ribosomu. Vezna mjesta za molekule tRNA označena su slovima A, P i E (eng. *aminoacyl*, *peptidyl* i *exit*). Preuzeto i prilagođeno iz Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L. (2012).³

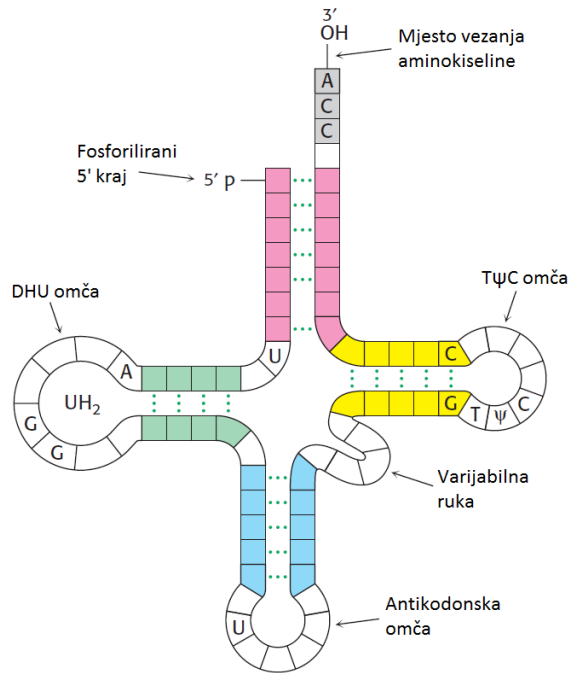
Translaciju, kao i transkripciju, možemo podijeliti u tri koraka: inicijacija, elongacija i terminacija.³⁻⁵ Inicijacija je okarakterizirana interakcijom 3' kraja 16S rRNA i 5' kraja mRNA koja dovodi do smještanja AUG, to jest START kodona u A mjesto. Važno je reći kako se kod prokariota na 5' kraju, otprilike 10 nukleotida uzvodno od START kodona, nalazi purinom bogati slijed koji nazivamo Shine-Dalgarno sekvencom, a upravo je to vezno mjesto s pomoću kojeg se ostvaruje interakcija mRNA i ribosoma.²² Jednom kada je AUG kodon smješten u A mjesto njega prepoznaje inicijacijska tRNA ($tRNA_i$) koja je u slučaju prokariota aminoacilirana *N*-formilmetioninom, a kod eukariota metioninom. Ostvarivanje navedenih interakcija potpomažu proteini koje nazivamo inicijacijskim faktorima (IF). Kada su one ostvarene, IF mogu disocirati te dolazi do vezanja 50S podjedinice ribosoma i nastajanje kompleksa 70S, a translacija ulazi u fazu elongacije. Tada slijedi translokacija mRNA i aa- $tRNA_i$ u P mjesto ribosoma te vezanje sljedeće aa-tRNA u A mjesto. Vezanje odgovarajuće aa-tRNA potpomažu proteini zvani elongacijski faktori (EF).³⁻⁵ Dodatno, njihova je uloga zaštita esterske veze između aminokiseline i tRNA od hidrolize. Peptidil-transferaza, sastavni dio 50S podjedinice, katalizira nastajanje peptidne veze između dvije aminokiseline koje se nalaze u P i A mjestu. Nakon nastanka peptidne veze ponovo dolazi do translokacije prilikom koje tRNA iz P mjesta prelazi u E, a ona iz A mjesta u P. Rastući polipeptidni lanac se ne translocira, već cijelo vrijeme raste u izlazni tunel u P mjestu. Proces elongacije na isti način se ponavlja sve do STOP kodona kojeg prepoznaju faktori otpuštanja (eng. *release factor*, RF). Oni interagiraju s peptidil-transferaznim centrom potičući ga na interakciju s vodom, prilikom koje dolazi do hidrolize posljednje aminokiseline s tRNA te slobodni polipeptidni lanac napušta ribosom. Navedeni

dogadjaji nazivaju se terminacijom. Polipeptidni lanac prolazi kroz proces smatanja, a često i posttranslacijske modifikacije prije nego što postane funkcionalni protein.³⁻⁵

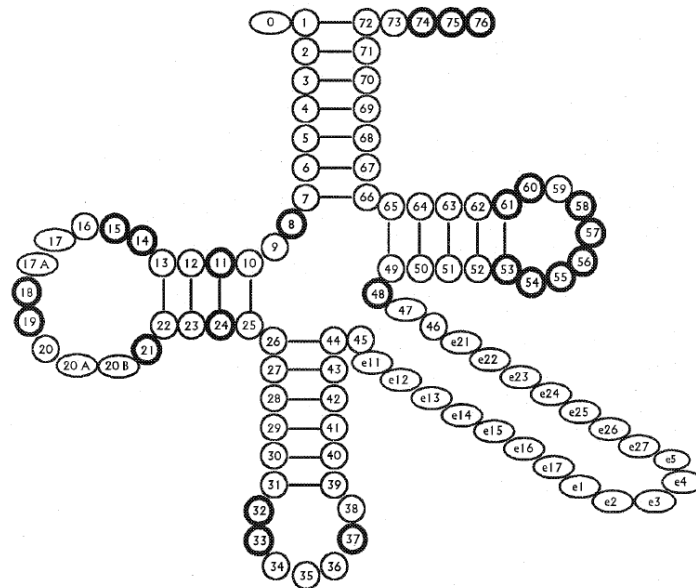
2.2. Struktura molekula tRNA

U prethodnom poglavlju opisani su procesi odgovorni za prijenos i dešifriranje genetičke informacije. Upravo u kontekstu dešifriranja, točnije u procesu translacije, spomenute su „molekule prevoditelji“, odnosno tRNA. Kao što im ime kaže, one su polimeri ribonukleotida, a prisutne su u svim poznatim organizmima. Njihova uloga je prijenos aminokiseline do ribosoma i prepoznavanje pripadnog kodona. Dije se u izoakceptorske skupine u koje su zajedno svrstane tRNA za istu aminokiselinu, a različitog antikodona.

S obzirom na važnost funkcija koje obavljaju, ne čudi njihova visoka strukturna očuvanost. Shematski prikaz dvodimenzionalne strukture nalazi se na slici 2.4, a naziva se modelom djeteline.²³ Uglavnom su građene od 73 do 93 nukleotida, od kojih otprilike polovica tvori dvolančanu strukturu.³ Na slici 2.5 prikazan je konsenzus za numeraciju nukleotida u molekuli tRNA. Obično je 7-15 nukleotida modificirano (npr. metilirano ili dimetilirano) što omogućuje specifična svojstva, poput nemogućnosti stvaranja određenog baznog para ili povećanja hidrofobnosti.³ Upareni sljedovi grade zavojnice A-konformacije. Krenuvši od 5' kraja prvo nailazimo na fosforilirani gvanin (pG). Sljedeći specifičan motiv je D ruka sastavljena od 4 ili 5 parova baza i omče koja sadrži nekoliko dihidrouridina (UH₂), a glavna uloga joj je stabilizacija tercijarne strukture. Antikodonska ruka sadrži pet sparenih baza i omču sa sedam nesparenih nukleotida, od kojih tri nazivamo antikodonom. Oni su komplementarni kodonu s kojim ostvaruju interakcije u A mjestu ribosoma. U prethodnom poglavlju spomenuto je kako komplementarnost ne mora nužno biti potpuna zbog hipoteze kolebljive baze. T ψ C ruka građena je od 5 parova baza i omče koja sadrži ribotimidin, pseudouridin (ψ) i citozin, a izuzev toga što stabilizira tercijarnu strukturu ostvaruje i interakcije s velikom podjedinicom ribosoma.⁵ Varijabilna ruka osim stabilizacijske uloge koju dijeli s D i T ψ C rukama, ostvaruje i interakcije s aminoacil-tRNA-sintetazom (aaRS). Građena je od 3 do 21 nukleotida i omče veličine do 7 baza. Na 5' kraju nalazi se akceptorska peteljka koju karakterizira jako konzervirani CCA kraj na čiji se adozin (A76), odnosno 2' ili 3' hidroksilnu skupinu njegove riboze kovalentno veže pripadna aminokiselina.³



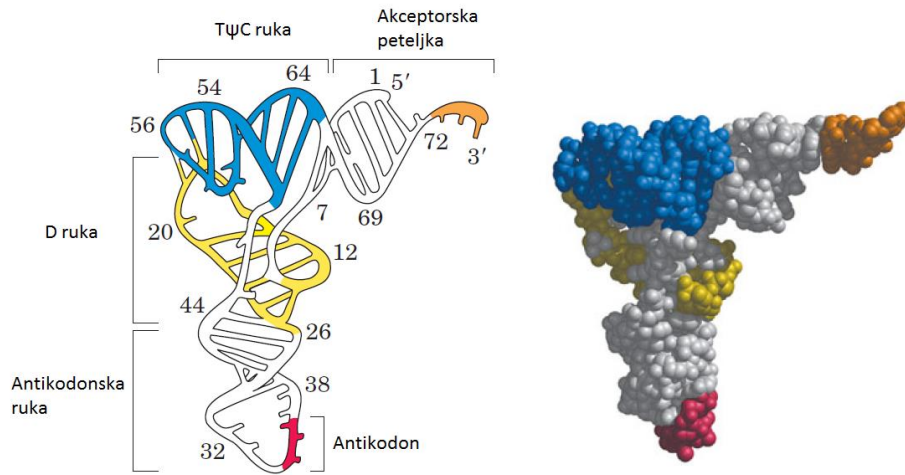
Slika 2.4. Molekula tRNA prikazana modelom djeteline. Obojane baze povezane točkama predstavljaju Watson-Crickove parove baza. Jednoslovnim i dvoslovnom kraticom označene su konzervirane baze. Preuzeto i prilagođeno iz Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L. (2012).³



Slika 2.5. Numeracija nukleotida u molekuli tRNA. Kružićima su označeni nukleotidi koji se uvijek nalaze u molekuli tRNA. Ovalno su označeni nukleotidi koji nisu prisutni u svim strukturama. Podebljanim kružićima označene su pozicije na kojima se nalaze jako očuvani nukleotidi. Preuzeto iz Sprinzl i sur. (1998).²⁴

Na slici 2.6. prikazana je tercijarna struktura molekule tRNA. Kao što je sekundarno specifičan oblik djeteline, tercijarnoj je to oblik slova L.²⁵ Jednu granu čine TψC ruka i akceptorska peteljka, a drugu D i antikodonska ruka. Ovakav prostorni raspored smješta akceptorsku peteljku, na koju se veže aminokiselina, i antikodonsku ruku, koje ostvaruju veliki

broj interakcija s aaRS na suprotne krajeve. Takav raspored je povoljan jer akceptorska peteljka ostvaruje univerzalne, a antikodonska ruka specifične interakcije. Stabilnost tercijarne strukture ostvarena je vodikovim vezama među bazama i okomitim (eng. *stacking*) interakcijama.³



Slika 2.6. Tercijarna struktura tRNA^{Phe}. Preuzeto i prilagođeno Nelson D. L., Cox M. M. (2008).⁴

2.3. Aminoacil-tRNA-sintetaze

2.3.1. Podjela aminoacil-tRNA-sintetaza

Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) su enzimi koji kataliziraju nastajanje kovalentne veze između tRNA i pripadne aminokiseline. Jedna aaRS prepoznaje jednu aminokiselinu i jednu ili više izoakceptorskih tRNA. Enzimi aaRS dijele se u dva razreda, a podjela se temelji na strukturnim i mehanističkim razlikama (tablica 2.1).^{26,27} Unutar razreda one su podijeljene u tri podrazreda (a, b i c) prema kemijskoj sličnosti aminokiselinskih supstrata.²⁷ Lizil-tRNA-sintetaza (LysRS) nalazi se u oba razreda što je posljedica činjenice da LysRS iz većine arheja i nekih bakterija više odgovara razredu I, dok ostale pripadaju razredu II.²⁸

Tablica 2.1. Podjela aminoacil-tRNA-sintetaza u dva razreda.

Razred I			Razred II			
Podrazred	Enzim	Kvaternarna struktura	Podrazred	Enzim	Kvaternarna struktura	
IA	IleRS	α	IIA	GlyRS	α_2	
	LeuRS	α		HisRS	α_2	
	MetRS	α, α_2		ProRS	α_2	
	ValRS	α		SerRS	α_2	
IB	CysRS	α, α_2		ThrRS	α_2	
	GlnRS	α				
	GluRS	α				
IC	TrpRS	α_2		IIB	AsnRS	α_2
	TyrRS	α_2			AspRS	α_2
					LysRS	α_2
ID	ArgRS	α	IIC	AlaRS	α_2, α^m	
IE	LysRS	α		PheRS	$(\alpha\beta)_2, \alpha$	
				PylRS	α_2	
				SepRS	α_4	
			TrpRS	α_2		

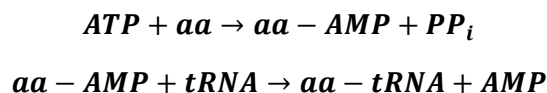
AaRS koje pripadaju razredu I u blizini ili na samom N-kraju sadrže Rossmannovu strukturu, to jest peteročlanu paralelnu β -ploču povezanu α -zavojnica.^{1,29} To je dobro poznati strukturni motiv koji služi vezanju nukleotida, najčešće ATP ili NAD⁺. Samo vezanje ATP-a ostvaruje se preko dva očuvana aminokiselinska slijeda, KMSKS i HIGH, pri čemu se ATP veže u izduženoj konformaciji.^{1,29} Kod svih aaRS razreda I unutar slijeda Rossmannove strukture umetnuta je CP1 (eng. *Connective peptide 1*) domena, koja je kod onih aaRS koje pokazuju sposobnost popravka pogreške nakon prijenosa izrazito povećana (vidi kasnije).^{1,29} Rosmannova struktura veže akceptorsku peteljku tRNA sa strane malog utora, a sama peteljka se oblikuje u strukturu ukosnice. C-terminalni dio aaRS razreda I posjeduje znatno manje očuvanu primarnu i terciarnu strukturu, a uglavnom služi vezanju antikodonske ruke. Svi enzimi ovog razreda su monomeri, izuzev TrpRS i TyrRS koji su dimeri.^{1,29}

AaRS razreda II opisane su s tri vrlo očuvana motiva: 1, 2 i 3.^{1,29} Motiv 1 građen je od duge α -zavojnice kojoj je uloga ostvarivanje interakcija među dvama podjedinicama dimera

koje aaRS razreda II uglavnom stvaraju.^{1,29} Motivi 2 i 3 bitni su za ostvarivanje interakcija sa supstratom, a dio su para paralelnih β -lanaca povezanih omčom. Zadaća motiva 2 je vezanje ATP-a, aminokiseline i tRNA čiju akceptorsku peteljku, za razliku od aaRS razreda I, veže sa strane velikog utora. Motiv 3, baš kao i motivi KMSKS i HIGH, služi vezanju ATP-a koji zauzima savinutu konformaciju.^{1,29}

2.3.2. Mehanizam reakcije aminoacilacije

Reakcija aminoacilacije odvija se u dva koraka (slika 2.7), a to su aktivacija aminokiseline i njen prijenos na tRNA. U prvom koraku reaktanti su aminokiselina i ATP, pri čemu α -karboksilni kisikov atom aminokiseline napada α -fosfor ATP-a. Mehanizam reakcije je bimolekulska nukleofilna supstitucija koja rezultira nastajanjem aminoacil-adenilata (aa-AMP) i pirofosfata (PP_i).² GlnRS, GluRS, ArgRS i LysRS-I za aktivaciju zahtijevaju prisutnost tRNA što ih čini ribonukleoproteinima čija se enzimaska aktivnost nalazi u proteinskom dijelu kompleksa.¹ Aktivirana aminokiselina spremna je za prijenos na tRNA, a reakcija se odvija na način da 2' ili 3' hidroksilna skupina riboze adenzina (A76), koji se nalazi na 3' kraju tRNA, nukleofilno napada karbonilni ugljikov atom aminoacil-adenilata rezultirajući nastajanjem aminoacilirane tRNA (aa-tRNA) i AMP-a. Cijeli proces energetski je povoljan među ostalim jer oslobođeni pirofosfat biva hidroliziran uz pomoć anorganske pirofosfataze.¹



Slika 2.7. Dva koraka reakcije aminoacilacije koju kataliziraju aminoacil-tRNA-sintetaze.

Iako ukupno gledajući aaRS kataliziraju istu reakciju u identična dva koraka, iz strukturnih proizlaze i neke mehanističke razlike. Tako aaRS razreda I prenose aminokiselinu na 2'OH dok je one razreda II prenose na 3'OH skupinu riboze A76. Valja naglasiti kako aminoacil-tRNA (aa-tRNA) jednom kada se nađe u otopini prenosi aminokiselinu s 2' na 3'OH skupinu.³⁰ To se događa iz razloga što je isključivo tRNA aminoacilirana na 3'OH supstrat peptidil-transferazne aktivnosti ribosoma. Druge mehanističke razlike očituju se u samoj kinetici reakcijskih događaja. Naime, najsporiji korak, odnosno korak koji ograničava ukupnu brzinu reakcije kod aaRS razreda I je otpuštanje aminoacilirane-tRNA u otopinu, a kod aaRS razreda II ograničavajući korak vjerojatno je aktivacija aminokiseline.³¹

2.3.3. Interakcija aminoacil-tRNA sintetaza i tRNA

U prethodnim poglavljima objašnjeno je kako aaRS veže akceptorsku peteljku tRNA, a zaključeno je kako način vezanja ovisi o razredu kojem enzim pripada. Nadalje, možemo se pitati na koji način aaRS prepoznaje pripadnu tRNA. To prepoznavanje je od ključne važnosti

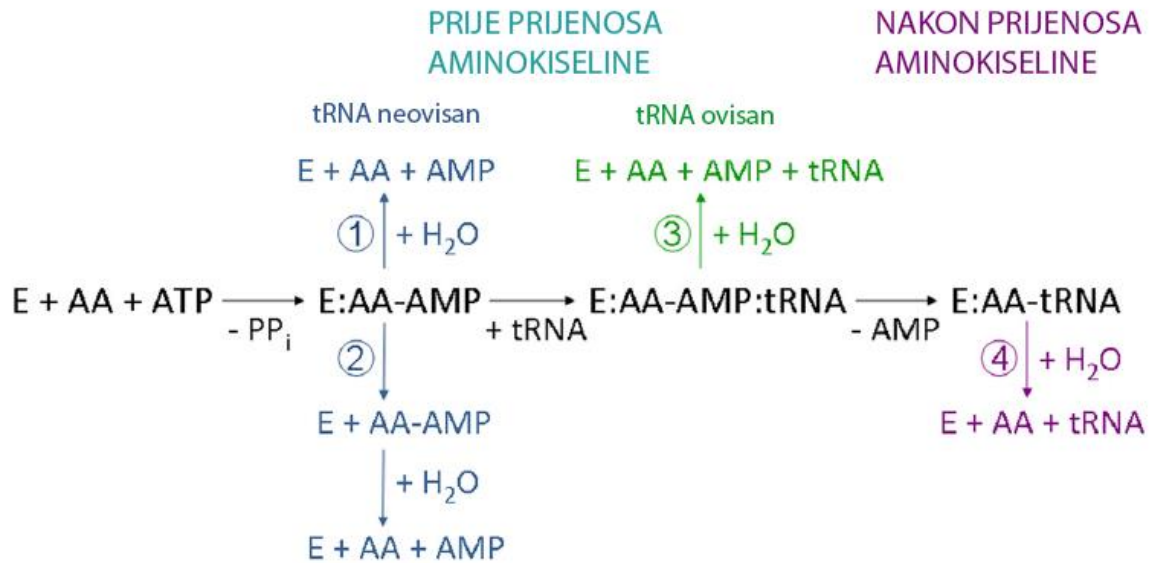
u očuvanju točnosti biosinteze proteina. Za vezanje odgovarajuće tRNA na aaRS zaslužni su elementi identiteta, pozitivni i negativni.³² Naime, pozitivni elementi identiteta su svi strukturni elementi koji doprinose nastajanju stabilnog kompleksa pripadne tRNA:aaRS. Iz razloga što su aaRS i tRNA usporedive veličine, broj povoljnih interakcija u takvom kompleksu je velik.³² Kako bi se točnost prepoznavanja povećala postoje i negativni elementi identiteta koji onemogućavaju stabilno vezanje nepripadne tRNA i aaRS.³³ Elementi identiteta najčešće su antikodonska ruka, varijabilna ruka, diskriminacijska baza (baza na poziciji 73) i drugi. Varijabilna ruka je element identiteta u slučajevima kada je aminokiselina kodirana s većim brojem kodona. Upravo na temelju duljine varijabilne ruke molekule tRNA moguće je podijeliti u dvije skupine. Tip 1 predstavljaju tRNA s kratkom varijabilnom rukom, 4 ili 5 nukleotida, a tip 2 one s dugom varijabilnom rukom, obično duljine od 13 do 21 nukleotida.³² Primjeri tipa 2 koje pronalazimo u svim domenama života su tRNA^{Ser} i tRNA^{Leu}. Pripadnost pojedinoj skupini nekih tRNA ovisi o tome iz kojeg organizma potječe. Na primjer, tRNA^{Tyr} iz *E. coli* pripada tipu 2 dok se ona iz prokariota svrstava u tip 1. Općenito, preko elemenata identiteta molekula tRNA biva kinetički diskriminirana.³⁴ Naime, kod takvog tipa diskriminacije najveći efekt odražava se preko utjecaja na brzinu kemijske reakcije, a ne preko afiniteta enzima za molekulu tRNA.

2.3.4. Mehanizmi popravka pogreške u reakciji aminoacilacije

Za uspješan prijenos genetičke informacije potrebna je velika točnost procesa koji u njoj sudjeluju. Dakle, točnost s kojom aaRS prepoznaju svoje supstrate je od velike važnosti. U prethodnom poglavlju objašnjeno je koje su interakcije odgovorne za pravilno prepoznavanje pripadne tRNA. No, i bez mnogo kemijskog znanja, intuitivno se nameće zaključak kako je prepoznavanje pripadne aminokiseline znatno zahtjevniji posao. Ponajviše iz razloga što su aminokiseline oko dva reda veličine manje od tRNA. Pa kako ih onda aaRS prepoznaju i diskriminiraju? Najčešće temelj diskriminacije proizlazi iz njihovih kemijskih i strukturnih svojstava. No, postavlja se pitanje što s vrlo sličnim aminokiselinama, poput izoleucina i valina. Razlika u jednoj metilenskoj skupini čini ih gotovo identičnima, a to pred aaRS stavlja vrlo težak zadatak. Stoga ne čudi kako su one pred koje je stavljen takav problem razvile mehanizme koji im omogućavaju popravak pogreške. Deset ih je koje su evolucijski razvile takvu aktivnost, a to su: AlaRS, LeuRS, IleRS, ValRS, MetRS, SerRS, ThrRS, ProRS, PheRS i LysRS-II.³⁵

S kemijske strane, popravak pogreške temelji se na hidrolizi kovalentne veze između aminokiseline i AMP-a, odnosno tRNA. Ovisno o tome koja se veza i gdje hidrolizira, o prisustvu tRNA i drugim faktorima, razlikujemo nekoliko mehanizama popravka pogreške

(slika 2.8).³⁶ Ukoliko je tRNA aminoacilirana pogrešnom aminokiselinom govorimo o popravku nakon prijenosa aminokiseline, koji se kod LeuRS, izoleucil-tRNA-sintetaze (IleRS) i valil-tRNA-sintetaze (ValRS) zbiva u CP1 domeni. Aktivno mjesto CP1 domene nalazi se oko 30 Å od sintetskog mjesta, a nakon misacilacije se 3' kraj tRNA translocira i pozicionira aminokiselinu u mjesto za popravak pogreške.¹¹ Ako je aminokiselina aktivirana, odnosno nastao je aa-AMP, ali ona nije prenesena na tRNA radi se o popravku pogreške prije prijenosa aminokiseline. Neenzimski tip popravka pogreške prije prijenosa temelji se na otpuštanju aa-AMP u otopinu i njegovoj neenzimskoj hidrolizi. Popravak pogreške prije prijenosa može biti i enzimski ako se odvija na aaRS, a tada razlikujemo tRNA-neovisan i tRNA-ovisan popravak. Razlika je u tome što u prvom slučaju tRNA ne stimulira, a u drugom stimulira hidrolitičku aktivnost enzima. Općenito, popravak pogreške prije prijenosa je vrlo slab te je onaj nakon prijenosa taj kojim se većina popravka zapravo odvija. Doduše, vrijedi spomenuti IleRS kao primjer kod kojeg tRNA-ovisan popravak pogreške prije prijenosa doprinosi do 30 % ukupnom popravku pogreške.⁹ Molekula tRNA u tRNA-ovisnom popravku ne sudjeluje s pomoću hidroksilnih skupina na njenom 3' kraju, već ostatak strukture utječe na konformacijsku promjenu sintetskog aktivnog mjesta koje zatim biva optimizirano za hidrolizu aminoacil-adenilata.³⁷ Osim toga, prisutnost tRNA u slučaju IleRS povećava K_m vrijednosti 10 puta prema pripadnoj (Ile) i nepripadnoj (Val) aminokiselini te na taj način smanjuje učestalost misaktivacije

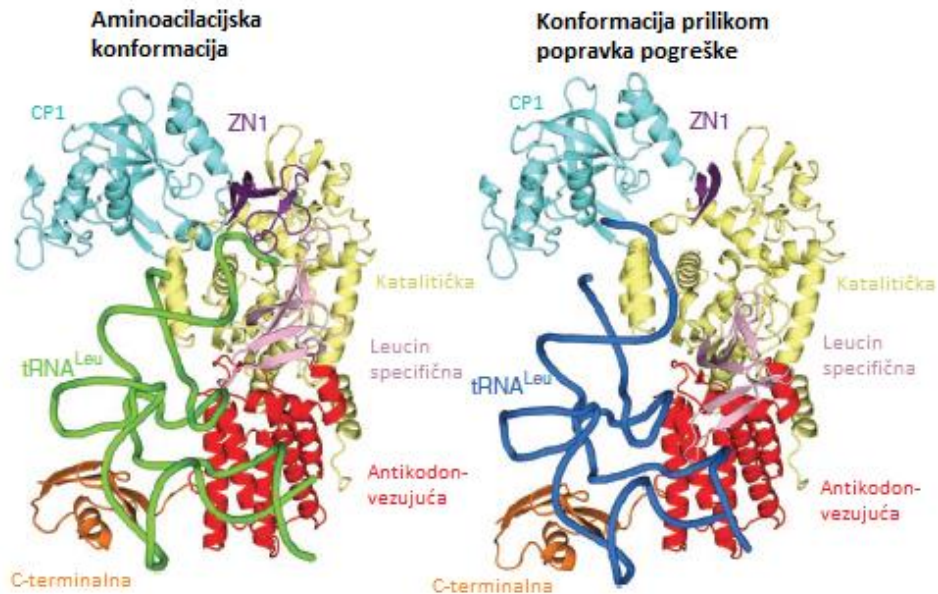


Slika 2.8. Shematski prikaz mehanizama popravka pogreške reakcije aminoaciliranja. Popravak pogreške prije prijenosa može se odvijati enzimskom hidrolizom nepripadnog aminoacil-adenilata u aktivnom mjestu u odsustvu (1) ili prisustvu tRNA (3). Također, može se odvijati u otopini nakon disocijacije nepripadnog aminoacil-adenilata (2). Misacilirana tRNA hidrolizira se mehanizmom popravka pogreške nakon prijenosa aminokiseline (4). Crne strelice predstavljaju reakcijski put u slučaju pripadne aminokiseline. Preuzeto i prilagođeno iz Dulić i sur. 2010.³⁶

2.4. Leucil-tRNA-sintetaza

2.4.1. Strukturni elementi leucil-tRNA-sintetaze

Leucil-tRNA-sintetaza (LeuRS) pripada razredu Ia aminoacil-tRNA-sintetaza (aaRS), a katalizira aminoacilaciju izoacceptorskih tRNA^{Leu} leucinom. Nalazi se u obliku monomera, a strukturno je slična ostalim pripadnicima Ia razreda, poput IleRS i ValRS čiji su glavni strukturni elementi Rossmannova struktura koja čini katalitičku domenu i antikodon-vezujuća domena karakteristična za Ia razred. Nadalje, karakteristična su još četiri elementa: cink-vezujuća (ZN1), CP1, leucin-specifična (LSD) i C-terminalna domena. Valja naglasiti kako zbog mogućnosti popravka pogreške nakon prijenosa kompleks LeuRS:tRNA ima dvije konformacije – aminoacilacijska konformacija i konformacija prilikom popravka pogreške (slika 2.9).³⁸



Slika 2.9. Struktura LeuRS:tRNA^{Leu} kompleksa iz *E. coli* u aminoacilacijskoj konformaciji (lijevo) i konformaciji prilikom popravka pogreške nakon prijenosa aminokiseline (desno). Molekule tRNA^{Leu} su prikazane zelenom, odnosno plavom bojom. Domene LeuRS označene su: svijetlo plavo – CP1, žuto – katalitička, rozo – leucin specifična, ljubičasto – ZN1, crveno – antikodon-vezujuća i narančasto – C-terminalna. Preuzeto i prilagođeno iz Palencia i sur 2012.³⁹

Sintetsko aktivno mjesto LeuRS može se nalaziti u tri konformacije: otvorena, poluotvorena i zatvorena.³⁹ Otvorena konformacija tipična je za slučaj kada u aktivnom mjestu nema supstrata, a 3' kraj tRNA usmjeren je u CP1 domenu. Poluotvorena konformacija primjećena je kada se u aktivnom mjestu nalazi 5'-O-[N-(leucil)-sulfamoi]adenozin (Leu-AMS) analog leucil-adenilata, a na enzim nije vezana tRNA. Kada su na enzim vezani aminoacil-adenilat i tRNA radi se o zatvorenoj konformaciji. Navedene konformacije definirane su položajem očuvanog KMSKS motiva. U Rossmannovu strukturu umetnuta je ZN1 domena u kojoj je cink koordiniran s četiri aminokiselinska ogranka te ima strukturu ulogu.³⁸ LeuRS iz *T. thermophilus*, za razliku od one iz *E. coli*, sadrži još jednu cink-vezujuću domenu (ZN2), u kojoj je uloga cinka također strukturalna. Spomenutom KMSKS motivu prethodi leucin-specifična domena karakteristična za prokariotske LeuRS koja je građena od pet β -ploča i dvije α -zavojnice, a smještena je na ulazu u aktivno mjesto.³⁸ Iako njena funkcija nije posve razjašnjena poznato je kako njena delecija uzrokuje gubitak aminoacilacijske aktivnosti.⁴⁰ S obzirom na spregu s KMSKS motivom pretpostavlja se kako nedostatak LSD vodi k njegovoj prevelikoj fleksibilnosti što ima negativan utjecaj na aminoacilaciju. Antikodon-vezujuća domena građena je od šest α -zavojnica, a kod aaRS razreda Ia obično ostvaruje interakcije s antikodonom tRNA. Doduše, kod LeuRS to nije slučaj, što je vjerojatno

direktna posljedica činjenice da aminokiselinu leucin kodira šest kodona te je pet izoakceptorskih tRNA prisutno u stanici: tRNA^{Leu}_{CAG}, tRNA^{Leu}_{CAA}, tRNA^{Leu}_{GAG}, tRNA^{Leu}_{UAG} i tRNA^{Leu}_{UAA}. C-terminalna domena velika je oko 60 aminokiselina koje grade β -ploče i α -zavojnice, a uloga joj je ostvarivanje specifičnosti prema tRNA i stabilizacija tRNA^{Leu}.⁴¹ Pokazano je kako njena delecija narušava aminoacilacijsku sposobnost LeuRS.⁴²

U aminokiselinski slijed koji prethodi ZN1 domeni umetnuta je domena za popravak pogreške (CP1 domena) čija je glavna uloga hidroliza pogrešno aminoacilirane tRNA^{Leu} (popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline na tRNA).^{38,39} U arhejskim i citosolnim eukariotskim LeuRS umetnuta je u sam slijed ZN1 domene.³⁸ Građena je u obliku β -bačve, a s ostatkom LeuRS povezana je dvama β -poveznicama. Iako ne postoji konsenzus oko točne granice poveznica, eksperimentalno je potvrđeno kako izolirana CP1 domena bez poveznica ne može hidrolizirati misaciliranu tRNA.^{43,44} Kristalna struktura LeuRS:tRNA^{Leu} kompleksa iz *T. thermophilus* sugerira kako β -poveznice interagiraju s jednolančanim dijelom 3' kraja tRNA.⁴³ Osim toga, njihova velika fleksibilnost omogućava pomicanje CP1 domene prilikom prelaska iz jedne konformacije u drugu.³⁹

2.4.2. Interakcije leucil-tRNA-sintetaze i aa-tRNA^{Leu}

S obzirom na to da prilikom popravka pogreške nakon prijenosa aminokiseline dolazi do translokacije 3' kraja tRNA iz sintetskog u aktivno mjesto CP1 domene, kompleks se može nalaziti u dvije konformacije koje se razlikuju u određenim interakcijama. Aminoacilacijska konformacija stabilizirana je s većim brojem interakcija (slika 2.10).^{39,41} Razlika u broju interakcija uglavnom potječe od baza 69-76, a evolucijski očuvana diskriminatorna baza A73, koja je jedan od glavnih elemenata identiteta tRNA^{Leu}, u konformaciji koja se ostvaruje prilikom popravka pogreške ne ostvaruje interakcije s enzimom.^{39,41,45} Domena ZN1 u aminoacilacijskom kompleksu je uređena i ostvaruje interakcije s CP1 domenom i tRNA dok je u konformaciji koja se ostvaruje prilikom popravka pogreške neuređena.³⁹ Leucin specifična domena u aminoacilacijskoj konformaciji ostvaruje više interakcija nego prilikom popravka pogreške.³⁹ Kao što je spomenuto u prethodnom poglavlju prepoznavanje tRNA ne ostvaruje se preko antikodonske omče, a to vrijedi za obje konformacije.^{39,45} C-terminalni kraj enzima i varijabilna ruka, koja je element identiteta tRNA^{Leu} ostvaruju stabilne interakcije u oba stanja.³⁹ Još jedan univerzalni element identiteta, specifičan za većinu bakterija, je baza U16 koja u obje konformacije sudjeluje u ostvarivanju direktnih i vodom posredovanih interakcija s K/DD/RR motivom.³⁹

uzgoja bakterija.¹⁶ Iz navedenih razloga moguće je pretpostaviti kako je mehanizam popravka pogreške optimiziran za hidrolizu tRNA^{Leu} misaminoacilirane norvalinom.

2.4.4. Popravak pogreške reakcije aminoaciliranja

Gotovo sav popravak misaminoacilirane tRNA^{Leu} kod LeuRS iz *E. coli* odvija se mehanizmom popravka pogreške nakon prijenosa i to u zasebnoj CP1 domeni čije je aktivno mjesto regija bogata treoninima (T247 T248 R249 P250 D251 i T252).¹⁰ Nadalje, popravak pogreške nakon prijenosa ovisi o kinetičkoj razdiobi između hidrolize i disocijacije misaminoacilirane tRNA, s time da disocirana aa-tRNA ima mogućnost ponovnog vezanja kako bi bila hidrolizirana.¹⁰ Uspoređujući Leu-tRNA^{Leu} i Nva-tRNA^{Leu}, procijenjene brzine njihove disocijacije su 4,9 s⁻¹ i 1,5 s⁻¹, a brzine hidrolize 0,098 s⁻¹, to jest 310 s⁻¹.¹⁰ Što se tiče ukupne brzine reakcije popravka pogreške, ona je ograničena disocijacijom produkata ili konformacijskom promjenom koja joj prethodi.¹⁰ Prethodno su navedene brzine hidrolize pripadnog leucina i nepripadnog norvalina, a valja napomenuti kako se hidrolizirati može i izoleucin što se odvija brzinom od 40 s⁻¹ iz čega se može zaključiti kako je norvalin znatno bolji supstrat u toj reakciji.¹⁰

Točnost aminoaciliranja aaRS koje imaju mogućnost popravka pogreške Fersht je opisao modelom dvostrukog sita.¹⁷ Prema tom modelu sintetsko aktivno mjesto je prvo i grublje sito koje može aktivirati i prenositi na tRNA pripadnu aminokiselinu i sve one koje su manje od nje. Drugo sito je aktivno mjesto za popravak pogreške koje je finije, a kroz njega mogu proći i biti hidrolizirane sve aminokiseline koje su manje od pripadne. Dakle, ovaj model sugerira kako se tRNA aminoacilirana pripadnom aminokiselinom, odnosno njen 3' kraj ne može vezati u aktivno mjesto domene za popravak pogreške. Prethodno navedeni kinetički podaci o deacilacijskoj sposobnosti LeuRS pokazuju kako se u CP1 domeni hidrolizira i Leu-tRNA^{Leu}, što upućuje na to da se ona ipak veže u njeno aktivno mjesto. Kao nadopuna kinetičkim mjerenjima primijenjene su i termodinamičke metode kako bi se odredile K_d vrijednosti. Ustanovljeno je kako nema značajne razlike u afinitetu za analoge supstrata 2'-(L-norvalil)amino-2'-deoksiadenozina (Nva2AA) i 2'-(L-leucil)amino-2'-deoksiadenozina (Leu2AA) niti za potpune supstrate Leu- i Nva-tRNA^{Leu} (neobjavljeni rezultati grupe I. Gruić-Sovolj). Dakle, nameće se zaključak kako glavna razlika proizlazi iz brzine deacilacije koja je 10³ puta već u slučaju norvalina u odnosu na leucin.

Kako bi se utvrdile uloge određenih kemijskih skupina koje se nalaze u aktivnom mjestu praćena je kinetika deacilacije u uvjetima jednog kruga mutanata koji mogu odgovoriti na ta pitanja. Zaključeno je kako T252A mutacija omogućava deacilaciju Leu-tRNA^{Leu}, dok D345A mutacija potpuno gasi deacilacijsku sposobnost enzima,¹⁰ baš kao što se to zbiva u slučaju kada

je supstratu uklonjena 3'OH skupina riboze terminalnog A76 (neobjavljeni rezultati grupe I. Gruić-Sovulj). Iz kinetičkih i kristalografskih podataka pretpostavljeno je kako D345 radi ionski most s amino skupinom supstrata te na taj način pozicionira karbonilni ugljikov atom koji će biti napadnut od strane nukleofilne vode. Grupa S. Martinis mjerila je deacilacijsku sposobnost T252V i T252S mutanata te ustanovila kako T252V mutant zadržava sposobnost diskriminacije Leu-tRNA^{Leu}, a T252S je gubi.¹⁸ Doduše, ti pokusi su rađeni u uvjetima ustaljenog stanja, a oni nisu prikladni za ovakva mjerenja iz razloga što su kinetički podaci koji iz njih proizlaze odraz najsporiye reakcije u mehanizmu.¹⁰ Kao što je navedeno, to je disocijacija produkta ili konformacijska promjena koja joj prethodi, a ne nužno sama brzina deacilacije aa-tRNA^{Leu}.

2.4.5. Simulacije molekularne dinamike leucil-tRNA-sintetaze

Dosadašnja istraživanja leucil-tRNA sintetaze koja su uključivala simulacije molekularne dinamike uglavnom su vršene na strukturi LeuRS iz *T. thermophilus* ili *E. coli* dobivenoj homolognim modeliranjem iz prethodno navedene strukture što zasigurno nije najbolji odraz LeuRS iz *E. coli*. Koristeći jednu i drugu strukturu Lee i Briggs su smještanjem leucina prepoznali dva mjesta CP1 domene u koja se on može pozicionirati.⁴⁶ Za jedno od tih mjesta danas znamo kako je aktivno mjesto za popravak pogreške poslije prijenosa. Tada su pretpostavili i prepoznali značajne aminokiseline unutar i oko aktivnog mjesta: T247, T248, T252, M336, D342 i D345 te interakcije koje one ostvaruju sa supstratom. Dvije grupe su na strukturi iz *T. thermophilus* problemu mehanizma reakcije popravka pogreške poslije prijenosa pristupile koristeći hibridne QM/MM metode te su pokazale kako je LeuRS:tRNA zapravo ribonukleoproteinski kompleks koji katalizira reakciju uz pomoć molekule vode koordinirane od strane 3'OH skupine riboze supstrata. Voda biva deprotonirana i kao nastali nukleofil napada vezu između karbonilnog ugljika i kisika na 2' položaju.^{47,48} Predložena su dva mehanizma reakcije koja se razlikuju u načinu deprotonacije vode te je zaključeno kako neovisno o slobodi rotacije 3'OH skupine ona uvijek može koordinirati vodu, kisikom ili vodikom.⁴⁷ Hagiwara i autori pretpostavili su produktivnu konformaciju u kojoj 3'OH skupina ostvaruje vodikovu vezu s T248, a vodu koordinira kisikom što je približava karbonilnom ugljiku.⁴⁹ Također, zaključuju i kako se diskriminacija pravilno aminoacilirane tRNA, odnosno Leu-tRNA^{Leu} temelji na steričkim smetnjama između leucinskog dijela supstrata i T252. Valja naglasiti kako su u svojim istraživanjima koristili valil-2'-adenozin kao supstrat, dok je zapravo norvalin najveća prijetnja pogrešnoj aminoacilaciji.^{8,10} Osim njih i grupa S. Martinis pokušala je računalnim simulacijama odgonetnuti prirodu diskriminacije Leu-tRNA^{Leu} u domeni za popravak pogreške, a dolaze do zaključaka kako je diskriminacija treoninom na poziciji 252 ostvarena na temelju održavanja

strukture aktivnog mjesta hidroksilnom skupinom i steričkim smetnjama između metilne skupine treonina i Leu-tRNA^{Leu}.¹⁸ Također, pretpostavljaju kako, u odnosu na WT mutant T252V smanjuje aktivno mjesto čime podupiru njegovu diskriminacijsku sposobnost, dok T252S omogućava deacilaciju jer ga povećava.¹⁸ U konačnici, Lee i suradnici također pretpostavljaju kako se diskriminacija odvija na temelju steričkih smetnji, odnosno zaključuju kako aktivno mjesto koje sadrži treonin na poziciji 252 nema dovoljno prostora kako bi se omogućilo vezanje leucina.⁵⁰

S obzirom da trenutno ne postoji suglasje oko prirode diskriminacije supstrata u aktivnom mjestu domene za popravak pogreške LeuRS odlučili smo simulirati MD nekoliko različitih sustava kako bismo dobili odgovor na to pitanje. K tome, budući da smatramo da trenutna kinetička mjerenja nisu dostatna da objasne kemijsku pozadinu te diskriminacije, u sklopu ovog rada započet ćemo sa sveobuhvatnim kinetičkim istraživanjima u nadi da ćemo uspjeti razjasniti tu problematiku.

2.5. Usporedba mehanizama specifičnosti prema supstratu enzima koji imaju sposobnost popravka pogreške

Aminoacil-tRNA-sintetaze nisu jedini enzimi koji zahtijevaju visoku specifičnost svojih reakcija. Jedni od takvih enzima su i DNA-polimeraze koje sudjeluju u procesu replikacije DNA sintetizirajući komplementarni lanac.³⁻⁵ Dakle, uloga DNA-polimeraza je prepoznati i vezati pripadni nukleotid te katalizirati nastajanje fosfodiesterske veze. S obzirom na to da se DNA prenosi s generacije na generaciju možemo reći kako je točnost procesa DNA-polimeraze još od veće važnosti nego što je to u slučaju aaRS.

Specifičnost prema supstratu osim kinetički može se ostvarivati i na temelju vezne energije.⁸ DNA-polimeraze i aaRS koje efikasno diskriminiraju nepripadne aminokiseline u sintetskom aktivnom mjestu specifičnost ostvaruju tako što se prilikom vezanja supstrata ne ostvaruje dovoljna energija za pravilno smještanje istog niti za stabilizaciju prijelaznog stanja. U suprotnosti s DNA-polimerazama, neke aaRS u sintetskom aktivnom mjestu ne diskriminiraju efikasno nepripadne aminokiseline koje slične pripadnoj te one imaju potrebu za popravkom pogreške.³⁶ Za razliku od takvih aaRS, DNA-polimeraze većinu specifičnosti ostvaruju u sintetskom aktivnom mjestu.⁵¹ Kako bi se specifičnost sintetskog mjesta DNA-polimeraze mogla bolje razumjeti, valja napomenuti da nakon vezanja nukleotida dolazi do konformacijske promjene u enzimu koja omogućuje njegovu ugradnju u rastući polinukleotidni lanac (mehanizam induciranog pristajanja).^{52,53} U slučaju kada se na enzim veže nepripadni nukleotid, brzina povratne konformacijske promjene se povećava otprilike 300 puta, a brzina

ugradnje nukleotida se smanjuje otprilike 1000 puta.⁵² Kombinacija ova dva efekta znatno pogoduje disocijaciji nepripadnog nukleotida.

Unatoč visokoj specifičnosti sintetskog aktivnog mjesta, neke DNA-polimeraze posjeduju i domenu za popravak pogreške, egzonukleaznu domenu. Ta domena pred sobom ima zadatak diskriminirati pravilno od nepravilno sparenog baznog para u rastućem lancu DNA. U ovom slučaju diskriminacija se odvija na temelju kinetičke razdiobe između translokacije DNA u domenu za popravak pogreške i nastavka polimerizacije.⁵⁴ S obzirom na to da se nakon ugradnje nepripadnog nukleotida brzina polimerizacije smanjuje, dolazi do favoriziranja translokacije, a samim time i popravka pogreške.⁵⁵ Prilikom ugradnje pripadnog nukleotida favorizira se polimerizacija i ne dolazi do hidrolize fosfodieterske veze. Samo aktivno mjesto domene za popravak pogreške nije jako specifično prema pripadnom, odnosno nepripadnom supstratu. U suprotnosti s DNA-polimerazama, aaRS kod kojih mjesto za popravak pogreške ostvaruje visoku specifičnost prema supstratu koji zahtjeva popravak u usporedbi s onim koji ne zahtjeva. Primjerice, leucil-tRNA-sintetaza katalizira hidrolizu Leu-tRNA^{Leu} 1000 puta sporije nego hidrolizu nepripadno aminoacilirane tRNA.¹⁰

2.6. Molekularna dinamika

Unatoč napretku eksperimentalnih tehnika s modernom tehnologijom, kemičari i dalje ostaju zakinuti za tehnike koje bi im omogućile direktno opažanje događaja na molekularnoj razini. Bez takvih opažanja nemoguće je u potpunosti razumjeti zbivanja među samim atomima i molekulama, stoga ne čudi da molekularna dinamika postaje sve prihvaćenija i poželjnija tehnika u kemijskim laboratorijima. Naime, sam termin molekularna dinamika (MD) podrazumijeva računalne tehnike koje predviđaju gibanje atoma u nekom sustavu.^{56,57} Izračuni proizlaze iz Newtonove klasične mehanike računajući potencijalnu energiju svakog pojedinog atoma u sustavu.^{56,57} Energija se računa za svaki, unaprijed određeni, vremenski korak te kao rezultat dobivamo razvoj struktura u vremenu, odnosno trajektoriju.^{56,57} Prema ergotskoj hipotezi, ukoliko simuliramo molekularnom dinamikom dovoljno dugo, opaziti ćemo sve konformacije zastupljene u sustavu s velikim brojem istovrsnih molekula.^{56,57} Opažanja koja proizlaze iz analize trajektorije bitno je povezati s eksperimentalnim rezultatima te na taj način dobivamo najpotpunije razumijevanje proučavanog sustava. Osim za potpuniju interpretaciju eksperimentalnih rezultata MD je moguće koristiti i za planiranje eksperimenata, smanjenje njihovog broja i sl.

Svaka MD simulacija kreće od statične 3D strukture, a u slučaju bioloških makromolekula ona je najčešće dobivena difrakcijom rentgenskog zračenja, NMR-om ili

homolognim modeliranjem. Jednom kada imamo strukturu sustava koji želimo simulirati, na njega primjenjujemo polje sila. Ono označava skup parametara i jednadžbi koje na temelju geometrije sustava svakoj njegovoj čestici pridružuje potencijalnu energiju.^{56,57} Dva glavna doprinosa ukupnoj energiji sustava su vezni i nevezni:

$$E = E_{vezna} + E_{nevezna}$$

Vezni doprinos moguće je razlučiti na:

$$E_{vezna} = E_{veza} + E_{kut} + E_{torzija}$$

gdje prvi član predstavlja energiju ovisnu o istezanju veze, a drugi član energiju ovisnu o kutu između dvije veze.^{56,57} Oba člana opisuju se jednadžbom harmoničnog oscilatora. Posljednji član predstavlja energiju ovisnu o torzijskom kutu koja je posljedica rotacije oko jednostruke veze.^{56,57}

Nevezne interakcije raspisuju se na sljedeći način:

$$E_{nevezna} = E_{el} + E_{vdW}$$

gdje prvi član predstavlja energiju koja je posljedica elektrostatskih interakcija i opisuje se Coulombovim zakonom, a drugi član je energija uzrokovana van der Waalsovima interakcijama i opisuje se Lennard-Jonesovim potencijalom.^{56,57} Ovisno o svrsi i programu koji se koristi primjenjuju se različita polja sila, a razlikuju se u parametrima i obliku jednadžbi. Razlikujemo opća i specijalizirana polja sila. Opća sadrže parametre koji opisuju velik broj tipova atoma, dok specijalizirana polja sila opisuju neke određene skupove poput organskih ili pak bioloških molekula. Najpoznatija polja sila za biološke makromolekule su: AMBER, CHARMM, GROMOS i OPLS.⁵⁷

Postoji niz parametara koje je potrebno definirati pri izvođenju simulacije. Tako možemo birati između različitih razina na kojima ćemo promatrati sustav te proučavati pojedinačne atome, skupine atoma ili čitave aminokiseline kao najmanje gradivne jedinice sustava. Otapalo možemo simulirati eksplicitno ili implicitno, a postoje i mnogi algoritmi za računanje brzine i položaja čestica u sustavu u ovisnosti o vremenu simulacije (Verlet, leap-frog, Beeman i dr.). Primjenjuju se i različiti termostati, barostati i načini tretiranja rubnih uvjeta. Prilikom odabira svakog od ovih parametara treba biti oprezan kako bi sama simulacija bila što bolji odraz realnog sustava. Ukoliko pak želimo proučavati specifične promjene u proteinima postoje razne modificirane MD metode poput: molekularne dinamike s nasumičnim

LITERATURNI PREGLED

ubrzanjem (eng. *Random Acceleration MD*), ubrzane molekularne dinamike (eng. *Accelerated MD*), MD simulacije krupnog zrna (eng. *Coarse grained MD*) i dr.

Kao što je prethodno spomenuto, molekularna dinamika pruža uvid u organizaciju sustava na atomskoj razini. Cilj ovog rada je kombinacijom MD simulacijâ i biokemijskih eksperimenata rasvijetliti molekularnu osnovu mehanizma diskriminacije leucina u mjestu za popravak pogreške enzima LeuRS.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

3.1.1. Standardne kemikalije

Agar (*Sigma*), agarozna (*Sigma*), akrilamid (*Sigma*), amonijev acetat ($\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$) (*Kemika*), amonijev klorid (NH_4Cl) (*Zorka Šabac*), amonijev peroksodisulfat (APS) (*Serva*), 1,4-bis(2-(4-metil-5-fenil)oksazolil)benzen (POPOP) (*Calbiochem*), 2,5-difenil oksazol (PPO) (*Merck*), ditiotreitrol (DTT) (*Sigma*), ekstrakt kvasca (*BD Difco*), etanol (*Kemika*), etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) (*Sigma*), fenilmetilsulfonil-fluorid (PMSF) (*Sigma*), glicerol (*Kemika*), glicin (*USB Corporation*), *N*-(2-hidroksietil)piperazin-*N'*-2-etansulfonska kiselina (Hepes) (*USB Corporation*), imidazol (*Sigma*), izopropil- β -tiogalaktozid (IPTG) (*Sigma*), kalijev acetat (KCH_3COO) (*Kemika*), kalijev hidroksid (KOH) (*Kemika*), kanamicin (*Sigma*), kloridna kiselina (HCl) (*Kemika*), magnezijev klorid (MgCl_2) (*Fluka*), β -merkaptioetanol (*Serva*), *N,N'*-metilenbisakrilamid (*Merck*), natrijev acetat (NaCH_3COO) (*Kemika*), natrijev dodecilsulfat (SDS) (*Merck*), natrijev hidroksid (NaOH) (*Kemika*), natrijev klorid (NaCl) (*Kemika*), *N,N,N',N'*-tetrametiletildiamin (TEMED) (*Serva*), toluen (*T. T. T.*), trikloroctena kiselina (*Kemika*), tripton (*BD Difco*), Tris(hidroksimetil)-aminometan (Tris) (*Sigma*).

3.1.2. Boje

Bromfenolno plavilo (BPB) (*Serva*), Coomassie Brilliant Blue R-250 (*Merck*), etidijev bromid (EtBr) (*Boehringer Mannheim*), ksilencijanolo fluorofosfat (XCFF) (*Serva*).

3.1.3. Aminokiseline i nukleotidi

ATP (*Sigma*), dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (*Sigma*), leucin ($\geq 99.5\%$) (*Sigma*).

3.1.4. Enzimi, proteini i nukleinske kiseline

Albumin goveđeg seruma (*bovine serum albumine*; BSA) (*NEB*), DNaza I (*Sigma*), DpnI (*NEB*), lizozim (*USB*), *Pfu* DNA-polimeraza s odgovarajućim $10 \times$ puferom i magnezijevim sulfatom (MgSO_4) (*Fermentas*), termostabilna anorganska pirofosfataza (TIPP) (*NEB*), T4 DNA-ligaza (*Fermentas*), T4 polinukleotid-kinaza (*NEB*).

Oligonukleotidi korišteni kao početnice u lančanoj reakciji polimeraze za sekvenciranje naručene su od komercijalnog proizvođača (*Macrogen*). Njihovi sljedovi prikazani su u tablici 3.1.

3.1.5. Markeri veličine

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

3.1.6. Komercijalni kompleti

QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) za izolaciju plazmidne DNA iz bakterijskih stanica i *QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)* za pročišćavanje DNA od proteina i malih molekula.

3.1.7. Radioaktivno obilježeni spojevi

[¹⁴C]leucin (*Perkin Elmer*).

3.1.8. Ostali korišteni materijali

Centricon®-centrifugal filter device (Milipore), filtracijski sustav *Sartorius*, filter papir (*Whatman 3MM*), kolona Superdex 200 increase 10/30 GL (*GE Healthcare*), Ni-NTA agaroz (*Qiagen*).

3.1.9. Hranjive podloge i mediji za uzgoj bakterije *E. coli*

Tekuća hranjiva podloga Luria-Bertani (LB): γ (kvašćev ekstrakt) = 5 g dm⁻³, γ (tripton) = 10 g dm⁻³, γ (NaCl) = 10 g dm⁻³.

Krute hranjive podloge LB: γ (kvašćev ekstrakt) = 5 g dm⁻³, γ (tripton) = 10 g dm⁻³, γ (NaCl) = 10 g dm⁻³, γ (agar) = 15 g dm⁻³.

3.1.10. Bakterijski sojevi i plazmidi (*E. coli*)

BL21 (F⁻ *ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3); Novagen*): laboratorijski soj korišten za prekomjernu ekspresiju gena kloniranih u ekspresijski vektor koji sadrži T7 promotor (pET serija vektora). Gen koji kodira za T7-RNA-polimerazu nalazi se u bakterijskom kromosomu. Transkripciju tog gena kontrolira *lacUV5* promotor, kojeg se može inducirati dodatkom IPTG-a. Ovaj soj pogodan je i zbog mutacija gena *lon* i *ompT*, čime je spriječeno djelovanje proteaza i razgradnja proteina prilikom pročišćavanja.

pET28b: plazmid iz serije vektora pET, a korišten je za prekomjernu ekspresiju proteina pod kontrolom inducibilnog promotora *T7lac*. Korištenjem ovog plazmida omogućena je ekspresija rekombinantnih proteina s histidinskim privjeskom (His-privjesak) na N- ili C-kraju kako bi isti mogao biti pročišćen afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA koloni. Plazmid nosi gen za otpornost na antibiotik kanamicin.

3.2. Metode rada s bakterijama

3.2.1. Transformacija bakterijskih stanica elektroporacijom

Elektroporacija je metoda unošenja strane molekule DNA u bakterijske stanice, a temelji se na izlaganju bakterija električnom pulsu koji uzrokuje kratkotrajnu povećanu propusnost bakterijske stanične stijenke. Postupak izvođenja je sljedeći: 50-100 ng plazmidne DNA dodaje se u 40 μ L elektrokompetentnih stanica, a nastala suspenzija prebaci se u ohlađenu kivetu za elektroporaciju. Za elektroporaciju je korišten uređaj MicroPulser (*Biorad*), a primijenjen je

puls od $2,5 \text{ kV cm}^{-1}$ u trajanju 4,5-5,5 ms. Bakterije su zatim resuspendirane u 1 mL tekućeg medija LB i inkubirane 1 h pri $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Alikvoti bakterijske suspenzije (200-800 μL) nanášeni su na hranjive podloge s antibiotikom kanamicinom koje su inkubirane preko noći na $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Na takvim pločama narasti će samo bakterije koje su primile vektor koji nosi otpornost na kanamicin.

3.3. Metode rada s nukleinskim kiselinama

3.3.1. Lančana reakcija polimeraze (PCR)

Lančana reakcija polimeraze (eng. *Polymerase chain reaction*, PCR) je metoda za umnažanje DNA *in vitro*. Temelji se na ponavljanju ciklusa sastavljenih od denaturacije dvolančane DNA (kalupa), sljepljivanja oligonukleotidnih početnica koje omeđuju slijed koji želimo umnožiti te od koji umnažanje započinje i u konačnici njihovog produljivanja, odnosno sinteze komplementarnih lanaca DNA s pomoću termostabilne DNA-polimeraze. Metoda PCR korištena je u modificiranom obliku za priređivanje mutanata leucil-tRNA-sintetaze (LeuRS) metodom ciljane mutageneze.

3.3.2. Ciljana mutageneza

Ciljana mutageneza temelji se na PCR metodi u kojoj se koriste početnice koje sadrže željenu mutaciju te u kojoj se kao kalup koristi *in vivo* proizvedeni plazmid koji sadrži gen od interesa. Naime, koristeći opisane materijale kao rezultat umnažanja dobiva se linearni vektor koji u genu sadrži željenu točkastu mutaciju. Razlika u odnosu na klasičnu PCR metodu je u tome što se novosintetizirana DNA ne može koristiti kao kalup u novom ciklus pa stoga umnažanje nije eksponencijalno, već linearno. Kako bi se uklonio izvorni plazmid koristi se endonukleaza DpnI koja cijepa metiliranu i hemimetiliranu DNA. S obzirom na to da je kalup proizveden *in vivo*, a linearni vektor *in vitro*, kalup biva razgrađen, a linearni vektor sa željenom mutacijom sačuvan.

Sastav reakcijske smjese bio je: γ (plazmid) = $1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, γ (početnica) = $5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, c (dNTP) = 20 mmol dm^{-3} , $2,5 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$ Pfu-DNA-polimeraza s odgovarajućim $10 \times$ puferom i magnezijevim sulfatom (MgSO_4). Kao kalup korišten je pET28bLeuRS_T252A plazmid, a korištene početnice prikazane su u tablici 3.1. Početnice su osmišljene tako da sadrže bar 40 % GC. Mogućnost nastajanja sekundarnih struktura i svojstva početnica provjerena su s pomoću programa OligoCalc. Početnice su naručene od tvrtke *Macrogen*. PCR se provodio u uređaju Thermal Cycler (*Eppendorf*), a postavke korištene pri izvođenju PCR-a prikazane su u tablici 3.2.

Tablica 3.1. Početnice korištene u metodi ciljane mutageneze za priređivanje LeuRS mutanata. Crveno su označen promijenjeni nukleotidi, a podcrtani su promijenjeni kodoni.

Naziv početnice	$T_m / ^\circ\text{C}$	GC / %	Nukleotidni slijed 5'-3'
T252S_F	74,5	60,71	CTACCCGCCCGGACTCCTTTATGGGTTG
T252S_R	74,5	60,71	CAACCCATAAAGGAGTCCGGGCGGGTA
T252V_F	74,5	60,71	CTACCCGCCCGGACGTCCTTTATGGGTTG
T252V_R	74,5	60,71	CAACCCATAAAGACGTCCGGGCGGGTA

Tablica 3.2. Uvjeti lančane reakcije polimeraze.

	T / $^\circ\text{C}$	t / min	Broj ciklusa
Početna denaturacija	95	2	1
Denaturacija	95	0,5	16
Sparivanje početnica	55	1	16
Produljenje	68 / 72	10	16
Završno produljenje	68 / 72	10	1

3.3.3. Agarozna gel-elektroforeza

Agarozni gelovi koriste se u horizontalnoj elektroforezi jer sadrže pore dovoljno velike za DNA i RNA molekule, a samu veličinu pora moguće je regulirati koncentracijom agaroze u gelu. S obzirom na to da sve nukleinske kiseline imaju gotovo jednak omjer mase i naboja njihovo gibanje kroz molekulsko sito – agarozni gel ovisiti će samo o njihovoj veličini i obliku. Dakle, najsporije će putovati linearne, a najbrže superzavijene molekule.

Za elektroforezu su korišteni gelovi sastava: w (agaroz) = 1 %, TAE pufer (c (Tris) = 40 mmol dm⁻³, c (EDTA) = 1 mmol dm⁻³ titriran s CH₃COOH do pH = 8,0) i γ (EtBr) = 50 µg dm⁻³. Uzorci su prije nanošenja pomiješani s puferom za nanošenje (ϕ (glicerol) = 50 %, w (XCFE) = 0,4 % i w (BPB) = 0,4 %). Bromfenol plavo i XCFE omogućava praćenje uzoraka tijekom elektroforeze, a glicerol olakšava njihovo nanošenje na gel. Elektroforeza je provedena u TAE puferu s dodanim etidijevim bromidom pri 120 V i sobnoj temperaturi. Korištena je aparatura za horizontalnu elektroforezu (*EPS 600, Pharmacia Biotech*). Kao marker veličine korišten je GeneRuler 1 kb DNA Ladder (*Thermo Scientific*).

Detekciju DNA omogućava etidijev bromid koji se interkalira između baznih parova. Naime, interkalacija povećava intenzitet fluorescencije 8-40 puta. Etidijev bromid fluorescira s valnom duljinom pobude 302 nm, a emisije 590 nm. Nakon elektroforeze gelovi su snimljeni s pomoću kamere MiniBIS Pro (*Bio-Imaging Systems*).

3.3.4. Ligacija DNA s pomoću T4-DNA-ligaze

Kako bi se povećala efikasnost elektroporacije linearni vektor je cirkulariziran/ligiran. Prije same ligaciji vektora na 5' kraj linearnog PCR produkta potrebno je dodati fosforilnu skupinu,

stoga je priređena reakcijska za fosforilaciju T4-DNA-kinazom prema uputama proizvođača. Smjesa je inkubirana 20 min pri 37 °C, a kinaza je inaktivirana 10 min pri 75 °C. U smjesu je zatim dodana T4-DNA-ligaza prema uputama proizvođača, smjesa je inkubirana 1 h pri 22 °C, a ligaza je inaktivirana 10 min pri 65 °C. DNA je od proteina i soli pročišćena koristeći QIAquick Gel Extraction Kit (*Qiagen*).

3.3.5. Izolacija plazmidne DNA

U svrhu izolacije plazmidne DNA iz bakterijskih stanica korišten je komercijalni QIAprep Spin Miniprep Kit (*Qiagen*), a izolacija je provedena prema uputama proizvođača. Pročišćavanje se temelji na metodi alkalne lize stanice uz to što se plazmidna DNA adsorbira na kolonice i ispiru s istih u nekoliko koraka kako bi se povećala njena čistoća.

3.3.6. Određivanje koncentracije nukleinskih kiselina

Koncentracije nukleinskih kiselina određivane su na uređaju NanoDrop 1000 nanošenjem 2 μL uzorka na uređaj nakon prethodnog nuliranja istog otopinom u kojoj se uzorak nalazi. Koncentracija se određuje mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini 260 nm. Mjerno područje instrumenta za mjerenje koncentracije nukleinskih kiselina je 2-3700 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$.

3.3.7. Analiza nukleotidnih sljedova

Rekombinantni plazmidi sekvencirani su od strane servisa tvrtke *Macrogen*. Analiza sekvenci napravljena je pomoću alata NCBI BLAST (eng. *Basic Local Alignment Search Tool*) usporedbom nukleotidnih sljedova. Kromatogrami su analizirani u programu *Chromas Lite*.

3.4. Metode rada s proteinima

3.4.1. Prekomjerna ekspresija rekombinantnih proteina

Za proizvodnju mutanata enzima leucil-tRNA-sintetaze prvo je pripravljeno 5 mL prekonocne kulture kojom je inokulirano 0,5 L LB medija u koji je prethodno dodan antibiotik kanamicin. Bakterijska kultura je uzgajana u tresilici na 37 °C dok vrijednost OD_{600} nije iznosila 0,5-0,8, kada je prekomjerna ekspresija proteina inducirana dodatkom IPTG-a do konačne koncentracije 0,25 mmol dm^{-3} . Bacterije su uzgajane dodatna 3 h nakon čega su istaložene centrifugiranjem 15 min pri 5000 g i 4 °C. Talog bakterijskih stanica pohranjen je na -20 °C.

3.4.2. Priprema proteinskih ekstrakata

Kako bi se proteini pripremili za pročišćavanje na Ni-NTA agarozu, talog bakterijskih stanica je resuspendiran u puferu A (c (Hepes) = 20 mmol dm^{-3} pH 7,5, c (NaCl) = 500 mmol dm^{-3} , c (MgCl_2) = 5 mmol dm^{-3} , c (imidazol) = 10 mmol dm^{-3} , c (β -merkaptoetanol) = 5 mmol dm^{-3}). Stanična stijenka je razbijena sonikacijom. Prije same sonikacije, koja je provedena 6 puta po 1 min s pauzama od 1 min, u smjesu su dodani lizozim (γ = 50 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$), DNaza I (γ = 3 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$).

¹⁾ i PMSF – inhibitor serinskih proteaza ($c = 0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$). Lizat je nakon sonikacije centrifugiran 1 h pri 10000 g i 4 °C. Supernatant, odnosno proteinski ekstrakt profiltriran je kroz sterilni filter pora veličine 22 mikrona kako bi se uklonile sve neistaložene čestice. Tako pripremljeni ekstrakt pročišćavan je na Ni-NTA agarozu.

3.4.3. Afinitetna kromatografija s imobiliziranim metalnim ionima

Ova vrsta kromatografije temelji se na reverzibilnim interakcijama između proteina i punila kolone. U našem slučaju kao punilo kolone korištena je Ni-NTA agaroz, odnosno agaroz na koju je kovalentno vezana nitriloctena kiselina koja zauzima četiri koordinacijska mjesta na Ni^{2+} ionu što ostavlja dva mjesta slobodna. Kako bi se protein propuštanjem kroz kolonu vezao na istu, on je eksprimiran s His-privjeskom na N-kraju. Naime, His-privjesak je pri fiziološkom pH neutralan i uglavnom ne utječe na funkciju rekombinantnih proteina. Vezanje za kolonu temelji se na zauzimanju posljednja dva koordinacijska mjesta na niklu od strane imidazolnog prstena dvaju histidina. Proteini se s kolone ispiru puferima s povećanom koncentracijom imidazola.

Za pročišćavanje su korištena četiri pufera: A, B, C i D. Svi puferi su temeljno istog sastava: $c(\text{Hepes}) = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 7,5$, $c(\text{NaCl}) = 500 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{MgCl}_2) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$ i $c(\beta\text{-merkaptioetanol}) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$. Razlikuju se u koncentraciji imidazola koja je u puferima A, B, C i D redom iznosila: 10, 20, 30 i 200 mmol dm^{-3} . Kolona je napunjena s 1 mL Ni-NTA i isprana s 10 mL redestilirane vode te uravnotežena s isto toliko pufera A. Proteinski ekstrakt propušten je tri puta kroz kolonu radi potpunog vezanja proteina na istu. Radi ispiranja proteina koji nisu ostvarili specifične interakcije kolona je isprana s 30 mL pufera A i zatim s po 10 mL pufera B te 10 mL pufera C. Ciljni protein eluiran je s kolone sa 6 mL pufera D. Pročišćavanje je provedeno pri 4 °C. Uspješnost pročišćavanja provjerena je SDS poliakrilamidnom gel-elektroforezom.

3.4.4. Denaturirajuća poliakrilamidna gel-elektroforeza

S pomoću denaturirajuće poliakrilamidne gel-elektroforeze u prisustvu natrijeva dodecil-sulfata (SDS) analizirani su proteinski uzorci. Uslijed denaturacije protein biva okružen molekulama negativno nabijenog deterdženta, to jest SDS-a. Kako broj molekula koje okružuju protein ovisi o njegovoj veličini, svi proteini imaju isti omjer mase i naboja, a razdvajanje, odnosno gibanje u električnom polju u tom slučaju ovisi samo o molekulskoj masi proteina.

Za pripremu gelova i samo provođenje elektroforeze korištena je aparatura Mini-PROTEAN Tetra (*Biorad*). Sam gel za elektroforezu sastojao se od dva dijela, gel za sabijanje (4 % (w/v) akrilamid-bisakrilamid (29:1), $c(\text{Tris}) = 0,125 \text{ mol dm}^{-3}$ $\text{pH} = 6,8$, 0,1 % (w/v) SDS)

i gel za razdvajanje (9 % (w/v) akrilamid-bisakrilamid (29:1), c (Tris) = 0,375 mol dm⁻³ pH = 8,8, 0,1 % (w/v) SDS). Prije nanošenja na gel uzorcima je dodan pufer za nanošenje na gel (c (Tris) = 62,5 mmol dm⁻³, pH = 6,8, c (β-merkaptotanol) = 12,5 mmol dm⁻³, φ (glicerol) = 6,25 % , 1,25 % (w/v) SDS, 0,002 % (w/v) bromfenol plavo), a proteini su denaturirani inkubacijom 3 min pri 95 °C na termobloku. Elektroforeza je provođena u puferu sastava: γ (glicin) = 14,4 g dm⁻³, γ (Tris) = 3,03 g dm⁻³, 0,1 % (w/v) SDS, pH = 8,3 15 min pri 120 V u svrhu sabijanja uzoraka te zatim 45 min pri 180 V u svrhu njihovog razdvajanja. Kako bi se proteini vizualizirali gel je inkubiran u otopini boje Coomassie Brilliant Blue R-250 (γ (CBB R-250) = 2,5 g dm⁻³, φ (octena kiselina) = 10 %, φ (EtOH) = 45 %), a višak iste uklonjen je odbojavanjem u vrućoj vodi.

3.4.5. Ultrafiltracija

Kako bi se proteini ukoncentrirali korišten je komercijalno dostupan Centricon®-centrifugal filter device (*Milipore*) od 50 mL s porama od 30 kDa. Naime, pod utjecajem centrifugalne sile kroz pore prolaze molekule mase manje od 30 kDa što omogućava smanjivanje volumena uzorka većih M_r dok nije postignuta željena koncentracija proteina. Uzorci su centrifugirani pri 5000 g na 4°C.

3.4.6. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina određivana je na spektrofotometru NanoDrop 1000. Kako bi uređaj izmjerio koncentraciju potrebno je nanijeti 2 μL uzorka, upisati molekulsku masu i ekstincijski koeficijent (teoretski, izračunat programom *ProtParam*) određivanog proteina u programsko sučelje te nulirati instrument s pomoću pufera u kojemu se uzorak nalazi. Uređaj kao rezultat daje apsorpcijski spektar uzorka te koncentraciju proteina u mg mL⁻¹ izračunatu iz apsorbancije proteina pri valnoj duljini 280 nm.

3.4.7. Gel-filtracija

Gel-filtracija je kromatografska tehnika koja sastojke smjese razdvaja na temelju njihove veličine. Punila kromatografskih kolona najčešće su inertni gelovi koji se razlikuju u veličini čestica. Čestice gela sadrže pore u koje dovoljno male molekule mogu ulaziti. Kada se uzorak nanese na kolonu najbrže kroz nju putuju najveće molekule jer one mogu ulaziti u najmanji broj pora, dok se manje molekule na koloni duže zadržavaju jer postoji veći broj pora u koje one mogu ući. Gel-filtracija izvođena je na FPLC uređaju Äkta Purifier 10 (*GE Healthcare*) i koloni Superdex 200 increase 10/30 GL (*GE Healthcare*).

S obzirom na to da se LeuRS pročišćava s Leu-AMP u aktivnom mjestu sintetske reakcije potrebno ih je razdvojiti. To se postiže prijenosom Leu na tRNA^{Leu} i zatim

razdvajanjem LeuRS od Leu-tRNA^{Leu} gel filtracijom. Leucin se prenosi na tRNA^{Leu} u reakcijskoj smjesi sastava: c (enzim) = 20 $\mu\text{mol dm}^{-3}$, c (tRNA^{Leu}) = 10 $\mu\text{mol dm}^{-3}$, c (Hepes) = 0,1 mol dm^{-3} pH 7,0, c (MgCl₂) = 0,01 mol dm^{-3} , c (KCl) = 0,15 mol dm^{-3} , c (DTT) = 0,001 mol dm^{-3} , γ (BSA) = 0,01 mg mL^{-1} , c (ATP) = 4 mmol dm^{-3} . Reakcijska smjesa inkubirana je 1 h pri 37 °C. Kako bi nastali kompleks LeuRS:Leu-tRNA^{Leu} disocirao, prilikom ugušćivanja dodaje mu se jedan volumen 2 mol dm^{-3} NaCl. Prije nanošenja na gel-filtracijsku kolonu uzorci su ultrafiltriranjem prevedeni u pufer za gel-filtraciju sastava: c (Hepes) = 20 mmol dm^{-3} pH 7,5, c (NaCl) = 1 mol dm^{-3} , c (MgCl₂) = 10 mmol dm^{-3} , φ (glicerol) = 5 % i c (β -merkaptioetanol) = 5 mmol dm^{-3} . Na kolonu su nanošeni alikvoti uzoraka od 150 μL (γ (LeuRS) = 20 mg mL^{-1}) koji su prvo centrifugirani 10 min pri 10000 g i 4 °C kako bi se istaložile sve neotopljene čestice. Na detektoru uređaja praćena je apsorbancija pri valnim duljinama 260 i 280 nm, a sakupljane su frakcije od 0,5 mL. Frakcijama za koje je određeno da sadrže čisti protein određena je koncentracija na uređaju NanoDrop 1000, a u konačnici su sve frakcije spojene, ukoncentrirane kao što je opisano u poglavlju 3.4.6. i prevedene u pufer sastava: c (Hepes) = 20 mmol dm^{-3} pH 7,5, c (NaCl) = 50 mmol dm^{-3} , c (β -merkaptioetanol) = 5 mmol dm^{-3} , φ (glicerol) = 10 (%). Uzorak je spremljen na -80 °C.

3.5. Kinetičke metode

3.5.1. Ukupna reakcija aminoaciliranja

Aminoaciliranje je enzimski test kojim se mjeri ukupna brzina oba koraka reakcije koju kataliziraju aminoacil-tRNA-sintetaze. U svrhu praćenja napretka reakcije korišten je radioaktivno obilježeni [¹⁴C]leucin. Reakcije su se odvijale u puferu sastava: c (Hepes) = 20 mmol dm^{-3} pH 7,5, c (EDTA) = 100 $\mu\text{mol dm}^{-3}$, c (NH₄Cl) = 150 mmol dm^{-3} , γ (BSA) = 10 $\mu\text{g/mL}$, c (MgCl₂) = 10 mmol dm^{-3} , c (ATP) = 2 mmol dm^{-3} te pri temperaturi 37 °C.

Metoda se temelji na prijenosu radioaktivno obilježene aminokiseline na tRNA. Paralelno su provođene dvije reakcije u kojima su koncentracije supstrata bile c (LeuRS) = 100 nmol dm^{-3} i c (tRNA^{Leu}) = 10 $\mu\text{mol dm}^{-3}$, odnosno c (LeuRS) = 5 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ i c (tRNA^{Leu}) = 1 $\mu\text{mol dm}^{-3}$. U određenim vremenskim točkama uzimaju se alikvoti reakcijske smjese i reakcija se zaustavlja nanošenjem na diskice Whatman 3MM koji se uranjaju u hladnu vodenu otopinu trikloroctene kiseline γ (TCA) = 100 g dm^{-3} . Biološke makromolekule talože se na diskice, a [¹⁴C]leucin nevezan na tRNA ispire se 10 min u otopini γ (TCA) = 100 g dm^{-3} te zatim dva puta po 5 min u otopini γ (TCA) = 50 g dm^{-3} . Diskići se posuše uranjanjem u etanol i zagrijavanjem 30 min na 70 °C. Suhi diskići urone se u 2,5 mL scintilacijske otopine (γ (2,5-difenil oksazol) = 5 g dm^{-3} , γ (1,4-bis(2-(4-metil-5-fenil)oksazolil)bezen) = 0,3 g dm^{-3} u toluenu).

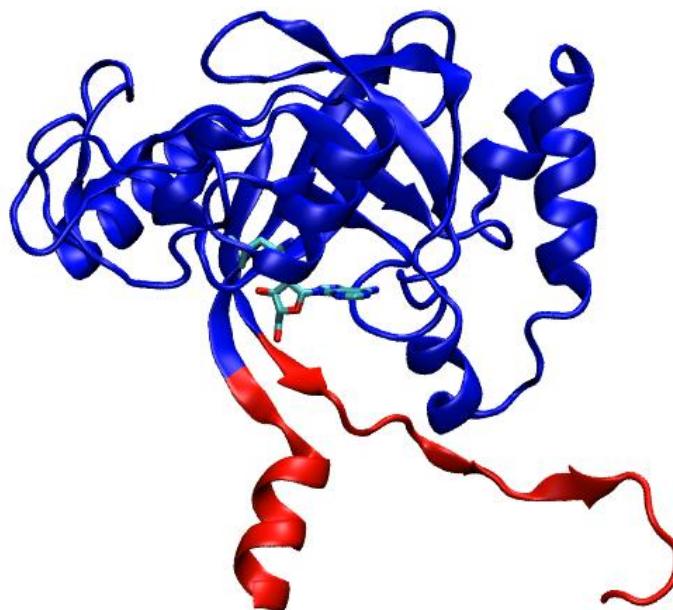
Radioaktivnost se mjeri u scintilacijskom brojaču kao broj udaraca u minuti (eng. *counts per minute*, cpm), a na temelju baždarnog pravca konstruiranog iz uzoraka poznate količine radioaktivnosti određuju se koncentracije [^{14}C]Leu-tRNA^{Leu} u alikvotima reakcijske smjese. Iz dobivenih koncentracija moguće je odrediti napredak i doseg reakcije aminoaciliranja.

3.6. Simulacije molekularne dinamike

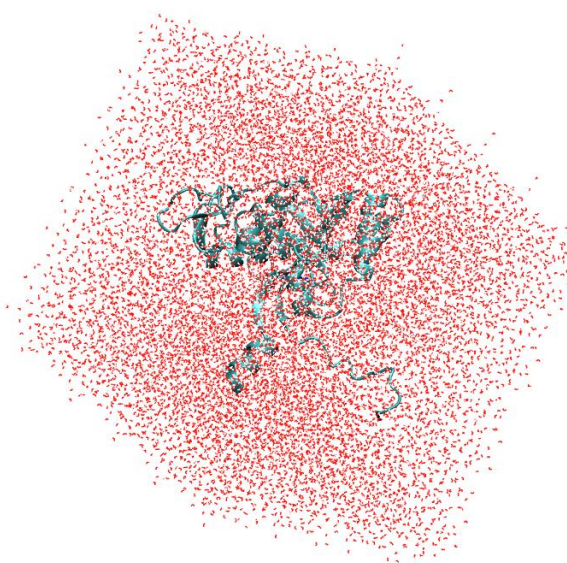
U svrhu *in silico* istraživanja mehanizma diskriminacije supstrata CP1 domene proteina leucil-tRNA-sintetaze (LeuRS) 8 sustava je podvrgnuto simulacijama molekularne dinamike (MD):

- divlji tip bez vezanog supstrata - (WT_Apo)
- divlji tip u kompleksu s leucil-2'-adenozinom - (WT_Leu)
- divlji tip u kompleksu s norvalil-2'-adenozinom - (WT_Nva)
- mutant T252A bez vezanog supstrata - (T252A_Apo)
- mutant T252A u kompleksu s leucil-2'-adenozinom - (T252A_Leu)
- mutant T252A u kompleksu s norvalil-2'-adenozinom - (T252A_Nva)
- mutant T252V u kompleksu s leucil-2'-adenozinom - (T252V_Leu)
- mutant T252S u kompleksu s leucil-2'-adenozinom - (T252S_Leu)

Kao početnu strukturu za izgradnju svih simuliranih sustava korištena je kristalna struktura mutanta T252A enzima LeuRS iz bakterije *Escherichia coli* s leucil-2-aminoadenozinom u aktivnom mjestu CP1 domene (neobjavljeni rezultati grupe I. Gručić-Sovulj). Radi uštede računalnog vremena, simulirana je samo CP1 domena koju tvore aminokiseline 216-430 (slika 3.1), a njeni krajnji dijelovi, koji su definirani aminokiselinama 216-227 i 414-430, zadržani su zbog njihove biološke uloge.⁴³ Zadržane su kristalne vode koje su se nalazile unutar 3 Å od odabrane domene. Supstrat je ovisno od sustava odstranjen ili zamijenjen leucil-2'-adenozinom, odnosno norvalil-2'-adenozinom, a to je učinjeno s pomoću programa VMD.⁵⁸ *In silico* mutacije su izvedene u programu Maestro.⁵⁹ Polarni vodici dodani su s pomoću programa WHAT IF⁶⁰, a nepolarni s pomoću programa *tleap* koji je dio programskog paketa Amber 12⁶¹. Sustavi su elektrostatski neutralizirani dodatkom 7 iona natrija te smješteni u kutiju približnih dimenzija 60x60x80 Å³ ispunjenu TIP3P modelom molekula vode⁶² (slika 3.2). Parametrizacija proteina izvršena je korištenjem ff99SB Amber polja sila⁶³, a parametri za supstrate dobiveni su semiempirijskim računima korištenjem programa antechamber koji je sastavni dio programskog paketa Amber 12. Na sustave su primijenjeni periodični rubni uvjeti (PBC).



Slika 3.1. Struktura CP1 domene (plavo) T252A mutanta LeuRS iz bakterije *Escherichia coli* sa supstratom leucil-2'-adenozinom u aktivnom mjestu i poveznicama (crveno).



Slika 3.2. WT_Leu sustav kakav je korišten u simulacijama molekularne dinamike.

Optimizacija geometrije provedena je u ukupno pet ciklusa od kojih je prvi imao 5000, a ostali po 1000 koraka. U prvom ciklusu gibanje svih atoma proteina i supstrata ograničeno je potencijalom od $100 \text{ kcal}/(\text{mol}/\text{Å}^2)$ kako bi molekule vode zauzele optimalne položaje i optimalnu geometriju. U drugom ciklusu ograničenje je primijenjeno na sve atome proteina i

supstrata izuzev atoma vodika primjenom istog potencijala. U trećem ciklusu isti potencijal je primijenjen kako bi se ograničilo gibanje atoma proteinske okosnice, a u četvrtom ciklusu je taj potencijal smanjen na 50 kcal/(mol/ Å²). U petom ciklusu optimizacija je sprovedena bez ikakvih ograničenja. Optimizaciju geometrije slijedila je ekvibracija sustava u dva ciklusa. Sustav je tijekom prvih 300 ps simulacije pri konstantom volumenu zagrijan do temperature 298 K. Zatim je tijekom narednih 200 ps ekvilibriran pri konstantom tlaku 1 atm. Minimizacija, ekvibracija i prvih 500 ps simulacije molekularne dinamike provedeno je u programu Amber 12. Sljedećih 60 ns simulirano je u programu Gromacs 4.6.3.⁶⁴ Simulacije su rađene pri konstantnom tlaku i volumenu uz primjenu Parrinello-Rahman barostata i v-rescale termostata, a vremenski korak je iznosio 1 fs. Za račun elektrostatskih interakcija korištena je PME metoda (eng. *Particle Mesh Ewald*).

U svrhu analize MD simulacija korišteni su alati dostupni u programskom paketu Gromacs i programu za vizualizaciju VMD. S pomoću navedenih programa računata su RMSD vrijednosti (eng. *Root mean square deviation*) koje predstavljaju prosječne udaljenosti ekvivalentnih atoma dvije strukture što zapravo ukazuje na razinu sličnosti tih struktura.⁵⁷ U molekularnoj dinamici ona se najčešće računa za uzastopne strukture dobivene tijekom simulacije, koje se poravnavaju i uspoređuju s početnom strukturom. Tako dobivamo informaciju o tome kako se sustav mijenja tijekom simulacije. RMSD se računa prema formuli:

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \delta_i^2}$$

gdje je N ukupni broj atoma u sustavu, a δ_i udaljenost između dva ekvivalentna atoma. Osim RMSD računata su i RMSF vrijednosti (eng. *Root mean square fluctuation*) koje predstavljaju mjeru uprosječenog fluktuiranja nekog dijela proteina tijekom MD simulacije.⁵⁷ Može se računati za pojedinačni atom, čitavu aminokiselinu ili proteinsku regiju. Tako dolazimo do informacije o rigidnosti ili fleksibilnosti pojedinih dijelova proteinske strukture. RMSF je moguće izračunati prema izrazu:

$$RMSF = \sqrt{\frac{1}{t} \sum_{i=1}^t (r_i - r_{ref})^2}$$

gdje je t ukupno vrijeme simulacije tijekom kojeg se računa RMSF vrijednost, r_i položaj atoma u trenutku i simulacije, a r_{ref} položaj atoma u referentnoj strukturi.

4. Rezultati

4.1. Simulacije molekularne dinamike

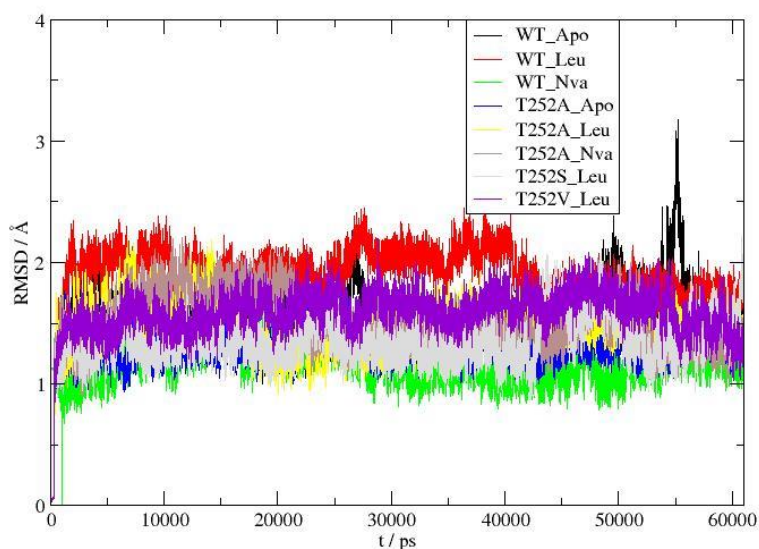
Simulirana je molekularna dinamika (MD) 8 različitih sustava:

- Divlji tip bez supstrata – WT_Apo
- Divlji tip sa supstratom leucil-2'-adenozinom – WT_Leu
- Divlji tip sa supstratom norvalil-2'-adenozinom – WT_Nva
- Mutant T252A bez supstrata – T252A_Apo
- Mutant T252A sa supstratom leucil-2'-adenozinom – T252A_Leu
- Mutant T252A sa supstratom norvalil-2'-adenozinom – T252A_Nva
- Mutant T252S sa supstratom leucil-2'-adenozinom – T252S_Leu
- Mutant T252V sa supstratom leucil-2'-adenozinom – T252V_Leu

Navedeni sustavi odabrani su iz dva glavna razloga. Prvo, kako bi ustanoviti osnovu diskriminacije leucina u aktivnom mjestu domene za popravak pogreške, simulirani su sustavi WT i T252A sa supstratima leucil- i norvalil-adenozinom (slika 4.1). Naime, poznato je kako divlji tip enzima katalizira hidrolizu Nva- i Leu-tRNA^{Leu} s velikom razlikom u koeficijentu brzine reakcije (hidroliza Leu-tRNA^{Leu} je vrlo spora), dok mutant T252A katalizira obje reakcije sa sličnim koeficijentom brzine reakcije.¹⁸ Navedeni sustavi simulirani su i bez supstrata, ponajprije da bi se utvrdilo dolazi li do velike promjene u enzimu ili samom aktivnom mjestu kada je supstrat vezan na njega. Drugo, dodatno su simulirani T252S i T252V mutanti s ciljem razlučivanja uloge diskriminatorne aminokiseline na poziciji 252. Iako postoje istraživanja koja su to pokušala utvrditi upravo na ovim mutantima njihovi rezultati su dvojbeni. Naime, korištene kinetičke metode nisu dostatne za određivanje brzine same kemijske promjene (objašnjeno u poglavlju 2.4.4.), a simulacije molekularne dinamike vršene su u trajanju od samo 1 ns, što nije nužno dovoljno za dobivanje potpunog uvida u sustav. K tome, simulacije su vršene bez supstrata u aktivnom mjestu što zasigurno ne daje odgovor na pitanje mehanizma kojim aminokiselina na poziciji 252 diskriminira leucin.¹⁸

4.1.1. Pregled strukture

U svrhu analize globalne stabilnosti simuliranih sustava, praćene su RMSD vrijednosti tijekom MD simulacija. S obzirom na očekivano veliku fleksibilnost poveznica, RMSD vrijednosti za cjelovite domene su statistički neznačajne (slika D1 u Dodatku). Stoga su mjerene RMSD vrijednosti za domenu bez poveznica i prikazane su na slici 4.1. Vidljivo je kako svi sustavi dostižu plato oko 2 ns simulacije. Srednje RMSD vrijednosti svih sustava prikazane su u tablici 4.1.



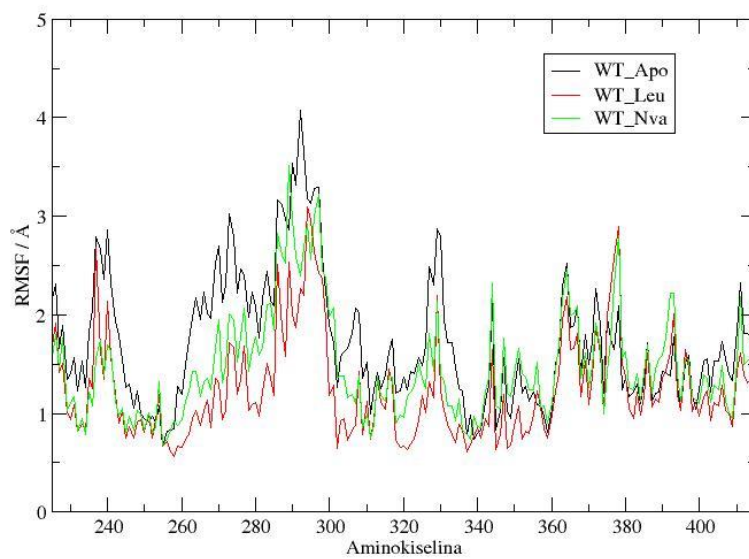
Slika 4.1. RMSD vrijednosti simuliranih sustava bez poveznica.

Tablica 4.1. Srednje RMSD vrijednosti simuliranih sustava bez poveznica.

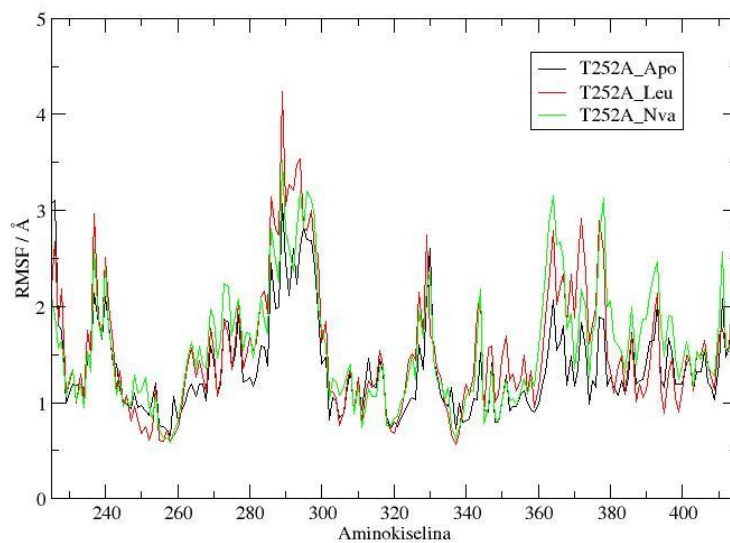
sustav	RMSD / Å
WT_Apo	$1,51 \pm 0,25$
WT_Leu	$1,90 \pm 0,22$
WT_Nva	$1,19 \pm 0,16$
T252A_Apo	$1,30 \pm 0,14$
T252A_Leu	$1,48 \pm 0,20$
T252A_Nva	$1,51 \pm 0,24$
T252V_Leu	$1,58 \pm 0,18$
T252S_Leu	$1,35 \pm 0,20$

Svi sustavi pokazuju stabilnost tijekom simulacije, izuzev jednokratnog skoka RMSD vrijednosti WT_Apo sustava na oko 55 ns simulacije za koji je detaljnim pregledom ustanovljeno kako je posljedica pomicanja vanjske fleksibilne petlje 70-80 (285-295). Uspoređujući srednje RMSD vrijednosti valja istaknuti kako su one najveće za WT_Leu ($1,90 \pm 0,22$ Å), a najmanje WT_Nva ($1,19 \pm 0,16$ Å) sustav. Ostali sustavi, neovisno o prisustvu, odnosno odsustvu određenog supstrata ili o pojedinoj mutaciji pokazuju slične vrijednosti.

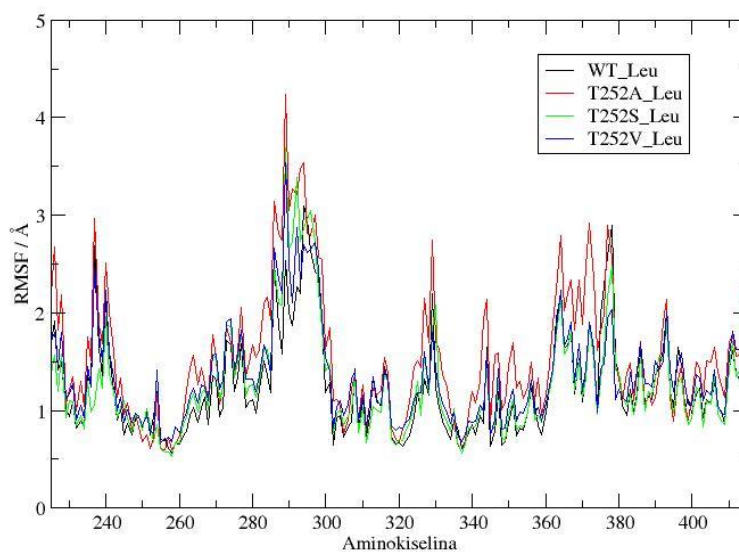
Također, mjerene su RMSF vrijednosti za pojedine sustave i prikazane su na slikama 4.2-4.4. Kod WT sustava pojavljuju se najveće razlike, a uglavnom su posljedica fleksibilnosti površinskih petlji. Mutant T252A i sustavi sa supstratom leucil-2'-adenozinom imaju vrlo slične vrijednosti. Literaturnim pregledom⁴⁶ i vizualnom analizom utvrđeno je koje aminokiseline igraju važnu ulogu u pozicioniranju supstrata. Kako bi se istražila mogućnost različitog smještaja supstrata u aktivno mjesto detaljnije su promatrane njihove RMSF vrijednosti (slika 4.5).



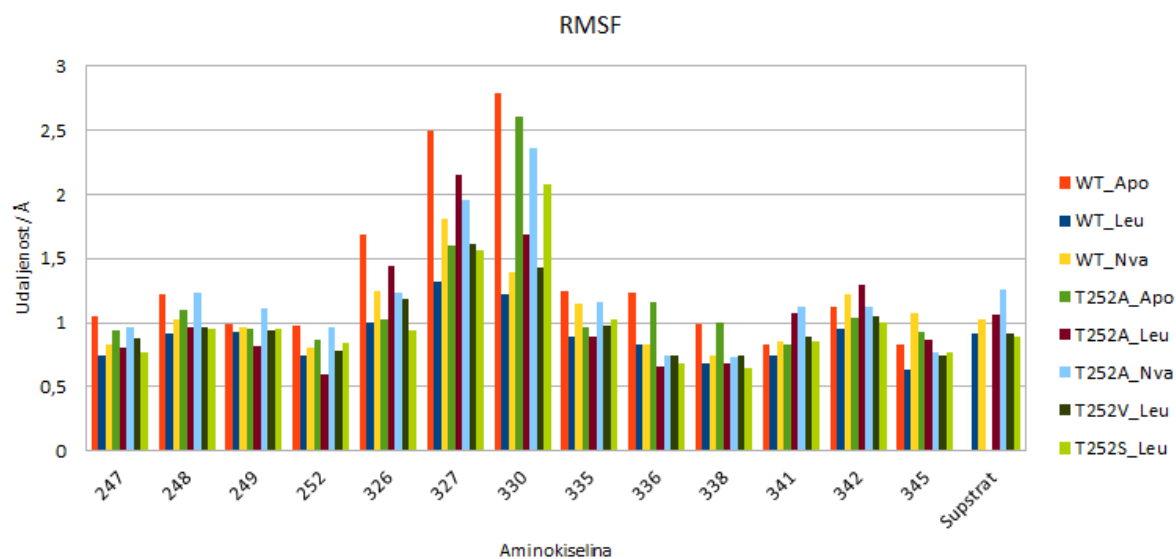
Slika 4.2. RMSF vrijednosti aminokiselina 225-415 WT sustava.



Slika 4.3. RMSF vrijednosti aminokiselina 225-415 T252A sustava.



Slika 4.4. RMSF vrijednosti aminokiselina 225-415 sustava sa supstratom leucil-2'-adenozinom.



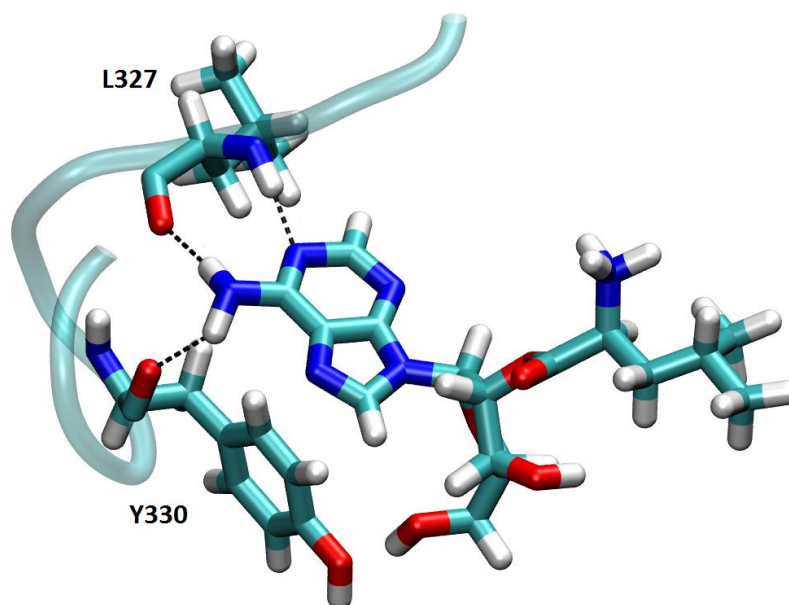
Slika 4.5. RMSF vrijednosti aminokiselinskih ograna bitnih u stabilizaciji supstrata.

4.1.2. Smještaj adenzinskog dijela supstrata

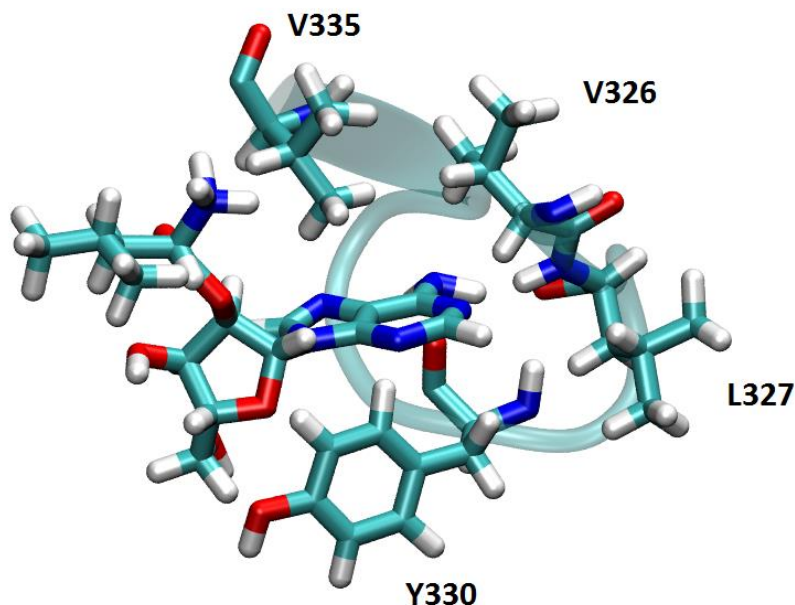
Kao aminokiseline važne za smještaj adenzinskog dijela supstrata prepoznati su ogranci V326, L327, Y330 i V335. L327 i Y330 preko okosnice ostvaruju vodikove veze s adenzinom (slika 4.6), dok V326, V335 i aromatski prsten Y330 stvaraju hidrofobno okružje koje pogoduje smještaju adenzina (slika 4.7). Nadalje, Y330 ostvaruje π - π interakcije u paralelnom i T-obliku. U tablici 4.2 nalaze se prosječne vrijednosti duljina pripadnih veza/interakcija tijekom MD simulacija. Sve interakcije su očuvane tijekom simulacije i ne pokazuju značajne razlike

REZULTATI

među sustavima (slike D2-D7 u Dodatku). Pregled RMSF vrijednosti ovih ogranaka ukazuje na to kako V326 i V335 pokazuju slične trendove u fluktuacijama, a oba najviše fluktuiraju tijekom simulacije WT_Apo sustava. V326 pokazuje veće razlike u fluktuaciji između promatranih sustava, no vizualnom analizom je ustanovljeno kako je to posljedica njegove prostorne slobode i zapravo je artefakt pojedine simulacije. V335, izuzev u sustavu WT_Apo, poprima najveće RMSF vrijednosti u sustavima s norvalil-2'-adenozinom. RMSF vrijednosti za L327 treba uzeti s oprezom jer se interakcije sa supstratom ostvaruju preko okosnice dok je bočni ogranak izložen vanjskom dijelu petlje što mu omogućava fluktuiranje i najviše doprinosi istome. Aminokiselina Y330 također pokazuje raznoliko ponašanje što nije neobično s obzirom da se pretpostavlja kako ima ulogu „poklopca“ pri vezanju A76 što zahtijeva povećanu fleksibilnost. U konačnici, vrijedi napomenuti kako Y330 ostvaruje interakcije s ribozom adenzina, no one su ostvarene s 5'OH skupinom koja nije dio pravog supstrata (aa-tRNA) koji na tom mjestu sadrži fosfat. Interakcije s 3'OH skupinom riboze adenzina komentirane su u sljedećem poglavlju.



Slika 4.6. Vodikove veze ostvarene između adenzina i okosnica aminokiselina L327 i Y330 u T252A_Leu sustavu.



Slika 4.7. Smještaj adenzina u hidrofobnoj petlji 325-335 u T252A_Leu sustavu.

Tablica 4.2. Prosječne duljine veza/interakcija zaslužnih za smještaj adenzina supstrata.

Sustav/veza	L327NH-N1 / Å	L327O-NH61 / Å	Y330O-NH62 / Å	c.m. ^a Y330-adenozin / Å	c.m. ^a V326-adeoznin / Å	c.m. ^a V335-adenozin / Å
WT_Leu	2,20 ± 0,20	1,89 ± 0,13	2,04 ± 0,24	4,62 ± 0,30	5,58 ± 0,17	5,75 ± 0,24
WT_Nva	2,19 ± 0,22	1,90 ± 0,13	2,04 ± 0,23	4,76 ± 0,22	5,73 ± 0,18	5,45 ± 0,28
T252A_Leu	2,07 ± 0,15	1,88 ± 0,12	2,01 ± 0,21	4,51 ± 0,25	5,55 ± 0,17	5,79 ± 0,18
T252A_Nva	2,15 ± 0,19	1,87 ± 0,12	1,97 ± 0,18	4,46 ± 0,39	5,68 ± 0,18	5,47 ± 0,29
T252V_Leu	2,14 ± 0,18	1,88 ± 0,12	2,02 ± 0,22	4,65 ± 0,40	5,59 ± 0,17	5,70 ± 0,26
T252S_Leu	2,14 ± 0,19	1,89 ± 0,12	1,99 ± 0,19	4,80 ± 0,48	5,65 ± 0,18	5,44 ± 0,31

^aCentar mase aminokiseline

4.1.3. Smještaj aminokiselinskog dijela supstrata

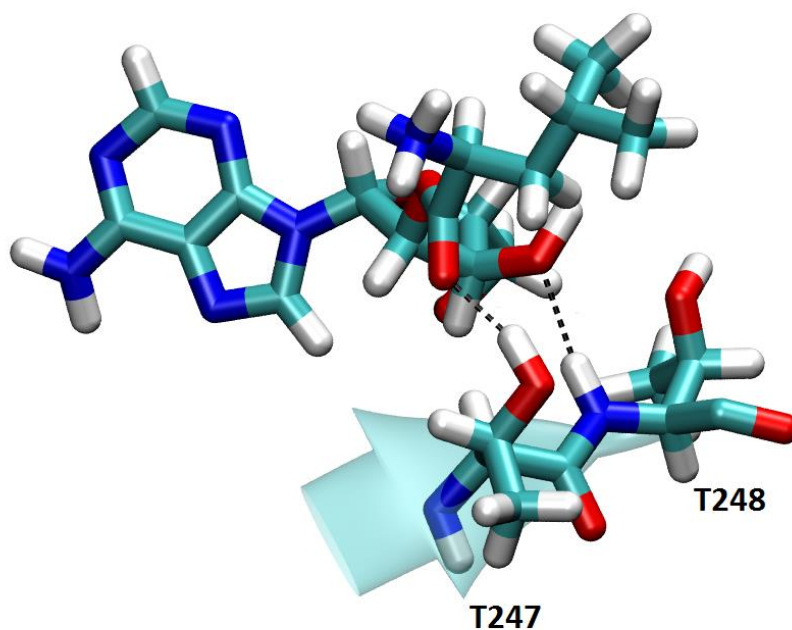
Za smještaj aminokiselinskog dijela supstrata ponajviše su odgovorna dva treoninska ogranka T247 i T248, D345 i hidrofobno okružje koje čine aminokiseline M336 i V338 te alifatski dijelovi R249 i D342. Hidroksilna skupina bočnog ogranka aminokiseline T247 i dušik iz okosnice T248 ostvaruju vodikove veze s karbonilnim kisikom supstrata, odnosno kisikom 3'OH skupine riboze (slika 4.8), dok D345 radi ionski most s amino skupinom supstrata (slika 4.9) (slike D8-D10 u Dodatku). Prosječne udaljenosti tih interakcija prikazane su u tablici 4.3. Vidljivo je kako neovisno o sustavu nema značajne razlike među njima, iako vrijedi spomenuti kako je najveće odstupanje od srednje vrijednosti, koje upućuje na najveću fleksibilnost ono u WT_Leu sustavu, a ta razlika je najočitija u slučaju interakcije dušika T248 i kisika 3'OH

REZULTATI

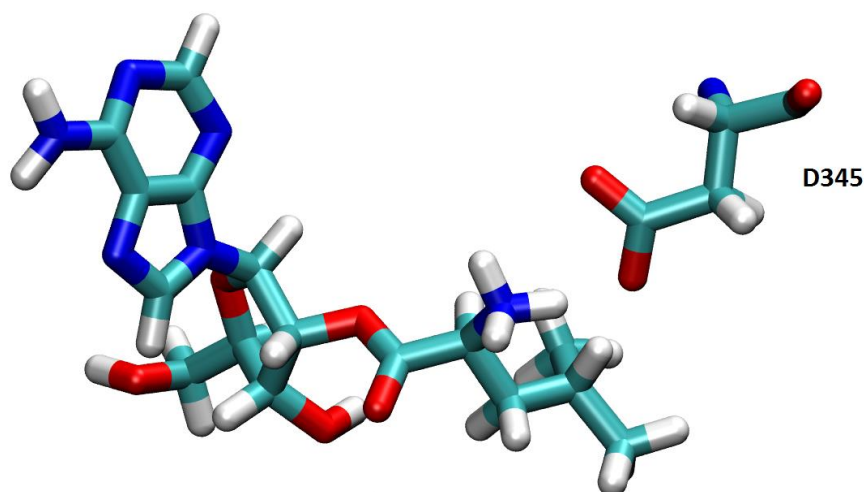
skupine. Također, RMSF vrijednosti za sva tri ogranka (T247, T248 i D345) ne pokazuju značajne razlike među sustavima. Sa slike 4.5 vidljivo je da aminokiseline (M336, V338, R249 i D342) prepoznate kao važne za ostvarivanje van der Waalsovih interakcija s aminokiselinskim dijelom supstrata (Slika 4.10) pokazuju gotovo jednolične RMSF vrijednosti neovisno o supstratu, odnosno mutaciji na poziciji 252. Izuzetak su Apo sustavi u kojima je prostorna sloboda istih znatno povećana.

Tablica 4.3. Prosječne udaljenosti interakcija kojima aminokiseline T247, T248 i D345 pozicioniraju supstrat.

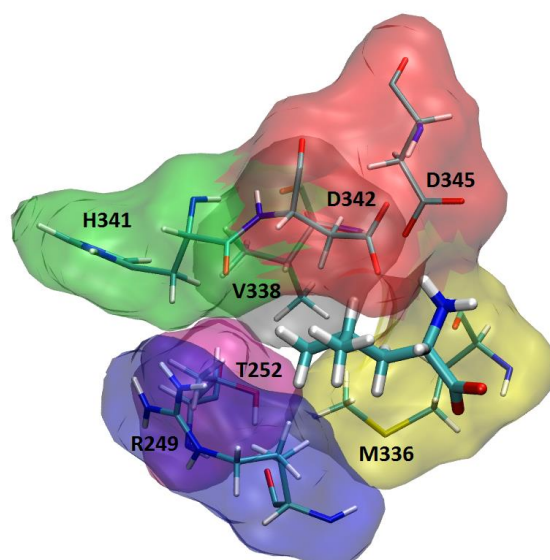
Sustav / interakcija	T247Hy1-O / Å	T248NH-O3' / Å	D345-NH ₃ / Å
WT_Leu	2,40 ± 0,64	2,27 ± 0,41	1,75 ± 0,10
WT_Nva	2,19 ± 0,47	2,06 ± 0,18	1,77 ± 0,10
T252A_Leu	2,28 ± 0,45	2,12 ± 0,21	1,79 ± 0,11
T252A_Nva	2,08 ± 0,34	2,08 ± 0,20	1,77 ± 0,10
T252V_Leu	2,29 ± 0,53	2,11 ± 0,24	1,81 ± 0,12
T252S_Leu	2,27 ± 0,48	2,10 ± 0,25	1,81 ± 0,12



Slika 4.8. Vodikove veze između supstrata i aminokiselina T247/T248 u T252A_Leu sustavu.



Slika 4.9. Ionski most između D345 i amino skupine supstrata u T252A_Leu sustavu.



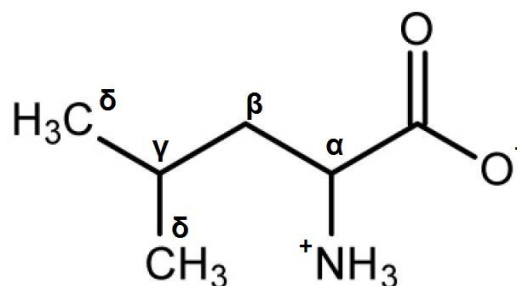
Slika 4.10. Smještaj aminokiselinskog dijela supstrata u aktivno mjesto u WT_Leu sustavu.

Supstrati pokazuju relativno slične RMSF vrijednosti (tablica D1 u Dodatku), izuzev norvalil-2'-adenozina u T252A sustavu za koji je ona oko 20% veća od ostalih. Najveća opažena razlika među sustavima leži u unutrašnjoj konformaciji aminokiselinskog dijela supstrata, koja je definirana torzijskim kutom N-C α -C β -C γ (slika 4.11). Vrijednosti kuta tijekom simulacije prikazane su na slici 4.12. Većinom se sustavi nalaze u konformaciji u kojoj vrijednost kuta iznosi -75° , dok se leucin-2'-adenozin u WT sustavu uglavnom nalazi u konformaciji opisanoj kutom $\pm 180^\circ$.^{*} Valja napomenuti kako leucil-2'-adenozin u sustavu T252A prelazi u takvu konformaciju neposredno prije 50 ns i zadržava se u njoj do kraja simulacije. Na slici 4.13

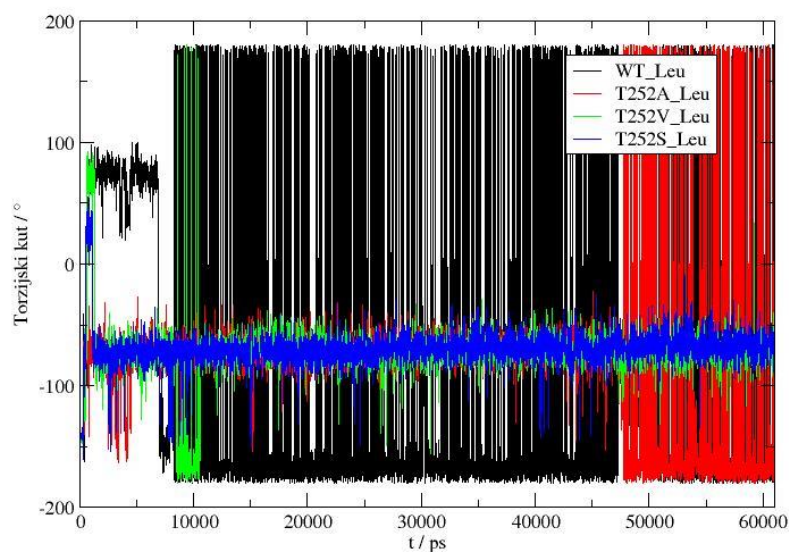
^{*} U WT sustavu leucin se nalazi kratko i u konformaciji od 75° , no kako ona pokazuje ista svojstva kao i konformacija -75° , radi jednostavnosti govorit će se samo o kutu od -75° .

REZULTATI

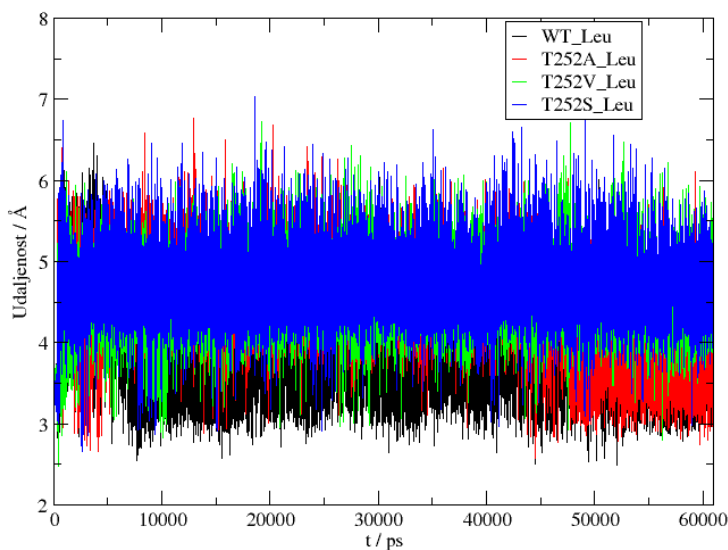
prikazana je udaljenost atoma C δ leucinskog dijela supstrata od kisika 3'OH skupine riboze supstrata. Najmanje udaljenosti odgovaraju vremenskim periodima koja su odgovarajuća konformaciji $\pm 180^\circ$. Srednje vrijednosti tih udaljenosti za sustave WT_Leu, T252_Leu, T252V_Leu i T252S_Leu iznose redom: $(3,92 \pm 0,47)$ Å, $(4,43 \pm 0,47)$ Å, $(4,56 \pm 0,36)$ Å, $(4,70 \pm 0,38)$ Å. Očito je kako je ona za WT_Leu sustav najmanja te graniči sa zbrojem van der Waalsovih radijusa hidroksilne i metilne skupine koji iznosi približno 3,5 Å. Norvalil-2'-adenozin se većinu vremena nalazi u konformaciji opisanoj kutom od -75° , no s obzirom na to da ima jednu metilnu skupinu manje od leucil-2'-adenozina promjena torzijskog kuta u $\pm 180^\circ$ ne odražava se na ostatak aktivnog mjesta, odnosno supstrata (slika D11 u Dodatku). Pregledom struktura dostupnih u CSD (*Cambridge Structural Database*) bazi podataka⁶⁵ zaključeno je kako su upravo ove dvije konformacije najzastupljenije kod oba aminokiselinska dijela, odnosno leucina i norvalina.



Slika 4.11. Aminokiselina leucin.

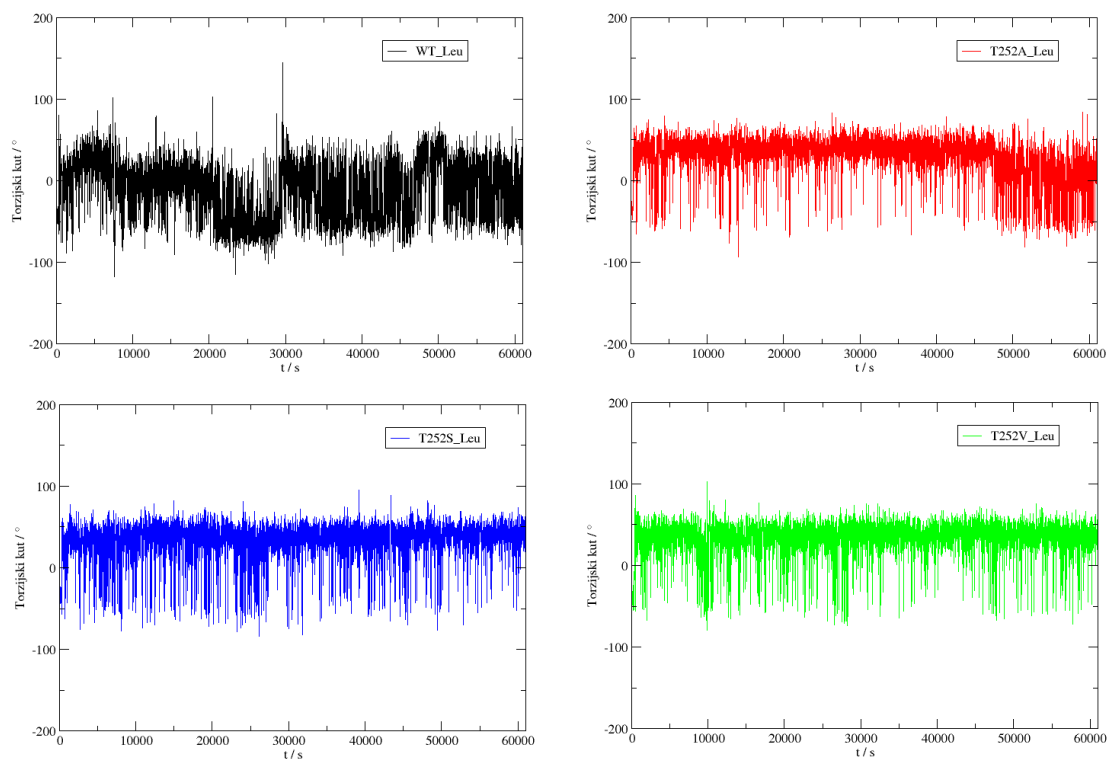


Slika 4.12. Vrijednosti torzijskog kuta N-C α -C β -C γ leucinskog dijela supstrata tijekom simulacije.

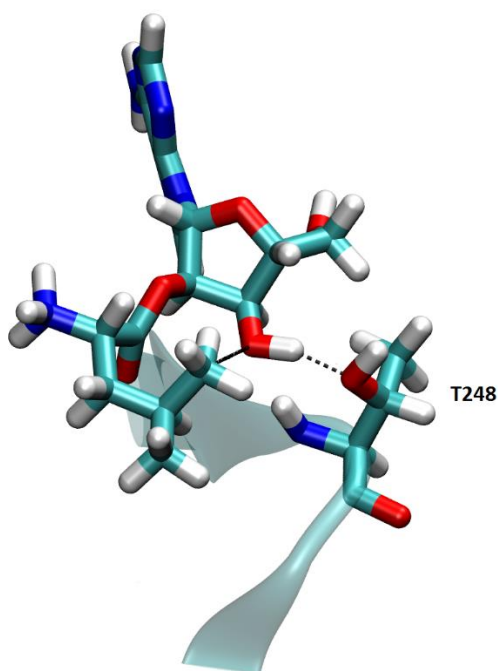


Slika 4.13. Udaljenost atoma C δ leucinskog dijela supstrata od vodika 3'OH skupine riboze tijekom simulacije.

3'OH skupina riboze supstrata također pokazuje različito ponašanje ovisno o sustavu, a ono se slaže s dva prethodno spomenuta opažanja. Naime, orijentaciju te skupine moguće je opisati torzijskim kutom C4-C3-O3'-HO3' (slika 4.14 i slike D12-D13 u Dodatku). U svim sustavima, izuzev WT_Leu većinu vremena vrijednost torzijskog kuta iznosi približno 45°. Najzastupljenija vrijednost u WT_Leu sustavu je približno 10°, a druga najzastupljenija vrijednost u svim sustavima je -50°. Za konformaciju opisanu kutom -50° karakteristična je vodikova veza koja nastaje između 3'OH skupine i kisika bočnog ogranka aminokiseline T248 (slika 4.15). Također, u toj konformaciji nije primijećena voda koju koordinira 3'OH skupina.



Slika 4.14. Vrijednost torzijskog kuta C4-C3-O3'-HO3' u sustavima sa supstratom leucil-adenozinom.

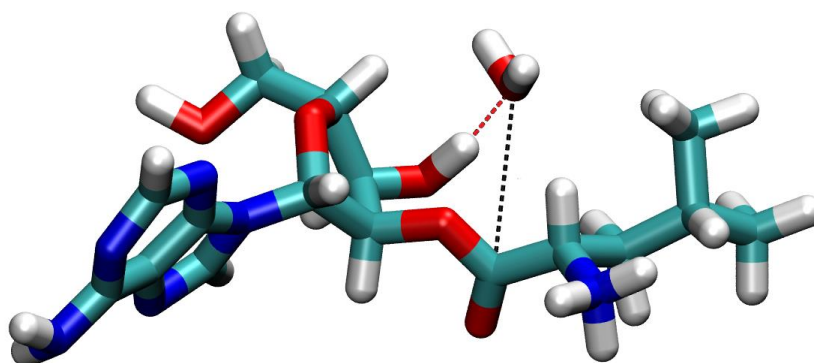


Slika 4.15. Vodikova veza između 3'OH skupine supstrata i kisika bočnog ogranka aminokiseline T248 označena je isprekidanom linijom. Punom linijom označena je udaljenost između najbližeg C δ atoma leucinskog dijela supstrata od kisika 3'OH skupine. Slika je prikaz WT_Leu sustava u konformaciji opisanoj s vrijednošću torzijskog kuta C4-C3-O3'-HO3' od -50°.

REZULTATI

4.1.4. Katalitička voda

Kao što je objašnjeno u poglavlju 2.4.5., pretpostavljeni mehanizam reakcije hidrolize supstrata odvija se s pomoću vode koju koordinira 3'OH skupina riboze A76. U našim simulacijama upravo je na tom mjestu primijećena voda koja se dugo zadržava što je u skladu s predviđenim reakcijskim mehanizmom. S obzirom na geometriju aktivnog mjesta, udaljenost koordinirane vode od karbonilnog ugljika ovisi o torzijskom kutu C4-C3-O3'-HO3' (slika 4.16). Kako je ustanovljena razlika u vrijednosti tog kuta u WT_Leu sustavu u odnosu na ostale, mjerena je udaljenost kisika koordinirane vode od karbonilnog ugljika supstrata. Prosječne vrijednosti mjerenih udaljenosti prikazane su u tablici 4.4 te se jasno uočava kako svi sustavi poprimaju vrlo slične vrijednosti, s izuzetkom WT_Leu ($4,67 \pm 0,47$ Å) gdje je ta udaljenost za oko 1 Å veća od ostalih.



Slika 4.16. Leucil-2'-adenozin iz aktivnog mjesta T252A sustava i voda koordinirana 3'OH skupinom riboze, a njihova udaljenost označena je crvenom isprekidanom linijom. Crnom isprekidanom linijom označena je udaljenost između kisika koordinirane vode i karbonilnog ugljika supstrata. Na slici je prikazan T252A_Leu sustav u kojemu je vrijednost torzijskog kuta N-C α -C β -C γ približno -75° .

Tablica 4.4. Prosječne udaljenosti kisika vode koordinirane 3'OH skupinom riboze sustrata od karbonilnog ugljika supstrata.

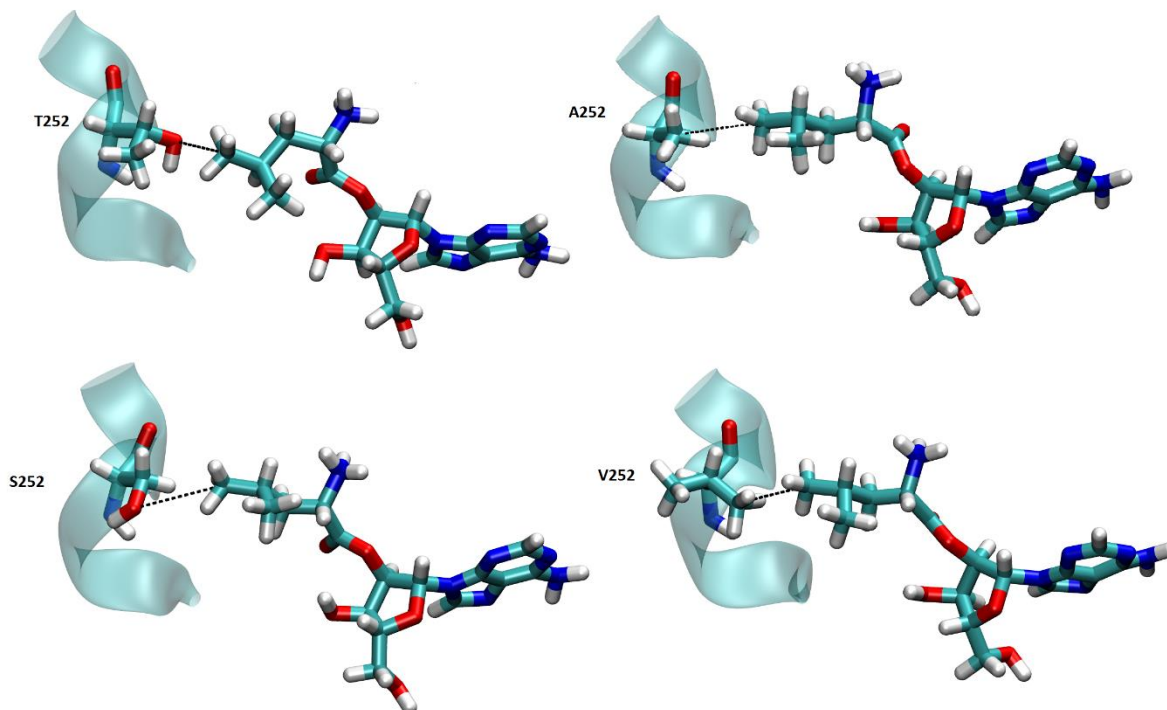
SUSTAV	UDALJENOST / Å
WT_Leu	$4,67 \pm 0,47$
WT_Nva	$3,62 \pm 0,33$
T252A_Leu	$3,86 \pm 0,47$
T252A_Nva	$3,71 \pm 0,38$
T252V_Leu	$3,76 \pm 0,39$
T252S_Leu	$3,69 \pm 0,36$

4.1.5. Diskriminatorsna aminokiselina

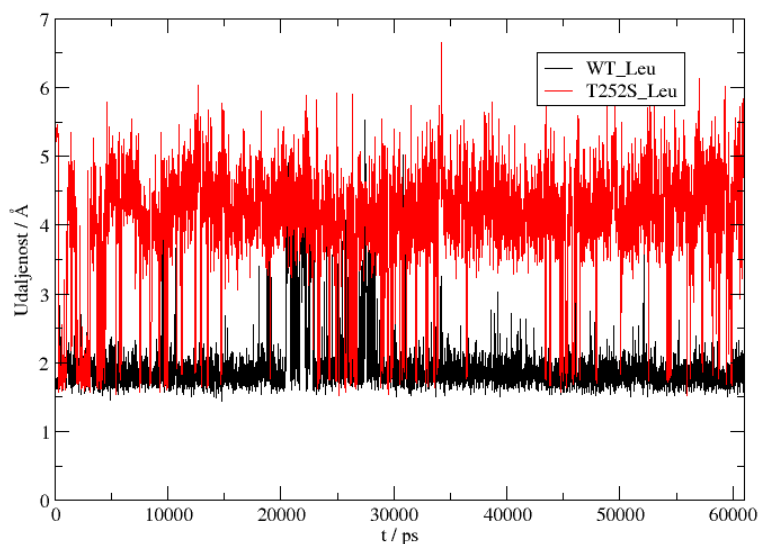
Mutacije na poziciji 252 (slika 4.17) napravljene su kako bi se dokučio mehanizam diskriminacije supstrata. Za sva tri mutanta, T252A, T252V i T252S, ustanovljeno je kako se

REZULTATI

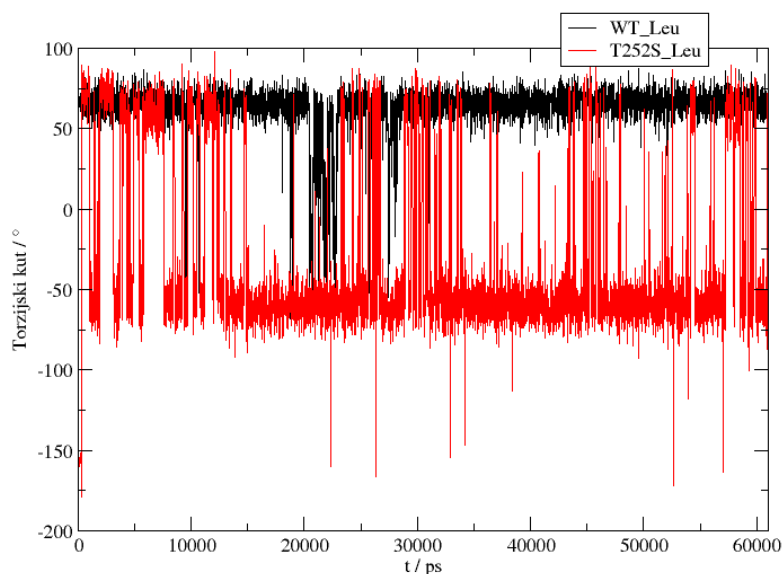
ponašaju slično, a to ponašanje je različito od WT. Kod sva tri mutanta konformacija leucinskog dijela supstrata većinu vremena opisana je torzijskim kutom -75° , a koordinirana voda nalazi se otprilike 1 Å bliže karbonilnom ugljiku nego što je to slučaj u divljem tipu. Kako bi se procijenila prostorna sloboda supstrata u aktivnom mjestu mjerena je udaljenost atoma C δ leucina od najbližeg mu teškog atoma bočnog ogranka diskriminatorne aminokiseline. Dobivene vrijednosti su za sustave WT_Leu, WT_Nva, T252A_Leu, T252A_Nva, T252V_Leu i T252S_Leu iznosile: $(3,49 \pm 0,29)$ Å, $(3,59 \pm 0,33)$ Å, $(4,21 \pm 0,48)$ Å, $(4,24 \pm 0,49)$ Å, $(3,77 \pm 0,30)$ Å i $(4,07 \pm 0,54)$ Å. Dakle, udaljenost je najveća u slučaju alanina, a potom serina, dok se valin i u konačnici treonin nalaze najbliže supstratu. Ustanovljeno je i kako hidroksilna skupina T252 stvara stabilnu vodikovu vezu s kisikom iz okosnice R249 tijekom cijele simulacije. Za razliku od T252, hidroksilna skupina S252 istu vodikovu vezu radi znatno rjeđe (slika 4.18). Oba bočna ogranka moguće je opisati i torzijskim kutom N-C α -C β -O γ čije su vrijednosti prikazane na slici 4.19. S obje slike moguće je zaključiti kako se aminokiselinski ogranci ponašaju znatno drugačije. Promatrajući RMSF vrijednosti (slika 4.5) vidljivo je kako diskriminatorna aminokiselina manje fluktuirá pored leucil- nego norvalil-2'-adenozina, a razlike među mutantima su neznačajne.



Slika 4.17. Diskriminatorsna aminokiselina na poziciji 252 u sustavima sa supstratom leucil-adenozinom. Isprekidanom linijom prikazana je udaljenost najbližeg teškog atoma bočnog ogranka od C δ leucinskog dijela supstrata. U svim sustavima, izuzev WT leucin se nalazi u konformaciji opisanoj torzijskim kutom N-C α -C β -C γ -75° . Ta vrijednost u WT_Leu sustavu iznosi $\pm 180^\circ$.



Slika 4.18. Duljina vodikove veze između hidroskilne skupine X252 i kisika iz okosnice R249 tijekom simulacije.

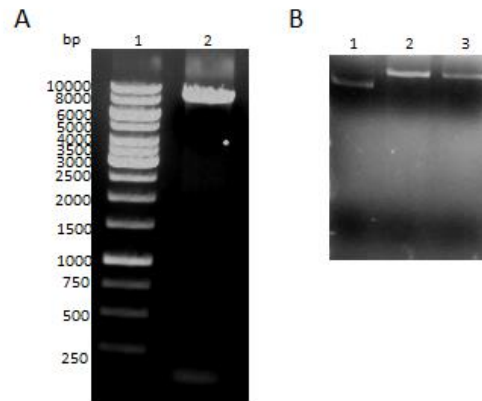


Slika 4.19. Vrijednosti torzijskog kuta N-C α -C β -O γ diskriminatorne aminokiseline.

4.2. Ciljana mutageneza

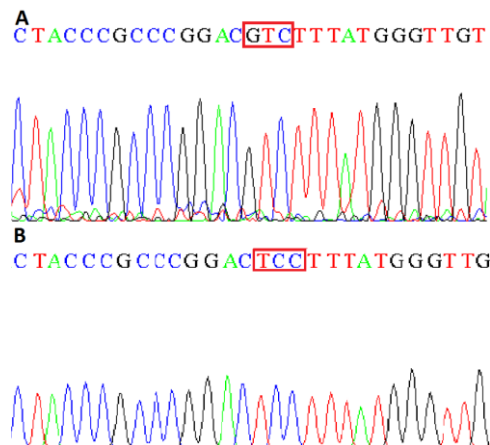
U prethodnom poglavlju opisani su rezultati simulacija molekularne dinamike, a oni sugeriraju kako mutacija diskriminatorne aminokiseline na poziciji 252 u serin ili valin smanjuje sposobnost diskriminacije pripadne aminokiseline – leucina. S obzirom na to da su ti rezultati u suprotnosti s literaturnim kinetičkim podacima o mutantima T252S i T252V (vidi poglavlje 2.4.4) odlučili smo sami testirati rezultate dobivene računalnim metodama.

Gen za LeuRS mutiran je metodom ciljane mutageneze koristeći početnice i postavke PCR-a kao što je opisano u poglavlju 3.3.2. Uspješnost PCR-a provjerena je agaroznom gel-elektroforezom, a rezultati su prikazani na slici 4.19. Sa slike 4.19 A vidljivo je kako je produkt PCR reakcije veličine oko 8000 bp što odgovara predviđenoj veličini vektora pET28b s ugrađenim genom za mutant LeuRS_T252S koja iznosi oko 7950 bp. Pri dnu jažice s uzorkom nalaze se dimeri početnica. Na slici 4.19 B prikazani su kalup i oba produkta, što pokazuje da su oba iste veličine, a nalaze se više od plazmida, što je očekivano jer su linearni.



Slika 4.19. Gel-elektroforeza na 1 % gelu agaroze. A) U jažicama se nalaze 1 – *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* i 2 – produkt PCR-a dobiven s početnicama T252S_F i T252S_R. B) U jažicama se nalaze: 1 – kalup pET28b_LeuRS_T252S, 2 – PCR produkt T252V i 3 - PCR produkt T252S.

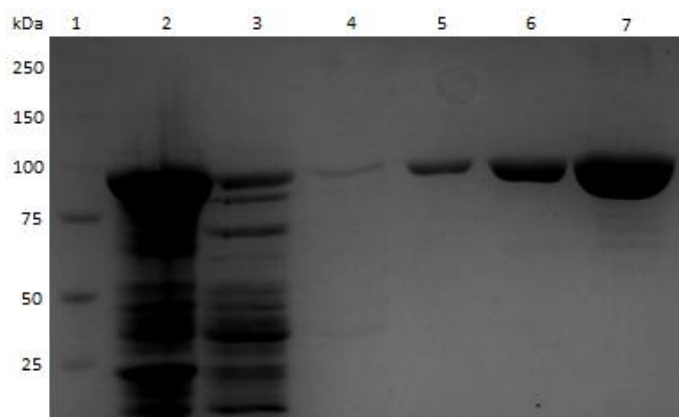
PCR produkti za koje je na agaroznoj gel-elektroforezi ustanovljeno da veličinom odgovaraju željenim produktima su cirkularizirani s pomoću T4-DNA-ligaze i pročišćeni koristeći QIAquick Gel Extraction Kit (*Qiagen*) kako bi se uklonili svi enzimi i soli iz smjese. Ligacijom i pročišćavanjem osigurana je veća uspješnost elektroporacije BL21(DE3) stanica. Stanice su prvo uzgojene na krutom LB mediju s antibiotikom kako bi narasle samo bakterije koje su primile plazmid, a zatim je uzgojena prekončna kultura iz koje je s pomoću QIAprep Spin Miniprep Kit-a (*Qiagen*) izoliran plazmid. Plazmidi su poslani na sekvenciranje u servis tvrtke *Macrogen*. Dijelovi kromatograma sekvenciranja prikazani su na slici 4.20. Označene su uspješno unesene željene mutacije i samim time priređeni geni za prekomjernu ekspresiju mutanata LeuRS_T252S i LeuRS_T252V.



Slika 4.20. Dio kromatograma sekvenciranja plazmida dobivenih PCR-om. A – plazmid s genom za mutant LeuRS_T252V i B – plazmid s genom za mutant LeuRS_T252S. Crvenim kvadratićem označeni su promijenjeni kodoni.

4.3. Pročišćavanje mutanata leucil-tRNA-sintetaze

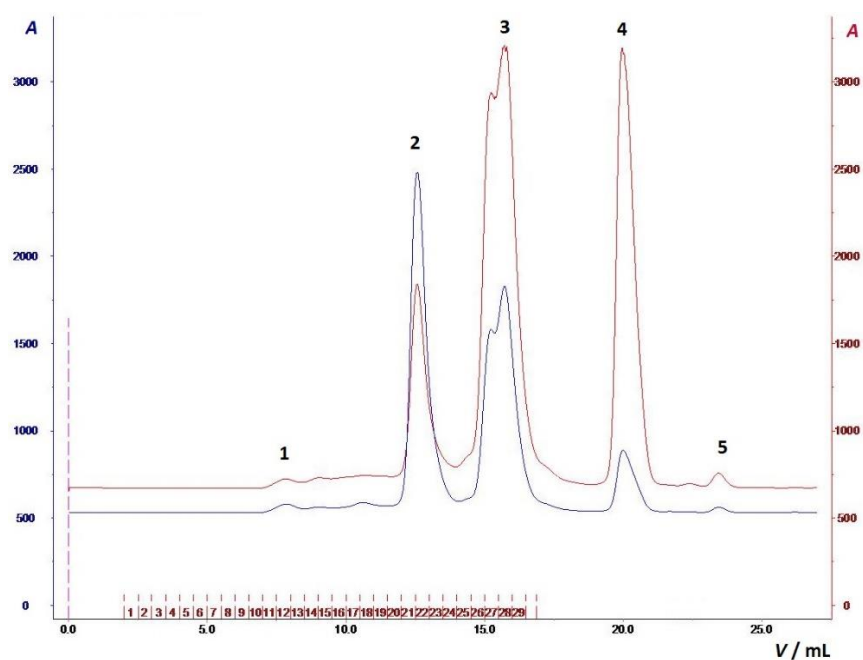
Mutanti su dobiveni prekomjernom ekspresijom kao što je opisano u poglavlju 3.4.1., pročišćeni afinitetnom kromatografijom (poglavlje 3.4.3.), a zatim ih je bilo potrebno dodatno pročistiti gel-filtracijom kao što je opisano u poglavlju 3.4.7. Kako bi se provjerila uspješnost pročišćavanja sakupljane frakcije su analizirane SDS-gel-elektroforezom (slika 4.21).



Slika 4.21. Analiza frakcija prikupljenih pročišćavanjem mutanta LeuRS_T252S SDS-elektroforezom. U jažicama se redom nalaze: 1 – *Protein Precision Plus Standards*, 2 – talog nakon soniciranja, 3 – nevezana frakcija na Ni-NTA kolonu, 4 – ispiranje puferom A, 5 – ispiranje puferom B, 6 – ispiranje puferom C i 7 – frakcije sakupljene eluiranjem s puferom D.

S gela je moguće zaključiti kako je protein uspješno eksprimiran. Naime, veličina proteina je oko 98,2 kDa, a najveće vrpce nalaze se u ravni sa standardom veličine 100 kDa. S obzirom da se u talogu nakon soniciranja nalazi velika količina ciljnog proteina, moguće je kako je pri ekspresiji djelomično završio u inkluzijskim tijelima ili da sonikacija nije bila u potpunosti uspješna. Gledajući nevezanu frakciju vidljivo je kako se ostali stanični proteini ne vežu nespecifično na kolonu. U konačnici, frakcije sakupljene ispiranjem puferima A, B, C i D sugeriraju kako je većina željenog proteina eluirana s puferom D. SDS-gel mutanta T252V nije prikazan u ovom radu jer je ekspresija bila jednako uspješna, a pročišćavanjem je dobiven jednako čist protein.

S obzirom da se leucil-tRNA-sintetaza pročišćava s Leu-AMP vezanim u sintetsko aktivno mjesto potrebno ga je ukloniti iz istog. Postupak prenošenja leucina na tRNA i gel-filtracije opisan je u poglavlju 3.4.7. Na slici 4.22 prikazan je kromatogram pročišćavanja mutanta LeuRS_T252S.



Slika 4.22. Gel-filtracijski kromatogram pročišćavanja mutanta LeuRS_T252S mutanta. Prikazane su apsorbancije pri valnim duljinama 280 nm (plavo) i 260 nm (crveno). Pri dnu su označene sakupljane frakcije. Vrpce su označene brojevima: 1 – kompleks LeuRS_T252S:Leu-tRNA^{Leu}, 2 - LeuRS_T252S, 3 - Leu-tRNA^{Leu}, 4 – AMP i ATP i 5 – nečistoće.

Iz kromatograma je vidljivo kako je LeuRS_T252S uspješno odvojen od Leu-tRNA^{Leu}. Vrpca 1 predstavlja kompleks enzima i tRNA koji nije razbijen povećanjem ionske jakosti otopine, ali s obzirom na intenzitet vrpce vidljivo je kako je ta količina vrlo mala. Vrpca 2 ima veću apsorbanciju pri valnoj duljini 280 nm nego 260 nm što je karakteristika proteina te je za nju zaključeno kako sadrži pročišćeni protein. Vrpca 3 ima obrnut trend apsorbancije u odnosu na vrpcu 2 i ona vjerojatno sadrži tRNA. K tome, s obzirom na to da je LeuRS veći od tRNA^{Leu} očekivano je kako će se prije eluirati s gel-kromatografske kolone. Vrpca 4 ima jaku apsorbanciju pri valnoj duljini 260 nm i vrlo slabu pri 280 nm te ona sadrži AMP i ATP koji je dodan u reakciju aminoaciliranja. Vrpca 5 predstavlja ostale nečistoće. Frakcije proteina su sakupljene, određena im je koncentracija te im je promijenjen pufer u onaj s 10 % glicerolom i spremljene na -80°. Kromatogram pročišćavanja LeuRS_T252V nije prikazan u ovom radu jer je protein pročišćen s jednakom uspješnošću kao i ovdje prikazan LeuRS_T252S.

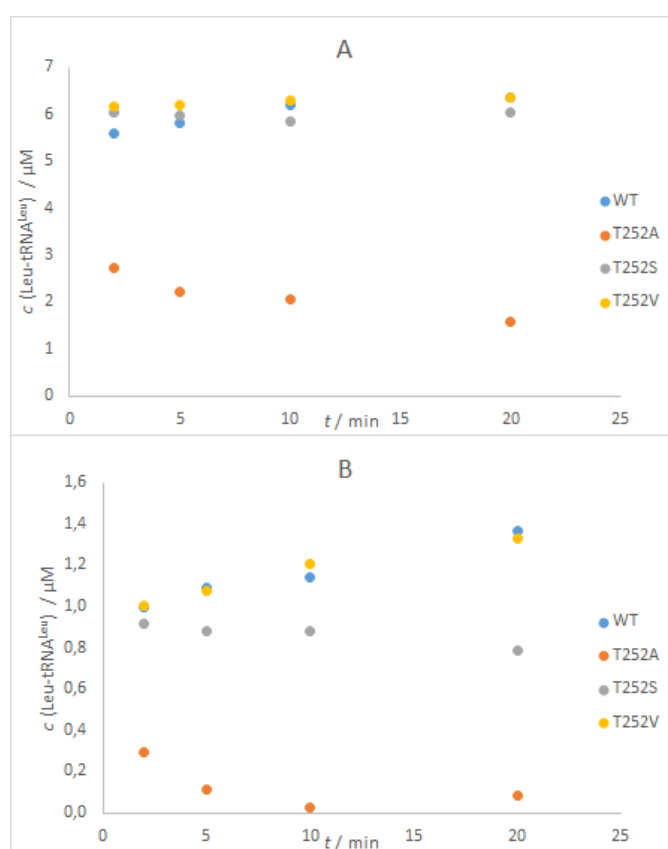
4.4. Ukupna reakcija aminoaciliranja

Kako bismo eksperimentalno provjerali opažanja iz simulacija MD bilo je potrebno napraviti kinetička mjerenja simuliranih mutanata, T252S i T252V te ih usporediti s WT i mutantom T252A. Mjerenja su izvršena kao što je opisano u poglavlju 3.5.1. Scintilacijskim brojanjem praćena je koncentracija radioaktivno obilježene [¹⁴C]Leu-tRNA^{Leu}, a njene koncentracije izračunate su s pomoću baždarnih pravaca. Napravljena su dva seta eksperimenata u kojima su

REZULTATI

se razlikovale koncentracije enzima i tRNA. Sva mjerenja napravljena su dva puta te su računane prosječne vrijednosti, a tijek reakcije prikazan je na slici 4.23.

Na slici 4.23. može se vidjeti kako rezultati pokazuju isti trend neovisno o uvjetima A (100 nM enzim i 10 μ M tRNA) ili B (5 μ M enzim i 1 μ M tRNA). U ovim eksperimentima mutanti T252S i T252V se ponašaju sličnije WT nego mutantu T252A. Naime, plato koncentracije [14 C]Leu-tRNA^{Leu} im je vrlo sličan. Dapače, kod mutanta T252A uočljiv je pad koncentracije [14 C]Leu-tRNA^{Leu} nakon 2. minute reakcije što je posljedica njegove deacilacijske sposobnosti. Kod mutanata T252S i T252V takvo što nije moguće primijetiti, iz čega zaključujemo da oni vjerojatno tu sposobnost nemaju.



Slika 4.23. Kinetika reakcije ukupnog aminoaciliranja za WT i tri mutanta T252S, T252S i T252V LeuRS. Eksperimenti su provedeni u dva različita postava A - 100 nM enzim i 10 μ M tRNA i B - 5 μ M enzim i 1 μ M tRNA. Sva mjerenja su napravljena dva puta, a rezultati su prikazani kao njihova srednja vrijednost.

5. Rasprava

Aminoacil-tRNA-sintetaze su enzimi koji kataliziraju nastajanje kovalentne veze između aminokiseline i molekule tRNA te na taj način sudjeluju u procesu translacije što ih čini zanimljivima za istraživanje.^{1,2} Jedna od interesantnijih tema istraživanja aaRS su mehanizmi kojima one ostvaruju točnost aminoaciliranja. Naime, o uspješnosti diskriminacije nepripadne aminokiseline ovisi točnost s kojom se sintetiziraju proteini. Jedan od primjera tih enzima je leucil-tRNA-sintetaza koja katalizira prijenos leucina na tRNA^{Leu} i koja je tema ovog rada. Poznato je kako LeuRS može katalizirati aktivaciju, a u nekim slučajevima i prijenos, i drugih aminokiselina, poput: izoleucina, valina, metionina, norvalina, norleucina, homocisteina, homoserina i α -aminobutirata.¹²⁻¹⁵ Glavna prijetnja točnosti LeuRS je neproteinogena aminokiselina norvalin koja se nakuplja u *E. coli* u mikroaerobnim uvjetima, a ne izoleucin kao što se donedavno smatralo.^{8,10,16} Kinetička istraživanja grupe I. Gručić-Sovulj pokazala su kako sintetsko mjesto LeuRS diskriminira Ile s faktorom oko 31000, dok je norvalin diskriminiran s faktorom od samo 116.¹⁰ Ukoliko sintetsko mjesto aaRS ne diskriminira nepripadni supstrat s faktorom od barem 3300 postoji potreba za mehanizmom popravka pogreške.⁸ Tri su osnovna enzimska mehanizma popravka pogreške kod aaRS. Jedan je popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline, a dva su popravka prije prijenosa, tRNA-ovisan i tRNA-neovisan.³⁶ Kod LeuRS dominantan je prvi navedeni mehanizam, a odvija se u domeni specifičnoj za IleRS, LeuRS i ValRS koja se naziva CP1 domenom ili domenom za popravak pogreške.¹⁰ Supstrat te reakcije je aa-tRNA^{Leu}. Postavlja se pitanje kako aktivno mjesto domene za popravak pogreške diskriminira supstrate, odnosno koji je mehanizam na temelju kojeg se Leu-tRNA^{Leu} ne hidrolizira efikasno u njemu.¹⁰ Kako bismo dobili odgovor na to pitanje simulirana je molekularna dinamika LeuRS iz *E. coli* (WT i mutant T252A) s dva različita supstrata, leucil-2'-adenozinom i norvalil-2'-adenozinom. Leucil-2'-adenozin je analog supstrata koji se vrlo sporo hidrolizira, dok je norvalil-2'-adenozin analog supstrata koji se brzo hidrolizira, budući da su brzine hidrolize za Leu-tRNA^{Leu} i Nva-tRNA^{Leu} 0,098, to jest 310 s^{-1} .¹⁰

5.1. Diskriminacija leucina u aktivnom mjestu

Općeprihvaćeni model koji opisuje uspješnost aminoaciliranja tRNA s nepripadnim aminokiselinama od strane aaRS koje imaju mogućnost popravka pogreške postavio je Fersht.¹⁷ Ovaj model predlaže da je sintetsko aktivno mjesto prvo, grubo sito koje dopušta vezanje pripadne aminokiseline i svih onih koje su manje od nje. Dakle, te aminokiseline mogu biti aktivirane i dijelom prenesene na tRNA^{Leu}. Drugo, fino sito je aktivno mjesto domene za popravak pogreške, ono je finije i kroz njega mogu proći aminokiseline manje od pripadne. Model sugerira kako se u aktivno mjesto domene za popravak pogreške Leu-tRNA^{Leu} ne može

vezati, dakle da je osnovni mehanizam ostvarivanja specifičnosti diskriminacija u osnovnom stanju. No, kinetički podaci pokazuju kako ona ipak biva hidrolizirana.^{8,10} Doduše, ta brzina je vrlo mala, ali nije zanemariva, a da bi uopće bila hidrolizirana mora se u vezati u aktivno mjesto. Kako bi nadopunili rezultate dobivene kinetičkim mjerenjima, grupa I. Gruić-Sovulj koristila je termodinamičke metode da bi odredila K_d vrijednost za vezanje Leu-tRNA^{Leu} na LeuRS. Izotermalna titracijska kalorimetrija (ITC) korištena je kako bi se odredio afinitet LeuRS prema leucil- (Leu2AA), odnosno norvalil-2'-aminoadenozinu (Nva2AA) – analogima supstrata koji ne mogu biti hidrolizirani. Određivane su K_d vrijednosti prema divljem tipu enzima, samostalno eksprimiranoj CP1 domeni te mutantu koji omogućava hidrolizu Leu-tRNA^{Leu}, T252A. Zaključeno je kako je konstanta disocijacije za Leu2AA svega 10 puta veća od one za Nva2AA te da nema značajne razlike u K_d vrijednosti za potpuni enzim u odnosu na samostalno eksprimiranu CP1 domenu. Iako uzrokuje bržu hidrolizu Leu-tRNA^{Leu} u odnosu na WT, mutacija T252A ne mijenja afinitet enzima prema Leu2AA. Također, određivan je afinitet cijele aa-tRNA^{Leu} prema hidrolitički neaktivnom D345A mutantu metodom termoforeze, a rezultati sugeriraju kako nema razlike u vezanju Leu-tRNA^{Leu} i Nva-tRNA^{Leu}, a što je vjerojatno posljedica velikog broja interakcija koje tRNA^{Leu} ostvaruje s enzimom.

S obzirom na to da konstante disocijacije sugeriraju kako se supstrati vežu bez prevelike razlike u afinitetu i to da je konstanta brzine hidrolize 1000 puta veća za Nva- nego za Leu-tRNA^{Leu} nameće se zaključak kako se diskriminacija odvija u katalitičkom koraku. Postavlja se pitanje koji je molekularni mehanizam te diskriminacije. U ovom radu primijenili smo simulacije MD i kinetičke metode kako bismo dobili odgovor na njega. Opažanja u simulacijama molekularne dinamike moguće je podijeliti u dva bitna segmenta. Prvo, neovisno o simuliranom sustavu interakcije zaslužne za smještaj supstrata su postojane i nepromijenjene. Sve vodikove veze između proteina i adenzinskog dijela supstrata su sačuvane i snažne, a isto vrijedi i za glavne interakcije s aminokiselinskim dijelom supstrata. To su ionski most između D345 i amino skupine te vodikova veza između T247 i karbonilnog kisika. U konačnici, snažna i postojana je i vodikova veza između okosnice T248 i kisika 3'OH skupine riboze. Ova opažanja idu u prilog eksperimentalnim podacima koji govore kako je razlika u konstanti disocijacije Leu2AA i Nva2AA mala te da na nju ne utječe mutacija T252A. Osim toga, ovi rezultati su u suprotnosti s rezultatima Lee i suradnika⁵⁰ koji pretpostavljaju kako leucin vrlo brzo nakon početka simulacije MD disocira iz aktivnog mjesta, dok izoleucin ostaje stabilno vezan. Disocijacija je vjerojatno posljedica činjenice kako je ligand u njihovim simulacijama sama aminokiselina (Ile/Leu) koja ostvaruje znatno manje interakcija nego leucil-2'-adenozin, koji je

samim time znatno realniji prikaz supstrata Leu-tRNA^{Leu}. Drugo, uočeno je kako se aminokiselinski dio supstrata, neovisno o sustavu, u aktivnom mjestu većinu vremena nalazi u dvije konformacije opisane torzijskim kutom N-C α -C β -C γ koji iznosi -75° , odnosno $\pm 180^\circ$. Glavna razlika između leucina i norvalina proizlazi iz jedine strukturne razlike među njima, a to je jedna metilna skupina više koju ima leucin. Naime, u WT_Leu sustavu vezanje leucina u konformaciji $\pm 180^\circ$ uzrokuje kaskadu događaja koja započinje približavanjem metilne skupina C δ 3'OH skupini riboze A76. S obzirom na to da norvalin ne posjeduje tu skupinu, vezanje u konformaciji -75° ili $\pm 180^\circ$ ne uzrokuje nikakvu značajnu promjenu unutar aktivnog mjesta niti na razini supstrata. Približavanje metilne skupine leucina hidroksilnoj skupini riboze u WT_Leu sustavu ih dovodi do udaljenosti ($3,92 \pm 0,47$) Å što je vrlo blizu zbroja njihovih van der Waalsovih radijusa ($3,5$ Å)⁶⁶ te samim time gotovo do steričkog sudara. To za posljedicu ima promjenu vrijednosti torzijskog kuta supstrata C4-C3-O3'-HO3' od 45° prema vrijednostima 10° i -50° , a ta rotacija opisuje odmicanje/okretanje 3'OH skupine. Važnost tog podatka leži u činjenici da je upravo ta skupina ključna za mehanizam reakcije hidrolize. Naime, računalne simulacije QM/MM sugeriraju kako se reakcija hidrolize odvija na način da 3'OH skupina koordinira vodu koja se deprotonira i kao nastali nukleofil OH⁻ napada vezu između karbonilnog ugljika aminokiselinskog dijela supstrata i 2' kisika riboze supstrata.^{47,47} K tome u prilog idu i neobjavljeni kinetički rezultati grupe I. Gruić-Sovulj koji pokazuju kako se supstrat bez 3'OH skupine ne hidrolizira. U našim simulacijama uočena je molekula vode koju koordinira 3'OH skupina te je ona identificirana kao molekula vode koja ima potencijal biti katalitička molekula vode. U WT_Leu sustavu primijećene su dvije stvari vezane uz dotične molekule vode. Prvo, pri vrijednostima torzijskog kuta C4-C3-O3'-HO3' oko 10° 3'OH skupina i dalje koordinira vodu, ali ona je sada udaljenija od karbonilnog ugljika aminokiselinskog dijela supstrata. Prosječna vrijednost te udaljenosti je za otprilike 1 Å veća nego u bilo kojem drugom sustavu. S obzirom da je poznato kako su sustavi WT_Nva, T252A_Leu i T252A_Nva produktivni, dok je WT_Leu neproduktivan postoji mogućnost kako sporija hidroliza, među ostalim, proizlazi iz udaljavanja katalitičke vode od veze koju treba napasti. Drugo, pri vrijednostima -50° 3'OH skupina ne koordinira vodu nego radi vodikovu vezu s bočnim ogrankom aminokiseline T248. Ovo opažanje u izravnoj je suprotnosti s rezultatima Hagiware i autora, koji pretpostavljaju produktivnu konformaciju kada je spomenuta vodikova veza ostvarena.⁴⁹ S obzirom na to da su njihove simulacije 60 puta kraće od naših vjerujemo kako naše opažanje nosi veći značaj. Gledajući vremenski udio u simulaciji tijekom kojeg 3'OH skupina koordinira vodu primijećeno je kako je on najmanji u WT_Leu sustavu te iznosi približno 55 %. Taj broj postaje značajan kada ga usporedimo s udjelima u WT_Nva,

T252A_Leu i T252A_Nva sustavima koji iznose 85-90 %. Dakle, vidimo kako se neproduktivnost odražava kroz dva efekta – prevelika udaljenost katalitičke vode i smanjeno vrijeme tijekom kojega katalitičku vodu koordinira 3'OH skupina. S obzirom da je cijela kaskada događaja posljedica da se leucin nalazi u konformaciji $\pm 180^\circ$ napravljena je analiza torzijskih kutova u CSD (*Cambridge Structural Database*) bazi podataka za sve strukture koje sadrže leucin i norvalin. Zaključeno je kako su upravo konformacije $\pm 70^\circ$ i $\pm 180^\circ$ najčešće za obje aminokiseline, s tim da je prva konformacija dva to tri puta zastupljenija. U slučaju norvalina stvar je relativno jednostavna, dvije konformacije koje su primijećene u simulacijama MD su sudeći prema kristalografskim podacima i dvije najčešće konformacije. Niti jedna konformacija u simulacijama ne uzrokuje promjenu unutar aktivnog mjesta koja bi mogla dovesti do neproduktivnog sustava, a to i je u skladu s eksperimentalnim podacima. S leucinom je situacija malo drugačija, ali i dalje u skladu s eksperimentalnim podacima. Mutant T252A tijekom gotovo cijele simulacije pokazuje svojstva produktivnog sustava, a WT upravo suprotno. Iako kristalografski podaci sugeriraju kako je konformacija koja bi trebala biti produktivna (-75°) najčešća za leucin on se u WT sustavu u njoj nalazi manji dio vremena. Moguće je kako struktura aktivnog mjesta ne dopušta ostvarivanje dovoljno povoljnih interakcija u toj konformaciji. Eksperimentalni podaci govore kako je diskriminatorna aminokiselina T252 ključna za diskriminaciju Leu-tRNA^{Leu}, a s time se poklapaju i rezultati simulacija. Naime, kada se na poziciji 252 nalazi alanin, konformacija leucina koja uzrokuje neproduktivnost je znatno manje vremenski zastupljena, 15 % naspram 85 %.

Dakle, s obzirom na kinetičke i termodinamičke rezultate te MD simulacije može se zaključiti kako se specifičnost prema supstratu aktivnog mjesta domene za popravak pogreške leucil-tRNA-sintetaze ostvaruje kroz kinetičku diskriminaciju. Leucin, supstrat koji treba biti diskriminiran, u aktivnom mjestu većinu vremena se smješta u konformaciji koja dovodi do slijeda događaja koji ne pogoduju zbivanju reakcije, odnosno u neproduktivnu konformaciju. Uspoređujući WT i mutant T252A zaključujemo kako WT LeuRS otežava vezanje leucina u produktivnoj konformaciji (-75°). Također, zaključujemo kako je takvo ponašanje posljedica aminokiseline T252. S obzirom na to, postavili smo si sljedeće pitanje – koja je kemijska pozadina kojom T252 pomaže u ostvarivanju diskriminacije LeuRS prema leucinu?

5.2. Uloga diskriminatorne aminokiseline

Kako bismo pokušali razjasniti koji je kemijski mehanizam kojim T252 utječe na diskriminaciju leucina priredili smo i simulirali dinamiku dva dodatna sustava – T252S_Leu i T252V_Leu. Naime, te mutacije su izabrane iz nekoliko razloga. Prvo, serin i valin imaju svaki po jedno

svojstvo slično treoninu, a koje bi moglo biti ključno za ostvarivanje diskriminacije. Serin ima hidroksilnu skupinu, a valin je veličinom i strukturom vrlo sličan treoninu. Pretpostavka je bila kako se diskriminacija temelji ili na steričkim smetnjama između treonina/valina i leucina, ili na nepovoljnim interakcijama hidroksilne skupine treonina/serina i metilne skupine leucina. Drugo, djelomična istraživanja, simulacije MD i praćenje kinetike, na ovim mutantima napravila je grupa S. Martinis, no postoje određene sumnje u rezultate istih.¹⁸ Kinetički rezultati sugeriraju kako mutant T252S hidrolizira Leu-tRNA^{Leu}, a T252V ne, no ti rezultati su dobiveni u uvjetima ustaljenog stanja što može dovesti do krive mehanističke interpretacije.¹⁰ Naime, u uvjetima ustaljenog stanja opažena brzina reakcije ograničena je najsporijim korakom u cjelokupnom mehanizmu, a kada govorimo o popravku pogreške nakon prijenosa aminokiseline, najsporiji korak reakcije je disocijacija produkta ili konformacijska promjena koja joj prethodi.¹⁰ Što se pak simulacija MD tiče, one su rađene u trajanju od svega 1 ns, što zasigurno nije dostatno kako bi se dobio potpuni uvid u sustav. Naime, naše simulacije traju 61 ns od čega je 1 ns ekvilibracija sustava. K tome, simulirali su sustave bez supstrata u aktivnom mjestu. Glavni cilj tog istraživanja bio je proučiti geometriju aktivnog mjesta, pri čemu su zaključili kako T252S hidrolizira Leu-tRNA^{Leu} jer povećava ulaz u njega, a T252V ne jer ga smanjuje. U sklopu ovog rada simulirani su isti mutanti na 60 puta dužoj vremenskoj skali, a započeta su i kinetička istraživanja.

Hidrolitičku aktivnost smo okarakterizirali metodama molekularne dinamike kao što je objašnjeno u poglavlju 5.1., a rezultati na mutantima T252S i T252V sugeriraju kako oni ne diskriminiraju leucin. Naime, u tim sustavima leucin se većinu vremena nalazi u konformaciji -75° , 3'OH skupina u konformaciji 45° , a udaljenost katalitičke vode je gotovo jednaka onoj u sustavima WT_Nva, T252A_Leu i T252A_Nva za koje je poznato kako su hidrolitički aktivni. Proučavano je i ponašanje X252 u aktivnom mjestu. Izmjerena je udaljenost najbližeg teškog atoma bočnog ogranka X252 od C δ skupine leucina i ustanovljeno je kako treonin ($(3,49 \pm 0,29)$ Å) i valin ($(3,77 \pm 0,30)$ Å) ostavljaju najmanje prostora supstratu, alanin najviše ($(4,21 \pm 0,48)$ Å), dok se serin ($(4,07 \pm 0,54)$ Å) nalazi negdje između njih. No, ako su treonin i valin najbliže supstratu kako to da valin ne tjera leucin na vezanje u neproduktivnoj konformaciji. Mogući razlog tome je što su interakcije između bočnog ogranka valina i leucina znatno povoljnije od onih između treonina i leucina, pri čemu hidroksilna skupina treonina vjerojatno igra ključnu ulogu. Zašto hidroksilna skupina serina nije u stanju diskriminirati leucin? Osim što je udaljenost OH skupine serina u prosjeku preko 0,5 Å udaljenija, ona također nije jednako fiskirana. Naime, fiksiranju hidroksilne skupine doprinosi vodikova veza koju ona radi s

okosnicom R249, a u slučaju serina ta veza gotovo da i ne postoji. Osim toga, usporedbom torzijskog kuta vidljivo je kako se nalaze u potpuno dvije različite konformacije. Moguće je kako metilna skupina treonina, koja nedostaje serinu doprinosi fiksaciji koja je bitna za diskriminaciju. Iz ovih rezultata proizlaze dva zaključka. Prvo, T252S i T252V mutacije onemogućavaju diskriminaciju pripadnog leucina, odnosno Leu-tRNA^{Leu}. Drugo, diskriminacija je posljedica nepovoljnih interakcija hidroksilne skupine T252 i leucinskog dijela supstrata koje pogoduju prijelazu u neproduktivnu konformaciju. Uloga metilne skupine T252 vjerojatno je strukturna, što bi značilo da svojim interakcijama doprinosi fiksaciji T252, a samim time i diskriminaciji.

S obzirom na to da su naši rezultati u djelomičnoj suprotnosti s rezultatima grupe S. Martinis, odlučili smo provjeriti sposobnost ukupnog aminoaciliranja mutanata T252S i T252V te ih usporediti s WT i mutantom T252A. Ukupno aminoaciliranje smo provjerili tako da smo pratili nastajanje Leu-tRNA^{Leu}. Ako enzim ima hidrolitičku aktivnost onda će ona onemogućiti akumulaciju Leu-tRNA^{Leu}, jer će nastala Leu-tRNA^{Leu} biti pocijepana. Rezultati kinetičkih mjerenja sugeriraju kako su oba mutanta svojim ponašanjem sličnija WT nego mutantu T252A, odnosno da niti jedan od njih ne hidrolizira Leu-tRNA^{Leu}. I ovi rezultati su u djelomičnom neslaganju s onima grupe S. Martinis. Naime, njihovi kinetički podaci govore kako T252S ima hidrolitičku sposobnost prema Leu-tRNA^{Leu} u značajnoj mjeri. Osim toga, ovi rezultati nisu u slaganju s našim računalnim simulacijama koje sugeriraju kako tu sposobnost imaju oba enzima.

Prvo, treba imati na umu ograničenja ovdje primijenjenih kinetičkih metoda, koje ne daju nužno potpune informacije o hidrolitičkoj aktivnosti mutanata LeuRS te je plan u nastavku ovog istraživanja primijeniti kinetiku jednog kruga. Time bi bili sigurni da mjerimo izolirani korak deacilacije. Drugo, kao što grupa S. Martinis primjećuje u svojim simulacijama, postoji mogućnost da dotične mutacije utječu na strukturu aktivnog mjesta CP1 domene na način da ne dozvoljavaju vezanje supstrata. Naime, ne postoje niti kinetički niti termodinamički podaci na temelju kojih bi se moglo zaključiti kako se supstrat Leu-tRNA^{Leu} ili njegovi analozi vežu u to aktivno mjesto, a naše strukture mutanata dobivene su *in silico* iz strukture za koju je poznato da veže supstrat. To je jedan od mogućih razloga zašto postoji neslaganje između simulacija MD i eksperimentalnih rezultata. Kao što je već rečeno, smatramo da su simulacije grupe S. Martinis prekratke, stoga planiramo vršiti znatno duže simulacije MD za mutante bez supstrata u aktivnom mjestu kako bi vidjeli postoji li utjecaj na strukturu aktivnog mjesta na većoj vremenskoj skali.

6. Zaključak

- Neovisno o tome je li supstrat leucil-2'-adenozin ili norvalil-2'-adenozin ne postoji značajna razlika u interakcijama zaslužnim za njihov smještaj u aktivno mjesto domene za popravak pogreške leucil-tRNA-sintetaze.
- Mutacija diskriminatorne aminokiseline T252 u alanin, serin i valin ne utječe na interakcije koje služe sidrenju supstrata u aktivno mjesto.
- Diskriminacija pripadnog para Leu-tRNA^{Leu} temelji se na tome da se leucinski dio supstrata u hidrolitičko aktivno mjesto WT LeuRS veže u konformaciji oko $\pm 180^\circ$ što uzrokuje kaskadu događaja koja za posljedicu ima neproduktivnost sustava izraženu preko udaljavanja katalitičke vode od veze koju treba hidrolizirati i smanjenog vremenskog udjela tijekom kojega je ona prisutna u aktivnom mjestu.
- Prijelaz supstrata u neproduktivnu konformaciju reguliran je od strane diskriminatorne aminokiseline T252.
- Računalne simulacije sugeriraju kako je na molekularnoj razini diskriminacija posljedica nepovoljnih interakcija između nepolarne metilne skupine leucinskog dijela supstrata i hidroksilne skupine bočnog ogranka T252 te njenog pravilnog smještaja koji je osiguran vodikovom vezom s R249 i hidrofobnim interakcijama metilne skupine njenog bočnog ogranka.
- Kinetička istraživanja pokazala su da mutanti T252S i T252V akumuliraju Leu-tRNA^{Leu} u rangu divljeg tipa enzima, za razliku od mutanta T252A. To ne podupire rezultate računalnih simulacija koji sugeriraju da navedeni mutanti nemaju sposobnost diskriminacije Leu-tRNA^{Leu} i time bi je trebali hidrolizirati. Stoga, potrebno je napraviti kinetička mjerenja u uvjetima jednog kruga i dodatne simulacije MD kako bi se dobio bolji uvid u istraživane sustave te razjasnili kontradiktorni rezultati.

7. Literaturna vrela

1. J.J. Perona, I. Gruic-Sovulj, *Top Curr Chem* **344** (2013) 1-41.
2. M. Ibba, D. Soll, *Annu Rev Biochem* **69** (2000) 617-650.
3. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, W. H. Freeman & Company, New York, 2012, str. 853-864, 865-869, 888-892, 893-908.
4. D. L. Nelson and M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman & Company, New York, 2008, str. 977-992, 1021-1060, 1065-1094.
5. D. Voet and J. G. Voet, *Biochemistry*, John Wiley & Sons, New York, 2011, str. 1173-1212, 1260-1300, 1308-1407.
6. H. S. Zaher, R. Green, *Cell* **136** (2009) 746-762.
7. E. Giegé, M. Sissler, C. Florentz, *Nucleic Acids Res.* **26** (1998) 5017-5035.
8. N. Cvetic, A. Palencia, I. Halasz, S. Cusack, I. Gruic-Sovulj, *EMBO J* **33** (2014) 1639-1653.
9. M. Dulic, J. J. Perona, I. G. Sovulj, *J. Biol. Chem.* **53** (2014) 25381-25394
10. N. Cvetic, J.J. Perona, I. Gruic-Sovulj, *J. Biol. Chem.* **287** (2012) 25381-25394.
11. O. Nureki, D.G. Vassylyev, M. Tateno, A. Shimada, T. Nakama, S. Fukai, M. Konno, T.L. Hendrickson, P. Schimmel, S. Yokoyama, *Science* **280** (1998) 578-582.
12. S.A. Martinis, G.E. Fox, *Nucleic Acids Symp Ser* **36** (1997) 125-128.
13. J.F. Chen, N.N. Guo, T. Li, E.D. Wang, Y.L. Wang, *Biochemistry* **39** (2000) 6726-6731.
14. Y. Tang, D.A. Tirrell, *Biochemistry* **41** (2002) 10635-10645.
15. M.T. Boniecki, M.T. Vu, A.K. Betha, S.A. Martinis, *Proc Natl Acad Sci USA* **105** (2008) 19223-19228.
16. J. Soini, C. Falschlehner, C. Liedert, J. Bernhardt, J. Vuoristo, P. Neubauer, *Microb Cell Fact* **7** (2008) 30.
17. A.R. Fersht, *Biochemistry* **16** (1977) 1025-1030.
18. R.S. Mursinna, K.W. Lee, J.M. Briggs, S.A. Martinis, *Biochemistry* **43** (2004) 155-165.
19. K. W. Lee, M. Son, C. Park, A. Baek, *WASET* **7** (2013) 355-360.
20. Y. Hagiwara, O. Nureki, M. Tateno, *FEBS Letters* **583** (2009) 1901-1908.
21. S. Klinge, F. Voigts-Hoffmann, M. Leibundgut, N. Ban, *Trends Biochem Sci* **37** (2012) 189-198.
22. N. Malys, *Mol Biol Rep* **39** (2012) 33-39.
23. R. W. Holley, J. Apgar, G. A. Everett, J. T. Madison, M. Marquisee, S. H. Merrill, J. R. Penswick, A. Zamir, *Science* **147** (1965) 1462-1465.

24. M. Sprinzl, C. Horn, M. Brown, A. Ioudovitch, S. Steinberg, *Nucleic Acids Res* **26** (1998) 148-153.
25. S. H. Kim, F. L. Suddath, G. J. Quigley, A. McPherson, J. L. Sussman, A. H. J. Wang, N. C. Seeman, Alexander Rich, *Science* **185** (1974), 435-440.
26. G. Eriani, M. Delarue, O. Poch, J. Gangloff, D. Moras, *Nature* **347** (1990) 203-206.
27. L. Ribas De Pouplana, P. Schimmel, *Trends Biochem Sci* **26** (2001) 591-596.
28. M. Ibba, S. Morgan, A.W. Curnow, D.R. Pridmore, U.C. Vothknecht, W. Gardner, W. Lin, C.R. Woese, D. Soll, *Science* **278** (1997) 1119-1122.
29. J.J. Perona, A. Hadd, *Biochemistry* **51** (2012) 8705-8729.
30. B.E. Griffin, M. Jarman, C.B. Reese, J.E. Sulston, D.R. Trentham, *Biochemistry* **5** (1966) 3638-3649.
31. C.M. Zhang, J.J. Perona, K. Ryu, C. Francklyn, Y.M. Hou, *J Mol Biol* **361** (2006) 300-311.
32. J. Cavarelli, D. Moras, *Faseb Journal* **7** (1993) 79-86.
33. L. Pallanck, M. Pak, L.H. Schulman, *tRNA Discrimination in Aminoacylation*, 1995, American Society of Microbiology.
34. M. Ibba, S. Sever, M. Praetorius-Ibba, D. Soll, *Nucleic Acids Res.* **27** (1990) 3631-3637.
35. G. Eriani, M. Delarue, O. Poch, J. Gangloff, D. Moras, *Nature* **347** (1990) 203-206.
36. M. Dulic, N. Cvetesic, J.J. Perona, I. Gruic-Sovulj, *J. Biol. Chem.* **285** (2010) 23799-23809.
37. N. Cvetesic, M. Bilus, I. G. Sovulj, *J. Biol. Chem.* **290** (2015) 13981-13991.
38. S. Cusack, A. Yaremchuk, M. Tukalo, *EMBO J* **19** (2000) 2351-2361.
39. A. Palencia, T. Crepin, M.T. Vu, T.L. Lincecum, Jr., S.A. Martinis, S. Cusack, *Nat Struct Mol Biol* **19** (2012) 677-684.
40. M.T. Vu, S.A. Martinis, *Biochemistry* **46** (2007) 5170-5176.
41. R. Fukunaga, S. Yokoyama, *Nat Struct Mol Biol* **12** (2005) 915-922.
42. R. Fukunaga, S. Yokoyama, *J Mol Biol* **346** (2005) 57-71.
43. A. K. Betha, A. M. Williams, S. A. Martinis, *Biochemistry* **40** (2007) 6258-6267.
44. Q. Huang, X. Zhou, Q. Hu, H. Lei, Z. Fang, P. Yao, E.Wang, *RNA* **20** (2014) 1440-1450.
45. M. Tukalo, A. Yaremchuk, R. Fukunaga, S. Yokoyama, S. Cusack, *Nat Struct Mol Biol* **12** (2005) 923-930.
46. K.W. Lee, J.M. Briggs, *Proteins* **54** (2004) 693-704.
47. M. Boero, *J. Phys. Chem. B* **115** (2011) 12276-12286.

48. Y. Hagiwara, M. J. Field, O. Nureki, M. Tateno, *J. Am. Chem. Soc.* **132** (2010) 2751-2758.
49. Y. Hagiwara, O. Nureki, M. Tateno, *FEBS Letters* **583** (2009) 1901-1908.
50. K. W. Lee, M. Son, C. Park, A. Baek, *WASET* **7** (2013) 355-360.
51. K. A. Johnson, *Biochimica et Biophysica Acta* **1804** (2010) 1041-1048.
52. Y. Tsai, K. A. Johnson, *Biochemistry* **45** (2005) 9675-9687.
53. K. A. Johnson, *J. Biol. Chem.* **283** (2008) 26297-26301.
54. K. A. Johnson, *Annu. Rev. Biochem.* **62** (1993) 685-713.
55. S.S. Patel, I. Wong, K. A. Johnson, *Biochemistry* **30** (1991) 511-525.
56. C. J. Cramer, *Essentials of Computational Chemistry*, John Wiley & Sons, New York, 2002, str. 17-100.
57. Branimir Bertoša, Natalia Mrnjavac, *Upute za vježbe iz računalne biofizike*, Zagreb, 2015.
58. W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, *Molec. Graphics* **14** (1996) 33-38.
59. Schrödinger Release 2015-4: Maestro, version 10.4, *Schrödinger*, LLC, New York, NY, 2015.
60. Vriend, *J. Mol. Graph.* **8** (1990) 52-56.
61. Case, et al., 2012, *AMBER 12*, University of California, San Francisco.
62. Jorgensen, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **105** (1983) 1407.
63. Hornak V. et al., *Proteins* **65** (2006) 712-725.
64. Berendsen, et al., *Comp. Phys. Comm.* **91** (1995) 43-56.
65. C. R. Groom, I. J. Bruno, M. P. Lightfoot, S. C. Ward, *Acta Cryst.* **B72** (2016) 171-179
66. J. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces*, Academic Press, London, 1991, str. 110.

8. Popis kratice i simbola

Popis standardnih aminokiselina

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

Popis kratica

aa	aminokiselina
aa-AMP	aminoacil-adenilat
aa-tRNA ^{aa}	aminoacilirana-Trna
aaRS	aminoacil-tRNA-sintetaza
AMP	adenozin-5'-monofosfat
APS	amonijev persulfat
ATP	adenozin-5'-trifosfat
BSA	albumin iz goveđeg seruma
BPB	bromfenol plavo
cpm	eng. <i>counts per minute</i> , broj otkucaja u minuti prilikom scintilacijskog mjerenja količine radioaktivnosti
CP1	eng. <i>connective peptide 1</i> , povezujući peptid 1
D	dihidrouridin
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
dNTP	deoksiribonukleotid-5'-trifosfat
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
EF	elongacijski faktor
FPLC	eng. <i>fast protein liquid chromatography</i>
Hepes	<i>N</i> -(2-hidroksietil)piperazin- <i>N'</i> -2-etansulfonska kiselina
IF	inicijacijski faktor
IPTG	izopropil- β -D-tiotiogalaktopiranozid
ITC	izotermalna titracijska kalorimetrija
Kan	kanamicin
k_{cat}	obrtni broj
K_d	konstanta disocijacije
K_m	Michaelis-Menten konstanta
Leu2AA	leucil-2'-aminoadenozin
LSD	leucin-specifična domena
LB	Luria-Bertani
mRNA	eng. <i>messenger RNA</i> , glasnička RNA
MD	molekularna dinamika
NMR	nuklearna magnetska rezonancija
NTA	nitriooctena kiselina
Nva	norvalin
Nva2AA	norvalil-2'-aminoadenozin
PBC	eng. <i>periodic boundary conditions</i> , periodični rubni uvjeti
PCR	lančana reakcija polimeraze
PME	eng. <i>Particle Mesh Ewald</i>
PMSF	fenilmetilsulfonil-fluorid
PP _i	pirofosfat
ψ	pseudouridin
RF	eng. <i>release factor</i> , faktor otpuštanja
RMSD	eng. <i>root mean square deviation</i>
RMSF	eng. <i>root mean square fluctuation</i>
RNA	ribonukleinska kiselina
rRNA	ribosomska nukleinska kiselina
SDS	natrijev dodecilsulfat
T	ribotimidin

POPIS KRATICA I SIMOBLA

TCA	trikloroocetna kiselina
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletilendiamin
tRNA ^{aa}	transfer ribonukleinska kiselina sepcifična za aminokiselinu aa
T_a	temperatura sljepljivanja
T_m	temperatura mekšanja
Tris	2-amino-2hidroksimetilpropan-1,3-diol
WT	divlji tip enzina
XCFP	ksilencijanil-fluorofosfat
ZN	cink-vezujuća domena

9. Životopis

Osobni podaci:

Ime i prezime: Igor Živković

Datum i mjesto rođenja: 26. svibnja 1992., Zagreb

Obrazovanje:

1999.-2007. Osnovna škola „Trnsko“ u Zagrebu

2007.-2011. Prirodoslovna škola Vladimira Preloga u Zagrebu – smjer Prirodoslovna gimnazija

2011.-2014. Preddiplomski studij kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

Naslov završnog rada: „Enzimski promiskuitet“, mentor: izv. prof. dr. sc. Branimir Bertoša

2014.-2016. Diplomski studij kemije Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, istraživački smjer, grane biokemija i analitička kemija

Nagrade:

2013. Posebna Rektorova nagrada za sudjelovanje na 6. Otvorenom danu Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Djelovanje u edukaciji:

2016. Demonstrator na kolegiju Praktikum biokemije za studente preddiplomskog studija kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

Ostale aktivnosti:

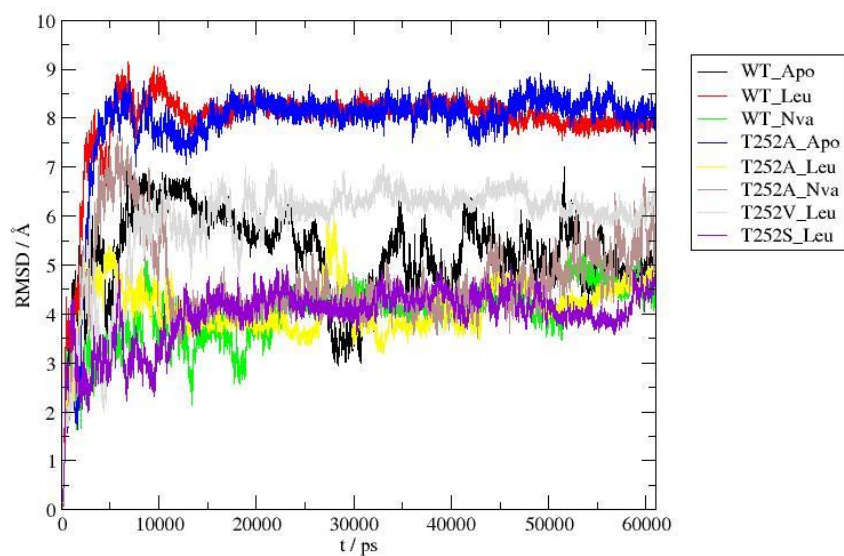
2001. – Član Saveza izviđača Hrvatske (od 2015. kuhar na višednevnim aktivnostima)

Strani jezici:

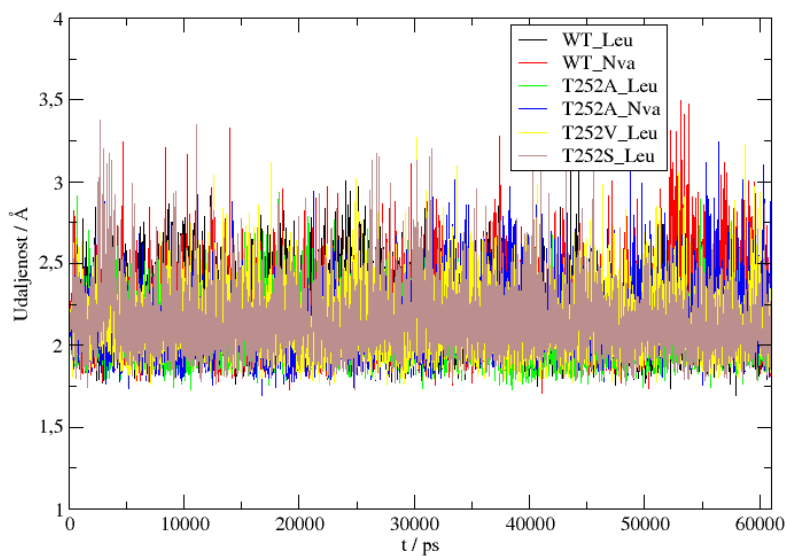
Engleski

Njemački (osnovno znanje)

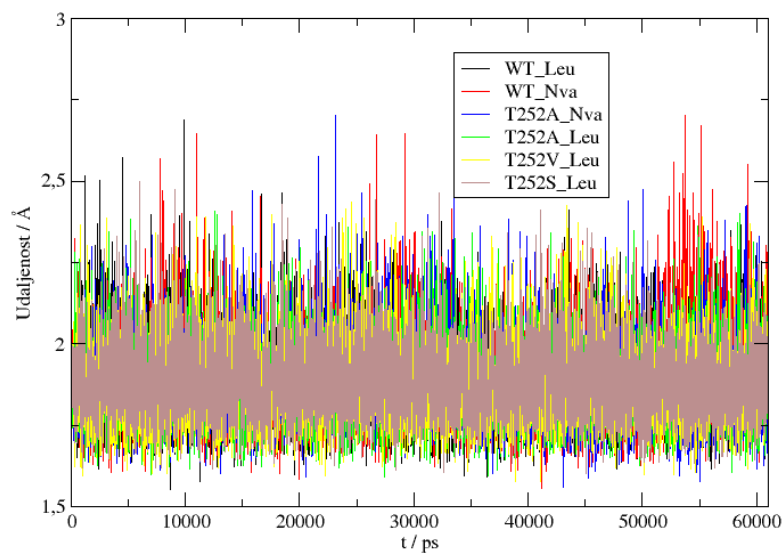
Dodatak



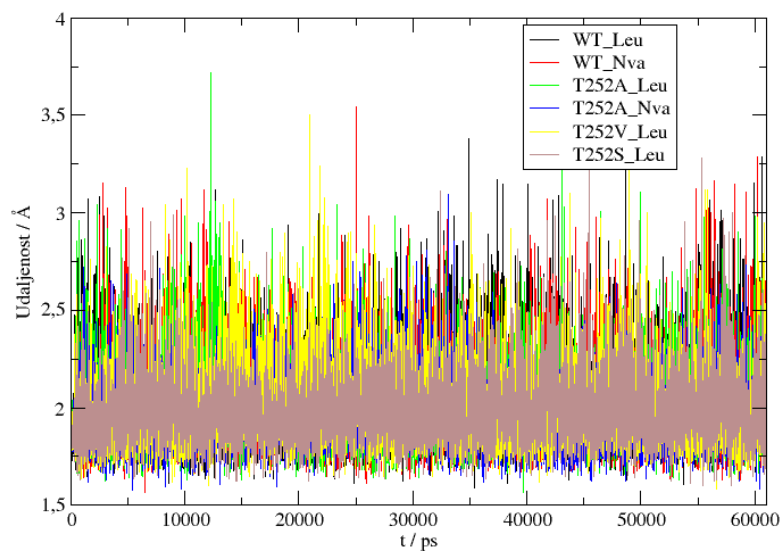
Slika D1. RMSD vrijednosti cjelovitih domena.



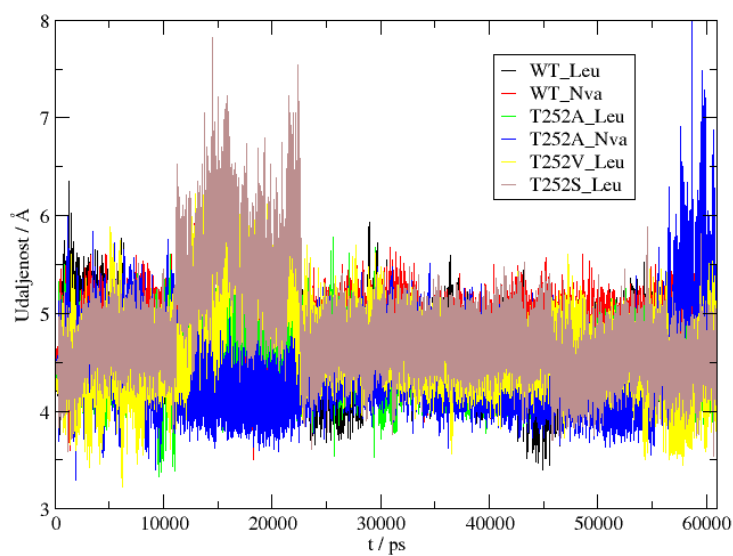
Slika D2. Udaljenost vodika okosnice L327 od N1 dušika adenzina supstrata tijekom simulacije.



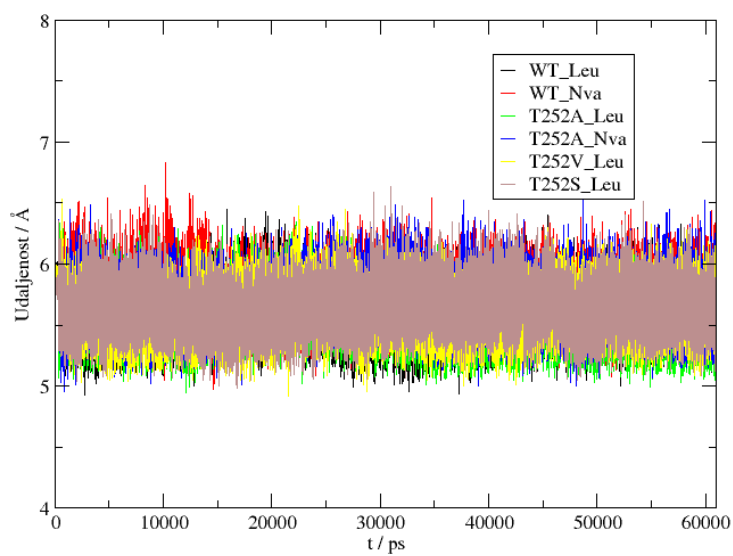
Slika D3. Udaljenost kisika okosnice L327 od NH61 vodika adenzina supstrata tijekom simulacije.



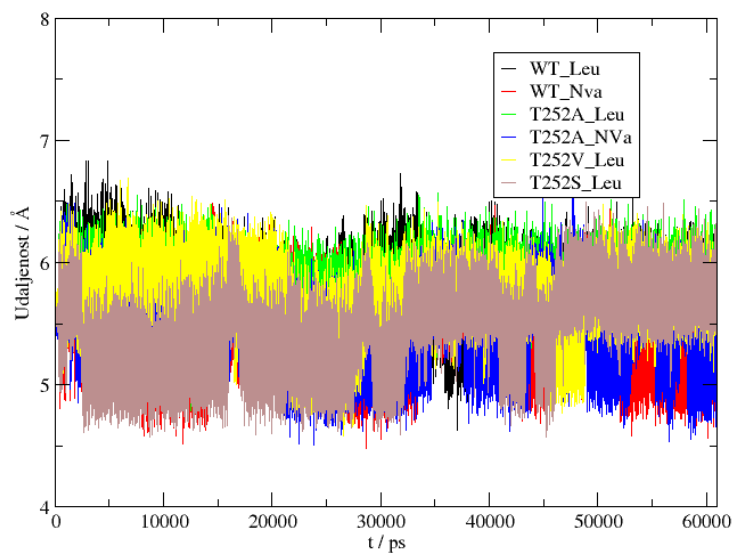
Slika D4. Udaljenost kisika okosnice Y330 od NH62 vodika adenzina supstrata tijekom simulacije.



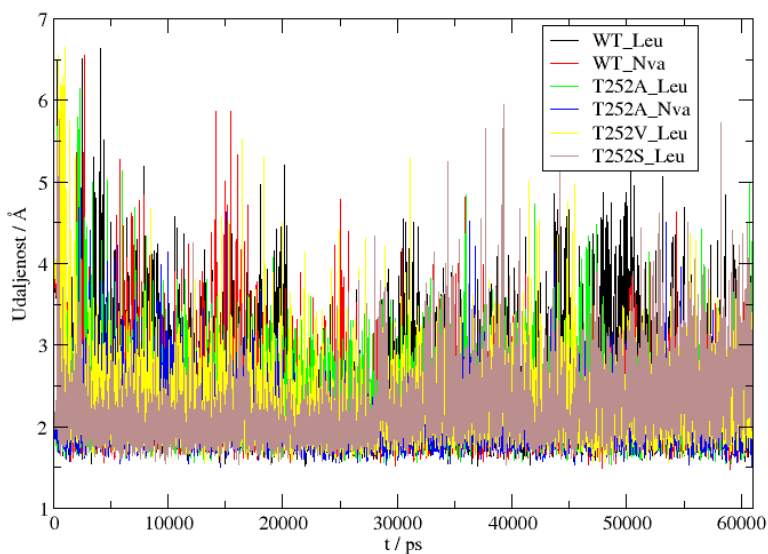
Slika D5. Udaljenost centra mase adenozina supstrata od centra mase Y330 tijekom simulacije.



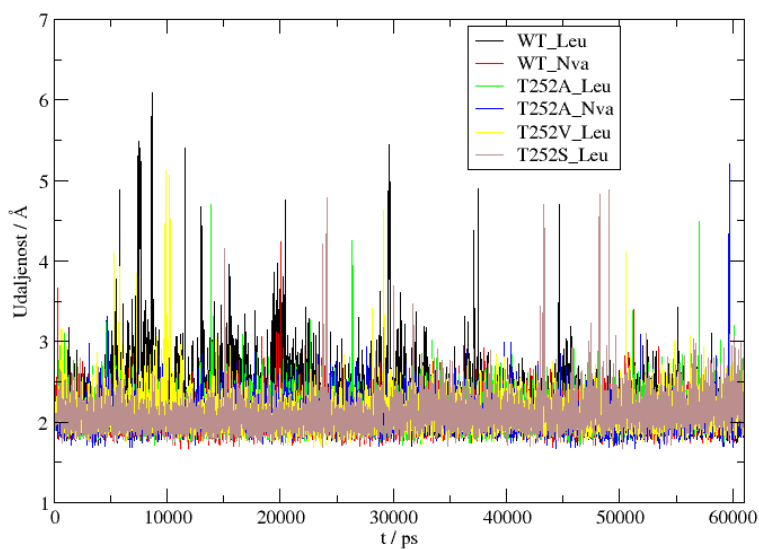
Slika D6. Udaljenost centra mase adenozina supstrata od centra mase V326 tijekom simulacije.



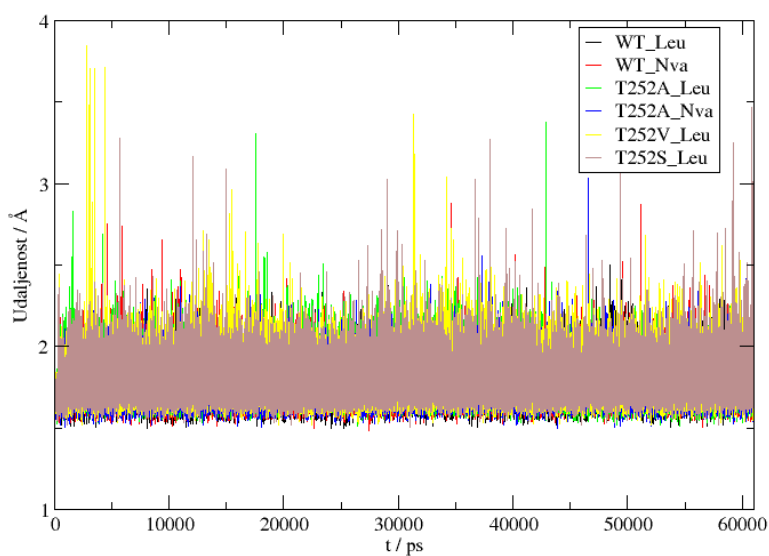
Slika D7. Udaljenost centra mase adenzina supstrata od centra mase V335 tijekom simulacije.



Slika D8. Udaljenost vodika HG1 bočnog ogranka T247 i karbonilnog kisika supstrata tijekom simulacije



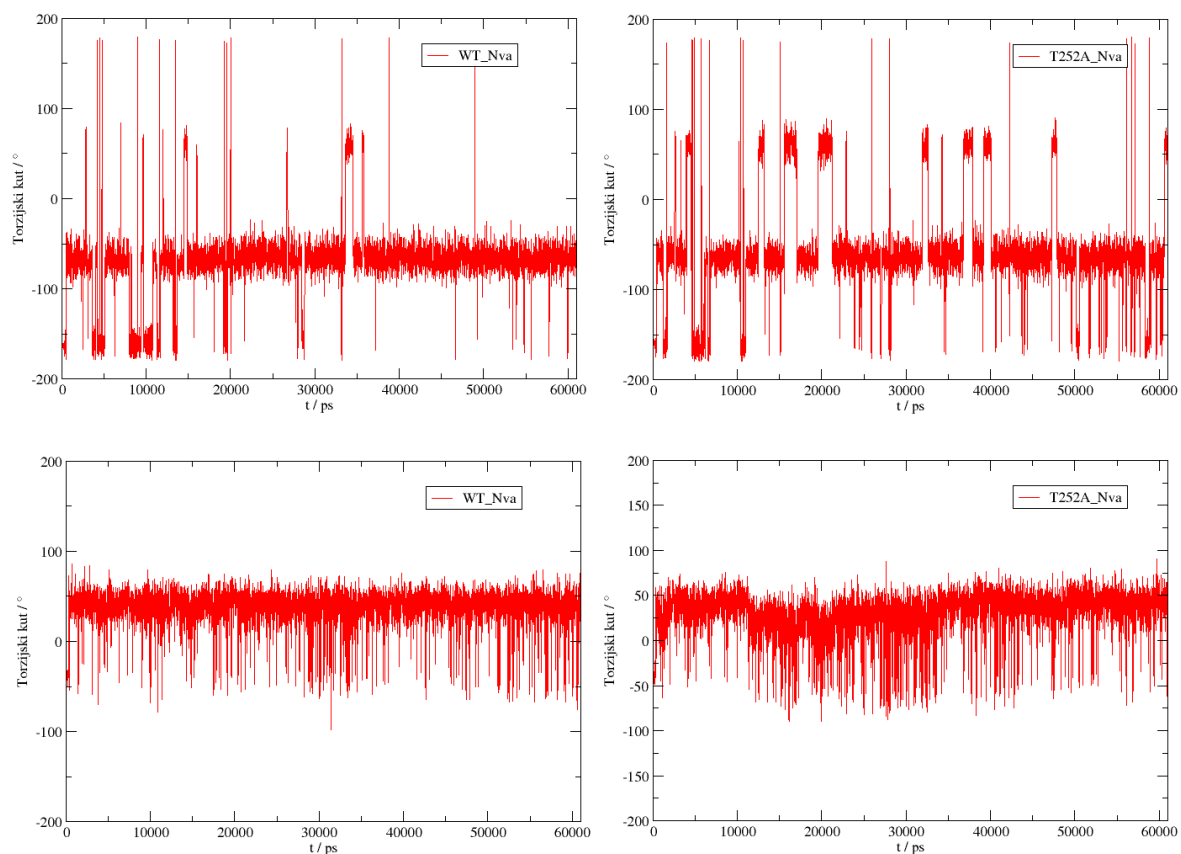
Slika D9. Udaljenost vodika NH skupine okosnice T248 i kisika 3'OH skupine supstrata tijekom simulacije.

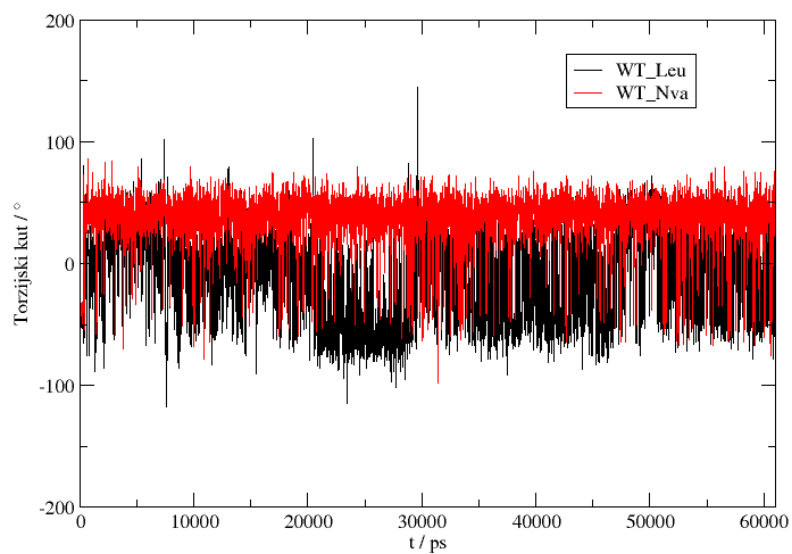


Slika D10. Najmanja udaljenost između kisika D345 i vodika amino skupine supstrata tijekom simulacije.

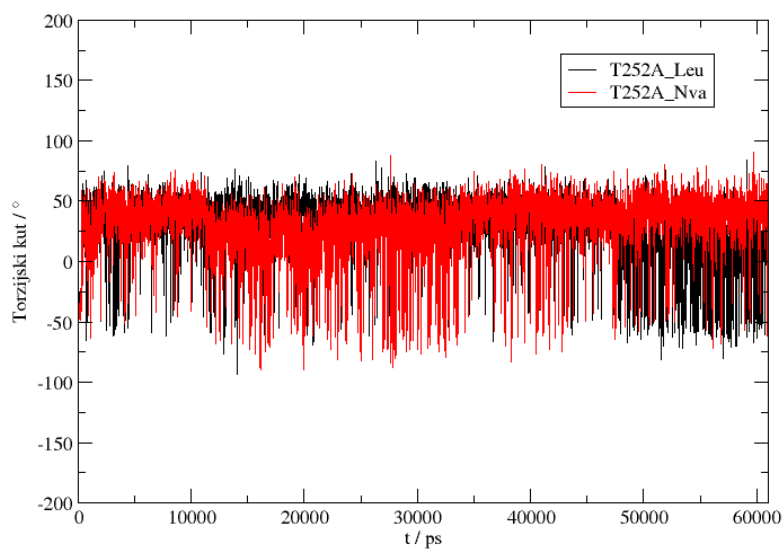
Tablica D1. RMSF vrijednosti supstrata.

Sustav	RMSF / Å
WT_Leu	0,91
WT_Nva	1,03
T252A_Leu	1,06
T252A_Nva	1,26
T252V_Leu	0,92
T252S_Leu	0,89

Slika D11. Vrijednosti torzijskih kutova N-C α -C β -C γ norvalina supstrata i C4'-C3'-O3'-HO3' u sustavima sa supstratom norvalil-2'-adenozinom.



Slika D12. Orijentacija 3'OH skupine definirana torzijskim kutem C4'-C3'-O3'-HO3' u WT sustavima.



Slika D13. Orijentacija 3'OH skupine definirana torzijskim kutem C4'-C3'-O3'-HO3' u T252A sustavima.