

Mehanizmi ostvarivanja supstratne specifičnosti u sintetskom i korektivnom mjestu izoleucil-tRNA-sintetaze

Živković, Igor

Doctoral thesis / Disertacija

2021

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:217:335823>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Igor Živković

**Mehanizmi ostvarivanja supstratne specifičnosti u
sintetskom i korektivnom mjestu
izoleucil-tRNA-sintetaze**

DOKTORSKI RAD

Mentor:
prof. dr. sc. Ita Gruić Sovulj

Zagreb, 2021.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Igor Živković

**On the substrate specificity mechanisms of the
synthetic and editing sites of isoleucyl-tRNA
synthetase**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:
Dr. Ita Gruić Sovulj, Professor

Zagreb, 2021

Osim biokemije, naučio sam ponešto i o minimalizmu, stoga...

...hvala...

...Lori, mami i tati bez kojih danas ne bih bio tu gdje jesam.

...Zorici na bezuvjetnoj ljubavi, podršci i razumijevanju.

...Iti koja mi je pružila priliku i strpljivo me učila svemu svih ovih godina.

...Morani za prijateljstvo, savjete i smijeh.

...Marku što je uvijek imao vremena te bio jedina druga konstanta u 312.

...Vladi i Mariu jer bez ručka ništa ovo ne bi bilo isto.

...ZBK na prekrasnih pet godina.

Sadržaj

SAŽETAK.....	VII
ABSTRACT	VIII
§ 1. UVOD.....	1
1.1. Svrha i cilj rada	5
§ 2. LITERATURNI PREGLED	6
2.1. Translacija	6
2.2. Struktura i elementi prepoznavanja tRNA.....	13
2.3. Aminoacil-tRNA-sintetaze.....	17
2.3.1. Podjela aminoacil-tRNA-sintetaza.....	17
2.3.2. Mehanizam reakcije aminoaciliranja	18
2.3.3. Prepoznavanje supstrata i točnost reakcije aminoaciliranja.....	20
2.3.4. Popravak pogreške prije prijenosa	22
2.3.5. Popravak pogreške nakon prijenosa.....	24
2.4. Isoleucil-tRNA-sintetaza.....	29
2.4.1. Strukturna obilježja isoleucil-tRNA-sintetaze	29
2.4.2. Prepoznavanje tRNA ^{lle}	31
2.4.3. Reakcije isoleucil-tRNA-sintetaze	32
2.5. Leucil-tRNA-sintetaza i valil-tRNA-sintetaza	36
2.6. Specifičnost enzima prema supstratima.....	39
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	42
3.1. Materijali	42
3.1.1. Standardne kemikalije.....	42
3.1.2. Aminokiseline i nukleotidi.....	42
3.1.3. Boje	43
3.1.4. Enzimi, proteini i nukleinske kiseline.....	43
3.1.5. Komercijalni kompleti za pročišćavanje DNA.....	43
3.1.6. Radioaktivne kemikalije	43
3.1.7. Hranjive podloge i mediji za uzgoj bakterije <i>E. coli</i>	43
3.1.8. <i>E. coli</i> sojevi.....	43
3.1.9. Plazmidi	44
3.1.10. Kromatografski pribor	44
3.1.11. Ostali materijali	44

3.2. Metode.....	45
3.2.1. Metode rada s nukleinskim kiselinama	45
3.2.1.1. Izolacija plazmidne DNA.....	45
3.2.1.2. Ciljana mutageneza.....	45
3.2.1.3. Agarozna gel-elektroforeza	48
3.2.1.4. Analiza nukleotidnih sljedova sekvenciranjem.....	49
3.2.1.5. Prekomjerna ekspresija i izolacija tRNA	49
3.2.1.6. Dijaliza tRNA	50
3.2.1.7. Denaturirajuća poliakrilamidna gel-elektroforeza uz dodatak ureje.....	50
3.2.1.8. Pročišćavanje prekomjerno eksprimirane tRNA ^{Ile} kromatografijom obrnutih faza	51
3.2.1.9. Obilježavanje tRNA radioaktivnim izotopom ³² P	52
3.2.1.10. Određivanje koncentracije nukleinskih kiselina.....	53
3.2.2. Metode rada s proteinima	53
3.2.2.1. Prekomjerna ekspresija rekombinantnih proteina	53
3.2.2.2. Priprema proteinskih ekstrakata	54
3.2.2.3. Afinitetna kromatografija na Ni-NTA agarozu.....	54
3.2.2.4. Pročišćavanje aaRS od supročišćenih aminokiselina i aminoacil-adenilata.....	56
3.2.2.5. Denaturirajuća poliakrilamidna gel-elektroforeza uz dodatak natrijevog dodecil-sulfata.....	57
3.2.2.6. Izmjena pufera gel-filtracijom.....	57
3.2.2.7. Ugušćivanje pufera ultrafiltracijom.....	57
3.2.2.8. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije proteina	58
3.2.2.9. Određivanje koncentracije proteina po Bradfordu	58
3.2.2.10. Aktivacija elongacijskog faktora Tu.....	58
3.2.3. Metode rada s bakterijama	59
3.2.3.1. Priprema kemijski kompetentnih stanica bakterije <i>E. coli</i>	59
3.2.3.2. Kemijska transformacija bakterijskih stanica	59
3.2.3.3. Priprema elektrokompetentnih stanica bakterije <i>E. coli</i>	59
3.2.3.4. Transformacija bakterijskih stanica elektroporacijom	60
3.2.3.5. Praćenje rasta bakterijskih stanica uz prekomjernu ekspresiju različitih varijanti IleRS	60
3.2.4. Kinetičke metode.....	61
3.2.4.1. Aktivacija aminokiselina praćena metodom izmjene pirofosfata	61
3.2.4.2. Reakcija aminociliranja	63
3.2.4.2.1. Aminoaciliranje uz [¹⁴ C]-aminokiselinu.....	64
3.2.4.2.2. Aminoaciliranje uz [³² P]-tRNA	65
3.2.4.3. Prijenos aminokiseline na tRNA u uvjetima jednog obrtaja enzima	66
3.2.4.4. Priprema misaciliranih tRNA ^{Ile} za reakciju hidrolize	68

3.2.4.5.	<i>Reakcija hidrolize (mis)aminoacilirane tRNA u uvjetima jednog obrtaja</i>	69
3.2.4.6.	<i>Paralelno praćenje nastanka AMP-a i (mis)aminoacilirane tRNA.....</i>	70
§ 4.	REZULTATI.....	72
4.1.	Proizvodnja i pročišćavanje proteina.....	72
4.2.	Proizvodnja i pročišćavanje tRNA ^{aa}	74
4.3.	Provjera čistoće komercijalnih uzoraka aminokiselina.....	76
4.4.	IleRS uspješno diskriminira nepripadne aminokiseline u sintetskom mjestu.....	78
4.5.	Popravlak pogreške nakon prijenosa sprečava nastajanje misaciliranih tRNA ^{Ile}	86
4.5.1.	<i>Isoleucil-tRNA-sintetaza ne diskriminira aminokiseline u reakciji prijenosa.....</i>	88
4.6.	Korektivno mjesto IleRS prepoznaje sve nepripadne aminokiseline.....	90
4.7.	His333, u sinergiji s Thr246, diskriminira Ile-tRNA ^{Ile} u korektivnom mjestu.....	92
4.8.	Mutanti IleRS koji hidroliziraju Ile-tRNA ^{Ile} koriste <i>in trans</i> popravlak	95
4.9.	Suvišni obrtaj ATP-a uslijed hidrolize Ile-tRNA ^{Ile} usporava rast stanica	100
4.10.	Isoleucil-tRNA-sintetaza koristi <i>in trans</i> popravlak	102
§ 5.	RASPRAVA	106
5.1.	Specifičnost sintetskog mjesta isoleucil-tRNA-sintetaze.....	106
5.2.	Specifičnost korektivnog mjesta IleRS.....	108
5.3.	Popravlak pogreške nakon prijenosa kod aminoacil-tRNA-sintetaza razreda Ia.....	111
§ 6.	ZAKLJUČAK	113
§ 7.	POPIS OZNAKÂ KRATICÂ I SIMBOLÂ.....	115
§ 8.	LITERATURNI IZVORI.....	118
§ 9.	ŽIVOTOPIS	XIV



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

Mehanizmi ostvarivanja supstratne specifičnosti u sintetskom i korektivnom mjestu izoleucil-tRNA-sintetaze

Igor Živković

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

Izoleucil-tRNA-sintetaza (IleRS) u sintetskom mjestu katalizira nastajanje Ile-tRNA^{Ile} za biosintezu proteina. IleRS može pogrešno aminoacilirati i strukturno, odnosno kemijski, slične nepripadne aminokiseline poput valina i norvalina što je toksično za stanicu. Kako bi popravila vlastitu pogrešku, IleRS hidrolizira misaminoaciliranu tRNA^{Ile} u zasebnom, korektivnom mjestu. U sklopu ove disertacije različitim kinetičkim metodama, uz široki spektar nepripadnih aminokiselina, istražena je enzimska specifičnost sintetskog i korektivnog mjesta IleRS. Sintetsko mjesto je uspješno diskriminiralo većinu testiranih aminokiselina u skladu s njegovom visokom specifičnošću. No, iako je frekvencija nastajanja misaminoaciliranih tRNA uz testirane aminokiseline bila izuzetno mala, sve misaminoacilirane tRNA^{Ile} bile su dobri supstrati korektivnog mjesta. Dakle, suprotno od sintetskog, korektivno mjesto pokazuje široku supstratnu specifičnost. Istovremeno, korektivno mjesto pokazuje visoku specifičnost u sprečavanju hidrolize pripadne Ile-tRNA^{Ile}, što sugerira da je mehanizam negativne selekcije usmjeravao evoluciju tog mjesta. Dodatna istraživanja su pokazala jedinstvene osobine popravka pogreške kod IleRS u odnosu na njegove najbliže evolucijske srodnike.

(126 + XI stranica, 52 slike, 11 tablica, 172 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: aminokiseline/ enzimska specifičnost/ korektivno mjesto/ *in trans* popravak/ izoleucil-tRNA-sintetaza/ negativna selekcija/ sintetsko mjesto/

Mentor: prof. dr. sc. Ita Gruić Sovulj

Rad prihvaćen: 08. rujna 2021.

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Branimir Bertoša
2. izv. prof. dr. sc. Mario Gabričević
3. dr. sc. Zrinka Kovarik, zn. savj.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

On the substrate specificity mechanisms of the synthetic and editing sites of isoleucyl-tRNA synthetase

Igor Živković

Division of Biochemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, Horvatovac 102a

Isoleucyl-tRNA synthetase (IleRS) within its synthetic site pairs isoleucine and tRNA^{Ile} for the ribosomal protein synthesis. IleRS can also misaminoacylate tRNA^{Ile} with structurally and chemically similar non-cognate valine and norvaline, which is toxic for the cell. To clear the errors, IleRS hydrolyzes misaminoacylated tRNA^{Ile}s at the dedicated editing site. Here we used a broad spectrum of non-cognate amino acids to explore the mechanisms by which IleRS' synthetic and editing sites exercise substrate specificity. We found that most of herein tested amino acids were efficiently discriminated at the synthetic site in agreement with its known high specificity. Nevertheless, despite the low misaminocylation frequencies, all misaminocylated tRNA^{Ile}s were rapidly hydrolyzed at the editing site. Thus, opposite to the synthetic site, the editing site exhibits broad substrate specificity. At the same time, the editing site displays high specificity against the cognate Ile-tRNA^{Ile} hydrolysis, indicating that negative selection directed evolution of the editing site.

(126 + XI pages, 52 figures, 11 tables, 172 references, original in Croatian)

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

Keywords: amino acids/ corrective site/ enzyme specificity/ *in trans* editing/ isoleucyl-tRNA synthetase/ negative selection/ synthetic site

Supervisor: Dr. Ita Gruić Sovulj, Professor

Thesis accepted: September, 8th, 2021

Reviewers:

Dr. Branimir Bertoša, Professor

Dr. Mario Gabričević, Associate Professor

Dr. Zrinka Kovarik, Permanent Scientific Advisor

§ 1. UVOD

Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) su enzimi koji kataliziraju nastajanje aminoaciliranih tRNA^{aa} (aa-tRNA^{aa}) koje su supstrati za ribosomsku biosintezu proteina (translaciju) [1]. AaRS se prema strukturnim i mehanističkim svojstvima dijele u razrede I i II [2,3]. Ipak, unatoč sitnim razlikama, kod svih aaRS aminoaciliranje se odvija u sintetskom mjestu u dva koraka. Prvi korak je aktivacija aminokiseline, odnosno nastajanje miješanog anhidrida – aminoacil adenilata (aa-AMP). Mehanistički gledano, radi se o bimolekularnoj nukleofilnoj supstituciji u kojoj α -karboksilni kisik aminokiseline djeluje kao nukleofil koji napada atom fosfora α -fosfata ATP-a, a izlazna skupina je pirofosfat (PP_i). Drugi korak je prijenos aminokiseline na tRNA^{aa}, odnosno nastajanje aa-tRNA^{aa}. I u ovom slučaju radi se o bimolekularnoj nukleofilnoj supstituciji u kojoj kisik 2' ili 3'OH skupine riboze terminalnog adenozina tRNA djeluje kao nukleofil koji napada α -karboksilni ugljikov atom aminokiseline aa-AMP-a, pri čemu je AMP izlazna skupina. Ako je aminokiselina prenesena na 2'OH skupinu, nakon disocijacije aa-tRNA^{aa} s aaRS doći će do transesterifikacije, odnosno prelaska aminokiseline s 2'OH na 3'OH skupinu [4] jer je isključivo 3' aminoacilirana tRNA supstrat peptidil-transferaznog centra ribosoma [5]. Reakcija aminoaciliranja termodinamički je povoljna jer je spregnuta s reakcijom hidrolize pirofosfata koju katalizira enzim pirofosfataza.

Točnost prepoznavanja supstrata u reakciji aminoaciliranja važna je jer aa-tRNA^{aa} donose aminokiseline do ribosoma koji katalizira nastajanje peptidne veze, odnosno proteina. Ugradnja aminokiseline na neodgovarajuće mjesto u proteinu, odnosno pogreška u dešifriranju genetičke informacije, može imati letalne posljedice za stanicu. Pretpostavlja se da je dopuštena učestalost pogreške u procesu translacije (učestalost mistranslacije) 1 u 3300 [6]. Zbog toga je važno da aaRS točno prepoznaju pripadne supstrate. Molekule tRNA (cca. 25 kDa) i aaRS (75-180 kDa) su usporedive veličine [7]. S obzirom na to da se radi o velikim molekulama, među njima postoji veliko interakcijsko sučelje, odnosno postoji velik broj interakcija koje mogu ostvariti. Osim toga, u strukturi tRNA postoje određene baze i/ili strukturni elementi tRNA koji se nazivaju elementima identiteta [8–10]. Elementi identiteta ostvaruju specifične, pozitivne ili negativne, interakcije s aaRS i na taj način doprinose točnom prepoznavanju od strane aaRS. Zbog toga aaRS nemaju problema s prepoznavanjem isključivo pripadne tRNA^{aa}.

Prepoznavanje aminokiseline je druga priča. Aminokiseline su puno manji supstrati čija je prosječna veličina 110 Da te stoga s aaRS ostvaruju znatno manje interakcija nego tRNA. K tome, u stanici postoji mnogo proteinogenih i neproteinogenih aminokiseline koje su po svojim fizikalno-kemijskim svojstvima slične. Zbog toga aaRS mogu pogriješiti i umjesto pripadne aminokiseline upotrijebiti neku sličnu nepripadnu aminokiselinu kao supstrat, to jest aktivirati je i prenijeti na tRNA. One aaRS kod kojih je ta pogreška učestalija od prethodno spomenute granice tolerancije, 1 u 3300, evolucijski su razvile mehanizme popravka pogreške [1]. Kod razreda I te aaRS su IleRS, LeuRS, ValRS i MetRS, dok se kod razreda II radi o AlaRS, LysRS-II, PheRS, ProRS, SerRS i ThrRS. Poznata su dva tipa popravka pogreške, prije i poslije prijenosa aminokiseline na tRNA^{aa}. Popravak pogreške prije prijenosa obuhvaća hidrolizu aa-AMP-a, uz ili bez prisutnosti tRNA^{aa}, a odvija se u sintetskom mjestu [11]. Popravak pogreške poslije prijenosa, odnosno hidroliza misacilirane aa-tRNA^{aa}, odvija se u zasebnoj domeni za popravak pogreške (korektivno mjesto) [12–16] te je kod onih aaRS koje ga posjeduju to dominantan tip popravka. Popravak poslije prijenosa može se odvijati na dva načina, *in cis* i *in trans*. *In cis* popravak pogreške obuhvaća direktnu translokaciju 3' aminoaciliranog kraja tRNA^{aa} iz sintetskog u korektivno mjesto te posljedičnu hidrolizu esterske veze između aminokiseline i tRNA^{aa}. *In trans* popravak podrazumijeva disocijaciju misaminoacilirane tRNA^{aa} s aaRS te ponovnu reasocijaciju s 3' aminoaciliranim krajem orijentiranim u korektivno mjesto kako bi došlo do hidrolize nepripadnog para aminokiseline i tRNA^{aa}. Dosadašnjim istraživanjima ustanovljeno je kako aaRS razreda I koriste *in cis* popravak, dok je za *in trans* popravak pokazano da postoji samo kod aaRS razreda II [14,17].

Aminoacil-tRNA-sintetaze imaju nezamjenjivu ulogu u organizmu pa njihovo pogrešno prepoznavanje supstrata može imati letalne posljedice za stanicu. Osim što su zbog toga razvile mehanizme popravka pogreške, pokazano je kako mnoge aaRS i u sintetskom mjestu postižu izrazito visoku specifičnost u usporedbi s ostalim enzimima koji koriste aminokiseline kao supstrate [18]. Zato aaRS predstavljaju izvrstan model za izučavanje i dublje razumijevanje fundamentalnih mehanizama i evolucije enzimske specifičnosti. Sami mehanizmi kojima se ostvaruje diskriminacija nepripadnih supstrata u sintetskom mjestu uglavnom su dobro okarakterizirani. No, iako je specifičnost korektivnog mjesta jednako važna, ona je znatno slabije istražena. Jedna od aaRS koja može poslužiti kao dobar model za njeno izučavanje jest izoleucil-tRNA-sintetaza (IleRS). Ona u sintetskom mjestu mora što specifičnije aminoacilirati tRNA^{Ile} pripadnim izoleucinom (Ile), dok u korektivnom mjestu mora specifično odbaciti

Ile-tRNA^{Ile}. Problematika IleRS je zanimljiva jer je Ile relativno malena i hidrofobna aminokiselina, a u stanici postoji cijeli niz aminokiselina koje su mu više ili manje slične po fizikalno-kemijskim svojstvima (glicin, alanin, α -aminobutirat, norvalin, valin, leucin, metionin, serin, treonin...). Zbog toga je evolucija supstratne specifičnosti sintetskog i korektivnog mjesta IleRS bila od neizmjerne važnosti.

Prethodno je pokazano da IleRS umjesto Ile može misaktivirati te prenijeti na tRNA^{Ile} nepripadne aminokiseline valin (Val) [11,19] i norvalin (Nva) [20]. Obje aminokiseline su za jednu metilensku/metilnu skupinu manje od Ile. Nva je drevna (pojavljuje se u Weber-Millerovom pokusu [21]) prirodna neproteinogena aminokiselina, koja se u anaerobnim uvjetima može akumulirati u stanici [22]. U reakciji aktivacije, IleRS navedene aminokiseline diskriminira faktorom oko 200. Mjera kojom se opisuje koliko je neka nepripadna aminokiselina lošiji supstrat od pripadne naziva se diskriminacijski faktor, a definira se kao $D = \frac{k_{sp,pripadna}}{k_{sp,nepripadna}}$, gdje je $k_{sp} = \frac{k_{cat}}{K_M}$. Za obje aminokiseline temelj diskriminacije potječe iz povećanja K_M , odnosno smanjenog prividnog afiniteta za vezanje supstrata, dok k_{cat} , odnosno obrtni broj, ostaje gotovo nepromijenjen. Promjena K_M vjerojatno je posljedica gubitka Van der Waalsovih interakcija uslijed smanjenja veličine i hidrofobnosti nepripadnog supstrata. U drugoj sintetskoj reakciji, prijenosu aktivirane aminokiseline na tRNA^{Ile}, Val i Nva su otprilike jednako dobri supstrati kao i Ile pa se smatra kako taj korak ne doprinosi diskriminaciji navedenih nepripadnih aminokiselina [20]. S obzirom na to da je izmjereni diskriminacijski faktor ispod granice tolerancije (1 u 3300) te da je ugradnja Val i Nva na izoleucinska mjesta u proteinima toksična za stanicu [20], IleRS je razvila mehanizme popravka pogreške. IleRS koristi oba tipa popravka pogreške, pri čemu je popravak poslije prijenosa dominantan. Ipak, valja spomenuti kako je IleRS specifikum u odnosu na ostale enzime koji posjeduju oba tipa popravka jer u njenom slučaju popravak prije prijenosa doprinosi ukupnom popravku s čak 30 % [23]. Istraživanjima korektivnog mjesta pokazano je kako Nva-tRNA^{Ile} i Val-tRNA^{Ile} bivaju brzo hidrolizirani (85 i 49 s⁻¹) [20]. U istim uvjetima hidroliza pripadnog para Ile-tRNA^{Ile} iznosi svega 0,058 s⁻¹ [24]. Kao što je prethodno spomenuto, mehanizam specifičnosti korektivnog mjesta nije posve razjašnjen. Naime, kako su u reakciji popravka pogreške poslije prijenosa uloge aminokiselina zamijenjene, sada su Val i Nva one aminokiseline koje trebaju biti supstrati reakcije, dok Ile treba biti diskriminiran. Drugim riječima, dobro je da se Val- i Nva-tRNA^{Ile} hidroliziraju kako bi se pogreška spriječila te da se Ile-tRNA^{Ile} sačuva kako bi

otišla u ribosomsku sintezu proteina. Najjednostavnija, a možda i najočekivanija pretpostavka jest kako se specifičnost ostvaruje kroz nemogućnost vezanja Ile-tRNA^{Ile} u aktivno mjesto.

Model koji opisuje specifičnost u sintetskom i korektivnom mjestu 1970-ih opisao je Alan Fersht te ga nazvao „modelom dvostrukog sita“ [25]. Ukratko, navedeni model predlaže kako je sintetsko mjesto prvo, grubo sito u koje se može vezati pripadna aminokiselina i sve one koje su manje od nje, dok je korektivno mjesto drugo, fino sito u koje se mogu vezati samo aminokiseline manje od pripadne. Poznati su primjeri odstupanja od tog modela. Primjerice, fenilalanil-tRNA-sintetaza (PheRS) misaminoacilira tRNA^{Phe} s tirozinom (Tyr) koji je veći od fenilalanina (Phe), a pogrešku efikasno popravljaju u korektivnom mjestu. Specifična hidroliza Tyr-tRNA^{Phe} posljedica je kemijske razlike između Phe i Tyr, odnosno specifičnih interakcija korektivnog mjesta s *para*-hidroksilnom skupinom Tyr [16,26]. Nadalje, kod IleRS (a i kod LeuRS, vidi kasnije) opažena je spora, ali nezanemariva, hidroliza pripadnog para Ile-tRNA^{Ile} ($0,058\text{ s}^{-1}$). To je iznenađujuće jer se prema modelu dvostrukog sita ona ne bi trebala vezati u korektivno mjesto. Za usporedbu, neenzimska hidroliza Ile-tRNA^{Ile} iznosi $5,7 \times 10^{-5}\text{ s}^{-1}$ [24] što je dodatna tri reda veličine sporije. Sva dosadašnja istraživanja ukazuju na to da se Ile-tRNA^{Ile} doista veže u korektivno mjesto, ali na manje produktivan način. Prijašnja istraživanja pokušala su razjasniti taj mehanizam specifičnosti [27–29]. No, s obzirom na to da su korištene isključivo kvalitativne metode pa nije određen niti jedan kinetički parametar, ona nisu bila dovoljna kako bi jednoznačno razlučila ovu problematiku. IleRS je evolucijski vrlo srodna LeuRS i ValRS (sva tri enzima pripadaju razredu Ia aaRS [30]) pa u prilog hipotezi vezanja Ile-tRNA^{Ile} u korektivno mjesto ide i činjenica da je pokazano kako se pripadni par Leu-tRNA^{Leu} veže u korektivno mjesto LeuRS. Termodinamička karakterizacija pokazala je samo deset puta manji afinitet vezanja nehidrolizabilnoga analoga supstrata 2'-amino-2'-(L-leucil)deoksiadenozina u odnosu na 2'-amino-2'-(L-norvalil)deoksiadenozin [31]. Kod LeuRS, Nva je najveća prijetnja točnosti aminoaciliranja. Razlika u brzini hidrolize pripadnog para Leu-tRNA^{Leu} i nepripadnog Nva-tRNA^{Leu} jest 3 reda veličine. Na temelju termodinamičkih, kinetičkih, strukturnih i računalnih istraživanja predložen je model prema kojemu se diskriminacija uspješno ostvaruje zbog toga što se Leu-tRNA^{Leu} u korektivno mjesto veže u neproduktivnoj konformaciji. Bočni ogranak Thr252 uzrokuje mispozicioniranje supstrata uslijed čega γ -metilna skupina leucina ometa pravilno smještanje katalitičke molekule vode [31].

1.1. Svrha i cilj rada

Iako postoje brojna istraživanja sintetskog i korektivnog mjesta IleRS, ona i dalje nisu uspjela pružiti neke fundamentalne odgovore o mehanizmima i evoluciji enzimske specifičnosti tih mjesta. Stoga je cilj ove disertacije primjenom različitih kinetičkih i molekularno bioloških metoda odgovoriti na sljedeća pitanja:

- kako fizikalno-kemijska svojstva različitih aminokiselina, s naglaskom na hidrofobnost, utječu na enzimsku specifičnost sintetskog mjesta
- kako prisutnost aminokiselinskih supstrata tijekom evolucije utječe na enzimsku specifičnost sintetskog mjesta
- kako fizikalno-kemijska svojstva različitih aminokiselina utječu na enzimsku specifičnost korektivnog mjesta
- kako efikasnost diskriminacije u sintetskom mjestu utječe na enzimsku specifičnost korektivnog mjesta
- koji je međusobni odnos specifičnosti sintetskog i korektivnog mjesta
- kako se ostvaruje specifična diskriminacija Ile-tRNA^{Ile} u korektivnom mjestu
- koji je glavni čimbenik kojim je gonjena evolucija specifičnosti korektivnog mjesta
- razlikuje li se mehanizam popravka pogreške IleRS od ostalih aaRS razreda Ia, LeuRS i ValRS?

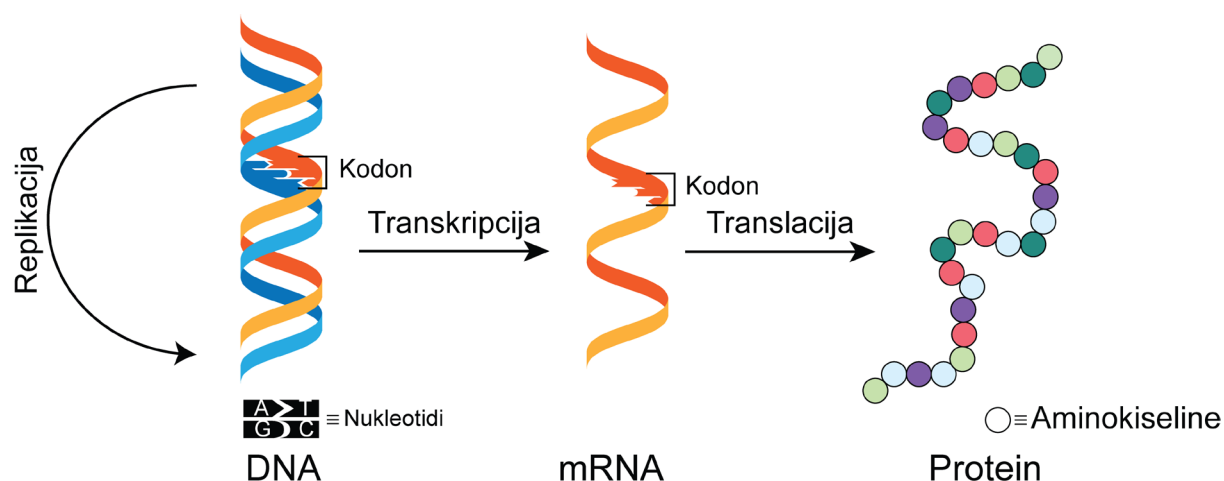
Glavne hipoteze na koje se oslanja ova disertacija su:

- hidrofobnost aminokiselina važan je faktor prepoznavanja u sintetskom mjestu
- korektivno mjesto katalizira reakcije sa širim spektrom aminokiselinskih supstrata od sintetskog mjesta
- aminokiseline koje bivaju dobro diskriminirane u sintetskom mjestu nisu nužno loši supstrati korektivnog mjesta
- korektivno mjesto koristi mehanizam negativne selekcije za specifičnu diskriminaciju pripadne Ile-tRNA^{Ile}.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Translacija

Svi poznati oblici života oslanjaju se na prijenos i dešifriranje genetičke informacije. Procese koji obavljaju te zadaće opisuje centralna dogma života (slika 2.1). Genetička informacija zapisana je u dvolančanim molekulama DNA koje se repliciraju tijekom diobe stanice. Za vrijeme replikacije svaki od dva lanca DNA služi kao kalup na temelju kojeg se sintetizira novi komplementarni lanac. Novonastala dvolančana DNA sastoji se od jednog starog i jednog novog lanca. Sam prijenos genetičke informacije bio bi potpuno besmislen kada ne bi postojali mehanizmi dešifriranja iste. Za to su zaslužni procesi transkripcije i translacije. Konkretnije, njihova zadaća je prevesti genetičku informaciju iz „jezika nukleotida“ u „jezik aminokiselina“, odnosno u njen funkcionalni oblik – proteine. Tijekom transkripcije, DNA se prepisuje u molekule glasnike RNA (engl. *messenger RNA*, mRNA) koje potom u procesu translacije služe kao kalup za biosintezu proteina. S obzirom na to da su tema ovog rada enzimi povezani s biosintezom proteina, u nastavku teksta fokus će biti na procesu translacije.



Slika 2.1. Centralna dogma života.

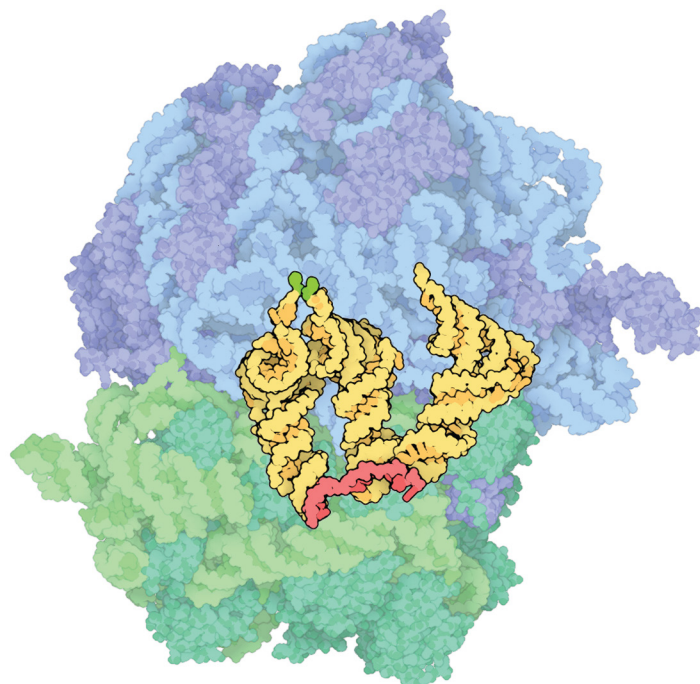
Tijekom procesa translacije sintetizira se polipeptidni lanac (protein) na temelju polinukleotidnog kalupa. U molekulama DNA, i komplementarnim im mRNA, genetička informacija zapisana je u obliku tripleta nukleotida koji se nazivaju kodonima. U standardnom genetičkom kodu postoje 64 kodona koji kodiraju za 20 proteinogenih aminokiselina. Svojstvo

da jednu aminokiselinu kodira više od jednog kodona naziva se degeneriranost genetičkog koda (tablica 2.1). Većina aminokiselina kodirana je s dva do tri različita kodona. Metionin (Met) i triptofan (Trp) su jedine aminokiseline kodirane s jednim kodonom, dok su neke aminokiseline poput leucina (Leu) i serina (Ser) kodirane s čak šest kodona. K tome, valja naglasiti kako tri kodona (UAA, UAG i UGA) ne kodiraju niti jednu aminokiselinu, već signaliziraju zaustavljanje (terminaciju) translacije (vidi kasnije). S obzirom na to da aminokiseline ne mogu samostalno prepoznati pripadajući kodon, u cijeli proces uključene su i molekule prijenosne RNA (engl. *transfer RNA*, tRNA). Dva najvažnija svojstva molekula tRNA su da na svoj 3' kraj mogu vezati aminokiseline te da posjeduju slijed koji se naziva antikodon. Antikodon je komplementaran kodonu čime je omogućeno dešifriranje genetičke informacije i ugradnja aminokiselina na predviđeno mjesto u proteine. Detaljniji opis strukture tRNA slijedi u poglavlju 2.2.

Tablica 2.1. Genetički kod.

Prva baza	Druga baza				Treća baza
	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

Proces translacije odvija se na ribosomima. Ribosomi (slika 2.2) su ribonukleoproteinski kompleksi koji se u stanicama nalaze u velikom broju. Procjenjuje se kako u bakteriji *E. coli* postoji između 30 000 i 70 000 kopija ribosoma [32] koji čine oko četvrtinu njene ukupne suhe mase [33]. Sam prokariotski kompleks također je zapanjujuće veličine – mase je 2,7 MDa i promjera 18 nm. Sastavljen je od dvije podjedinice, 50S i 30S, čijom asocijacijom nastaje funkcionalni 70S ribosom (S označava sedimentacijski koeficijent). Veća, 50S podjedinica građena je od dvije molekule ribosomske RNA (rRNA) i 36 (33 različita) proteina. Manja, 30 S podjedinica građena je od jedne molekule rRNA i 21 proteina [34–37]. Eukariotski ribosom je veći od prokariotskog, ima 4,2 MDa i 23 nm u promjeru, a građen je od većeg broja proteina i rRNA [38]. S druge strane, mitohondrijski i kloroplastni ribosomi su nešto manji i jednostavniji [39,40]. Jedna od najzanimljivijih stvari vezanih uz ribosom jest da rRNA nema samo strukturnu, već i katalitičku ulogu što znači da se radi o ribozimu [41]. Naime, proteini u ribosomu uglavnom se nalaze na površini kompleksa s tek ponekim izduženim polipeptidnim lancem koji ulazi duboko u strukturu rRNA poradi stabilizacije. U aktivnom mjestu ribosoma, koje se naziva peptidil-transferaznim centrom (PTC), nalazi se isključivo rRNA koja katalizira nastajanje peptidnih veza u rastućem proteinu. Izuzev PTC-a valja spomenuti kako ribosom sadrži tri vezna mjesta za tRNA, A (engl. *aminoacyl*), P (engl. *peptidyl*) i E (engl. *exit*) [37], koja se protežu kroz obje ribosomske podjedinice. U mjesto A veže se aminoacilirana-tRNA (aa-tRNA) čiji antikodon odgovara kodonu na mRNA koji se trenutno nalazi u tom mjestu. Nakon formiranja peptidne veze, novonastala peptidil-tRNA translocira se iz mjesta A u mjesto P. Istovremeno, tRNA koja se do tada nalazila u mjestu P prelazi u mjesto E te će u sljedećem katalitičkom ciklusu disocirati s ribosoma.

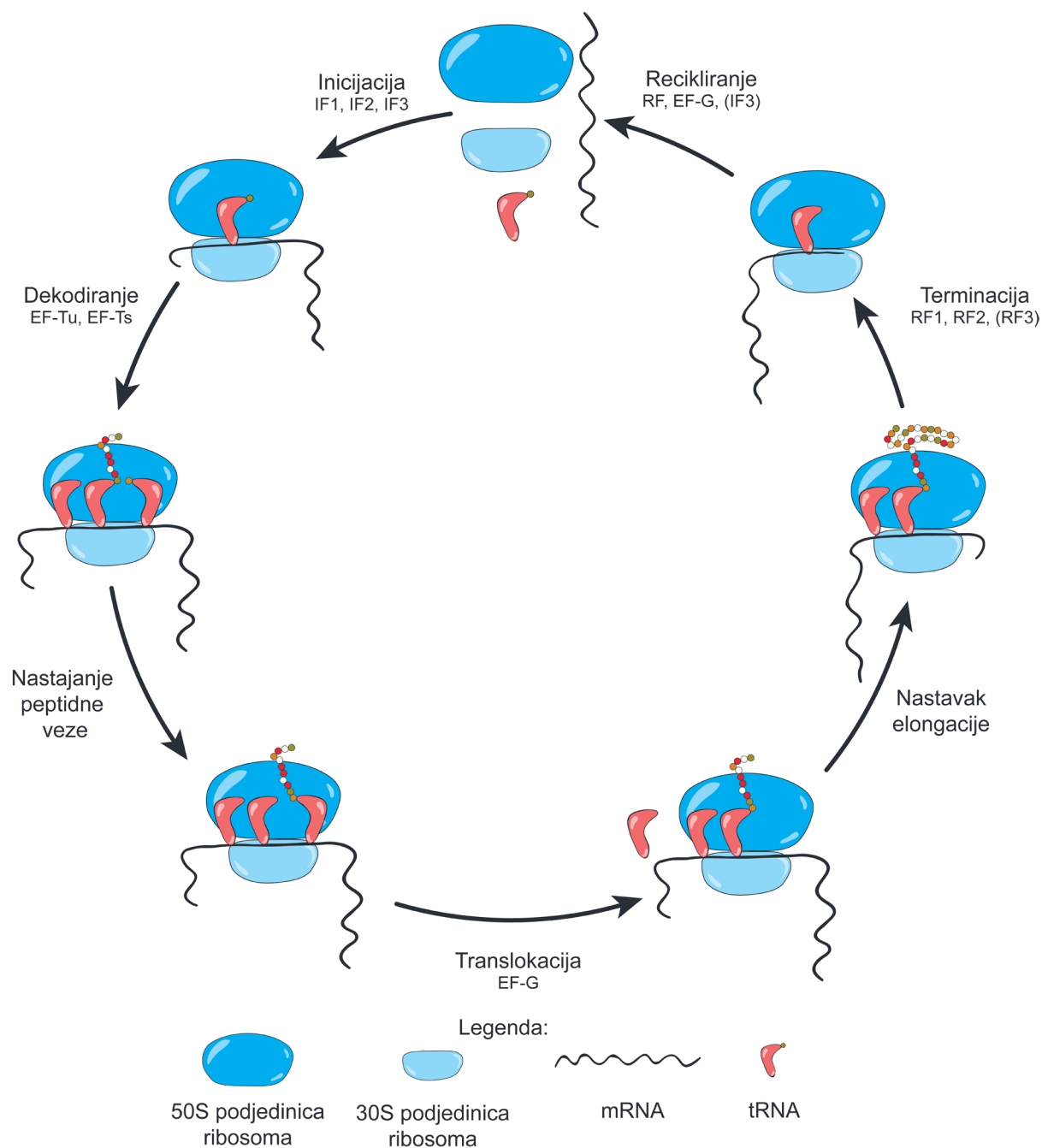


Slika 2.2. Struktura 70S ribosoma iz bakterije *E. coli* (PDB ID: 4V5D). Svijetlo zeleno – rRNA dio 30S podjedinice, modrozeleno – proteinski dio 30S podjedinice, plavo rRNA dio 50S podjedinice, ljubičasto – proteinski dio 50S podjedinice, žuto lijevo na desno – aa-tRNA u A mjestu, peptidil-tRNA u P mjestu i tRNA u E mjestu, crveno – mRNA. Preuzeto i prilagođeno iz [42].

Cjelokupni proces translacije¹ dijeli se na tri koraka: inicijacija, elongacija i terminacija (slika 2.3) [33]. Inicijaciji prethodi aktivacija aminokiselina za biosintezu proteina, odnosno njihovo vezanje na tRNA. Te reakcije kataliziraju enzimi aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) koje će detaljnije biti obrađene u poglavlju 2.4. Tijekom inicijacije dolazi do sklapanja funkcionalnog ribosoma i vezanja inicijacijske tRNA ($fMet-tRNA^{fMet}$) [33,43]. Da bi inicijacija uspjela potrebni su: 30S i 50S podjedinice ribosoma, inicijacijski faktori 1, 2 i 3 (IF1, IF2, IF3), mRNA i inicijacijska tRNA. Inicijacijski faktori su proteini koji potpomažu sklapanje ribosoma. Prokariotske mRNA specifične su po tome da uvijek počinju s istim kodonom – AUG koji kodira aminokiselinu metionin (Met). Kako bi postojala razlika između Met s kojim počinje translacija i onog koji se nalazi na bilo kojem drugom mjestu u proteinu, postoji posebna inicijacijska $tRNA^{fMet}$. Vezanje Met na obje $tRNA^{Met}$ i $tRNA^{fMet}$ katalizira metionil-tRNA-sintetaza (MetRS) [44]. Nastala $Met-tRNA^{fMet}$ je supstrat metionil-tRNA-formiltransferaze pri čemu nastaje $fMet-tRNA^{fMet}$, odnosno inicijacijska

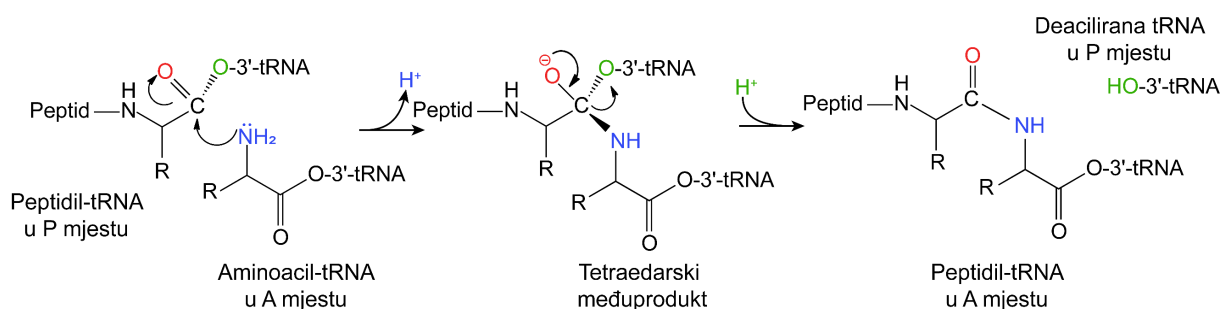
¹Detaljan opis translacije koji slijedi u nastavku poglavlja odnosi se na prokariote. Translacija u eukariotima djeluje na sličnim principima, ali je znatno složenija i manje istražena.

tRNA [45]. U prvom koraku inicijacije nastaje kompleks 30S podjedinice, inicijacijskih faktora i mRNA. U sljedećem koraku 30S podjedinica i mRNA ostvaruju interakcije preko Shine-Dalgarno (SD) sekvence [46,47]. Radi se o visoko očuvanoj sekvenci na mRNA koja se nalazi oko osam nukleotida uzvodno od start kodona. Uslijed nastalih interakcija dolazi do pravilnog pozicioniranja AUG start kodona i vezanja inicijacijske fMet-tRNA^{fMet} u P mjesto ribosoma. U posljednjem koraku veže se 50S podjedinica, disociraju inicijacijski faktori i nastaje 70S inicijacijski kompleks.



Slika 2.3. Shematski prikaz procesa translacije.

Sljedeća faza translacije je elongacija. Za elongaciju su potrebni 70S inicijacijski kompleks, aa-tRNA^{aa}, elongacijski faktori Tu, Ts i G (EF-Tu, EF-Ts i EF-G) te GTP [33]. Elongacijski faktor Tu u stanicama veže aa-tRNA^{aa}. Procjenjuje se kako je afinitet između EF-Tu i aa-tRNA^{aa} toliko velik da je pri staničnim koncentracijama, cca. 100 $\mu\text{mol/dm}^3$ za oboje, sva aa-tRNA^{aa} kompleksirana [48]. Treba napomenuti kako je EF-Tu GTPaza koja veže aa-tRNA^{aa} isključivo u GTP-veznom obliku. Nastali kompleks EF-Tu:aa-tRNA^{aa}:GTP veže se na ribosom tako da se aa-tRNA^{aa} pozicionira u A mjestu. Ako se vezala prava aa-tRNA^{aa} dolazi do prepoznavanja kodona, odnosno nastaju pravilne kodon:antikodon interakcije. One izazivaju konformacijske promjene, aktivaciju GTPazne aktivnosti EF-Tu i posljedičnu hidrolizu GTP-a [49–52]. Aminoacilirana tRNA premješta svoj 3' kraj s vezanom aminokiselinom u peptidil-transferazni centar, a EF-Tu:GDP disocira s ribosoma. EF-Tu se regenerira (prevodi u EF-Tu:GTP) pomoću EF-Ts. U peptidil-transferaznom centru slobodna α -amino skupina aminokiseline vezane na tRNA u A mjestu vrši nukleofilni napad na estersku vezu između rastućeg polipeptida (fMet u prvom elongacijskom ciklusu) i tRNA u P mjestu (slika 2.4) [53].



Slika 2.4. Mehanizam reakcije nastajanja peptidne veze u peptidil-transferaznom centru.

Produkt reakcije je polipeptidni lanac produžen za jednu aminokiselinu vezan na tRNA u A mjestu. U posljednjoj fazi elongacije uz pomoć EF-G dolazi do: i) disocijacije slobodne tRNA u E mjestu (ne događa se u prvom elongacijskom ciklusu), ii) translokacije slobodne tRNA iz P u E mjesto te iii) translokacije peptidil-tRNA iz A u P mjesto. S obzirom na to da tijekom cijelog procesa tRNA i mRNA ostvaruju kodon:antikodon interakcije, mRNA se translocira zajedno s tRNA pa se u A mjesto pozicionira kodon koji odgovara sljedećoj aminokiselini.

Ciklus elongacije ponavlja se sve dok se u A mjestu ne nađe stop kodon. Tada se radi o posljednjoj fazi inicijacije – terminaciji [33]. Stop kodoni u A mjestu bivaju prepoznati od strane proteina koji se nazivaju faktori otpuštanja (engl. *release factor*, RF1 i RF2) [54,55]. RF1 prepoznaje UAG i UAA, a RF2 UGA i UAA stop kodone. Uslijed njihovog vezanja u A

mjesto i prepoznavanja stop kodona dolazi do konformacijskih promjena koje se prenose do peptidil-transferaznog centra u kojemu se hidrolizira esterska veza između polipeptida i tRNA. Polipeptid se otpušta u otopinu gdje smatanjem (i eventualnim posttranslacijskim modifikacijama) postaje funkcionalni protein, a translacija je završena.

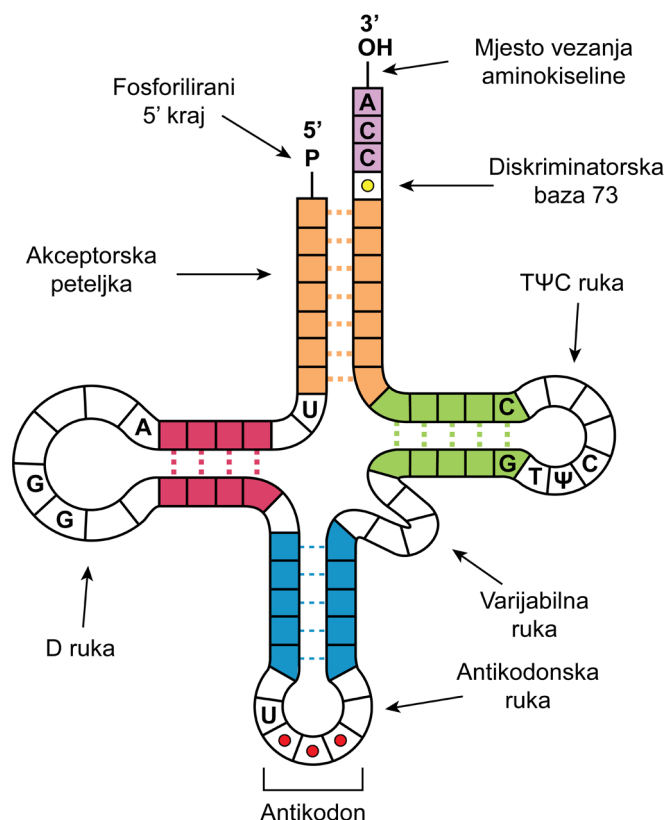
Iz opisanog je jasno kako se radi o opsežnom i kompliciranom procesu koji je neophodan za život jer rezultira biosintezom proteina – molekula koje obavljaju većinu funkcija u stanici. Stoga, ne čudi da je točnost prepisivanja genetičke informacije u translaciji od velike važnosti. Pogrešno ugrađena aminokiselina, odnosno mistranslacija može uzrokovati nastajanje nefunkcionalnog proteina. Ta pogreška nije nasljedna kao što su pogreške u replikaciji DNA, ali može biti vrlo skupa s energetskog gledišta – za ugradnju jedne aminokiseline troši se energija ekvivalentna 4 ATP-a. Ili, još gore, može dovesti do razvoja neurodegenerativnih bolesti i biti toksična za stanicu [56,57]. Vjernost translacije osigurana je na nekoliko razina. Prvo, aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) sparuju pripadnu aminokiselinu i tRNA^{aa} s visokom točnošću (vidi kasnije). Nadalje, EF-Tu radi manje stabilne komplekse s nepripadnim nego s pripadnim parom aminokiseline i tRNA. To znači da je smanjena vjerojatnost dolaska nepripadnog para aa-tRNA^{aa} do ribosoma. Doduše, treba napomenuti kako to svojstvo ovisi i o svojstvima aminokiseline vezanih na tRNA. Primjerice, dok s jedne strane EF-Tu puno bolje veže pripadni par Asn-tRNA^{Asn} od nepripadnog Asp-tRNA^{Asn}, s druge strane razlika u vezanju Leu-tRNA^{Leu} i Nva-tRNA^{Leu} je zanemariva (Nva – norvalin, aminokiselina manja za jednu metilnu skupinu od leucina, vidi kasnije) [58–60]. Jednom kad se aa-tRNA^{aa} veže na ribosom postoje mnogi načini osiguravanja točnosti, a najznačajniji je pravilno prepoznavanje kodona i antikodona [43]. Ako se ne ostvare pravilne interakcije, kompleks EF-Tu:aa-tRNA^{aa}:GTP disocira iz A mjesta i veže se sljedeći kompleks. Čak i ako dođe do ugradnje aminokiseline na pogrešno mjesto, ribosom može primijeniti retrospektivni popravak pogreške [61,62]. Ukratko, tim mehanizmom potiče se preuranjena terminacija translacije kako bi se minimizirao utrošak resursa na potencijalno nefunkcionalan protein. Unatoč tome što je stanica evolucijski razvila mnoge mehanizme kojima osigurava točnost translacije, danas je poznato kako postoje određene situacije u kojima mistranslacija može biti korisna po stanicu. Pokazano je kako stanice mogu preživljavati i u slučajevima kada razina mistranslacije doseže 10 % [63]. Smatra se kako ona može biti korisna prilikom prilagodbe na stres poput prisutnosti antibiotika ili nedostatka određenih proteinogenih aminokiseline [64–66]. Unatoč tome neosporiva je

činjenica da su procesi kojima se osigurava vjernost u translaciji od velikog značaja, a u fokusu ovog rada je prva stepenica na tom putu – aminoacil-tRNA-sintetaze.

2.2. Struktura i elementi prepoznavanja tRNA

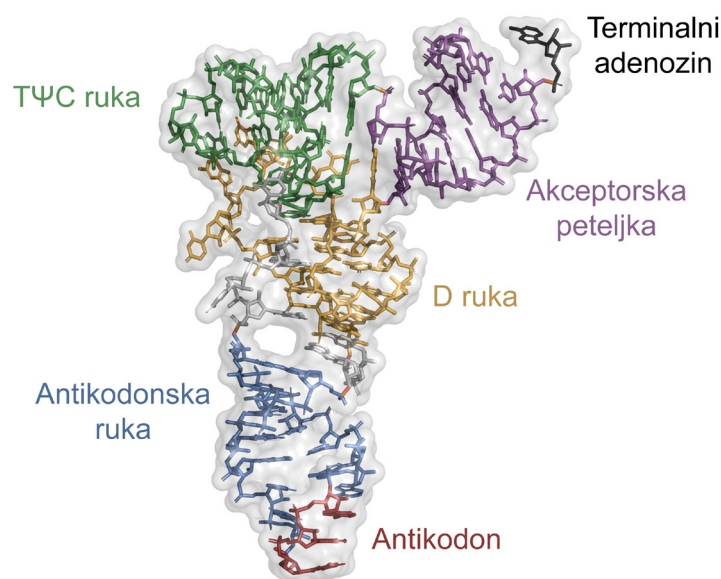
Prije samih aminoacil-tRNA-sintetaza potrebno je proučiti građu jednog od njihovih supstrata – tRNA. Molekule tRNA su poliribonukleotidi. Njihovo postojanje i ulogu, prenošenje aminokiseline do ribosoma te prepoznavanje kodona, davne 1955. godine pretpostavio je Francis Crick, zaključivši da su za dešifriranje genetičkog koda potrebne molekule adapteri [67]. Prepoznavanje kodona ostvaruje se preko slijeda koji se naziva antikodon. Antikodon je slijed od tri nukleotida koji su komplementarni kodonu i s njim se sparuju u antiparalelnom smjeru (prepoznaju se prva baza kodona i treća baza antikodona). Iako postoji 61 antikodon koji kodira za aminokiseline, nije potrebno toliko tRNA za njihovo prepoznavanje. To je posljedica pojave koja se naziva „hipoteza kolebljivih baza“ [33]. Ona kaže kako je sparivanje treće baze kodona i prve antikodona kolebljivo. Odnosno, ne mora se ostvariti Watson-Crickov par baza za uspješno prepoznavanje. Uslijed toga stanici su potrebne minimalno 32 različite tRNA za prepoznavanje 61 kodona. One tRNA koje prepoznaju različite kodone koji kodiraju za istu aminokiselinu nazivaju se izoakceptori.

Osim antikodona, tRNA posjeduju i druge važne i vrlo očuvane strukturne elemente. Prvu primarnu strukturu molekule tRNA (tRNA^{Ala}) odredio je Robert Holley 1965. godine [68,69]. Danas se u bazama podataka nalaze geni za blizu 400 000 različitih tRNA iz skoro 5000 organizama [70,71]. Na temelju svih tih podataka nedvosmisleno se zna kako je struktura tRNA očuvana kroz sve domene života. Iako se može pronaći tRNA od 54 pa sve do 100 nukleotida, one ih uglavnom broje oko 76. Iz toga slijedi da se mase tRNA kreću od 18 do 31 kDa. Dodatnoj raznolikosti tRNA doprinose i brojne posttranskripcijske modifikacije kojih može biti i do 25 % [33]. Na slici 2.5 modelom djeteline shematski je prikazana molekula tRNA i njena sekundarna struktura [33].



Slika 2.5. Sekundarne strukture tRNA – model djeteline.

Ističe se šest specifičnih elemenata. Prvi element je fosfat na 5' kraju. Zatim slijedi akceptorska peteljka – element građen od sedam parova baza i izrazito sačuvanog 3' CCA kraja. Upravo se na 3' kraju, točnije na 2'OH ili 3'OH hidroksilnu skupinu terminalnog adenzina (A76), može kovalentno vezati aminokiselina. Treći element je D ruka koja je građena od 3 od 4 para baza i petlje od 5 do 9 nukleotida, a koja je specifična po tome što sadrži modificiranu bazu dihidrouridin (D). Četvrti element je antikodonska ruka koja je građena od 5 parova baza i omče koja sadrži baze antikodona. Peti element je najrazličitiji duž svih tRNA te se zbog toga naziva varijabilna ruka. Radi se o strukturi koja može sadržavati od 3 do 21 nukleotida i do 8 parova baza. U konačnici postoji T Ψ C ruka koja se sastoji od pet parova baza i uglavnom završava sa slijedom T Ψ C pri čemu je Ψ baza pseudouridin. Pseudouridin je derivat uracila koji umjesto N-C glikozidne veze dušične baze i šećera ima C5-C1' glikozidnu vezu. Izuzev primarne i sekundarne, tRNA ima i specifičnu tercijarnu strukturu u obliku slova L (slika 2.6).

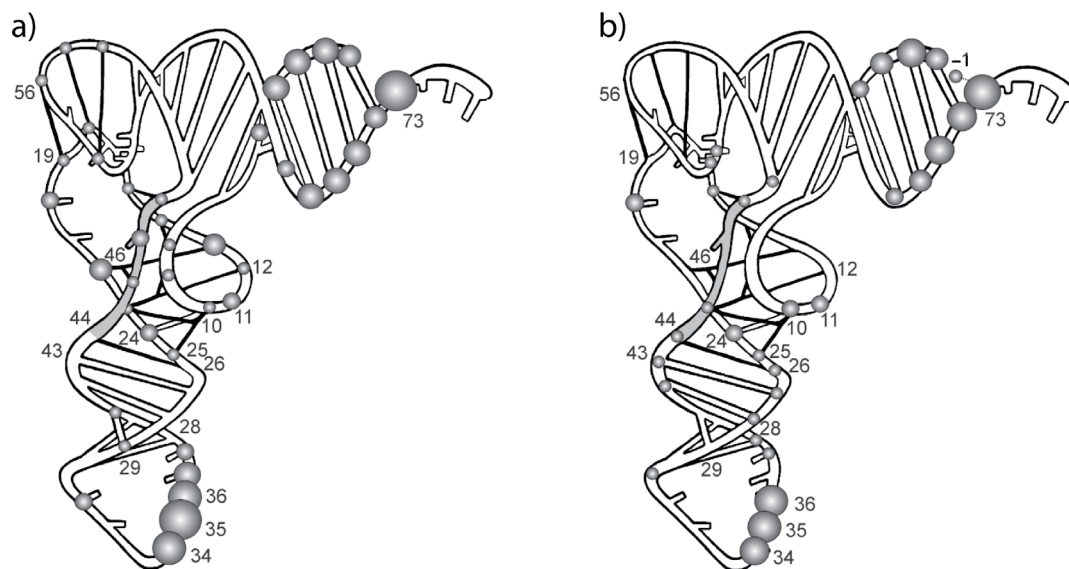


Slika 2.6. Tercijarna struktura tRNA^{Phe} iz *E. coli* (PDB ID: 3L0U).

Struktura je stabilizirana vodikovim vezama i interakcijama slaganja baza (engl. *stacking interactions*). Oba kraja su otprilike jednako duga (60 Å). Jedan krak čine TΨC ruka i akceptorska peteljka, a drugi D i antikodonska ruka. Strukturnom raspodjelom u kojoj se na suprotnim krajevima molekule nalaze najvažniji elementi za funkciju tRNA (antikodonska ruka i akceptorska peteljka) omogućeno je maksimalno iskorištavanje potencijala za ostvarivanje pripadnih interakcija. S jedne strane antikodon ostvaruje vrlo specifične interakcije, dok s druge strane akceptorska peteljka uglavnom ostvaruje univerzalne interakcije.

Upravo se u područjima oko antikodonske ruke i akceptorske peteljke nalazi najveći broj elemenata koji ostvaruju interakcije s aaRS [8–10]. Te elemente naziva se pozitivnim ili negativnim elementima identiteta (shematski su prikazani na slici 2.7). Njihov značaj leži u tome što je ostvarivanje pravilnih interakcija, odnosno prepoznavanje pripadne aaRS i tRNA, jedan od temeljnih načina očuvanja točnosti u procesu translacije. Pozitivni elementi identiteta obuhvaćaju one elemente čije prepoznavanje doprinosi nastajanju kinetički produktivnog kompleksa aaRS:tRNA^{aa}. Najčešće se radi o prepoznavanju barem jedne baze antikodona te baznog para 1-72 ili baze 73 u akceptorskoj peteljci. Baza na poziciji 73 naziva se diskriminatorska baza. Pokazano je kako jedino u slučaju Leu i Ser aaRS ne prepoznaje niti jedan element antikodona. To zapravo ne čudi jer je poznato kako su te aminokiseline kodirane s čak šest kodona. U takvim slučajevima aaRS ostvaruje interakcije s drugim elementima tRNA poput varijabilne ruke. S druge strane, negativni elementi identiteta sprečavaju interakcije

neprikladnih aaRS i tRNA^{aa}. Primjerice, baza A36 sprečava prepoznavanje tRNA^{Arg} od strane triptofanil-tRNA-sintetaze (TrpRS) u *E. coli* [9]. U konačnici, može se zaključiti kako prepoznavanje pripadne tRNA ne predstavlja problem za aaRS zbog velikog broja interakcija koje međusobno ostvaruju.



Slika 2.7. Vjerojatnost uloge određene baze kao elementa identiteta u tRNA iz a) razreda I i b) razreda II. Brojevima je označen položaj baze u primarnoj strukturi, a veličina kuglica odražava vjerojatnost da je baza na toj poziciji element identiteta. Preuzeto i prilagođeno iz [10].

2.3. Aminoacil-tRNA-sintetaze

Aminoacil-tRNA-sintetaze su enzimi koji kataliziraju nastajanje esterske veze između aminokiseline i tRNA^{aa}. Prema međunarodnoj enzimskoj klasifikaciji pripadaju skupini ligaza koje kataliziraju nastajanje C-O kovalentne veze i pripisuje im se EC broj (engl. *enzyme commission number*) 6.1.1.X.

2.3.1. Podjela aminoacil-tRNA-sintetaza

Aminoacil-tRNA-sintetaze su podijeljene u dvije skupine, razred I i razred II. Podjela je prikazana u tablici 2.2, a temelji se na strukturnim i mehanističkim razlikama [2,3]. Jedina iznimka jest lizil-tRNA-sintetaza (LysRS) koja uglavnom pripada razredu II, ali varijanta koja se nalazi u nekim bakterijama i većini arheja svrstava se u razred I [72,73]. Dodatno, unutar razreda I i II, aaRS se dijele u podrazrede a, b i c. Prvotna podjela u podrazrede određena je na temelju riješenih kristalnih struktura i načina na koji aaRS vežu akceptorsku peteljku tRNA [74,75]. Naknadno je na temelju evolucijske srodnosti aaRS (filogenetske analize) razred I podijeljen u pet podrazreda a-e [30].

Tablica 2.2. Podjela aminoacil-tRNA-sintetaza.

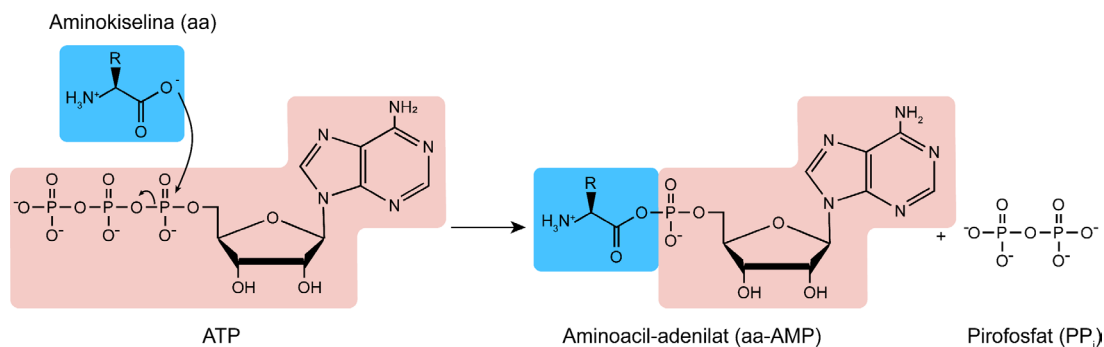
Razred I			Razred II		
Podrazred	Enzim	Kvaternarna struktura	Podrazred	Enzim	Kvaternarna struktura
a	IleRS	α	a	GlyRS	α_2
	LeuRS	α		HisRS	α_2
	MetRS	α, α_2		ProRS	α_2
	ValRS	α		SerRS	α_2
b	CysRS	α, α_2		ThrRS	α_2
	GlnRS	α			
	GluRS	α			
c	TrpRS	α_2	b	AsnRS	α_2
	TyrRS	α_2		AspRS	α_2
				LysRS	α_2
d	ArgRS	α	c	AlaRS	α_2, α
				PheRS	$(\alpha\beta)_2$
e	LysRS	α		TrpRS	α_2

Aminoacil-tRNA-sintetaze razreda I uglavnom su monomerne strukture, uz iznimke TrpRS i TyrRS koji su homodimeri. Katalitička srž aaRS razreda I građena je od peteročlane paralelne β -ploče čiji su lanci povezani α -zavojnica, a koja pripada superporodici HUP (engl. *HIGH-signature proteins*, *UspA*, *PP-ATPase*) [76] i često se nalazi u enzimima koji vežu ATP i NADH. Kod svih aaRS razreda I opaža se insercija u navedenoj domeni. Radi se o CP1 domeni (engl. *connective peptide 1*) koja posjeduje dodatnu, osobito veliku inserciju (cca. 200 aminokiselina) kod izoleucil-, leucil- i valil-tRNA-sintetaza (IleRS, LeuRS i ValRS) koja ima zasebnu katalitičku aktivnost (vidi kasnije). ATP se u aktivno mjesto veže u izduženoj konformaciji pri čemu većinu interakcija ostvaruje s visoko očuvanim sljedovima KMSKS i HIGH. Nadalje, većina enzima iz ovog razreda ostvaruje interakcije s antikodonom preko C-terminalne domene. Vezanje akceptorske peteljke odvija se sa strane malog utora pri čemu se peteljka oblikuje u strukturu ukosnice [1].

S druge strane, aminoacil-tRNA-sintetaze razreda II uglavnom postoje u homodimernim formama. Njihovu katalitičku srž sačinjava sedmeročlana antiparalelna β -ploča premrežena α -zavojnica u kojoj se primjećuju tri vrlo očuvana motiva, motivi 1, 2 i 3. Motiv 1 ne sudjeluje u vezanju supstrata, već se nalazi na interakcijskom sučelju između podjedinica dimera i ostvaruje stabilizirajuće interakcije. Motivi 2 i 3 nalaze se u susjednim lancima spomenute β -ploče. Motiv 2 sudjeluje u vezanju aminokiseline, ATP-a i tRNA. Za razliku od aaRS razreda I, ovi enzimi vežu tRNA sa strane malog utora. Motiv 3 funkcijom je analogan motivima KMSKS i HIGH te veže ATP, ali u svinutoj konformaciji [1].

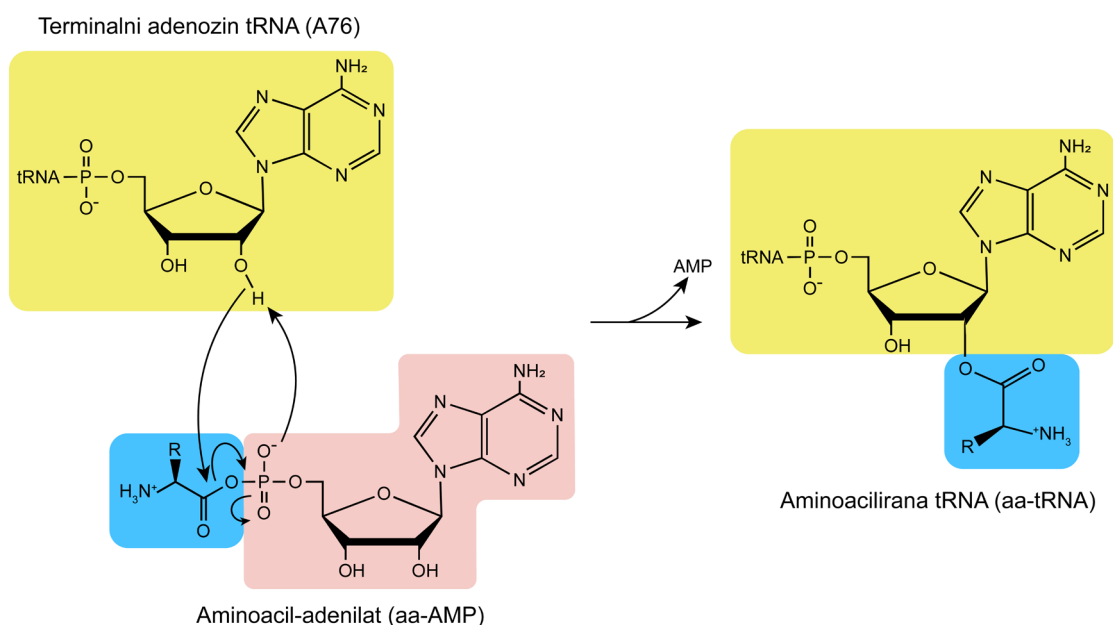
2.3.2. Mehanizam reakcije aminoaciliranja

Aminoacil-tRNA-sintetaze reakciju aminoaciliranja provode u dva koraka, aktivacija aminokiseline i njen prijenos na tRNA. Oba koraka odvijaju se u istom sintetskom aktivnom mjestu. Reakcija aktivacije aminokiseline obuhvaća nastajanje aminoacil-adenilata (aa-AMP) i pirofosfata (PP_i) iz aminokiseline i ATP-a (slika 2.8). Mehanistički gledano, radi se o bimolekulskoj nukleofilnoj supstituciji u kojoj je α -karboksilni kisikov atom nukleofil koji napada α -fosfor ATP-a, a pirofosfat je izlazna skupina. Kod većine aaRS aktivacija aminokiseline može se odvijati i bez vezanja tRNA. Međutim, to nije slučaj kod ArgRS, GlnRS, GluRS i LysRS-I. Dakle, u njihovom slučaju radi se o ribonukleoproteinima kod kojih katalitička aktivnost leži u proteinskoj komponenti.



Slika 2.8. Mehanizam reakcije aktivacije aminokiseline.

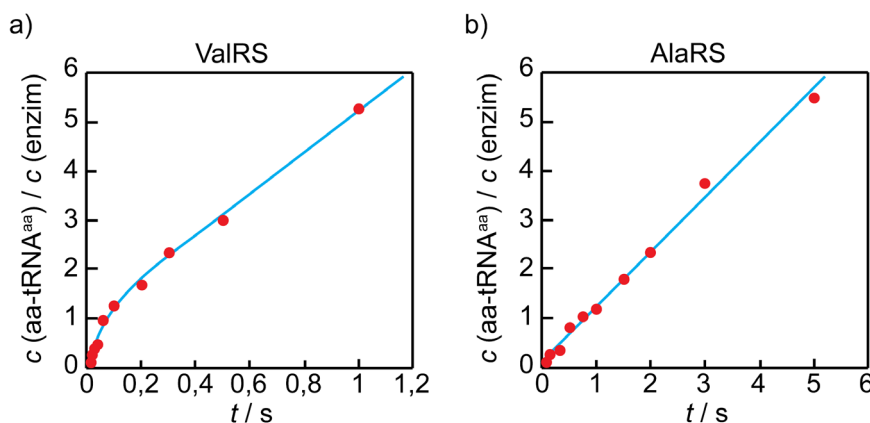
Jednom kada se aminokiselina aktivira, ona može biti prenesena na tRNA. Mehanizam reakcije prijenosa također je bimolekulska nukleofilna supstitucija u kojoj 2'OH ili 3'OH skupina terminalnog A76 tRNA napada karbonilni ugljikov atom aminokiseline pri čemu nastaje esterska veza, a adenilat je izlazna skupina (slika 2.9). Cijeli proces je termodinamički povoljan jer je spregnut s reakcijom anorganske pirofosfataze koja hidrolizira pirofosfat nastao u aktivaciji.



Slika 2.9. Mehanizam reakcije prijenosa aminokiseline na tRNA.

Strukturne razlike između aaRS razreda I i II, opisane u prethodnom poglavlju, prenose se na mehanističke razlike u ukupnoj reakciji aminoaciliranja. Dok sve aaRS razreda I prenose aminokiselinu na 2'OH skupinu tRNA, razred II je prenosi na 3'OH skupinu [77]. Jedina iznimka u razredu II je PheRS [77]. Ipak, valja spomenuti kako aa-tRNA^{aa} u otopini može slobodno prelaziti iz 2'-aminoaciliranog u 3'-aminoacilirani oblik [4]. Pri tome je ravnoteža

pomaknuta prema nastajanju potonjeg jer EF-Tu veže samo tRNA aminoaciliranu na 3'OH skupini te je isključivo ona supstrat peptidil-transferaznog centra na ribosomu [5]. Nadalje, detaljna kinetička karakterizacija reakcije aminoaciliranja pokazala je da se razred I i razred II razlikuju i u koraku koji određuje brzinu reakcije. Kod razreda I to je disocijacija produkta, dok je kod razreda II to aktivacija aminokiseline u prisutnosti tRNA [3]. To je pokazano tako što je praćena reakcija aminoaciliranja u predustaljenom i ustaljenom stanju. Takvim mjerenjima moguće je opaziti bifaznu ili linearnu ovisnost koncentracije produkta u vremenu (slika 2.10). Za bifaznu ovisnost (slika 2.10 a) karakteristična je kratka, brza, eksponencijalna faza nakon koje slijedi duga i sporija linearna faza. Prva faza naziva se *burst* (prevedeno s engl.: eksplozija, prsnuće) fazom i ona odgovara brzom nastajanju produkta čija količina stehiometrijski odgovara količini enzima (aktivnih mjesta) u reakcijskoj smjesi (sjecište y-osi određeno je ekstrapolacijom linearne faze). *Burst* faza je posljedica brze kemijske pretvorbe iza koje slijedi drugi sporiji korak koji određuje ukupnu brzinu reakcije u ustaljenom stanju što se manifestira kao sporija linearna faza. Najčešće se radi o disocijaciji produkta ili konformacijskoj promjeni koja joj prethodi. Ovakav mehanizam opažen je kod ValRS kao predstavnika aaRS razreda I [3]. Opažanje samo linearne faze (slika 2.10 b), kao što je to bio slučaj za AlaRS kao predstavnika aaRS razreda II, ukazuje na to da je prvi korak kemijske pretvorbe u reakcijskom putu onaj koji ograničava kemijsku reakciju [3].

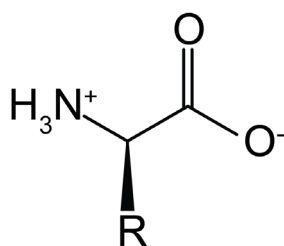


Slika 2.10. Aminoaciliranje u uvjetima predustaljenog i ustaljenog stanja uz a) ValRS i b) AlaRS. Preuzeto i prilagođeno iz [3].

2.3.3. Prepoznavanje supstrata i točnost reakcije aminoaciliranja

S obzirom na to da je aminoaciliranje preduvjet za translaciju, točnost tih procesa je blisko korelirana. Procjenjuje se kako je razina pogreške u translaciji koju stanica može tolerirati 1 u 3300 [6]. Da bi aaRS održale razinu točnosti na toj ili višoj razini potrebno je prepoznavanje

isključivo pripadnih supstrata. Prepoznavanje pripadne tRNA ne predstavlja problem za aaRS, jer, kao što je već spomenuto, radi se o molekulama koje su usporedive veličinom (18-32 kDa vs cca. 75-180 kDa). Iz velikih masa proizlazi veliko interakcijsko sučelje, odnosno velik broj interakcija. Među njima se ističu pozitivni i negativni elementi identiteta koji osiguravaju točno prepoznavanje aaRS i tRNA. Prepoznavanje aminokiseline, čija je opća struktura prikazana na slici 2.11, je druga priča. Prosječna veličina aminokiseline je 110 Da što znači da su oko 230 puta manje od tRNA, a samim time je i broj interakcija koje mogu ostvariti s aaRS znatno smanjen. Nadalje, glavnu interakciju aminokiseline ostvaruju preko α -amino i α -karboksilne skupine. Iako se radi o jakim usmjerenim interakcijama, problem leži u tome što su te skupine zajedničke svim aminokiselinama – pripadnim i nepripadnim. Dakle, aaRS se moraju osloniti na prepoznavanje i specifično vezanje pripadne aminokiseline isključivo na temelju interakcija s bočnim ogrankom. Nedavna analiza pokazala je kako aaRS značajno efikasnije eliminiraju nepripadne aminokiseline nego ostali enzimi koji koriste aminokiseline kao supstrate što ih čini vrijednim modelom za istraživanje enzimske specifičnosti [18].



Slika 2.11. Opća struktura aminokiseline.

Mehanizmi kojima aaRS osiguravaju eliminaciju nepripadnih supstrata su raznoliki. Najčešće se diskriminacija temelji na steričkim smetnjama koje za posljedicu imaju smanjen afinitet prema supstratu i/ili kinetički neproduktivno vezanje. To se može primijetiti u slučaju kemijski sličnih, ali većih supstrata, primjerice kod AlaRS i α -aminobutirata (Abu) [78] te ValRS i izoleucina (Ile) [25], a efikasna eliminacija Ile, koji je strukturni izomer leucina (Leu), vidljiva je i kod LeuRS [79]. Aktivno mjesto GlyRS je izrazito negativno nabijeno te sadrži hidrofilne aminokiseline (Ser ili Thr) koje sprečavaju aktivaciju Ala [80]. Bakterijska ThrRS primjenjuje još zanimljivije rješenje, naime u aktivnom mjestu dva His i jedan Cys koordiniraju ion Zn^{2+} , a četvrto mjesto zauzima molekula vode. Vezanje Thr u ovo aktivno mjesto omogućeno je zbog toga što može bidentatno koordinirati ion cinka i tako zamijeniti molekulu vode [81]. Strukturno najbližija aminokiselina Thr je Val koja nema tu mogućnost te biva eliminirana iz sintetskog puta ThrRS [82].

Ipak, postoje mnoge aminokiseline koje su po svojim fizikalno-kemijskim svojstvima dovoljno slične pripadnim aminokiselinama da ih aaRS mogu pogrešno prepoznavati i aktivirati s učestalošću iznad granica tolerancije (1 u 3300). Jedan od takvih primjera je LeuRS koja u reakciji aktivacije pripadni leucin prepoznaje samo 116 puta bolje od nepripadne neproteinogene aminokiseline norvalin (Nva) [79]. Broj kojim se izražava koliko je puta neki nepripadni supstrat lošiji od pripadnog naziva se faktor diskriminacije, a definira se kao

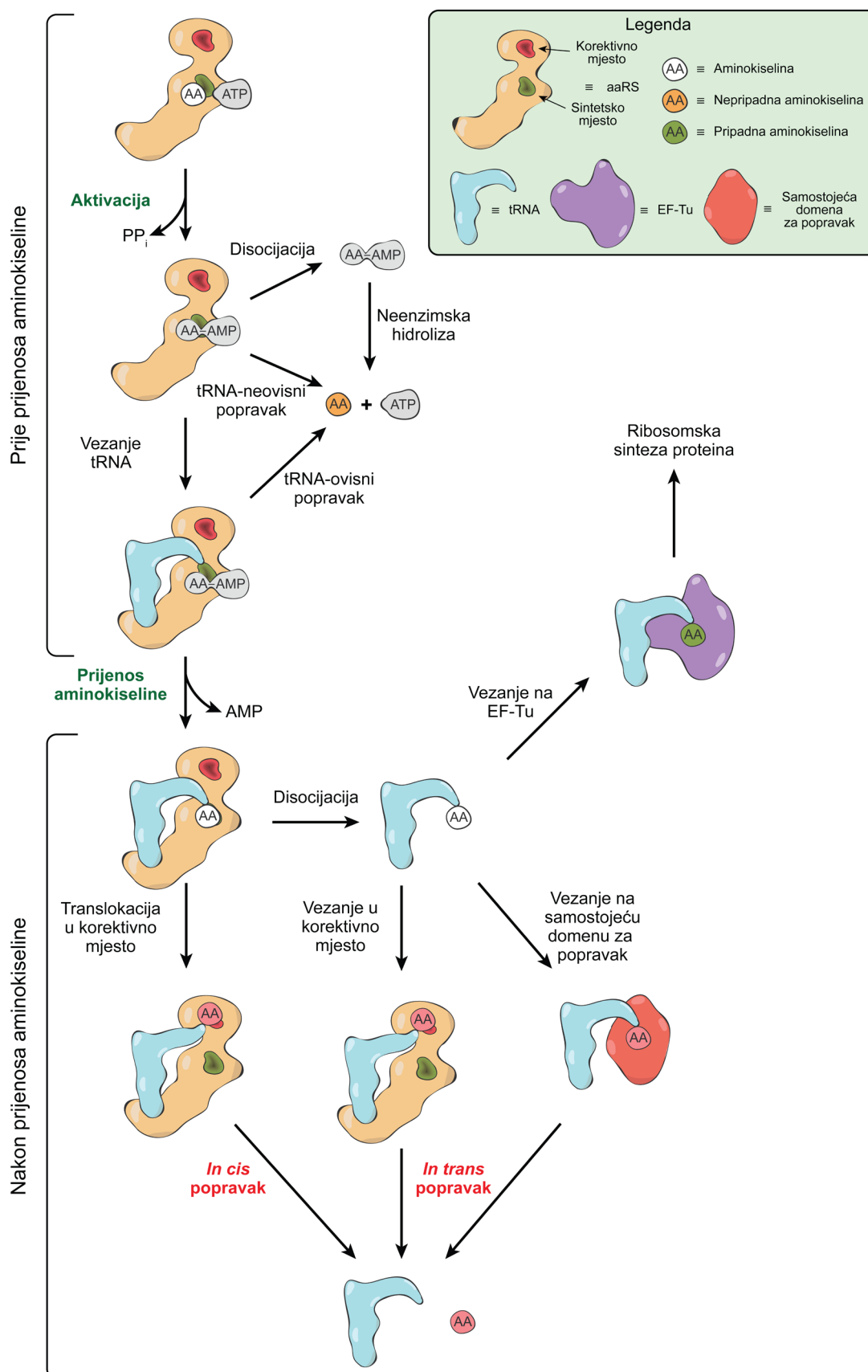
$$D = \frac{k_{sp,pripadni\ supstrat}}{k_{sp,nepripadni\ supstrat}} = \frac{\left(\frac{k_{cat}}{K_M}\right)_{pripadni\ supstrat}}{\left(\frac{k_{cat}}{K_M}\right)_{nepripadni\ supstrat}}.$$

Osim LeuRS, tu je i IleRS koja cca. samo

200 puta lošije prepoznaje Nva i Val od pripadnog Ile [31]. O oba enzima kasnije će biti puno više govora. One aaRS čija je razina pogreške veća od tolerabilne razine evolucijski su razvile mehanizme popravka pogreške. U razredu I to su IleRS, LeuRS, MetRS i ValRS, a u razredu II AlaRS, LysRS-II, PheRS, ProRS, SerRS i ThrRS. Popravak pogreške podrazumijeva hidrolizu pogrešno sintetiziranog međuprodukta ili produkta, te se može odvijati prije ili nakon prijenosa aminokiseline na tRNA. U prvom slučaju, supstrat popravka pogreške je aminoacil-adenilat (aa-AMP). U drugom slučaju, supstrat je tRNA aminoacilirana nepripadnom aminokiselinom (misaminoacilirana tRNA, misaa-tRNA).

2.3.4. Popravak pogreške prije prijenosa

Molekula tRNA može ne stimulirati ili stimulirati popravak pogreške prije prijenosa aminokiseline pa se tako radi o tRNA-neovisnom i tRNA-ovisnom popravku pogreške prije prijenosa (slika 2.12). U oba slučaja popravak se odvija u sintetskom mjestu [11]. U slučaju SerRS, MetRS i LysRS-II popravak pogreške prije prijenosa je jedini oblik popravka [1]. No, ako enzim posjeduje i popravak pogreške nakon prijenosa, tada je popravak prije prijenosa sporedan način popravka. Procjenjuje se kako kod ValRS i IleRS tRNA-neovisni popravak sudjeluje sa svega 3 % aktivnosti u ukupnoj aktivnosti popravka pogreške [11]. IleRS je jedina aaRS za koju je nedvojbeno pokazano kako posjeduje tRNA-ovisni popravak pogreške prije prijenosa, a pretpostavlja se kako njegov doprinos doseže i do 30% aktivnosti ukupnog popravka pogreške čime se ističe u odnosu na ostale aaRS [23]. Vrijedi spomenuti kako u tRNA-ovisnom popravku tRNA ne sudjeluje direktno u hidrolizi aa-AMP, već utječe na konformaciju aktivnog mjesta čineći popravak efikasnijim [24].

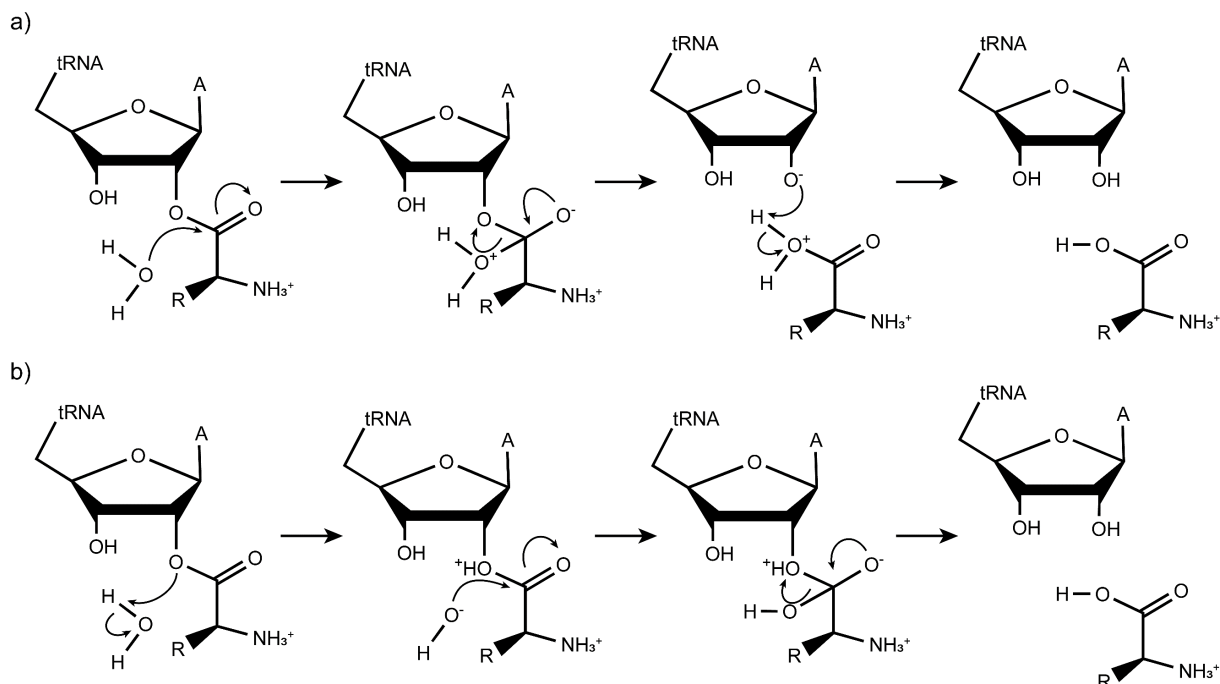


Slika 2.12. Ukupna reakcijska shema aaRS.

2.3.5. Popravak pogreške nakon prijenosa

Dominantan tip popravka jest popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline, odnosno hidroliza pogrešno aminoacilirane tRNA (misaminoacilirane tRNA). Za razliku od popravka pogreške prije prijenosa, popravak nakon prijenosa odvija se u korektivnom mjestu, smještenom u zasebnoj domeni za popravak pogreške, koje je od sintetskog mjesta udaljeno 30-40 Å [12–16]. Nakon što aminokiselina biva prenesena na tRNA postoji nekoliko mogućih ishoda (slika 2.12). Prva opcija je da se 3' kraj misaminoacilirane tRNA premjesti iz sintetskog mjesta u mjesto za popravak pogreške bez disocijacije tRNA s enzima, gdje zatim slijedi hidroliza esterske veze između aminokiseline i tRNA. U tom slučaju radi se o popravku pogreške *in cis*. U drugom slučaju, (mis)aa-tRNA brže disocira s aaRS nego što se događa translokacija. Disocirana (mis)aa-tRNA može se ponovno vezati na aaRS tako da se misaminoacilirani 3' kraj sada veže u korektivno mjesto. Ako tada dođe do hidrolize (mis)aa-tRNA, radi se o popravku pogreške *in trans*. Popravak *in trans* opaža se i ako se disocirana (mis)aa-tRNA, umjesto na aaRS, veže na samostojeću domenu za popravak pogreške – riječ je o homolozima domena za popravak pogreške aaRS razreda II koji hidroliziraju misaminoacilirane tRNA (vidi kasnije). Osim reasocijacije na aaRS, (mis)aa-tRNA može asociirati s EF-Tu koji je štiti od hidrolize i odvodi na ribosom kako bi se uključila u proces translacije. Uvriježeno je mišljenje kako je *in cis* popravak specifičan za aaRS razreda I, dok je *in trans* svojstvo razreda II [13,17,83].

Kod aaRS razreda I, popravak pogreške nakon prijenosa primjećuje se samo kod evolucijski vrlo srodnih pripadnika razreda Ia – IleRS, LeuRS i ValRS. Popravak nakon prijenosa kod ovih aaRS odvija se u korektivnom mjestu domene za popravak pogreške ubačenoj u peptid CP1 koji dijeli katalitičku domenu na dva dijela [84,85]. Prema predloženom mehanizmu reakcije radi se o kinetici potpomognutoj supstratom. Naime, smatra se kako 3'OH skupina riboze terminalnog adenzina A76 gradi vodikovu vezu s katalitičkom molekulom vode. Na taj način voda se pozicionira za hidrolizu i aktivira za nukleofilni napad na karboksilni ugljikov atom koji sudjeluje u esterskoj vezi između aminokiseline i tRNA (slika 2.13). I dalje nije razjašnjeno dolazi li do deprotonacije molekule vode prije ili nakon njene adicije na karboksilni ugljikov atom. Uloga proteinskog dijela je stabilizacija prijelaznog stanja i pravilno pozicioniranje supstrata [86–88].



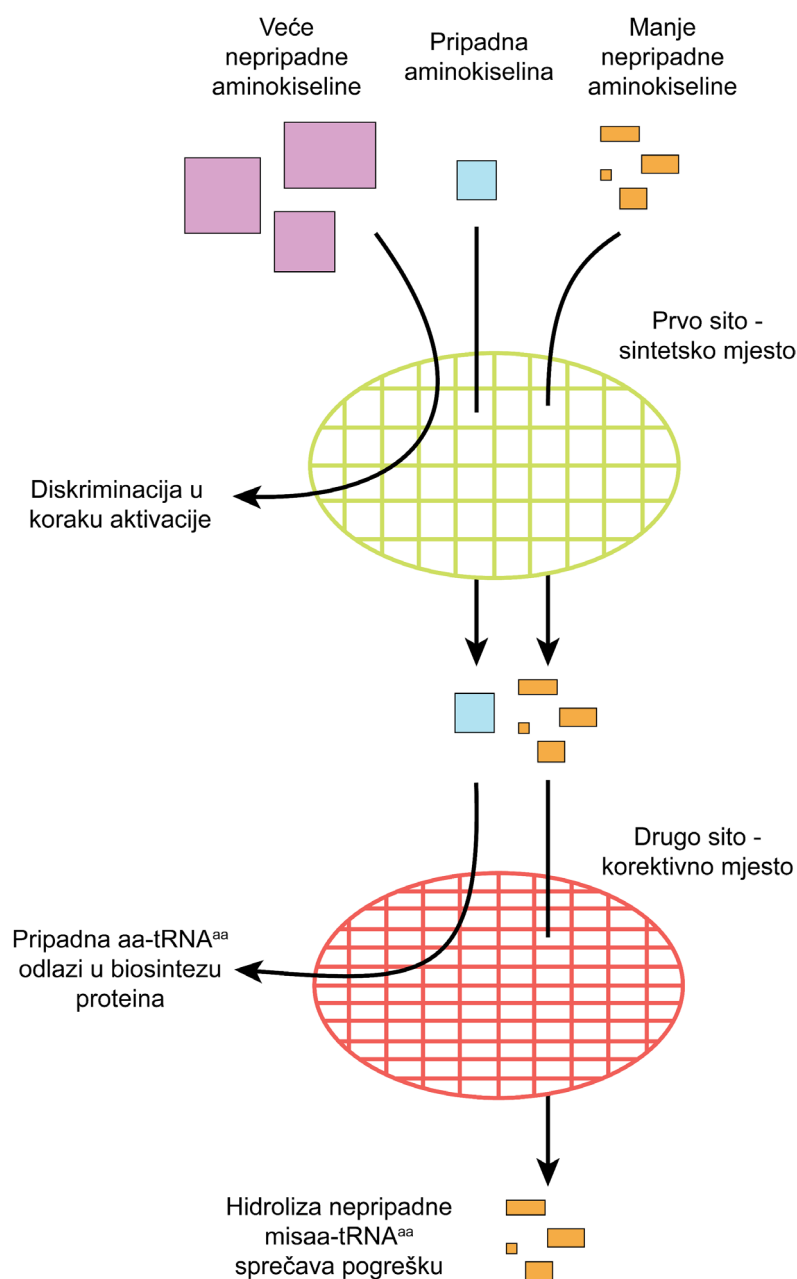
Slika 2.13. Dva predložena mehanizma reakcije hidrolize misaminoacilirane tRNA u mjestu za popravak pogreške, a) deprotonacija vode nakon i b) deprotonacija vode prije adicije na aminokiselinu.

Treba spomenuti još jednu, vjerojatno i najvažniju, ulogu proteinskog dijela, a to je diskriminacija pripadnog para aa-tRNA^{aa}. Zasigurno vrijedi podsjetiti kako je cilj mjesta za popravak pogreške hidrolizirati nepripadni par aminokiseline i tRNA, dok pripadni par ne smije podleći hidrolizi. Upravo su mehanizmi kojima se ostvaruje razlikovanje aminokiselina u mjestu za popravak pogreške jedna od glavnih tema ove disertacije te će o tome biti više govora kasnije.

U slučaju aaRS razreda II opaža se veća evolucijska raznolikost domena za popravak pogreške. Na C-kraju AlaRS i N-kraju ThrRS nalaze se homologne domene za popravak pogreške. Objema domenama je osnovna funkcija hidroliza tRNA misaminoacilirane serinom (Ser) [82,89–93]. Pronađena je i homologna samostojeća domena AlaX koja hidrolizira Ser-tRNA^{Ala} [90], ali je opaženo kako neke AlaX hidroliziraju i Gly-tRNA^{Ala} [94]. Nadalje, domena za popravak pogreške ThrRS iz arheja homologna je skupini proteina koji sprečavaju ulazak D-aminokiselina u proteine – D-aminoacyl-tRNA-deacylaze, no svejedno ima zadaću hidrolize L-Ser-tRNA^{Thr} [95]. PheRS je heterotetramerni protein ($\alpha_2\beta_2$), a aktivno mjesto za popravak pogreške nalazi se u B3/B4 domeni β -podjedinice [26]. Najveću prijetnju točnosti aminociliranja PheRS predstavlja Tyr [26], a hidroliza Tyr-tRNA^{Phe} je osobito važna jer niti

EF-Tu niti ribosom ne razlikuju pripadni Phe- od nepripadnog para Tyr-tRNA^{Phe} [96]. U konačnici, posljednji član razreda II koji posjeduje popravak pogreške nakon prijenosa je ProRS kod kojega se, izuzev standardne domene za popravak pogreške (INS domena), nalaze čak dvije homologne samostojeće domene (YbaK i ProXp-Ala) [94,97,98]. INS domena je optimirana da hidrolizira Ala-tRNA^{Pro} [98]. No, ProRS osim Ala na tRNA^{Pro} može prenijeti i Cys [99]. Hidroliza Cys-tRNA^{Pro} postiže se pomoću samostojeće domene YbaK [100]. U nekim organizmima pronađena je ProRS koja ne posjeduje INS domenu. U takvim slučajevima za hidrolizu Ala-tRNA^{Pro} zadužena je samostojeća domena ProXp-Ala [101]. Za kraj vrijedi spomenuti kako su u nekim organizmima pronađeni i drugi homolozi INS domene, ProXp-ST1 i ProXp-ST2 za koje je pokazano da hidroliziraju razne tRNA misaminoacilirane sa Ser i Thr. Pretpostavlja se kako ti enzimi svojim domaćinima pružaju selektivnu prednost u preživljavanju, ali za točno određivanje njihove uloge potrebna su daljnja istraživanja [102].

Međusobni odnos sintetskog i korektivnog mjesta prvi je 1970-ih godina opisao Alan Fersht modelom dvostrukog sita (slika 2.14) [25]. Model je postavljen na temelju istraživanja ValRS i IleRS enzima. Prema modelu, sintetsko mjesto je prvo, grubo sito u kojemu se sterički eliminiraju sve aminokiseline veće od pripadne. Pripadna aminokiselina i one manje od nje (u određenoj mjeri) bivaju prenesene na tRNA. Aminoacilirana-tRNA može se translocirati (*in cis*) ili disocirati pa reasocirati (*in trans*) u mjesto za popravak pogreške koje je drugo, fino sito. U mjesto za popravak pogreške mogu se vezati samo aminokiseline manje od pripadne. Vezanje pripadne aminokiseline spriječeno je na temelju steričkih smetnji. Esterska veza tRNA i nepripadnih aminokiselina biva hidrolizirana, a tRNA aminoacilirana pripadnom aminokiselinom odlazi u biosintezu proteina.



Slika 2.14. Shematski prikaz modela dvostrukog sita.

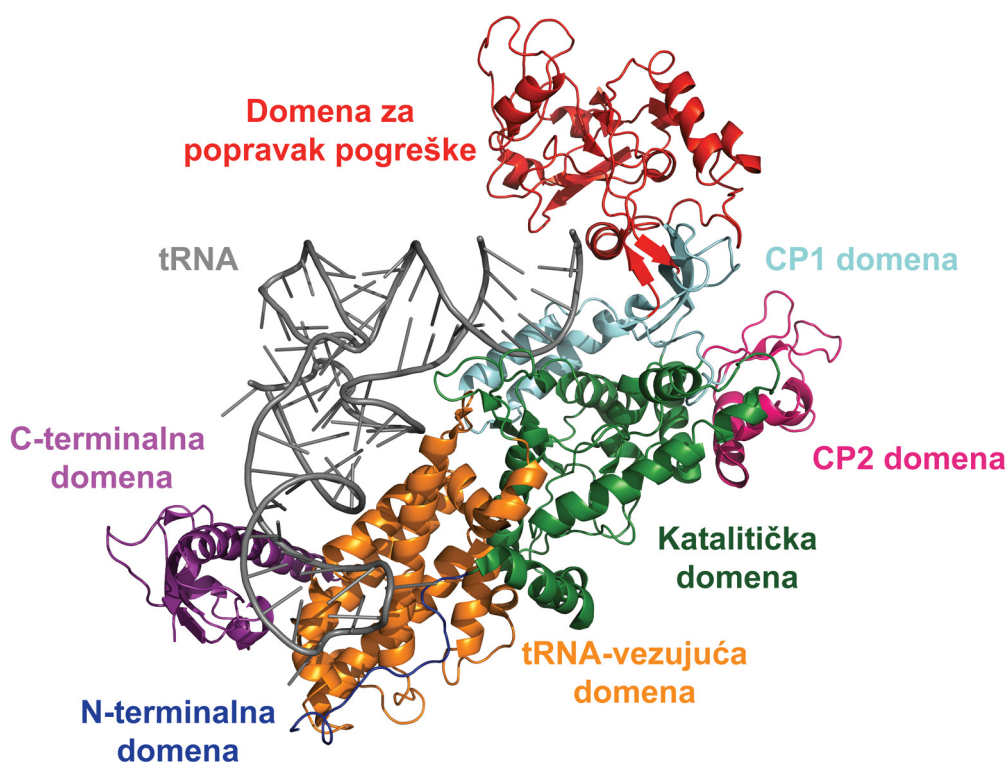
Iako je model dobro zamišljen i više nego zadovoljavajuć za grubo razumijevanje odnosa dvaju aktivnih mjesta, tijekom godina su pronađene određene iznimke, a model je nadograđivan. Prva iznimka jest PheRS čija domena za popravak pogreške hidrolizira Tyr-tRNA^{Phe}. Razlikovanje Tyr i Phe ne ostvaruje se na temelju razlike u veličini (nepripadna aminokiselina je veća od pripadne!), već na temelju različitih kemijskih svojstava. Specifično vezanje Tyr osigurano je interakcijama enzima i *para*-hidroksilne skupine koju Phe ne posjeduje [16,26]. U slučaju ProRS koji koristi domenu za popravak pogreške (INS domena) i

samostojeću domenu YbaK, radi se o modelu trostrukog sita [100,103]. U sintetskom mjestu (prvo sito) osim Pro, na tRNA^{Pro} se prenose i Ala i Cys. INS domena (drugo sito) hidrolizira samo Ala-tRNA^{Pro} pri čemu su pripadna Pro-tRNA^{Pro} i nepripadna Cys-tRNA^{Pro} eliminirane na temelju steričkih smetnji [97,100,104]. U konačnici YbaK (treće sito) hidrolizira isključivo Cys-tRNA^{Pro}. Do specifične hidrolize Cys-tRNA^{Pro} dolazi jer se odvija mehanizmom potpomognutim supstratom u kojemu je tiolna skupina Cys nužna za reakciju [104,105]. Za kraj će biti detaljnije analiziran primjer LeuRS. Za njega je prethodno spomenuto kako mu je najveća prijetnja točnosti aminoaciliranja neproteinogena aminokiselina norvalin (Nva) [79]. Nva je za jednu metilnu skupinu manji od Leu. U stanici se nalazi kao nusprodukt biosinteze Leu [106], s time da je opaženo kako se može akumulirati u mikroaerobnim uvjetima [22]. Prethodna istraživanja pokazala su kako je u mjestu za popravak pogreške LeuRS brzina hidrolize nepripadnog para Nva-tRNA^{Leu} oko 3500 puta veća od brzine hidrolize pripadnog para Leu-tRNA^{Leu} (228 vs 0,063 s⁻¹). S obzirom na to da je opažena nezanemariva brzina hidrolize Leu-tRNA^{Leu}, to je sugeriralo kako se ona ipak veže u aktivno mjesto za popravak pogreške. U nastavku istraživanja to je potvrđeno određivanjem konstante disocijacije za vezanje LeuRS i Leu-tRNA^{Leu}/Nva-tRNA^{Leu}. Razlika u afinitetu enzima prema Leu-tRNA^{Leu} i Nva-tRNA^{Leu} bila je zanemarivo mala (0,7 vs 0,5 μmol/dm³). Mala razlika objašnjena je činjenicom da enzim ostvaruje većinu interakcija s tRNA^{Leu} koja je zajednička obama supstratima. Stoga je određena i konstanta disocijacije za vezanje LeuRS i nehidrolizabilnih analoga supstrata popravka pogreške nakon prijenosa – 2'-amino-2'-(L-leucil)deoksiadenozina i 2'-amino-2'-(L-norvalil)deoksiadenozina. Analози predstavljaju aminoacilirani krajnji adenin tRNA (A76) i na taj način daju puno bolji uvid u interakcije bočnog ogranka Leu/Nva s korektivnim mjestom LeuRS. Pokazano je kako se analog Leu-tRNA^{Leu} veže sa svega 10 puta manjim afinitetom od analoga Nva-tRNA^{Leu} (2,8 vs 0,19 mmol/dm³). Tako male razlike u afinitetu nisu mogle objasniti tako veliku razliku u brzini hidrolize (3500 puta). U konačnici, pomoću simulacija molekulske dinamike predložen je mehanizam prema kojemu se Leu-tRNA^{Leu} veže u aktivno mjesto, ali u neproduktivnoj konformaciji pri čemu δ-metilna skupina leucina ometa pravilno smještanje katalitičke molekule vode [31]. Dakle, u LeuRS sustavu radi se o kinetičkoj diskriminaciji pripadnog supstrata. Zanimljivo, i kod IleRS je primijećena slična brzina hidrolize pripadnog para Ile-tRNA^{Ile} (0,058 s⁻¹) [24]. Zbog toga, a i jer se radi o bliskom srodniku LeuRS, ovaj enzim se postavio kao zanimljiv model za daljnje istraživanje enzimske specifičnosti i suodnosa sintetskog i korektivnog mjesta.

2.4. Isoleucil-tRNA-sintetaza

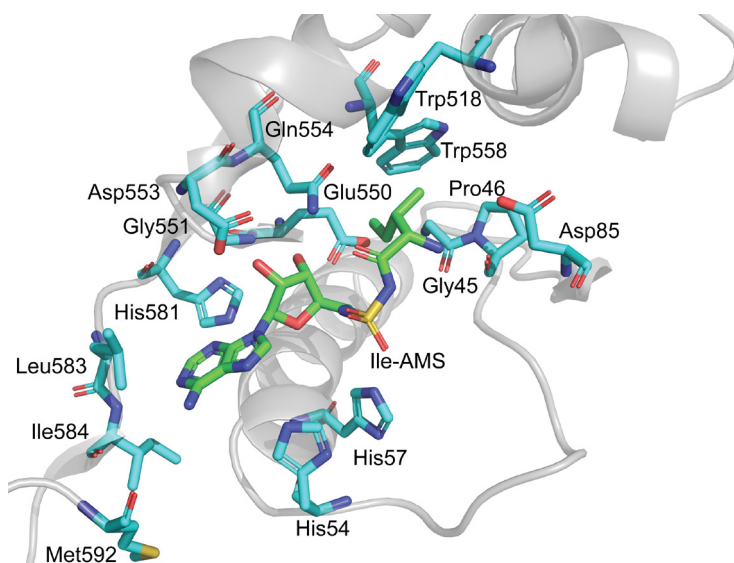
2.4.1. Strukturna obilježja isoleucil-tRNA-sintetaze

Isoleucil-tRNA-sintetaza je enzim koji katalizira aktivaciju i prijenos aminokiseline Ile na tRNA^{Ile}. IleRS pripada aaRS razredu Ia zajedno s bliskim evolucijskim srodnicima LeuRS i ValRS. IleRS je monomerni enzim veličine 104 kDa sastavljen od cca. 1000 aminokiselina. Struktura se uobičajeno dijeli na sedam domena: N-terminalna, katalitička domena, CP1, CP2, domena za popravak pogreške, tRNA-vezujuća i C-terminalna domena (slika 2.15).



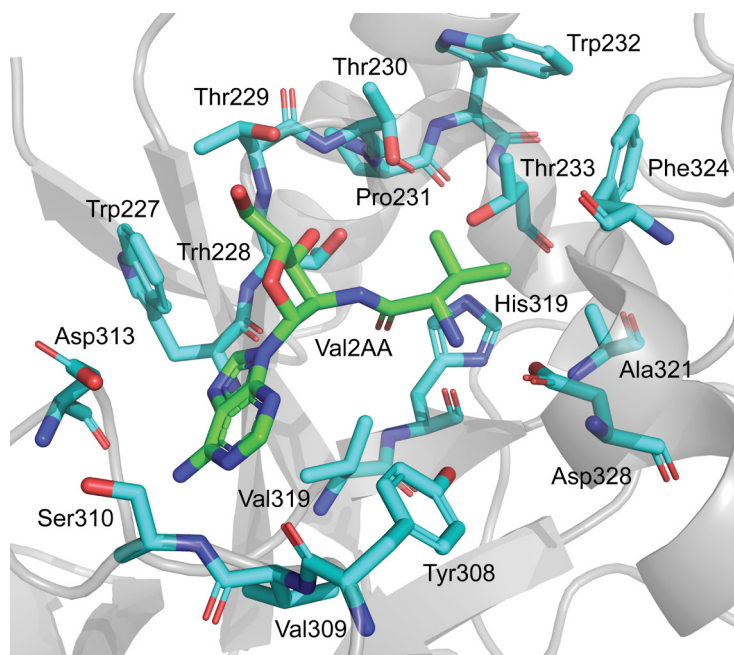
Slika 2.15. Struktura IleRS u kompleksu s tRNA^{Ile} iz *S. aureus* (PDB ID: 1QU3).

Katalitička domena sadrži prethodno opisanu strukturu iz superporodice HUP. Na temelju riješene kristalne strukture iz bakterije *T. thermophilus* identificirane su aminokiseline koje grade sintetsko aktivno mjesto i ostvaruju interakcije s isoleucil-adenilatom (Ile-AMP) (slika 2.16) [14,107]. Očekivano, aminokiseline iz očuvanih motiva HGVH i KMSKS ostvaruju interakcije s adenilatnim dijelom Ile-AMP, a radi se o Gly56, His57, Lys592, Met593, Ser594 i Lys595. Bočni ogranak izoleucina smješta se u hidrofobni džep koji grade Gly45, Pro46, Trp518 i Trp558. α -karboksilni ugljikov atom radi vodikovu vezu s dušikom bočnog ogranka Gln554, dok α -amino skupina radi vodikovu vezu s Asp85 i Pro46 [14,107]. Zbog toga što ostvaruju navedene reakcije, ovi bočni ogranci očuvani su u svim analiziranim IleRS [14].



Slika 2.16. Interakcije analoga izoleucil-adenilata (5'-N-[N-(L-izoleucil)sulfamoil]adenozin, Ile-AMS) u sintetskom mjestu IleRS iz *T. thermophilus* (PDB: 1JZQ).

Domena za popravak pogreške pojavljuje se kao insercija u CP1 domeni i građena je od otprilike 200 aminokiselina. U njoj je smješteno aktivno mjesto za popravak pogreške nakon prijenosa (korektivno mjesto) koje ima katalitičku aktivnost hidrolize misaminoacilirane tRNA^{Ile} [14,27,84,85,107]. Iz strukture *T. thermophilus* IleRS s vezanim analogom supstrata popravka pogreške nakon prijenosa (2'-amino-2'-valildeoksiadenozinom) u korektivno mjesto, identificirani su bočni ogranci zaduženi za pozicioniranje supstrata [27,28] (slika 2.17).



Slika 2.17. Interakcije analoga supstrata popravka pogreške nakon prijenosa (2'-amino-2'-L-valildeoksiadenozin, Val2AA) u korektivnom mjestu IleRS iz *T. thermophilus* (PDB: 1WNZ).

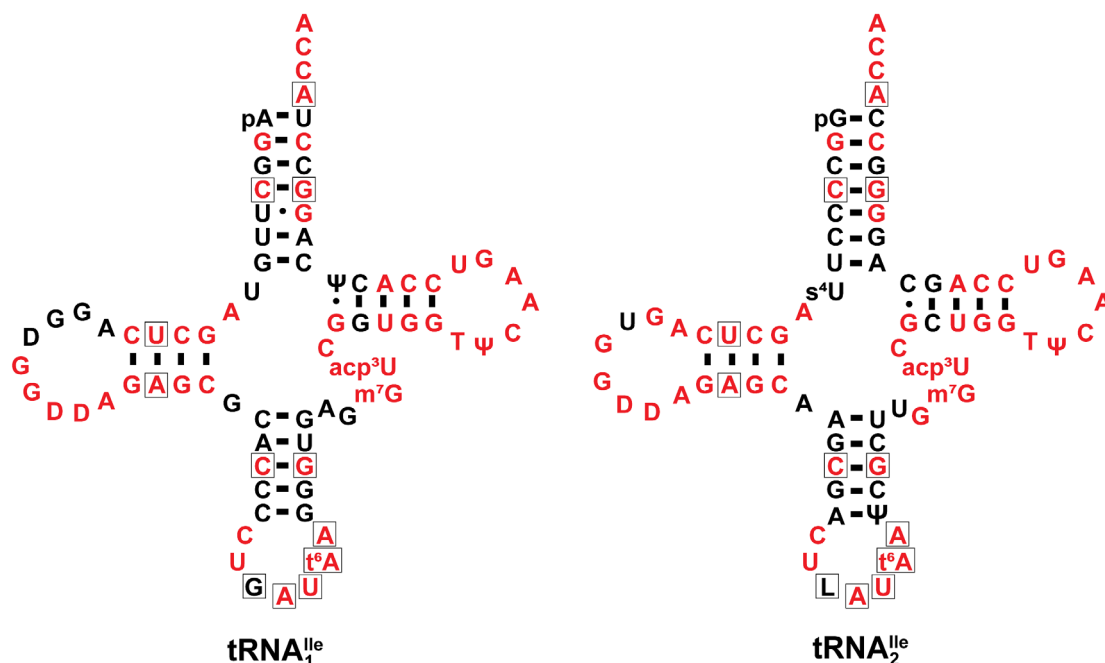
Adeninski dio A76 tRNA^{Ile} ostvaruje interakcije sa Ser310, Asp313 i Val318. 3'OH skupina riboze smješta se pomoću vodikovih veza s Thr228, Thr229 i molekulom vode koju pozicioniraju Thr229 i Thr230. Vrlo vjerojatno se radi o katalitičkoj molekuli vode s obzirom na to da se nalazi na poziciji na kojoj se nalazi voda u pretpostavljenom mehanizmu reakcije hidrolize misaminoacilirane tRNA^{Leu} u korektivnom mjestu LeuRS. α -karboksilna skupina aminokiselinog dijela supstrata ostvaruje vodikove veze s molekulom vode koja se pozicionira kroz interakcije s Trp227 i His319. α -amino skupina elektrostatski interagira s Asp328 i His319. Bočni ogranak supstrata smješta se u džep koji okružuju Thr233, His319, Ala321 i Phe324. Navedeni bočni ogranci su visoko očuvani u svim IleRS sustavima. Više govora o ulogama pojedinih bočnih ogranka u prepoznavanju supstrata slijedi kasnije.

CP2 domena u primarnoj strukturi smješta se nakon CP1 domene. CP2 domena nema zasebnu katalitičku funkciju, ali je poznato kako je nužna za aktivaciju aminokiselina i popravak pogreške nakon prijenosa [108,109]. Na temelju istraživanja na LeuRS sustavu pretpostavljena uloga CP2 domene je pravilna orijentacija 3' kraja tRNA^{Ile} u mjesto za popravak pogreške [109]. C-terminalna domena zadužena je za ostvarivanje interakcija s antikodonskom rukom tRNA^{Ile} (vidi kasnije) [13]. Za kraj, vrijedi spomenuti kako je IleRS metaloenzim. U strukturi IleRS nalaze se dva tetraedarski koordinirana Zn²⁺ iona. Oba iona koordinirana su s četiri cisteinska bočna ogranka. Ioni nemaju katalitičku ulogu, ali su nužni za aktivnost enzima [107,110–112].

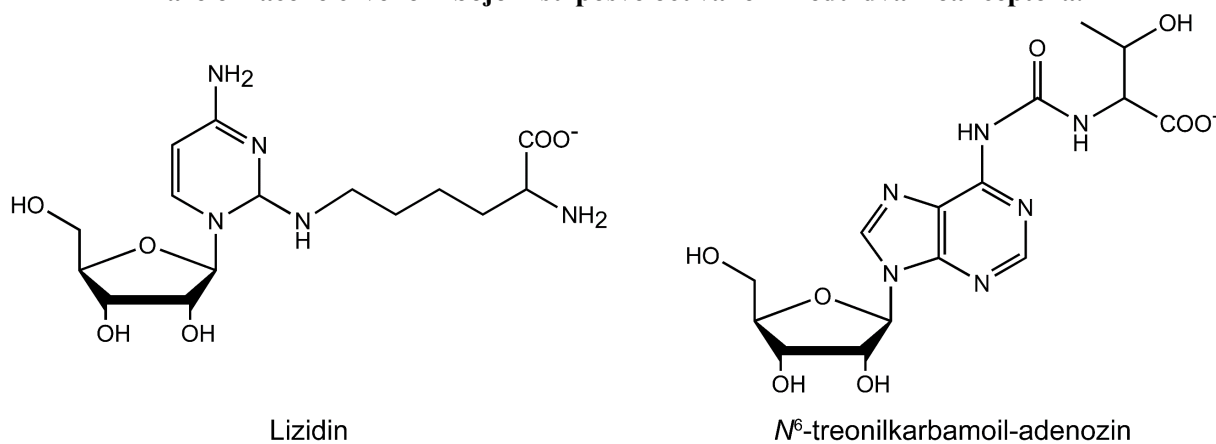
2.4.2. Prepoznavanje tRNA^{Ile}

Aminokiselina izoleucin kodirana je s tri kodona: AUU, AUC i AUA. Za njihovo čitanje potrebne su dvije izoakceptorske tRNA^{Ile}, GAU (glavni izoakceptor, dekodira AUU i AUC) i LAU (sporedni izoakceptor, dekodira AUA) (slika 2.18). Baza označena slovom L je modificirana baza lizidin. Lizidin nastaje vezanjem aminokiseline Lys preko ϵ -amino skupine na C-2 atom pirimidinskog prstena (u ovom slučaju citidin) (slika 2.19a) [113]. Lizidin ima ulogu negativnog elementa identiteta koji sprečava prepoznavanje tRNA^{Ile} od strane MetRS [9]. Primarne strukture ovih izoakceptora dijele 68 % identiteta, a glavne razlike pronalaze se u antikodonskoj ruci i akceptorskoj peteljci [114,115]. Kao glavni elementi identiteta glavnog izoakceptora tRNA^{Ile} prepoznati su nukleotidi antikodonske ruke: G34, A35, U36, t⁶A37 i A38, diskriminatorska baza A73 te parovi baza C29-G41, U12-A23 i C4-G69 [116]. I u antikodonskoj ruci nalazi se jedna modificirana baza - t⁶A37 (slika 2.19b). Radi se o

treonilkarbamoilaciji adenina na N-6 atomu čiji nedostatak čini tRNA^{Ile} značajno manje kinetički aktivnom [116].



Slika 2.18. Izoakceptori tRNA^{Ile} iz *E. coli*. Uokvirene baze su glavni elementi diskriminacije. Baze označene crvenom bojom su posve očuvane između dva izoakceptora.



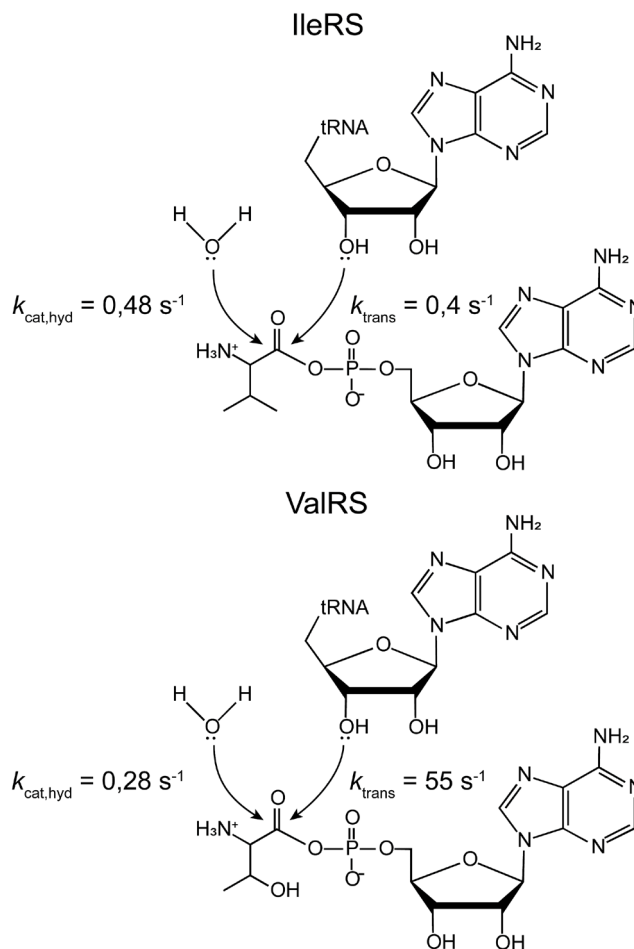
Slika 2.19. Struktura modificiranih baza antikodonske ruke tRNA^{Ile}.

2.4.3. Reakcije izoleucil-tRNA-sintetaze

Kao i kod ostalih aaRS, IleRS aminoaciliranje provodi u dva koraka, aktivacija i prijenos aminokiseline na tRNA^{Ile}. Izuzev izoleucina, pokazano je kako IleRS može aktivirati aminokiseline valin i norvalin [19,20,117]. Val se aktivira 160, a Nva 240 puta lošije nego Ile. Valja naglasiti kako gotovo sav efekt potječe iz razlike u prividnom afinitetu enzima prema supstratu, odnosno iz povećanja K_M vrijednosti (Ile vs Nva vs Val – 0,0046 vs 0,82 vs 0,47 mmol/dm³). Obrtni broj se vrlo malo mijenja u oba slučaja (Ile vs Nva vs Val – 55 vs 41

vs 35 s^{-1}) [20]. Relativno slaba diskriminacija u koraku aktivacije posljedica je visoke strukturne i kemijske sličnosti među supstratima. Naime, Val i Nva su svega jednu metilnu skupinu manji od Ile što im omogućava da se u aktivno mjesto smještaju na način da ostvaruju dovoljan broj interakcija za dobro prepoznavanje, a da pritom ne dolazi do steričkih sudara niti do mispozicioniranja elemenata koji sudjeluju u samoj reakciji aktivacije. Također, pokazano je kako obje aminokiseline mogu biti prenesene na tRNA^{Ile} pri čemu nema dodatne diskriminacije nepripadnih supstrata [11,19,20]. Zbog toga što IleRS ne može posve uspješno eliminirati nepripadne aminokiseline iz sintetskih reakcija (diskriminacijski faktor je manji od tolerabilne razine pogreške), evolucijski je razvila mehanizme popravka pogreške. Prvi primijećeni mehanizam popravka pogreške kod svih aaRS općenito, bila je upravo hidroliza Val-AMP-a od strane IleRS u prisutnosti tRNA^{Ile} [118,119]. Naknadno je pokazano kako IleRS posjeduje popravak pogreške nakon prijenosa [120] koji se odvija u korektivnom mjestu [28,85,107]. Donedavno se smatralo kako se i popravak pogreške prije prijenosa odvija u istom mjestu, ali ta ideja je sada odbačena [11].

Prethodno je spomenuto da je IleRS jedini enzim kod kojega je popravak pogreške prije prijenosa nezanemariv u odnosu na ukupni popravak pogreške (30 %). Osim toga, za IleRS je pokazano kako dodatak tRNA^{Ile} značajno stimulira brzinu hidrolize Val-AMP i Nva-AMP u sintetskom mjestu [11,23]. Opažanje da je popravak pogreške prije prijenosa (na primjeru hidrolize Val-AMP-a) značajniji kod IleRS nego kod ostalih aaRS razreda I temelji se na kinetičkoj razdiobi [11]. Naime, aa-AMP u sintetskom mjestu može podleći dvjema kemijskim reakcijama, prijenos na tRNA^{Ile} i hidroliza. Koja od te dvije reakcije će se odvijati i u kojem obujmu ovisit će o njihovim brzinama. S obzirom na to da su te brzine na IleRS sustavu za Val-AMP usporedive (hidroliza $0,48 \text{ s}^{-1}$ vs prijenos $0,4 \text{ s}^{-1}$), popravak pogreške prije prijenosa postaje značajan mehanizam popravka pogreške (slika 2.20 gore). S druge strane, na ValRS sustavu brzina hidrolize Thr-AMP (Thr je glavna prijetnja točnosti aminoaciliranja ValRS, vidi poglavlje 2.5.) iznosi $0,28 \text{ s}^{-1}$, a prijenosa 55 s^{-1} što čini hidrolizu zanemarivom (slika 2.20 dolje). Kako je kod IleRS hidroliza pripadnog Ile-AMP puno sporija, on uglavnom podliježe prijenosu i rezultat je aminoacilirana Ile- tRNA^{Ile} [11].



Slika 2.20. Kinetička razdioba između popravka pogreške prije prijenosa (hidrolize aa-AMP) i prijenosa na tRNA u sintetskom mjestu izoleucil-, odnosno valil-tRNA-sintetaze. Preuzeto i prilagođeno prema [11].

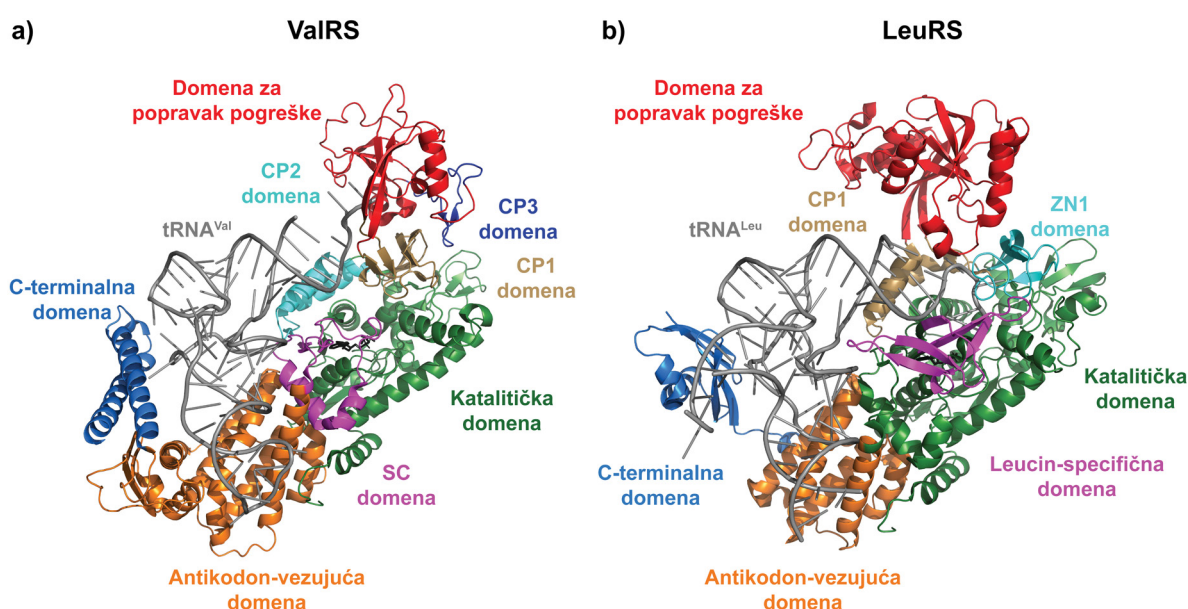
Unatoč nezanemarivom doprinosu popravka prije prijenosa, popravak nakon prijenosa je dominantan tip popravka kod IleRS, baš kao i kod ostalih aaRS koje ga imaju. Popravak pogreške nakon prijenosa IleRS optimiran je prema hidrolizi Nva-tRNA^{Ile} (85 s^{-1}) i Val-tRNA^{Ile} (49 s^{-1}) [20]. Jedno od najzanimljivijih pitanja vezanih uz korektivno mjesto jest kako ono tako dobro razlikuje tako slične aminokiseline (Ile od Val i Nva)? Dugo se smatralo da je mehanizam isključivanja pripadnog Ile-tRNA^{Ile} iz reakcije popravka nakon prijenosa temeljen na steričkim smetnjama, odnosno da se Ile-tRNA^{Ile} ne može vezati u korektivno mjesto. Među ostalim, upravo je na osnovu IleRS (i ValRS) postavljen model dvostrukog sita [25]. Ipak, opažanje da se Ile-tRNA^{Ile} hidrolizira brzinom $0,058 \text{ s}^{-1}$ bacilo je sumnju na tu ideju [24]. Naime, da bi se Ile-tRNA^{Ile} hidrolizirala ona se prvo mora vezati u aktivno mjesto. Dakle, moguće je da se radi o kinetičkoj diskriminaciji kao i na LeuRS sustavu [31], ali za potvrdu te teze potrebna su daljnja istraživanja.

Radi istraživanja mehanizma djelovanja korektivnog mjesta IleRS, na enzimu iz *T. thermophilus* mutirane su neke od aminokiselina za koje je utvrđeno da grade to aktivno mjesto [27,28]. Radi se o Thr228 (Thr241), Thr229 (Thr242), Thr230 (Thr243), Thr233 (Thr246), Asp328 (Asp342), His319 (His333). U zagradama je navedena numeracija za IleRS iz *E. coli*. Za Thr228Ala, Thr229Ala i Asp328Ala mutante pokazano je kako sporije hidroliziraju Val-tRNA^{Ile} nego divlji tip enzima (engl. *wild-type*, WT; enzim jednakog aminokiselinskog slijeda kao onaj koji se nalazi u prirodi), što potvrđuje da su ti bočni ogranci važni za hidrolizu. Mutacije Thr230Ala i Thr233Ala nisu imale efekt na hidrolizu Val-tRNA^{Ile} [27]. Nadalje, mutacije Thr230Arg, a osobito Thr230Arg/Asp328Ala potpuno utišavaju hidrolizu. U konačnici mutanti His319Ala i Thr233Ala hidroliziraju pripadnu Ile-tRNA^{Ile} slično kao i Val-tRNA^{Ile} [28]. Slična istraživanja rađena su na IleRS iz *E. coli* i potvrdila su kako His333Ala IleRS (His319Ala u IleRS iz *T. thermophilus*) hidrolizira Ile-tRNA^{Ile} [29]. Ipak, valja naglasiti da iako su ova istraživanja dobro zamišljena, ona imaju neke fundamentalne pogreške zbog kojih zaključci koji iz njih proizlaze nisu dostatni da objasne mehanizam diskriminacije aminokiselina u mjestu za popravak pogreške IleRS. Prvi problem je posljedica toga da se smatralo kako se Ile-tRNA^{Ile} ne veže u aktivno mjesto za popravak pogreške. Stoga se hidrolizu Ile-tRNA^{Ile} uz Thr233Ala (Thr246Ala) i His319Ala (His333Ala) obrazlaže isključivo kao posljedicu povećanja veznog džepa, odnosno omogućenog vezanja Ile-tRNA^{Ile} u isti. Nadalje, drugi problem je da se u vrijeme tih istraživanja smatralo kako je jedan od supstrata domene za popravak pogreške nakon prijenosa i aa-AMP, odnosno supstrat popravka pogreške prije prijenosa. S obzirom na to da se on neminovno morao drugačije smjestiti u mjesto za popravak pogreške nego aa-tRNA^{Ile} (radi se o molekulama drugačije strukture), dio opažanja iz ovih istraživanja bio je usmjeren na objašnjenje tog fenomena. U konačnici, mjerenja brzine hidrolize nisu rađena u adekvatnim eksperimentalnim uvjetima. Kako je disocijacija (aa-)tRNA^{aa} najsporiji korak u reakcijskom putu aaRS razreda I, brzinu deacilacije (i prijenosa, vidi kasnije) potrebno je mjeriti u zasićenju u uvjetima jednog kruga. U suprotnom izmjerene brzine ne odražavaju brzinu kemijskog koraka hidrolize aa-tRNA^{aa}, već brzinu disocijacije produkta. Ukratko, u eksperimentalnom postavu kinetike jednog kruga koristi se puno viša koncentracija enzima u odnosu na koncentraciju supstrata. Time je osigurano da enzim veže sav supstrat u reakcijskoj smjesi. To znači da se prati samo jedan enzimski obrtaj, odnosno jedan krug kemijske pretvorbe supstrata u produkt čime je eliminiran limitirajući korak reakcije – disocijacija produkta, to jest regeneracija enzima za idući enzimski obrtaj. Nadalje, niti u

jednom radu nije objavljen niti jedan koeficijent brzine reakcije, već se sve reakcije prikazuju isključivo grafički/kvalitativno. Zbog ta dva razloga nemoguće je odrediti koliko pojedini bočni ogranak zapravo doprinosi specifičnosti prema supstratu i samom popravku pogreške nakon prijenosa. Dakle, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se bolje opisao mehanizam kojim domena za popravak pogreške razlikuje pripadni Ile- od nepripadnih aa-tRNA^{Ile} parova.

2.5. Leucil-tRNA-sintetaza i valil-tRNA-sintetaza

S obzirom na to da su najbliži evolucijski srodnici IleRS, vrijedi ukratko promotriti LeuRS i ValRS. Supstrati sva tri enzima su aminokiseline razgranatih bočnih ograna. Ile, Leu i Val su kodirani NUN kodonima što upućuje na to kako su genetski kod i aaRS koevoluirali [121]. Sva tri enzima su strukturno vrlo slična, a razlike se očituju ponajviše u specifičnosti prema tRNA i aminokiselinama. Strukturni elementi ValRS su: katalitička domena (superporodica HUP), CP1, CP2 i CP3 domene, domena za popravak pogreške, antikodon-vezujuća, SC (engl. *stem-contact*, domena za interakciju s peteljkom tRNA^{Val}) i C-terminalna domena (slika 2.21a) [14,122]. Kod LeuRS postoje također katalitička, CP1, domena za popravak pogreške, antikodon-vezujuća i C-terminalna domena, a specifične za LeuRS su ZN1 i leucin-specifična domena [123](slika 2.21b). ZN1 domena veže Zn²⁺ ion u tetraedarskoj koordinaciji [12]. Funkcija leucin-specifične domene nije u potpunosti razjašnjena, no pokazano je kako je nužna za aminoaciliranje, ali ne i za popravak pogreške nakon prijenosa [124].



Slika 2.21. Strukture a) ValRS iz *T. thermophilus* (PDB ID: 1IVS) s tRNA^{Val} pozicioniranom u korektivno mjesto i b) LeuRS iz *E. coli* s tRNA^{Leu} pozicioniranom u sintetsko mjesto (PDB ID: 4AQ7).

Što se tiče prepoznavanja tRNA, glavni elementi identiteta tRNA^{Val} su druga i treća baza antikodona (A35 i C36) te baze G20 i G45. Za razliku od ostalih aaRS razreda Ia, ValRS ne prepoznaje nukleotide u akceptorskoj peteljci tRNA^{Val}, a diskriminatorska baza G73 služi kao negativni element identiteta kojim se sprečava aminoaciliranje od strane ostalih aaRS [125]. Leucin je kodiran sa šest kodona, a posljedica toga je da u stanici postoji pet izoakceptora tRNA^{Leu}: tRNA^{Leu}_{CAA}, tRNA^{Leu}_{UAA}, tRNA^{Leu}_{CAG}, tRNA^{Leu}_{GAG} i tRNA^{Leu}_{CAA} [126]. Nadalje, tRNA^{Leu} pripada skupini II tRNA koje imaju dugu varijabilnu ruku [126]. Ipak, izuzev varijabilne ruke, niti jedan od tih elemenata nije element identiteta tRNA^{Leu}. Elementi identiteta su: diskriminatorska baza A73, baze G18 i G19 D ruke te baze U55 i C56 TψC ruke [123,127,128]. Valja naglasiti kako diskriminatorska baza ne ostvaruje interakcije s LeuRS kada je CCA kraj vezan u mjesto za popravak pogreške [123].

Kako IleRS, tako mu i srodni LeuRS i ValRS katkad pogrešno aktiviraju i na tRNA^{aa} prenose neke nepripadne aminokiseline. Zbog toga, oba enzima primjenjuju popravak pogreške nakon prijenosa koji se odvija u korektivnom mjestu. Za ValRS je pronađeno kako može pogrešno aktivirati treonin (Thr), α-aminobutirat (Abu), norvalin (Nva) i alanin (Ala), pri čemu se Thr i Abu aktiviraju 1000, Nva 4400, a Ala 10 000 puta lošije nego Val (brojevi označavaju diskriminacijski faktor) [20,25,129]. Abu, Thr i Nva mogu se prenijeti na tRNA^{Val} uslijed čega podliježu reakcijama popravka pogreške [20,25,129,130]. Thr se dobro aktivira jer je strukturno vrlo sličan Val – jedna metilna skupina Val zamijenjena je hidroksilnom skupinom. S druge strane, Abu je poput Nva drevna aminokiselina [21] koja se danas ne nalazi u genetičkom kodu. ValRS je vrlo dobro aktivira jer je od Val manja samo za jednu metilnu skupinu. Nva je strukturni izomer Val i za njegovim popravkom vjerojatno nema potrebe (diskriminacijski faktor > 3300) pa se pretpostavlja kako se radi o katalitičkoj aktivnosti koju je ValRS „naslijedila“ od zajedničkog pretka Ile/Leu/ValRS (vidi kasnije) [20]. Sva tri enzima razreda Ia pokazuju visoku razinu sličnosti u primarnoj i tercijarnoj strukturi korektivnog mjesta i primjenjuju sličan način prepoznavanja supstrata. To se prvenstveno odnosi na adenin, ribozu te α-karboksilnu i α-amino skupinu supstrata. Strukturna analiza ValRS iz *T. thermophilus* pokazala je kako je aktivno mjesto za popravak pogreške nakon prijenosa hidrofilan džep građen od Arg216, Thr219, Lys270, Thr272, Asp276 i Asp279 [14]. Thr se u to mjesto smješta na temelju vodikove veze njegove hidroksilne skupine s Asp279 koju Val ne može ostvariti pa biva diskriminiran. Dakle, mehanizam diskriminacije ne temelji se na steričkim smetnjama kao što to pretpostavlja model dvostrukog sita, već na ostvarivanju specifičnih interakcija preko

hidroksilne skupine [14]. No, preostaje činjenica da su hidrofobni Abu- i Nva-tRNA^{Val} dobri supstrati istog tog aktivnog mjesta [20,130]. Abu-tRNA^{Val} vjerojatno podliježe hidrolizi jer je manji od pripadnog Val-tRNA^{Val} pa se može smjestiti u aktivno mjesto [14], ali to ne objašnjava mehanističku osnovu prema kojoj je Nva-tRNA^{Val} dobar supstrat.

Prethodno je spomenuto kako je najveća prijetnja točnosti aminoaciliranja LeuRS neproteinogeni Nva. Osim Nva (diskriminacijski faktor 116), LeuRS može aktivirati i Abu (5500) te Ile (31 400) [79,131]. Vrijedi spomenuti kako se dugo smatralo da je najveća prijetnja točnosti LeuRS upravo, izostrukturalno mu, Ile [84,132–134]. No, nedavno je pokazano kako su publicirani diskriminacijski faktori za Ile (od 630 do 5400) bili posljedica kinetičkih artefakata uslijed kontaminacije komercijalnih uzoraka izoleucina pripadnim leucinom [79]. Naime, prilikom istraživanja nepripadnih supstrata često ih se koristi u visokim koncentracijama uslijed visokih K_M vrijednosti. To može predstavljati problem jer već i male kontaminacije (cca. 0,1 %) pripadnim supstratom mogu uzrokovati značajne kinetičke artefakte. U poglavlju 2.3.5. već je detaljnije objašnjen mehanizam diskriminacije pripadnog Leu iz mjesta za popravak pogreške – kinetička diskriminacija. Ovdje samo treba dodati kako je glavna diskriminatorska aminokiselina Thr252, koja uslijed steričkih smetnji pozicionira δ -metilnu skupinu bočnog ogranka Leu na način da ona ometa pravilno pozicioniranje katalitičke vode [31]. Mutacija Thr252Ala povećava brzinu hidrolize pripadnog Leu-tRNA^{Leu} 400 puta (0,063 vs 25 s⁻¹). Thr252 u *E. coli* LeuRS analogan je prethodno spomenutom Thr246 iz *E. coli* IleRS [31].

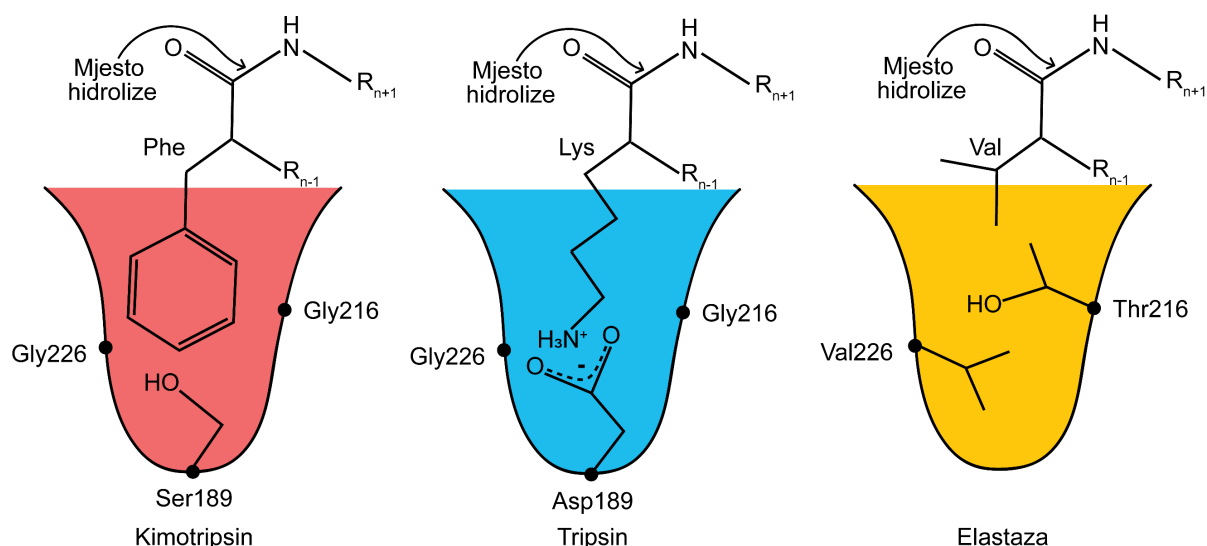
Uspoređujući IleRS, LeuRS i ValRS vidljivo je da se radi o vrlo srodnim enzimima koji dijele mnoga zajednička svojstva. Gruba tercijska struktura ovih enzima gotovo je identična, a aktivna mjesta pokazuju visoku sličnost i na razini primarne strukture. IleRS, LeuRS i ValRS i dalje dijele neke aktivnosti, poput hidrolize Nva-tRNA^{aa} za što trenutno ne postoji bolje objašnjenje od pretpostavke da se radi o aktivnosti koja je bila neophodna prije nego što su ovi enzimi divergirali iz zajedničkog Ile/Leu/ValRS pretka. Ipak, trenutno razumijevanje mehanizama diskriminacije u njihovim aktivnim mjestima ukazuje na to da oni ne primjenjuju posve identična evolucijska rješenja unatoč svojoj sličnosti koju dijele. Stoga, izučavanje aaRS razreda Ia i dalje predstavlja izazov i nosi nove spoznaje pomoću kojih je moguće bolje razumjeti mehanizme enzimske specifičnosti, što je osobito zanimljivo kada se radi o tako delikatnim razlikama među supstratima kao što to ovdje zna biti slučaj.

2.6. Specifičnost enzima prema supstratima

Većina enzima u svrhu obavljanja svoje biološke funkcije mora prepoznati točno jedan određeni supstrat. Unatoč tome, mnogi enzimi mogu koristiti nepripadne supstrate što je posljedica fizikalno-kemijske sličnosti supstrata. Mjera kojom se određuje koliko dobro enzim prepoznaje neki supstrat zove se enzimska specifičnost, a najčešće se izražava kao k_{cat}/K_M , odnosno – k_{sp} konstanta specifičnosti [135,136]. Zanimljivo, meta-analiza na gotovo dvije tisuće jedinstvenih kinetičkih parametara dostupnih u bazama podataka BRENDA i KEGG, pokazala je kako najviše k_{sp} vrijednosti imaju enzimi koji kataliziraju reakcije u metabolizmu ugljika i primarnog dobivanja energije [137–139]. Ipak, za potpuno razumijevanje značenja pojedine konstante specifičnosti potrebno ju je gledati u kontekstu usporedbe dvaju ili više supstrata. O omjeru $\frac{k_{sp, \text{pripadni supstrat}}}{k_{sp, \text{nepripadni supstrat}}}$ (diskriminacijski faktor) bilo je govora prethodno u tekstu, ukratko on govori koliko puta je enzim efikasniji u prevođenju pripadnog od nepripadnog supstrata u produkt.

Kako enzimi razlikuju između pripadnih i nepripadnih supstrata? Školski primjer koji omogućava razumijevanje ove problematike su serinske proteaze [135,140]. Radi se o skupini enzima koja katalizira hidrolizu peptidne veze. Tri najznačajnija predstavnika serinskih proteaza su tripsin, kimotripsin i elastaza. Iako sva tri enzima kataliziraju istu kemijsku reakciju, izrazito su specifični prema mjestu cijepanja peptidne veze. Tripsin cijepa peptidnu vezu iza pozitivno nabijenih aminokiselina (arginin i lizin), kimotripsin iza aromatskih aminokiselina (tirozin, triptofan i fenilalanin), a elastaza iza malih aminokiselina (glicin, alanin i valin). Prepoznavanje se temelji na pravilnom vezanju bočnog ogranka aminokiseline ispred peptidne veze u S1 džep serinske proteaze (slika 2.22). Na dnu S1 džepa tripsina smješten je izrazito očuvani Asp – negativno nabijena aminokiselina, koja ostvaruje povoljne elektrostatske interakcije s pozitivno nabijenim Arg i Lys [141]. Kinetička istraživanja su pokazala da je konstanta specifičnosti tripsina prema supstratu koji u S1 džep veže Arg 400 000 veća nego ako se u isto mjesto veže Tyr [142]. Zanimljivo je dodati kako većina efekta ($> 100\,000$) proizlazi iz smanjenja k_{cat} , što potvrđuje vezanje supstrata na enzim, ali u vrlo neproduktivnoj konformaciji. Kimotripsin na dnu svog S1 džepa sadrži očuvani Ser što rezultira 50 000 puta boljim vezanjem Phe u odnosu na Ala [143], a to je vjerojatno posljedica nemogućnosti manje

aminokiseline (Ala) da ostvari jednak broj hidrofobnih interakcija². U konačnici, S1 džep elastaze sadrži Val i Thr što ga čini značajno manjim nego kod tripsina i kimotripsina [144]. Posljedica toga je 300 000 puta veća konstanta specifičnosti u slučaju kada supstrat sadrži Val umjesto Phe. Iz primjera serinskih proteaza jasno je kako i vrlo srodni enzimi koji kataliziraju istu reakciju na različitim supstratima uz male strukturne razlike postižu visoku enzimsku specifičnost.



Slika 2.22. Shematski prikaz vezanja supstrata u S1 vezni džep serinskih proteaza.

Općenito govoreći, enzimska specifičnost temeljno potječe iz privlačnih interakcija koje bočni ogranci aktivnog mjesta ostvaruju sa supstratom, ali točno prepoznavanje supstrata dolazi uz cijenu. Naime, evolucija aktivnog mjesta prema što boljem prepoznavanju pripadnog supstrata može za rezultat imati usporavanje enzimski katalizirane reakcije. Drugim riječima, prepoznavanje je posljedica privlačnih interakcija koje stabiliziraju supstrat što rezultira porastom energije aktivacije (razlike u potencijalnoj energiji supstrata i prijelaznog stanja), odnosno smanjenjem koeficijenta brzine reakcije. Ova pojava naziva se ravnotežom između brzine i točnosti [145]. Veća točnost kroz privlačne interakcije postiže se na jednoj od dvije razine, vezanje supstrata ili vezanje prijelaznog stanja. Prvi slučaj je učestaliji i u njemu enzim ostvaruje što više pozitivnih interakcija s pripadnim supstratom, dok nepripadni supstrat biva odbačen uslijed slabijeg vezanja. Drugi slučaj je mnogo rjeđi, ali ga vrijedi spomenuti jer je za njega cijena brzine nauštrb točnosti puno manja. U njemu se diskriminacija među supstratima

² U ovom radu pojam hidrofobne interakcije koristit će se u kontekstu ostvarivanja Van der Waalsovih interakcija hidrofobnih supstrata s enzimom.

ostvaruje kroz specifične interakcije s prijelaznim stanjem [145]. Ipak, smatra se kako je za postizanje maksimalne specifičnosti potrebna negativna selekcija, odnosno odbacivanje neprikladnih, a ne specifično prepoznavanje prikladnih supstrata. Tada se u aktivnom mjestu nalaze bočni ogranci čija je uloga ostvarivanje odbijajućih interakcija s neprikladnim supstratima. Najveća prednost negativne selekcije jest što veća specifičnost dolazi uz daleko najmanju cijenu brzine nauštrb točnosti [145].

Kod nekih enzima potreban je puno viši stupanj specifičnosti nego što je moguće ostvariti u primarnoj reakciji bilo kroz pozitivne bilo kroz negativne interakcije. To svojstvo je poželjno kod enzima koji sudjeluju u procesima koji su neophodni za preživljavanje stanice i/ili njenih potomaka, kao što je prijenos genetičke informacije. Kako bi podignuli specifičnost na zadovoljavajuću razinu, takvi enzimi nerijetko posjeduju mehanizme popravka pogreške. U prethodnim poglavljima detaljno je razrađen ovaj problem na primjeru aaRS. Drugi, vrlo dobro istražen primjer su DNA-polimeraze koje kataliziraju nastajanje fosfodiesterske veze prilikom procesa replikacije DNA, odnosno kataliziraju nastajanje komplementarnog lanca. Specifičnost DNA-polimeraza u sintetskom mjestu osigurana je mehanizmom induciranog pristajanja [146,147]. Uslijed vezanja prikladnog supstrata (nukleotida komplementarnog nukleotidu na lancu kalupu) dolazi do konformacijske promjene koja je neophodna za odvijanje katalize. U slučaju vezanja neprikladnog supstrata, disocijacija je brža od konformacijske promjene. S obzirom na to da se pogreška u ovoj reakciji prenosi s generacije na generaciju, neke DNA-polimeraze posjeduju mehanizam popravka pogreške. Ukratko, popravak kod DNA-polimeraza temelji se na kinetičkoj razdiobi između nastavka polimerizacije i translokacije novonastalog lanca u domenu za popravak pogreške. Kada se u lanac ugradi pogrešan nukleotid, polimerizacija se usporava te je preferirana translokacija. Zanimljivo, za razliku od aaRS koje dobro razlikuju između prikladne i neprikladne aminokiseline u domeni za popravak pogreške, DNA-polimeraze to ne rade, već hidroliziraju fosfodiestersku vezu neovisno o tome koji je nukleotid ugrađen [148,149].

Prepoznavanje prikladnog supstrata je veoma opsežan problem s kojim se susreće većina enzima. Iz opisanih primjera je jasno kako ne postoji univerzalan način rješavanja tog problema, već mu razni enzimi pristupaju na razne načine. Zbog toga je važno i dalje istraživati mehanizme kojima enzimi specifično prepoznaju prikladne supstrate, a upravo to je cilj ove disertacije.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Standardne kemikalije

Agar (*Sigma*), akrilamid (C_3H_5NO) (*Sigma*), amonijev acetat (CH_3COONH_4) (*Kemika*), amonijev klorid (NH_4Cl) (*Kemika*), amonijev peroksodisulfat (APS) (*Serva*), amonijev sulfat ($(NH_4)_2SO_4$) (*Kemika*), ampicilin (*Sigma*), 1,4-bis(2-(4-metil-5-fenil)oksazolil)benzen (POPOP) (*Calbiochem*), borna kiselina (*Zorka Šabac*), cinkov klorid ($ZnCl_2$) (*Sigma*), 2,5-difeniloksazol (PPO) (*Merck*), dimetilsulfoksid (DMSO) (*Sigma*), ditiotreitol (DTT) (*Sigma*), etanol (*Kemika*), etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) (*Sigma*), fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF) (*Sigma*), fenol (*Sigma*), glicerol (*Kemika*), glicin (*USB Corporation*), glukoza (*Sigma*), *N*-(2-hidroksietil)piperazin-*N'*-2-etansulfonska kiselina (Hepes) (*USB Corporation*), imidazol (*Sigma*), izopropil- β -tiogalaktozid (IPTG) (*Sigma*), izopropanol (*Kemika*), kalijev acetat (CH_3COOK) (*Kemika*), kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4) (*Sigma*), kalcijev klorid ($CaCl_2$) (*Kemika*), kanamicin (*Sigma*), klorovodična kiselina (HCl) (*Kemika*), kloroform (*Kemika*), kvašćev ekstrakt (*BD Difco*), magnezijev acetat ($((CH_3COO)_2Mg)$) (*Sigma*), magnezijev klorid ($MgCl_2$) (*Fluka*), β -merkaptetanol (*Serva*), *N,N'*-metilenbisakrilamid (*Merck*), natrijev acetat (CH_3COONa) (*Kemika*), natrijev dodecilsulfat (SDS) (*Merck*), natrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4) (*Sigma*), natrijev hidroksid (NaOH) (*Kemika*), natrijev klorid (NaCl) (*Kemika*), natrijev pirofosfat ($Na_4P_2O_7$) (*Sigma*), niklov (II) sulfat ($NiSO_4$) (*Sigma*), octena kiselina (CH_3COOH) (*Kemika*), polietilenglikol 8000 (PEG₈₀₀₀) (*Sigma*), *N,N,N',N'*-tetrametiletilendiamin (TEMED) (*Serva*), tiamin (*Sigma*), trifluorooctena kiselina (TFA) (*Sigma*), triklorooctena kiselina (TCA) (*Kemika*), toluen (*T.T.T.*), tripton (*BD Difco*), tris(hidroksimetil)-aminometan (Tris) (*Sigma*), urea (*Kemika*).

3.1.2. Aminokiseline i nukleotidi

α -aminobutirat (*Sigma*), γ,γ -difluoro- α -aminobutirat (sintetizirano u sklopu suradnje s laboratorijem prof. B. Koksche, TU Berlin), γ,γ,γ -trifluoro- α -aminobutirat (sintetizirano u sklopu suradnje s laboratorijem prof. B. Koksche, TU Berlin), alanin (*Sigma*) ATP (*Sigma*), GTP

(Sigma), izoleucin (Sigma), leucin (Sigma), metionin (Sigma), norleucin (Sigma), norvalin (Sigma), serin (Sigma), treonin (Sigma), valin (Sigma).

3.1.3. Boje

Bromfenol plavo (Serva), Coomassie Brilliant Blue R-250 (Merck), Coomassie Brilliant Blue G-250 (Merck), GelRed (Sigma), ksilencijanolfosfor (XCFF) (Serva), toluidinsko modrilo (Sigma).

3.1.4. Enzimi, proteini i nukleinske kiseline

Albumin iz goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumin*, BSA) (NEB), DNaza I (NEB), DpnI (NEB), Phusion DNA-polimeraza (NEB), piruvat-kinaza (Sigma), P1 ribonukleaza (Sigma), termostabilna anorganska pirofosfataza (engl. *thermostable inorganic pyrophosphatase*, TIPP) (NEB). Oligonukleotidi (Macrogen) korišteni kao početnice u lančanoj reakciji polimeraze sintetizirani su po potrebi.

3.1.5. Komercijalni kompleti za pročišćavanje DNA

QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) za izolaciju plazmidne DNA.

3.1.6. Radioaktivne kemikalije

α -[^{32}P]-ATP (Perkin Elmer), [^{32}P]-pirofosfat (Perkin Elmer), [^{14}C]-izoleucin (Perkin Elmer), [^{14}C]-leucin (Perkin Elmer), [^{14}C]-valin (Perkin Elmer).

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

Tekuća hranjiva podloga Luria-Bertani (LB): Kvašćev ekstrakt ($\gamma = 5 \text{ g/dm}^3$), NaCl ($\gamma = 10 \text{ g/dm}^3$), tripton ($\gamma = 10 \text{ g/dm}^3$).

Kruta hranjiva podloga Luria-Bertani (LB): Agar ($\gamma = 15 \text{ g/dm}^3$), kvašćev ekstrakt ($\gamma = 5 \text{ g/dm}^3$), NaCl ($\gamma = 10 \text{ g/dm}^3$), tripton ($\gamma = 10 \text{ g/dm}^3$).

Minimalni medij M9: Na_2HPO_4 ($c = 50 \text{ mmol/dm}^3$), KH_2PO_4 ($c = 25 \text{ mmol/dm}^3$), NaCl ($c = 10 \text{ mmol/dm}^3$), NH_4Cl ($c = 20 \text{ mmol/dm}^3$), CaCl_2 ($c = 0,1 \text{ mmol/dm}^3$), MgSO_4 ($c = 2 \text{ mmol/dm}^3$), glukoza ($\gamma = 4 \text{ g/dm}^3$), tiamin ($c = 1 \text{ mmol/dm}^3$).

3.1.8. *E. coli* sojevi

BL21 (DE3) (*F⁻ ompT hsdSB (rB⁻ mB⁻) ga dcm* (DE3), Novagen): soj korišten za prekomjernu ekspresiju gena ukloniranih u vektore iz serije pET. Soj sadrži gen za T7 polimerazu ugrađen u

kromosom pod kontrolom inducibilnog promotora *lacUV5* i ne eksprimira aktivne proteaze *lon* i *ompT*.

XL10-Gold {TetrD(mcrA)183 D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI^qZDM15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r], *Agilent*}: soj korišten za umnažanje plazmidne DNA te za kloniranje.

3.1.9. Plazmidi

ΔpET3a – derivat pET3a plazmida iz serije vektora pET za prekomjernu ekspresiju pod kontrolom inducibilnog promotora. Radi se o niskokopijskom plazmidu koji nosi gen za rezistenciju na ampicilin. U sklopu ove disertacije korišten je za prekomjernu ekspresiju tRNA.

pET28b – plazmid iz serije vektora pET koji je korišten za prekomjernu ekspresiju proteina pod kontrolom inducibilnog promotora *T7lac*. Pomoću njega se ekspimiraju proteini s histidinskim privjeskom na N- ili C-kraju što omogućava njihovo pročišćavanje afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozi. Radi se o niskokopijskom plazmidu koji nosi gen za rezistenciju na kanamicin.

3.1.10. Kromatografski pribor

HP HisTrap (Cytiva), Ni-NTA agaroza (*Qiagen*), kromatografska kolona Jupiter C4 5 μm 300 Å 4,6 × 250 mm (*Phenomenex*), PD-10 gel-filtracijska kolona (*GE Healthcare*), pločice za tankoslojnu kromatografiju od polietilenimin-celuloze (*Macherey Nagel*).

3.1.11. Ostali materijali

Celulozna membrana za dijalizu (*Sigma*), centrikoni Amicon Ultra centrifugal filters® (*Milipore*), filter papir Whatman 3MM Chr (*GE Healthcare*), mikrotitarske pločice U-oblika 280 μL (*Kisker*), sterilni filteri s promjerom pora 0,22 μm (*Whatman*), zaslon s uskladištenim fosforom (*GE Healthcare*).

3.2. Metode

3.2.1. Metode rada s nukleinskim kiselinama

3.2.1.1. Izolacija plazmidne DNA

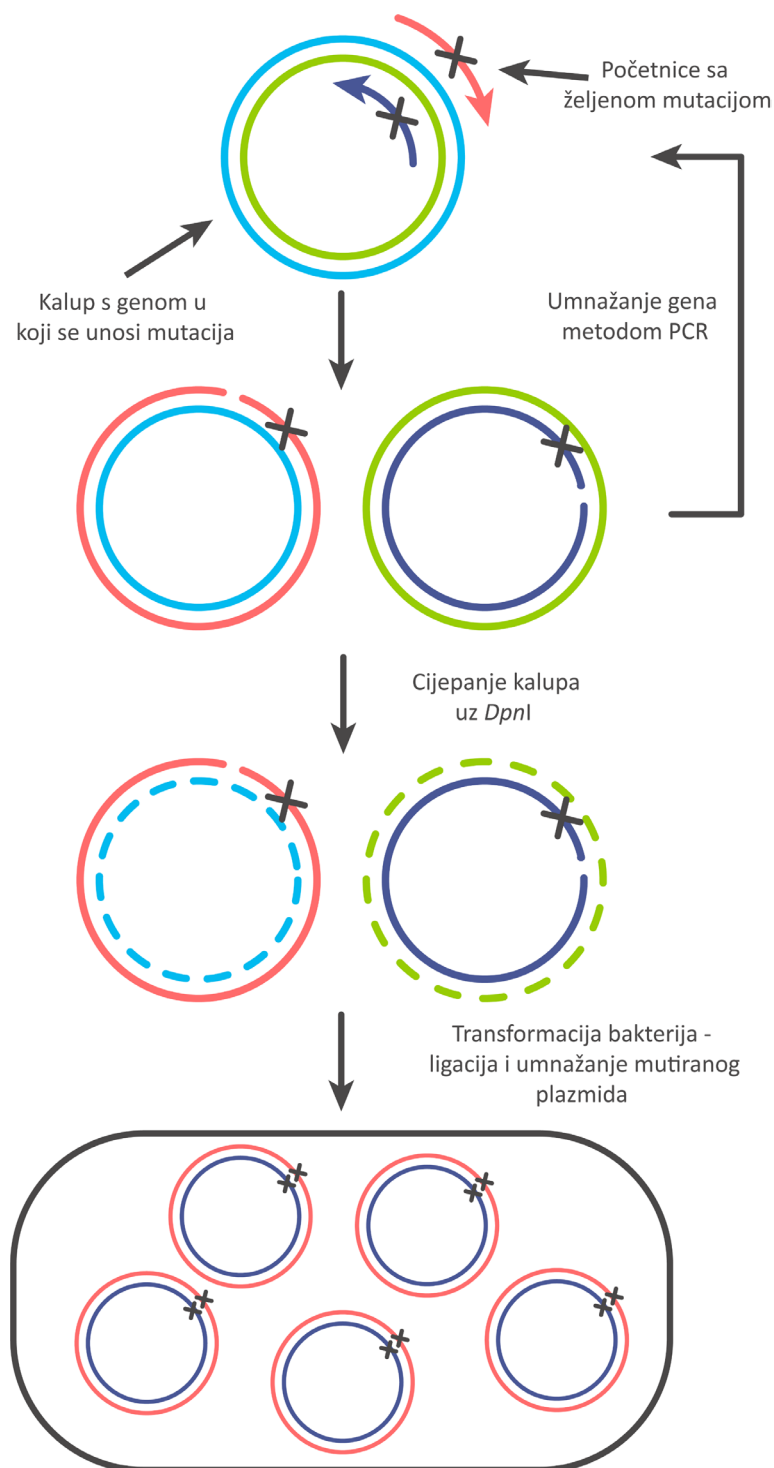
Za potrebe mutageneze i sekvenciranja plazmidnu DNA potrebno je izolirati iz bakterijskih stanica. U tu svrhu korišten je komercijalni QIAprep Spin Miniprep Kit (*Qiagen*). Izolacija je napravljena prema uputama proizvođača. Ukratko, prekonoćna bakterijska kultura je istaložena, a stanice su razbijene metodom alkalne lize. Netopljive komponente su istaložene, a supernatant, koji sadrži i plazmidnu DNA, nanesen je na silika kolone koje vežu DNA uslijed visoke ionske jakosti otopine. Radi veće čistoće uzorka, kolona se pročišćava nekoliko puta komercijalnim otopinama. Zatim slijedi elucija vezane DNA otopinom niske ionske jakosti.

3.2.1.2. Ciljana mutageneza

Osnovna shema metode ciljane mutageneze prikazana je na slici 3.1. Postupak se temelji na primjeni metode lančane reakcije polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) u kojoj se koriste početnice koje sadrže mutaciju koja se želi unijeti u gen, a kao kalup *in vivo* proizvedeni plazmid koji sadrži gen od interesa. Umnažanjem gena PCR metodom kao produkt dobiva se linearni plazmid koji sadrži željenu mutaciju. Za razliku od standardne PCR metode, novonastali produkt ovdje ne služi kao kalup u sljedećem krugu replikacije pa je umnažanje linearno, a ne eksponencijalno. U sljedećem koraku potrebno je ukloniti izvorni plazmid što se čini dodatkom endonukleaze DpnI koja cijepa (hemi)metiliranu DNA. S obzirom na to da je linearni vektor proizveden *in vitro*, a kalup *in vivo*, samo potonji je (hemi)metiliran te biva razgrađen. Sada je linearni vektor moguće koristiti za transformaciju bakterijskih stanica.

Sastav reakcijske smjese bio je: 1,2 ng/ μ L plazmida, 0,5 μ mol/dm³ početnice, 0,2 mmol/dm³ početnice, 0,02 U/ μ L *Phusion* DNA-polimeraze i 1 $\times$ odgovarajući *HighFidelity* pufer. Korištene početnice prikazane su u tablici 3.1. Početnice su generirane pomoću *QuikChange Primer Design* alata. Alat generira potpuno komplementarne početnice što u slučaju visokog udjela GC parova otežava denaturaciju parova početnica te smanjuje uspješnost mutageneze. Stoga su određeni parovi modificirani na način da su početnice skraćene na jednom kraju, a produljene na drugom kako bi se smanjilo njihovo preklapanje (tablica 3.1). Početnice su naručene od tvrtke *Macrogen*. Metoda ciljane mutageneze se provodila u uređaju Thermal Cycler T100TM (*BioRad*), a korišteni program prikazan je u tablici 3.2. Uspješnost

reakcije (nastajanje produkata) provjerena je agaroznom gel-elektroforezom. Produkti su nakon cijepanja kalupa korišteni za transformaciju bakterijskih stanica *E. coli* XL10-Gold (Agilent) metodama elektroporacije i kemijske transformacije (vidi kasnije).



Slika 3.1. Shematski prikaz metode ciljane mutageneze.

Tablica 3.1. Početnice korištene u metodi ciljane mutageneze za priređivanje IleRS mutanata. Podcrtani su izmijenjeni kodoni, a mutirani nukleotidi označeni su crvenom bojom.

Naziv početnice	Nukleotidni slijed 5'→3'
IleRS_W245A_R	5'-ggcagggcagagt <u>cgc</u> cggcgtggtggtc-3'
IleRS_W245A_F	5'-gaccaccacgccg <u>gcg</u> actctgcctgcc-3'
IleRS_L247A_R	5'-ggcaggg <u>cgc</u> agtcacacggcgtggtg-3'
IleRS_L247A_F	5'-cgtggact <u>gcg</u> cctgccaaaccgcgc-3'
IleRS_N250V_R	5'-aatagagattgcgcgg <u>acg</u> gcagggcagagtccac-3'
IleRS_N250V_F	5'-gtggactctgcctgcc <u>gtc</u> cgcgcaatctctatt-3'
IleRS_T243A_R	5'-cagagtccacggc <u>cg</u> cgggtggtccagatta-3'
IleRS_T243A_F	5'-taatctggaccacc <u>gcg</u> cgtggactctg-3'
IleRS_T243R_R	5'-tccacggc <u>cgg</u> gtggtccagattacc-3'
IleRS_T243R_F	5'-ggaccacc <u>cgg</u> cgtggactctgcct-3'
IleRS_T246A_R	5'-ggcagggcagag <u>c</u> ccacggcgtgg-3'
IleRS_T246A_F	5'-ccacgccgtgg <u>gct</u> ctgcctgcc-3'
IleRS_H333G_R	5'-cgcggtg <u>cca</u> acggcacccggtacc-3'
IleRS_H333G_F	5'-gccgtt <u>ggc</u> accgcgcctggccac-3'
IleRS_H333A_R	5'-ggcgcggtg <u>gca</u> acggcacccggtaccg-3'
IleRS_H333A_F	5'-cggtaaccggtgccgtt <u>gcc</u> accgcgcc-3'
IleRS_H333M_R	5'-ccaggcacggt <u>cat</u> aacggcacccggtaccggcatc-3'
IleRS_H333M_F	5'-gatgccggtaccggtgccgtt <u>atg</u> accgtgcctgg-3'
IleRS_A335V_R	5'-ccgtggccaggc <u>acg</u> gtgtgaacgg-3'
IleRS_A335V_F	5'-ccgttcacaccg <u>tgc</u> ctggccacgg-3'
IleRS_H338A_R	5'-ccgggccc <u>ggc</u> gccaggcgcggtgtg-3'
IleRS_H338A_F	5'-cgctggc <u>ggc</u> ggcccggaacta-3'
IleRS_D342A_R	5'-tcacatag <u>gcg</u> tccgggcccgtggccag-3'
IleRS_D342A_F	5'-cccggacg <u>cct</u> atgtgatcggtcagaa-3'
IleRS_H333M/A335V_R	5'-gtggccaggc <u>acg</u> gt <u>cat</u> aacggcacccggtaccggc-3'
IleRS_H333M/A335V_F	5'-gccggtaccggtgccgtt <u>atg</u> accg <u>tgc</u> ctggccac-3'

Tablica 3.2. Uvjeti lančane reakcije polimeraze.

Korak ciklusa	$\Theta / ^\circ\text{C}$	t / s	Broj ciklusa
Početna denaturacija	98	60	1
Denaturacija	98	10	25-30
Sparivanje početnica + produljenje	72	270	25-30
Završno produljenje	72	300	1

3.2.1.3. Agarozna gel-elektroforeza

Agarozna gel-elektroforeza je metoda koja se primjenjuje za odjeljivanje nukleinskih kiselina. Nukleinske kiseline su negativno nabijene molekule pa se u električnom polju kreću prema pozitivno nabijenoj anodi. Kako je gel agaroze zapravo molekulsko sito, kretanje nukleinskih kiselina kroz gel ovisit će o njihovoj veličini i stupnju superzavijenosti. Manje molekule većeg stupnja superzavijenosti brže će se kretati. Za elektroforezu su korišteni gelovi od 1 g/L agaroze otopljene u TEA puferu ($c(\text{Tris}) = 40 \text{ mmol/dm}^3$, $c(\text{EDTA}) = 1 \text{ mmol/dm}^3$ titrirana s CH_3COOH do pH 8,0). Uzorci su prije nanošenja na gel pomiješani s puferom za nanošenje koji sadrži boje ksilencijanolfosfat ($w = 0,4 \%$) i bromfenol plavo ($w = 0,4 \%$) koje omogućavaju praćenje uzorka tijekom elektroforeze, glicerol ($\varphi = 50 \%$) koji povećanjem viskoznosti uzorka olakšava njegovo nanošenje u jažice te komercijalnu boju GelRed (*Sigma*) koja služi za kasniju detekciju uzoraka. GelRed je dimer etidijevog bromida (EtBr) pri čemu su molekule premoštene dugačkom linearnom razmaknicom. Princip detekcije nukleinskih kiselina temelji se na interkalaciji boje GelRed između parova baza nukleinske kiseline, a nastali kompleks ima svojstvo fluorescencije ($\lambda_{\text{ex}} \sim 300 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$). Prednost korištenja GelRed boje nad EtBr jest što se radi o nemutagenoj i manje opasnoj tvari, dok je glavni nedostatak određeni utjecaj vezanja GelReda na mobilnost molekula u gelu agaroze koji se uglavnom empirijski određuje. Elektroforeza se provodila u TAE puferu pri 120 V i sobnoj temperaturi pomoću aparature za horizontalnu elektroforezu EPS 600 (*Pharmacia Biotech*). Kao marker veličina korišten je 1 kb DNA Ladder (*NEB*). Gelovi su snimljeni pomoću kamere MiniBIS Pro (*Bio-Imaging Systems*).

3.2.1.4. Analiza nukleotidnih sljedova sekvenciranjem

Plazmidi su nakon mutageneze sekvencirani od strane tvrtke *Macrogen*. Analiza dobivenih sljedova napravljena je pomoću alata NCBI BLAST (engl. *Basic Local Alignment Search Tool*) usporedbom nukleotidnih sljedova.

3.2.1.5. Prekomjerna ekspresija i izolacija tRNA

Geni za tRNA^{Ile}, tRNA^{Leu} i tRNA^{Val} uklonirani su u plazmidni vektor ΔpET3a pod kontrolom T7 promotora. Uzgoj i izolacija svih triju tRNA^{aa} odvijali su se na isti način. Prvo je uzgojena prekonoćna kultura u tekućem LB mediju uz dodatak ampicilina ($\gamma = 100 \text{ } \mu\text{g/mL}$) pri 37 °C i 250 rpm. Zatim je 5 mL prekonoćne kulture razrijeđeno 100 puta u tekućem LB mediju s dodanim ampicilinom ($\gamma = 100 \text{ } \mu\text{g/mL}$). Kultura je uzgajana pri 37 °C i 250 rpm do OD₆₀₀ (optička gustoća pri $\lambda = 600 \text{ nm}$) 0,5-0,6. Prekomjerna ekspresija tRNA^{aa} inducirana je dodatkom IPTG-a ($c = 1 \text{ mmol/dm}^3$) nakon čega su bakterije uzgajane 15 h pri 30 °C i 250 rpm. Stanice su istaložene centrifugiranjem pri $5000 \times g$ i 4 °C u trajanju od 15 min. Dobiveni talog iz 0,5 L tekućeg medija resuspendiran je u 15 mL pufera za izolaciju tRNA sastava $c(\text{Tris}) = 10 \text{ mmol/dm}^3$ i $c((\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}) = 10 \text{ mmol/dm}^3$. Suspenziji je dodan jednak volumen fenola zasićenog vodom, a smjesa je vorteksirana šest puta po pola minute uz pola minute inkubacije na ledu između vorteksiranja. Na taj način postiže se liza bakterijskih stanica koje sadrže prekomjerno eksprimirane molekule tRNA. Vodeni i fenolni sloj odvajaju se centrifugiranjem 15 min pri $10\,000 \times g$ i 4 °C. Vodeni sloj, u kojem se nalaze nukleinske kiseline, odvoji se i pomiješa s jednakim volumenom smjese fenol-kloroforma (smjesa fenola zasićenog vodom i kloroforma 1:1). Smjesa fenol-kloroforma omogućava ekstrakciju denaturiranih proteina zaostalih u vodenoj fazi i fenola otopljenog u vodenom sloju. Smjesa se miješa na rotatoru Multi Bio RS-24 (*Biosan*) dva puta po pet minuta pri 100 rpm uz pet minuta pauze na ledu. Slojevi se odvoje centrifugiranjem 15 min pri $10\,000 \times g$ i 4 °C. Radi povećanja prinosa izolirane tRNA, tRNA zaostala u slojevima fenola i fenol-kloroforma reekstrahirana je uz 7 mL pufera za izolaciju tRNA. Iz sakupljenih vodenih slojeva potrebno je istaložiti nukleinske kiseline velike molekulske mase (genomska DNA, mRNA i rRNA). To se postiže dodatkom PEG₈₀₀₀ ($\gamma = 80 \text{ g/dm}^3$) i natrijevog korida ($c = 0,5 \text{ mol/dm}^3$) te inkubacijom smjese 10 min na sobnoj temperaturi. Talog je istaložen centrifugiranjem 15 min pri $13\,000 \times g$ i 25 °C. Supernatant je odvojen, a uspješnost odvajanja provjerena je denaturirajućom poliakrilamidnom gel-elektroforezom u prisustvu ureje (vidi kasnije). tRNA iz supernatanta

izolirana je standardnim taloženjem nukleinskih kiselina etanolom na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ preko noći. Talog tRNA istaložen je centrifugiranjem 2 h pri $13\,000 \times g$ i $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Talog je osušen u uređaju SpeedVac DNA120 (*ThermoSavant*) te je otopljen u vodi (cca. 0,5 mL vode za talog dobiven iz 0,5 L bakterijske kulture). Kako bi se postigla deacilacija tRNA molekula koje su izolirane u aminoaciliranom obliku, u otopinu je dodan Tris ($c = 0,125\text{ mol/dm}^3$, pH 8,5) te je smjesa inkubirana 1,5 h pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Reakcija deacilacije je zaustavljena snižavanjem pH do približno 5 dodatkom octene kiseline. tRNA je dijalizom prevedena u pufer Hepes ($c = 5\text{ mmol/dm}^3$, pH 7,5). Koncentracija tRNA određena je spektrofotometrijski. Prije upotrebe, tRNA^{Leu} i tRNA^{Val} potrebno je renaturirati zagrijavanjem 3 min na $85\text{ }^{\circ}\text{C}$, nakon čega slijedi dodatak jednakog volumena magnezijevog klorida ($c = 20\text{ mmol/dm}^3$) zagrijanog na $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ te sporo hlađenje do sobne temperature. Molekule tRNA^{Leu} i tRNA^{Val} pročišćavaju se do zadovoljavajuće čistoće ($>90\%$ kinetički aktivnih molekula; vidi kasnije) što nije slučaj s tRNA^{Ile} čija je akceptorska aktivnost 40-50 % te ju je potrebno dodatno pročititi kromatografijom obrnutih faza.

3.2.1.6. Dijaliza tRNA

Prije skladištenja molekule tRNA^{aa} potrebno je prevesti u odgovarajući pufer. Dijaliza se provodi u crijevu od celulozne membrane. Crijevo je prije dijalize pripremljeno kuhanjem 1 min u kipućoj otopini EDTA (1 mmol/dm^3) kako bi se uklonili metalni ioni s površine celulozne membrane. tRNA^{aa} prevode se u Hepes ($c = 5\text{ mmol/dm}^3$, pH 7,5) u tri obroka pufera (cca. 1,5 L) u ukupnom trajanju cca. 15 h. Aminoacilirane-tRNA^{aa} na isti način prevode se u otopinu natrijeva acetata ($c = 5\text{ mmol/dm}^3$, pH 5,0) kako bi se stabilizirala esterska veza između aminokiseline i tRNA.

3.2.1.7. Denaturirajuća poliakrilamidna gel-elektroforeza uz dodatak ureje

Uspješnost odvajanja molekula tRNA od velikih nukleinskih kiselina provjerena je denaturirajućom poliakrilamidnom gel-elektroforezom uz dodatak ureje (urea-PAGE). Dodatak ureje (uz inkubaciju pri visokoj temperaturi) uzrokuje denaturaciju nukleinskih kiselina, a zbog istog omjera mase i naboja, koji je specifičan za sve nukleinske kiseline, kretanje molekula kroz gel ovisi isključivo o veličini molekule. Za pripremu gelova i elektroforezu korištena je aparatura Mini PROTEAN TETRA (*Biorad*). Korišteni gelovi sastojali su se od otopine akrilamida i bisakrilamida 19:1 ($\gamma = 60\text{ mg/mL}$) pomiješane s elektroforetskim puferom TBE do konačnih koncentracija: $c(\text{urea}) = 8\text{ mol/dm}^3$, $c(\text{Tris}) = 90\text{ mmol/dm}^3$,

c (borna kiselina) = 90 mmol/dm³, c (EDTA) = 2 mmol/dm³ pH 8,0. Polimerizacija gelova omogućena je dodatkom inicijacijske molekule amonijevog peroksodisulfata (γ = 0,07 µg/mL) i katalizatora *N,N,N',N'*-tetrametiletilendiamina (ϕ = 0,05 %). Nakon polimerizacije, gel je uronjen u elektroforetski pufer TBE, a jažice su isprane istim puferom od istaložene ureje. Prije nanošenja uzoraka pokrenut je pripremni korak elektroforeze u trajanju 30 min pri 80 V i jakosti električnog polja približno 6,7 V/cm. Tijekom pripremnog koraka iz gela izlaze zaostali ioni amonijevog peroksodisulfata te se postiže homogeni ionski sastav gela i pufera. Uzorci su pomiješani s jednakim volumenom pufera za nanošenje uzorka sastava: γ (urea) = 8 mol/dm³, γ (bromfenol plavo) = 2 mg/mL, γ (ksilencijanolfosforat) = 2 mg/mL, c (EDTA) = 10 mmol/dm³, pH 8,0 te su inkubirani 5 min na 85 °C kako bi se denaturirali. Elektroforeza je trajala 1 h pri 120 V i 10 V/cm. Nakon elektroforeze gel je obojan 15 minutnom inkubacijom uz miješanje u otopini sastava: γ (toluidinsko modri) = 40 µg/mL, ϕ (etanol) = 50 % i ϕ (octena kiselina) = 0,1 %. Nespecifično vezana boja uklonjena je kuhanjem u kipućoj destiliranoj vodi do pojave jasnih vrpca.

3.2.1.8. Pročišćavanje prekomjerno eksprimirane tRNA^{lle} kromatografijom obrnutih faza

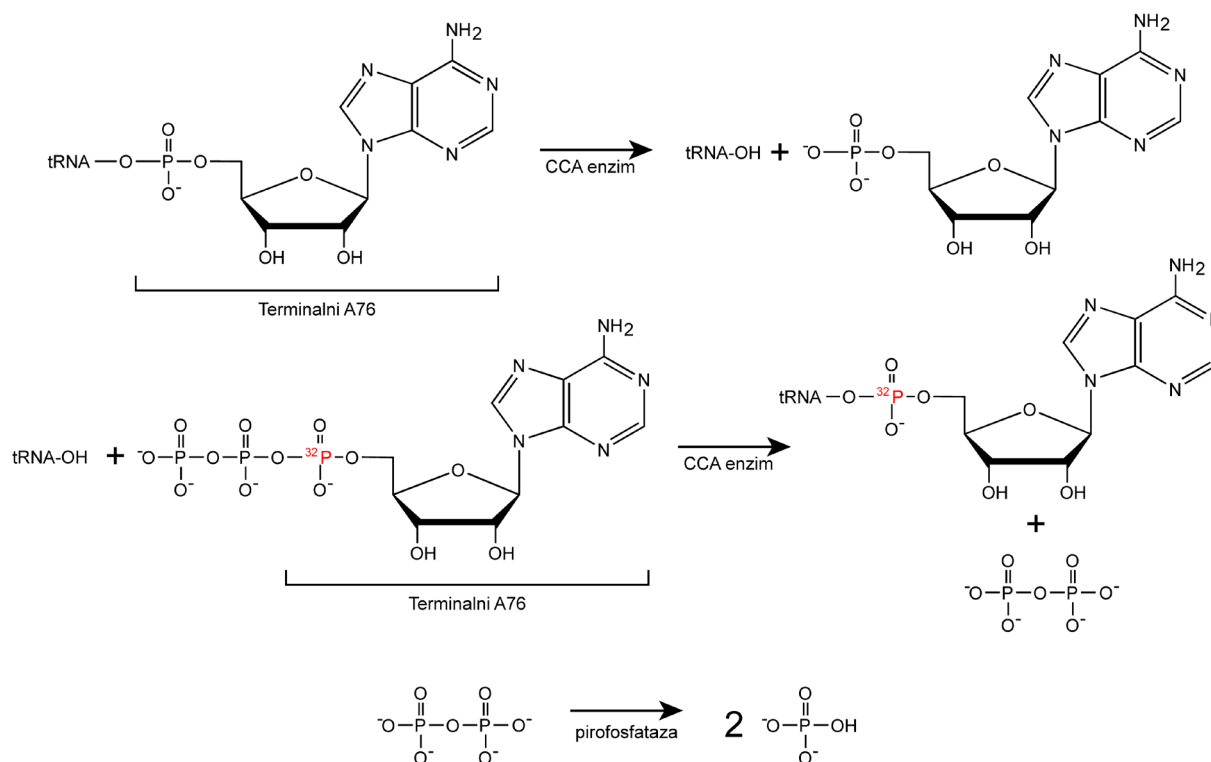
Prije kromatografije uzorak tRNA^{lle} potrebno je pripremiti. Priprema podrazumijeva i) ugušćivanje tRNA^{lle} isparavanjem otapala pri sniženom tlaku uz uređaj SpeedVac DNA120 (*ThermoSavant*) dok se ne postigne približna koncentracija γ (tRNA^{lle}) = 60 mg/mL te ii) centrifugiranje 15 min pri 20 000 × g radi taloženja nečistoća koje mogu utjecati na kromatografiju i smanjiti životni vijek kolone. Za kromatografiju su korišteni uređaj Äkta Purifier 10 (*GE Healthcare*) i RPC kolona Jupiter® 5 µm C4 300 Å, LC Column 250 × 4.6 mm (*Phenomenex*), a elucija se postiže povećanjem udjela etanola u mobilnoj fazi. Sastav mobilne faze A bio je: c (CH₃COONH₄ pH 5,0) = 20 mmol/dm³, c ((CH₃COO)₂Mg) = 10 mmol/dm³ i c (NaCl pH 5,0) = 400 mmol/dm³, dok je mobilna faza B dodatno sadržavala ϕ (etanol) = 30 %. Protokol standardnog pročišćavanja pri sobnoj temperaturi prikazan je u tablici 3.3. Dva oblika molekula tRNA^{lle} odvajaju se u 2 fazi elucije, dok 3 faza elucije služi ispiranju kolone od zaostalih tvari veće hidrofobnosti.

Tablica 3.3. Protokol kromatografije obrnutih faza za pročišćavanje prekomjerno eksprimirane tRNA^{lle}.

Faza	Trajanje faze / CV	Protok / mL/min	Udio pufera B / %
Uravnoteženje	15	1,85	0
Ispiranje	3	1,5	0
Elucija 1	2,5	1,5	3
Elucija 2	10	1,5	5
Elucija 3	5	1,5	100

3.2.1.9. Obilježavanje tRNA radioaktivnim izotopom ³²P

U svrhu kinetičkih eksperimenata potrebno je prirediti tRNA obilježene radioaktivnim izotopom ³²P. tRNA se obilježava tako da se na mjesto terminalnog adenzina A76 ugrađuje adenozin s izotopom ³²P na mjestu α-fosfata prema prethodno uhdanom postupku (slika 3.2) [150,151]. Proces se sastoji od dva koraka. U prvom koraku tRNA-nukleotidil-transferaza (nazvan CCA enzim) u suvišku pirofosfata katalizira odgradnju terminalnog adenzina. U drugom koraku dodatkom pirofosfataze (katalizira razgradnju pirofosfata) ravnoteža se pomiče prema prijenosu [³²P]-adenzina na tRNA pomoću ligacijske aktivnosti tRNA-nukleotidil-transferaze. Reakcijska smjesa sadrži: $c(\text{Tris}) = 200 \text{ mmol/dm}^3$ pH 8,0, $c(\text{MgCl}_2) = 20 \text{ mmol/dm}^3$, $c(\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7) = 5 \text{ mmol/dm}^3$, $c(\text{DTT}) = 0,5 \text{ mmol/dm}^3$, $c(\text{tRNA}^{\text{lle}}) = 5 \text{ } \mu\text{mol/dm}^3$, $c(\text{CCA enzim}) = 10 \text{ } \mu\text{mol/dm}^3$ i $c([\text{}^{32}\text{P}]\text{-ATP}) = 1 \text{ } \mu\text{mol/dm}^3$ specifične aktivnosti 3000 Ci/mmol. Prvi korak reakcije započinje dodatkom tRNA-nukleotidil-transferaze, a reakcija se inkubira 1 min na 37 °C. Drugi korak započinje dodatkom anorganske pirofosfataze (0,1 U/μL) (*NEB*) u reakcijsku smjesu te inkubacijom 2 min na sobnoj temperaturi. Reakcija se zaustavlja i pročišćava standardnim protokolom za ekstrakciju fenol-kloroformom. Zaostale male molekule, a osobito [³²P]-ATP uklanjaju se s dva uzastopna pročišćavanja na gel filtracijskim kolonama Micro Bio-Spin 30 (*BioRad*) prema uputama proizvođača. U konačnici, [³²P]-tRNA se dijalizom prevodi u otopinu Hepesa ($c = 5 \text{ mmol/dm}^3$, pH 7,5) i pohranjuje na -20 °C.



Slika 3.2. Shema obilježavanja tRNA ugradnjom radioaktivnog [^{32}P]-ATP-a na mjesto terminalnog A76 koristeći CCA enzim.

3.2.1.10. Određivanje koncentracije nukleinskih kiselina

Koncentracije nukleinskih kiselina određivane su spektrofotometrijski na uređajima NanoDrop 1000 (*Thermo Scientific*) i NanoDrop One (*Thermo Scientific*). Uređaj snima apsorpcijski spektar u području 220-350 nm te sam određuje koncentraciju nukleinskih kiselina na temelju podataka da 50 μg čiste DNA, odnosno 40 μg čiste RNA imaju vrijednost $A_{260} = 1$. Izuzev koncentracija, uređaji daju još dva važna parametra – omjere A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230} koji upućuju na čistoću uzoraka. Čista DNA ima omjer A_{260}/A_{280} oko 1,8, a čista RNA oko 2,0. Omjer A_{260}/A_{230} iznosi 1,8-2,0 za čiste DNA i RNA molekule.

3.2.2. Metode rada s proteinima

3.2.2.1. Prekomjerna ekspresija rekombinantnih proteina

Za prekomjernu ekspresiju proteina korištene su stanice *E. coli* BL(21)DE3 koje sadrže plazmidni vektor s ugrađenim proteinom od interesa: IleRS, LeuRS, ValRS i EF-Tu. U prvom koraku pripremljena je prekonoćna kultura uzgajanjem 5 mL bakterija uz odgovarajući antibiotik (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kanamicina za aaRS, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicilina za EF-Tu) pri 37 °C i 250 rpm. Prekonoćna kultura razrijeđena je 100 puta u LB mediju s dodanim odgovarajućim

antibiotikom, a bakterijske kulture su rasle u tresilici pri 37 °C i 250 rpm. U slučaju aaRS u bakterijsku kulturu pri OD₆₀₀ oko 0,1 dodan je ZnCl₂ do finalne koncentracije 1 mmol/dm³. Pri vrijednosti OD₆₀₀ 0,5-0,8 inducirana je ekspresija proteina dodatkom IPTG-a do množinske koncentracije 0,25 mmol/dm³ u slučaju aaRS i 0,2 mmol/dm³ u slučaju EF-Tu. Proteini se eksprimiraju 2-3 h u slučaju aaRS, to jest 4 h u slučaju EF-Tu. Stanice se zatim obore centrifugiranjem 15 min pri 4 °C i 5000 × g, a talog se pohranjuje na -20 °C do korištenja.

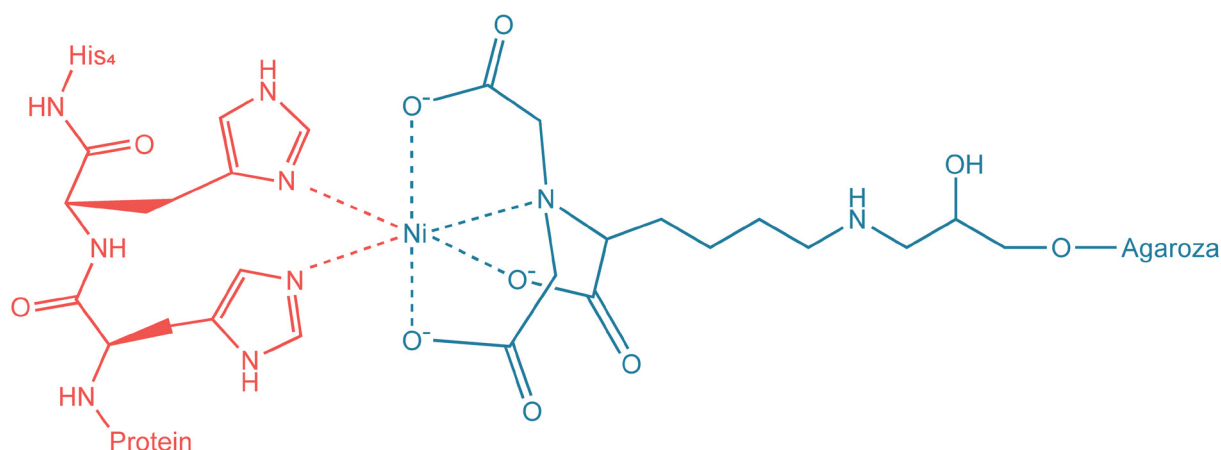
3.2.2.2. Priprema proteinskih ekstrakata

Talog stanica resuspendiran je u puferu A sastava: c (Hepes) = 20 mmol/dm³ pH = 7,5, c (NaCl) = 500 mmol/dm³, c (MgCl₂) = 20 mmol/dm³, c (imidazol) = 10 mmol/dm³ i c (β-merkaptetanol) = 5 mmol/dm³. Prilikom pročišćavanja EF-Tu korišten je pufer A_{EF-Tu} sljedećeg sastava: c (Hepes) = 50 mmol/dm³ pH = 7,5, c (NaCl) = 500 mmol/dm³, c (MgCl₂) = 10 mmol/dm³, c (imidazol) = 10 mmol/dm³, ϕ (glicerol) = 5 %, c (β-merkaptetanol) = 10 mmol/dm³, c (GDP) = 100 μmol/dm³. Za resuspendiranje taloga dobivenog iz 500 mL bakterijske kulture koristi se 5 mL pufera. U suspenziju se dodaju: DNaza I (γ = 3 ng/μL) koja cijepa genomsku DNA, lizozim (γ = 50 ng/μL) koji razgrađuje staničnu stijenku te PMSF (c = 0,1 mmol/dm³) koji inhibira serinske proteaze. Stanice su razbijene soniciranjem šest puta po 1 min s razmacima od 1 min. Tijekom soniciranja stanice su držane na ledu. Nastali stanični lizat centrifugiran je 1 h pri 4 °C i 15 000 × g. Dobiveni proteinski ekstrakt (supernatant) profiltriran je kroz sterilni filter s porama veličine 0,22 μm. Proteini su dalje pročišćavani afinitetnom kromatografijom.

3.2.2.3. Afinitetna kromatografija na Ni-NTA agarози

Afinitetna kromatografija s imobiliziranim metalnim ionom (IMAC) jedna je od najčešće korištenih oblika kromatografija u proteinskoj biokemiji zbog svoje visoke specifičnosti. Njena najpoznatija i najraširenija varijanta je kromatografija na Ni-NTA agarози kojom se pročišćavaju proteini koji su eksprimirani s histidinskim privjeskom (šest His zaredom) na N- ili C-kraju. Punilo kolone sačinjava sefaroza na koju je kovalentno vezana nitrilotrioctena kiselina koja koordinira četiri od šest veznih mjesta na Ni²⁺ ionu. Na preostala dva vezna mjesta prilikom pročišćavanja mogu se vezati histidini iz His-privjeska (slika 3.3). Vezanje je reverzibilno pa se nakon ispiranja nevezanih proteina s kolone, narušavanjem interakcija nikla i His-privjeska specifično eluira protein od interesa. Za pročišćavanje je korištena HisTrap HP 1 mL (Cytiva) kolona. Pročišćavanje se provodilo na kromatografskom sustavu Äkta Pure 25

(GE Healthcare). Za pročišćavanje su korišteni puferi A, B i C, odnosno A_{EF-Tu} , B_{EF-Tu} i C_{EF-Tu} . Puferi su sastava kao pufer za resuspendiranje taloga stanica opisan u poglavlju 3.2.2.2, a razlikuju se u koncentraciji imidazola koja je bila 10 mmol/dm³, 20 mmol/dm³ i 200 mmol/dm³ redom za pufer A, B i C, odnosno A_{EF-Tu} , B_{EF-Tu} i C_{EF-Tu} . Pročišćavanje se odvijalo pri 8 °C i protoku 1 ml/min, a protokol standardnog pročišćavanja prikazan je u tablici 3.4. Tijekom ispiranja sakupljane su frakcije od 1,5 mL, a tijekom elucije od 0,5 mL. Ispiranje puferom A služi ispiranju nevezanih, a puferom B ispiranju slabo vezanih proteina s kolone. Uspješnost pročišćavanja provjerena je SDS poliakrilamidnom gel-elektroforezom.



Slika 3.3. Shematski prikaz vezanja proteina preko histidinskog privjeska na Ni-NTA stacionarnu fazu.

Tablica 3.4. Kromatografska metoda za pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom.

Faza	Trajanje faze / CV	Mobilna faza
Uravnoteženje	10	Pufer $A_{(EF-Tu)}$ (10 mmol/dm ³ imidazol)
Nanošenje uzorka	Volumen uzorka	Pufer $A_{(EF-Tu)}$ (10 mmol/dm ³ imidazol)
Ispiranje #1	10-20	Pufer $A_{(EF-Tu)}$ (10 mmol/dm ³ imidazol)
Ispiranje #2	10	Pufer $B_{(EF-Tu)}$ (20 mmol/dm ³ imidazol)
Elucija	5	Pufer $C_{(EF-Tu)}$ (200 mmol/dm ³ imidazol)

3.2.2.4. Pročišćavanje aaRS od supročišćenih aminokiselina i aminoacil-adenilata

Neke aaRS se supročišćavaju s (aktiviranim) aminokiselinama u sintetskom mjestu što u nekim kinetičkim mjerenjima može uzrokovati artefakte i voditi k pogrešnim zaključcima. Stoga su proteini kod kojih je to moglo predstavljati problem podvrgnuti metodi pročišćavanja pirofosforolizom. Metoda se temelji na inkubaciji aaRS s pirofosfatom, čime se potiče reakcija pirofosforolize u sintetskom mjestu, te poticanju disocijacije nastalog ATP-a i aminokiseline s enzima. U prvom koraku se otopina sastava: γ (aaRS) = 1 mg/mL, c (Hepes) = 20 mmol/dm³ pH = 7,5, c (NaCl) = 500 mmol/dm³, c (MgCl₂) = 4 mmol/dm³, c (Na₄P₂O₇) = 2 mmol/dm³ inkubira 30 min na sobnoj temperaturi. Zatim je aaRS potrebno dodatno isprati i pročistiti od pirofosfata, disocirane aminokiseline i ATP-a na Ni-NTA agarozu. Pročišćavanje se provodi na kromatografskom sustavu Äkta Pure 25 (GE Healthcare) uz pufere A, A+PP_i i C pri 8 °C i protoku 1 ml/min prema protokolu prikazanom u tablici 3.5. Puferi A i C istog su sastava kao puferi iz prethodnog poglavlja, dok je pufer A+PP_i zapravo pufer A s dodanim 2 mmol/dm³ natrijevim pirofosfatom. Tijekom ispiranja puferom A+PP_i dodatno se potiče reakcija pirofosforolize i disocijacija produkata, a ispiranje puferom A uklanja pirofosfat. Elucija se postiže uz pufer C.

Tablica 3.5. Kromatografska metoda za pročišćavanje aaRS pirofosforolizom.

Faza	Trajanje faze / CV	Mobilna faza
Uravnoteženje	10	Pufer A+PP _i
Nanošenje uzorka	Volumen uzorka	Pufer A+PP _i
Ispiranje #1	10	Pufer A+PP _i
Ispiranje #2	10	Pufer A
Elucija	5	Pufer C

3.2.2.5. Denaturirajuća poliakrilamidna gel-elektroforeza uz dodatak natrijevog dodecil-sulfata

Analiza uspješnosti pročišćavanja proteina vršena je metodom diskontinuirane denaturirajuće poliakrilamidne gel-elektroforeze (SDS-PAGE). Prilikom denaturacije nastaju kompleksi proteina i SDS-a istog omjera mase i naboja što znači da se u gelu pod utjecajem električnog polja proteini razdvajaju na temelju njihove mase. Za pripremu SDS-poliakrilamidnih gelova i elektroforezu korištena je aparatura Mini Protean Tetra (*Biorad*). Priređeni SDS-gel bio je sačinjen od dva dijela, gela za razdvajanje (γ (akrilamid:bisakrilamid 29:1) = 90 mg/mL, c (Tris) = 0,385 mol/dm³ pH = 8,8 i γ (SDS) = 1 mg/mL) i gela za sabijanje (γ (akrilamid:bisakrilamid 29:1) = 40 mg/mL, c (Tris) = 0,125 mol/dm³ pH = 6,8 i γ (SDS) = 1 mg/mL). Prije same elektroforeze uzorcima proteina dodana je otopina za denaturaciju do konačnog sastava: c (Tris) = 62,5 mmol/dm³ pH = 6,8, c (β -merkaptotanol) = 12,5 mmol/dm³, ϕ (glicerol) = 6,25 %, γ (SDS) = 1,25 mg/mL i γ (bromfenolplavo) = 0,02 mg/mL. Proteini su zatim denaturirani zagrijavanjem 5 min pri 95 °C. Elektroforeza je provedena pri sobnoj temperaturi u dva koraka u puferu sastava: γ (glicin) = 14,4 mg/mL, γ (Tris) = 3,03 mg/mL pH = 8,3 i γ (SDS) = 1 mg/mL. U prvom koraku uzorci se sabijaju 15 min pri 120 V, dok se u drugom razdvajaju 40 min pri 180 V. Nakon elektroforeze gel je obojan inkubacijom u otopini sastava: γ (Coomassie Brilliant Blue R-250) = 2,5 mg/mL, ϕ (CH₃COOH) = 10 % i ϕ (C₂H₅OH) = 50 %. Nespecifično vezana boja uklonjena je kuhanjem u kipućoj destiliranoj vodi do pojave jasnih vrpca.

3.2.2.6. Izmjena pufera gel-filtracijom

Nakon pročišćavanja afinitetnom kromatografijom proteine je potrebno prevesti u pufer za pohranu proteina: c (Hepes) = 20 mmol/dm³ pH = 7,5, c (NaCl) = 50 mmol/dm³, c (β -merkaptotanol) = 5 mmol/dm³ i ϕ (glicerol) = 10 %. U slučaju EF-Tu sastav pufera bio je: c (Hepes) = 50 mmol/dm³ pH = 7,5, c (KCl) = 50 mmol/dm³, c (MgCl₂) = 10 mmol/dm³, c (GDP) = 10 μ mol/dm³, c (β -merkaptotanol) = 5 mmol/dm³ i ϕ (glicerol) = 50 %. Za izmjenu pufera korištene su komercijalne gel-filtracijske kolone PD10 (*GE Healthcare*) prema uputama proizvođača.

3.2.2.7. Ugušćivanje pufera ultrafiltracijom

Prije pohrane otopine proteina potrebno je ugustiti. Za to su korišteni *Centricon-centrifugal device* (*Milipore*) s filterima kroz čije pore mogu proći samo čestice manje od 10, 30 ili 50 kDa

prema uputama proizvođača. Proteinski uzorci su pohranjeni na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ u slučaju aaRS, odnosno $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ u slučaju EF-Tu.

3.2.2.8. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije proteina

Koncentracije proteina određivane su spektrofotometrijski na uređajima NanoDrop 1000 (*Thermo Scientific*) i NanoDrop One (*Thermo Scientific*). Uređaji određuju masenu koncentraciju na temelju vrijednosti apsorbancije pri 280 nm, ekstincijskog koeficijenta i molarne mase proteina. Također, važan parametar je omjer A_{260}/A_{280} koji za proteine čiste od nukleinskih kiselina i nukleotida iznosi 0,57.

3.2.2.9. Određivanje koncentracije proteina po Bradfordu

U slučaju EF-Tu koncentracija proteina uglavnom je određivana metodom po Bradfordu [152]. Metoda se temelji na reakciji proteina s bojom Coomassie Brilliant Blue G-250 što za posljedicu ima pomicanje valne duljine maksimalne apsorbancije s 465 nm na 595 nm. Apsorbancija smjese je linearno proporcionalna koncentraciji proteina u uzorku do granice od 1 mg/mL. Proteini su razrijeđeni u vodi do ukupnog volumena 30 μL . Zatim je 20 μL razrijeđenog uzorka pomiješano s 1 mL Bradfordovog reagensa (γ (Coomassie Brilliant Blue G-250) = 0,1 mg/mL, ϕ ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) = 5 % i ϕ (H_3PO_4) = 50 %), a dobivena smjesa je inkubirana 10 min na sobnoj temperaturi. Apsorbancija pri 595 nm izmjerena je na uređaju Evolution 60S (*Thermo Scientific*). Koncentracija je izračunata pomoću baždarnog pravca napravljenog uz proteinski standard poznatih koncentracija (albumin iz seruma goveda, BSA) u rasponu 0,1-1 mg/mL.

3.2.2.10. Aktivacija elongacijskog faktora Tu

Elongacijski faktor Tu pohranjuje se u kompleksu s GDP-om, odnosno u njegovom inaktivnom obliku. Da bi ga se moglo koristiti u kinetičkim eksperimentima potrebno ga je aktivirati – zamijeniti GDP s GTP-om [60]. Aktivacija se postiže inkubacijom 200 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ EF-Tu u otopini sastava: c (Hepes) = 70 mmol/dm^3 , c ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) = 50 mmol/dm^3 , c ($(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$) = 10 mmol/dm^3 , c (KCl) = 30 mmol/dm^3 , c (DTT) = 0,8 mmol/dm^3 , c (fosfoenolpiruvat) = 10 mmol/dm^3 , c (GTP) = 1 mmol/dm^3 i 0,08 U/ μL piruvat kinaze, 2 h pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. EF-Tu je korišten neposredno nakon aktivacije, a prethodna istraživanja pokazala su kako udio aktiviranog EF-Tu iznosi 10 % [60]. Koncentracije navedene dalje u tekstu odnose se isključivo na aktivni EF-Tu.

3.2.3. Metode rada s bakterijama

3.2.3.1. Priprema kemijski kompetentnih stanica bakterije *E. coli*

Kemijski kompetentne stanice su stanice koje mogu primiti stranu DNA metodom kemijske transformacije. S bakterijama se radi u sterilnim uvjetima u laminaru uz plamen. Prvo je uzgojeno 5 mL prekonoćne kulture u LB mediju. Uzgoj se vrši uz antibiotik ako se priprema bakterijski soj koji nosi gen za otpornost na antibiotik. Prekonoćna kultura je razrijeđena u 500 mL LB medija bez dodatka antibiotika te je uzgajana pri 37 °C i 250 rpm do optičke gustoće OD₆₀₀ 0,4-0,6. Bakterije su ohlađene na ledu 30 min, a zatim su istaložene centrifugiranjem 10 min pri 4 °C i 5000 × g. Supernatant je odvojen, a bakterijski talog je resuspendiran u 30 mL hladne otopine sastava: $c(\text{CaCl}_2) = 50 \text{ mmol/dm}^3$, $c(\text{MgCl}_2) = 50 \text{ mmol/dm}^3$ i $\varphi(\text{glicerol}) = 10 \%$. Bakterije su opet istaložene u istim uvjetima, supernatant je odvojen, a talog je ponovno resuspendiran u istoj otopini, ali u volumenu 3,6 mL. Bakterijska suspenzija inkubirana je na ledu 10 min. Suspenzija je alikvotirana po 50 µL u Eppendorf epruvete, a alikvoti su pohranjeni na -80 °C.

3.2.3.2. Kemijska transformacija bakterijskih stanica

Kemijska transformacija je metoda unošenja strane DNA u stanice pomoću kalcijevog klorida. Suspenziji bakterijskih stanica (50 µL) doda se od 1 pg do 100 ng plazmidne DNA. Smjesa se inkubira 30 min na ledu. Zatim slijedi temperaturni šok pri 42 °C u trajanju od 30 s te ponovna inkubacija na ledu 2 min. Bakterije se zatim razrijede u 950 µL LB medija zagrijanog na 37 °C i inkubiraju 1-2 h pri 37 °C i 300 rpm. Nakon inkubacije 100 µL bakterijske suspenzije nasadi se na krutu selektivnu hranjivu podlogu. S obzirom na to da plazmidi sadrže gen za otpornost na određeni antibiotik, preživjet će samo transformirane bakterije.

3.2.3.3. Priprema elektrokompetentnih stanica bakterije *E. coli*

Elektrokompetentne stanice su stanice koje mogu primiti stranu DNA metodom elektroporacije. Proces pripreme elektrokompetentnih stanica identičan je pripremi kemijski kompetentnih stanica do koraka prvog taloženja bakterijskih stanica. Istaložene stanice dva puta se ispiru s 500 mL ledeno hladne vode pri čemu se između ispiranja talože centrifugiranjem 10 min pri 4 °C i 5000 × g. Bakterije se zatim resuspendiraju u 10 mL glicerola ($\varphi = 10 \%$) i ponovno istalože centrifugiranjem 10 min pri 4 °C i 5000 × g. U konačnici bakterije se resuspendiraju u 1,5 mL glicerola ($\varphi = 10 \%$), alikvotiraju po 50 µL i pohrane na -80 °C.

3.2.3.4. Transformacija bakterijskih stanica elektroporacijom

Elektroporacija je metoda transformacije bakterijskih stanica koja se temelji na povećanju propusnosti bakterijske stijenke uslijed djelovanja električnog pulsa. Ukratko, alikvot od 50 μL elektrokompetentnih bakterija pomiješa se s 10-100 ng plazmidne DNA. Bakterije se prebace u ohlađenu kivetu za elektroporaciju, epruveta se postavi u uređaj za elektroporaciju MicroPulser (*Biorad*) te se bakterije izlože električnom pulsu od 2,5 kV/cm u trajanju od 4,5-6,0 ms. Bakterije se odmah resuspendiraju u 1 mL tekućeg LB medija zagrijanog na 37 °C te se inkubiraju 1 h pri 37 °C i 300 rpm. Nakon inkubacije 100 μL bakterijske suspenzije nasadi se na krutu selektivnu hranjivu podlogu. S obzirom na to da plazmidi sadrže gen za otpornost na određeni antibiotik, preživjet će samo transformirane bakterije.

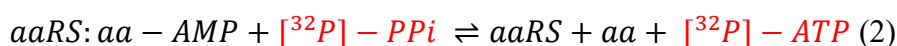
3.2.3.5. Praćenje rasta bakterijskih stanica uz prekomjernu ekspresiju različitih varijanti IleRS

Kako bi se istražio utjecaj različitih varijanti IleRS na rast bakterijskih stanica pratio se njihov rast uz ekspresiju WT, T246A, H333A i T246A/H333A IleRS. Korištene su *E. coli* BL21(DE3) stanice transformirane pET28b plazmidom s ugrađenim genom za različite varijante IleRS. Bakterije su uzgajane u M9 mediju s dodanom glukozom ($\gamma = 4 \text{ mg/mL}$) i kanamicinom ($\gamma = 50 \text{ }\mu\text{g/mL}$). Preko noći je uzgojena pretkultura u volumenu 5 mL. Bakterije su razrijeđene na optičku gustoću $\text{OD}_{600} = 0,04$ u 20 mL M9 medija s dodanom glukozom ($\gamma = 4 \text{ mg/mL}$), kanamicinom ($\gamma = 50 \text{ }\mu\text{g/mL}$) i IPTG-om ($c = 100 \text{ }\mu\text{mol/dm}^3$). IPTG se dodaje kako bi se inducirala ekspresija proteina različitih varijanti IleRS čiji se geni nalaze na plazmidu pET28b. Bakterije se uzgajaju u tikvicama za uzgoj bakterijskih kultura od 100 mL 12 h pri 37 °C i 250 rpm. Svakih 1 h bakterijska kultura je alikvotirana da bi se izmjerila optička gustoća OD_{600} . Za mjerenje OD_{600} korišten je spektrofotometar Evolution 60S (*Thermo Scientific*). Podaci su opisani krivuljama rasta prema logističkom modelu diobe stanica $y = \frac{A}{\left(1 + e^{\left(4 \times \frac{\mu}{A}(\lambda - t) + 2\right)}\right)}$, pri čemu: A predstavlja maksimalni rast stanica, λ predstavlja duljinu lag faze, a μ predstavlja koeficijent brzine rasta bakterijskih stanica.

3.2.4. Kinetičke metode

3.2.4.1. Aktivacija aminokiselina praćena metodom izmjene pirofosfata

Reakciju aktivacije aminokiselina moguće je pratiti takozvanom metodom izmjene pirofosfata [153–155]. Metoda se temelji na tome da se u reakcijsku smjesu izuzev aminokiseline i ATP-a dodaje i pirofosfat (suplementiran s radioaktivnim [^{32}P]-pirofosfatom kao biljegom). Produkt reakcije aktivacije (reakcija 1), aminoacil-adenilat (aa-AMP) u povratnoj reakciji s pirofosfatom daje ATP (reakcija 2). Do povratne reakcije dolazi jer je u smjesu dodan suvišak pirofosfata. Tu reakciju moguće je pratiti jer u njoj nastaje radioaktivno obilježeni ATP (nastaje radioaktivno obilježeni pirofosfat). S obzirom na to da je reakcija pirofosforolize puno brža od reakcije aktivacije aminokiselina, mjerenjem brzine pirofosforolize zapravo se mjeri brzina aktivacije aminokiselina jer je brzina pirofosforolize ograničena brzinom nastajanja aminoacil-adenilata.



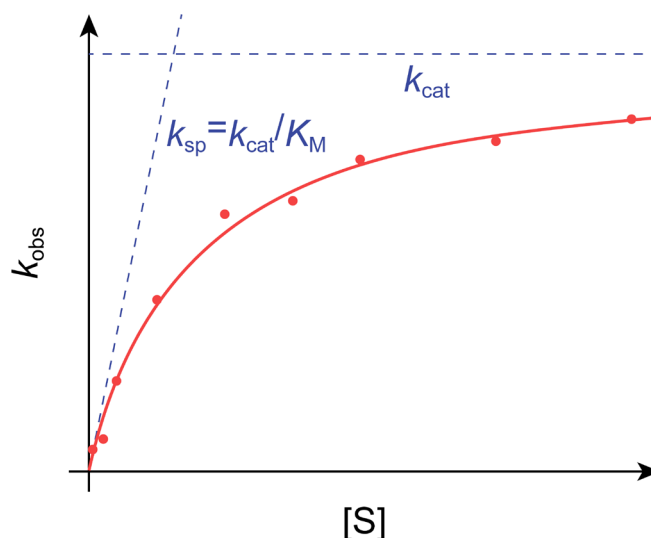
Opisanom metodom određeni su kinetički parametri k_{cat} , k_{sp} i K_{M} za aktivaciju aminokiselinskih supstrata uz enzime IleRS, LeuRS i ValRS. Reakcijska smjesa sadržavala je: $c(\text{Hepes}) = 50 \text{ mmol/dm}^3$, $c(\text{MgCl}_2) = 20 \text{ mmol/dm}^3$, $c(\text{DTT}) = 5 \text{ mmol/dm}^3$, $c(\text{ATP}) = 4 \text{ mmol/dm}^3$, $c(\text{PPi}) = 1 \text{ mmol/dm}^3$ i $\gamma(\text{BSA}) = 0,1 \text{ mg/mL}$. Koncentracija aminokiselina varirana je između 0,1 i $10 \times K_{\text{M}}$. Koncentracija enzima prilagođavana je koeficijentu brzine reakcije, a uglavnom se kretala od 20 nmol/dm^3 do $1 \text{ }\mu\text{mol/dm}^3$. Reakcije su praćene pri 37°C . Reakcija je započeta dodatkom aminokiseline u ostatak reakcijske smjese. U određenim vremenskim točkama uzimani su alikvoti reakcijske smjese od $1,5 \text{ }\mu\text{L}$ koji su zatim pomiješani s $3 \text{ }\mu\text{L}$ smjese za zaustavljanje reakcije ($c(\text{CH}_3\text{COONa}) = 600 \text{ mmol/dm}^3$ pH = 4,5, $\gamma(\text{SDS}) = 1,5 \text{ mg/mL}$). Kako bi se razdvojili supstrati od produkata, odnosno [^{32}P]-PPi od [^{32}P]-ATP-a, alikvoti zaustavljenih reakcijskih smjesa podvrgnuti su tankoslojnoj kromatografiji na polietileniminskim pločicama (*Macherey-Nagel*). Pločice su predrazvijene u destiliranoj vodi i posušene na sobnoj temperaturi. Na pločice je nanoseno 1-2 μL zaustavljene reakcijske smjese, a kromatografija se odvijala u mobilnoj fazi sastava $c(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 750 \text{ mmol/dm}^3$ pH = 3,5 i $c(\text{urea}) = 4 \text{ mol/dm}^3$ do trenutka kada fronta mobilne faze dođe do ruba pločice. Pločice su posušene fenom i izložene preko noći na zaslonu za detekciju radioaktivnosti (*GE Healthcare*). Zaslon je građen od materijala koji posjeduje

svojstvo fotostimulirajuće luminescencije. U prvom koraku molekule koje sačinjavaju zaslon bivaju pobuđene u više elektronsko stanje tijekom izlaganja kromatografske pločice, odnosno uslijed β -raspada izotopa ^{32}P . Na taj način na zaslon se „zapisuje“ informacija o količini radioaktivnog zračenja. U sljedećem koraku zaslon se izlaže na laserskom skeneru Typhoon (*GE Healthcare*). Laserski skener emitira elektromagnetsko zračenje koje uzrokuje povratak iz pobuđenog u osnovno elektronsko stanje. Rezultat tog prijelaza je luminescencija koja je proporcionalna količini radioaktivnog zračenja na kromatografskoj pločici. Kvantifikacija se vrši pomoću programa ImageQuant 8.1 (*GE Healthcare*), a rezultati su obrađeni pomoću programa Excel (*Microsoft*) i GraphPad Prism (*GraphPad Software*). Iz dobivenih rezultata odredi se koncentracija nastalog produkta ($[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$) u vremenu. Linearnom regresijom moguće je odrediti početne brzine reakcije – v_0 . Umjesto standardnog Michaelis-Menten modela, za određivanje kinetičkih podataka nelinearnom regresijom odabrana je jednačba:

$$k_{obs} = \frac{k_{sp} \times [S]}{1 + \frac{k_{sp} \times [S]}{k_{cat}}}; \text{ gdje je } k_{obs} \text{ opažena konstanta brzine reakcije pri određenoj koncentraciji}$$

supstrata, a računa se kao $k_{obs} = \frac{v_0}{[E]_0}$, odnosno početna brzina reakcije podijeljena s koncentracijom enzima, k_{sp} je konstanta specifičnosti (k_{cat}/K_M), k_{cat} je obrtni broj, a $[S]$ koncentracija supstrata [156]. Računanje kinetičkih parametara na ovaj način ima nekoliko prednosti nad standardnim Michaelis-Menteninim modelom – $v_0 = \frac{V_m \times [S]}{K_M + [S]}$; gdje je V_m je maksimalna brzina reakcije iz koje se dijeljenjem s koncentracijom enzima izračunava obrtni broj, $[S]$ početna koncentracija supstrata, a K_M Michaelisova konstanta koja se definira kao koncentracija supstrata pri kojoj je početna brzina jednaka polovini maksimalne brzine. Prva prednost jest to što se na ovaj način direktno dobivaju k_{sp} i k_{cat} , a ne K_M i k_{cat} . Naime, smatra se kako su upravo k_{sp} i k_{cat} dva najvažnija kinetička parametra jer predstavljaju egzaktnu vrijednost, k_{sp} – je donja granica koeficijenta brzine drugog reda za interakciju slobodnog enzima i supstrata dok je k_{cat} donja granica koeficijenta brzine prvog reda svih koraka reakcije nakon nastajanja enzim-supstrat kompleksa. Dodatno, k_{sp} se koristi kao mjera kojom se određuje koliko enzim preferira jedan supstrat u odnosu na drugi (vidi poglavlje 2.6.) [136,156]. Nedostatak K_M parametra leži u tome što on može biti veći, manji ili jednak konstanti disocijacije enzim-supstrat kompleksa i samim time ga je teško interpretirati bez dodatnih podataka te se stoga u ovom radu najčešće spominje kao mjera prividnog afiniteta [136,156]. Druga prednost preuređene Michaelis-Mentenine jednačbe jest manja pogreška pri određivanju kinetičkih parametara [156]. Naime, u standardnom Michaelis-Menteninom

modelu i k_{cat} i K_M određuju se ekstrapolacijom na beskonačnu koncentraciju supstrata – k_{cat} je koeficijent brzine reakcije pri toj koncentraciji dok je K_M koncentracija supstrata pri kojoj se postiže polovina te brzine. Nadalje, ta pogreška se prenosi kada se iz ta dva parametra izračunava konstanta specifičnosti. S druge strane, u preuređenom modelu, k_{sp} se određuje kao nagib pravca linearnog dijela krivulje pri vrlo niskim koncentracijama supstrata (slika 3.4) i samim time je pogreška u njegovom određivanju puno manja. Kinetički parametri su određivani zasebno za svaki eksperiment te su srednje vrijednosti i pogreške izračunate iz tih podataka.



Slika 3.4. Michaelis-Menten prikaz ovisnosti opaženog koeficijenta brzine reakcije o koncentraciji supstrata. Preuzeto i prilagođeno iz [156].

3.2.4.2. Reakcija aminociliranja

Ukupna reakcija aminoaciliranja može se pratiti uz $[^{14}\text{C}]$ -aminokiselinu ili $[^{32}\text{P}]$ -tRNA. Metoda uz $[^{14}\text{C}]$ -aminokiselinu uglavnom je korištena za određivanje udjela aktivnih molekula tRNA^{aa} (ona tRNA^{aa} koja može biti aminoacilirana) u pročišćenoj smjesi tRNA (akceptorska aktivnost), dok je za određivanje opaženog koeficijenta brzine reakcije aminoaciliranja korištena metoda uz $[^{32}\text{P}]$ -tRNA. Prednost rada uz $[^{14}\text{C}]$ -aminokiseline jest to što su one komercijalno dostupne pa nema potrebe za radioaktivnim obilježavanjem tRNA. S druge strane, eksperimentalni postav uz $[^{32}\text{P}]$ -tRNA omogućava korištenje znatno većih koncentracija aminokiselina jer je uz $[^{14}\text{C}]$ -aminokiseline maksimalna koncentracija aminokiseline definirana njenom specifičnom aktivnošću, odnosno količinom radioaktivne aminokiseline koju je potrebno dodati u smjesu da bi se ostvarila detekcija.

3.2.4.2.1. Aminoaciliranje uz [^{14}C]-aminokiselinu

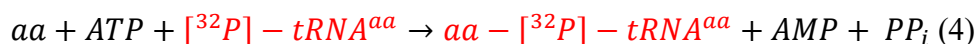
Udio aminoaciliranih molekula tRNA^{aa} (aa-tRNA^{aa}) određuje se na temelju radioaktivnosti ugrađene u tRNA^{aa} (reakcija 3).



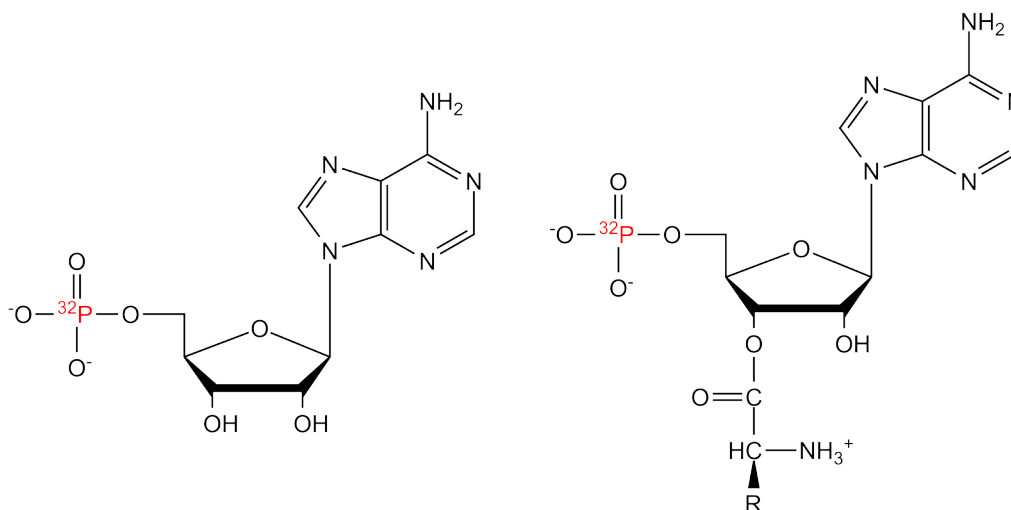
Standardna reakcijska smjesa za reakciju aminoaciliranja sastojala se od: $c(\text{Hepes}) = 20 \text{ mmol/dm}^3$, $c(\text{MgCl}_2) = 10 \text{ mmol/dm}^3$, $c(\text{NH}_4\text{Cl}) = 150 \text{ mmol/dm}^3$ (u slučaju ValRS i IleRS, dok je u slučaju LeuRS korišten kalijev klorid u istoj koncentraciji), $c(\text{ATP}) = 2 \text{ mmol/dm}^3$, $\gamma(\text{BSA}) = 0,1 \text{ mg/mL}$ i anorganska pirofosfataza TIPP $0,008 \text{ U/}\mu\text{L}$ (enzim koji katalizira razgradnju pirofosfata i pomiče ravnotežu prema nastajanju produkata). Koncentracija tRNA^{aa} iznosila je $1\text{--}2 \mu\text{mol/dm}^3$, dok su enzimi korišteni u koncentracijama $2\text{--}5 \mu\text{mol/dm}^3$ kako bi se osiguralo maksimalno aminoaciliranje tRNA^{aa}. Aminokiseline su korištene u koncentraciji barem pet puta većoj od K_M određenog u reakciji aktivacije. Korištena je smjesa radioaktivne i neradioaktivne aminokiseline čija je specifična aktivnost u reakcijskoj smjesi iznosila $50\text{--}100 \text{ mCi/mmol}$. Reakcije su praćene pri 37°C . Reakcija je započeta dodatkom enzima u ostatak reakcijske smjese. U određenim vremenskim točkama uzimani su reakcijski alikvoti volumena $9 \mu\text{L}$ koji su nanjeni na kromatografske papiriće Whatman 3MM Chr (*GE Healthcare*) dimenzija $2 \times 1 \text{ cm}$. Reakcija je zaustavljena uranjanjem papirića u otopinu hladnoj (cca. 4°C) triklorooctene kiseline $w = 10 \%$. Po završetku reakcije, papirići su ispirani 10 min u hladnoj otopini triklorooctene kiseline $w = 10 \%$ i dva puta po 5 min u hladnoj otopini triklorooctene kiseline $w = 5 \%$. Papirići su potom kratko isprani u malom volumenu ohlađenog etanola $\varphi = 96 \%$ te osušeni u sušioniku $20\text{--}30 \text{ min}$ na $70\text{--}80^\circ\text{C}$. Kako bi se odredila radioaktivnost aminoacilirane tRNA ($[^{14}\text{C}]\text{-aa-tRNA}^{\text{aa}}$) papirići su prebačeni u staklene bočice s $2,5 \text{ mL}$ scintilacijske otopine (toluenska otopina $\gamma(\text{PPO}) = 5 \text{ g/dm}^3$ i $\gamma(\text{POPOP}) = 0,3 \text{ g/dm}^3$) te podvrgnuti mjerenju na scintilacijskom brojaču Tri-Carb 2900 TR (*Perkin Elmer*). Na temelju broja otkucaja izmjerenih za vremenske točke i baždarnog dijagrama konstruiranog za aminokiseline poznate koncentracije i specifične radioaktivnosti izračuna se koncentracija aminoacilirane tRNA^{aa}.

3.2.4.2.2. Aminoaciliranje uz $[^{32}\text{P}]\text{-tRNA}$

U suštini, aminoaciliranjem uz $[^{32}\text{P}]\text{-tRNA}$, odnosno uz $[^{14}\text{C}]\text{-aminokiselinu}$ prati se ista reakcija, ali u ovom eksperimentalnom postavu kao radioaktivni biljeg koristi se $[^{32}\text{P}]\text{-tRNA}$ (reakcija 4).



Priprema radioaktivno obilježene tRNA opisana je u poglavlju 3.2.1.9. Sastav reakcijske smjese (soli, puferi i aditivi) bio je isti kao i u prethodno opisanoj metodi. Koncentracija $tRNA^{aa}$ iznosila je $10\text{--}20 \mu\text{mol/dm}^3$ (suplementirana s $[^{32}\text{P}]\text{-tRNA}^{aa}$), enzima od 100 nmol/dm^3 do $1 \mu\text{mol/dm}^3$, a koncentracija aminokiseline iznosila je barem $10 \times K_M$ u aktivaciji (izuzev u slučaju vrlo visokih K_M vrijednosti). Reakcije su praćene pri 37°C . Reakcija je započeta dodatkom aminokiseline u ostatak reakcijske smjese. Alikvoti vremenskih točaka volumena $1\text{--}2 \mu\text{L}$ pomiješani su s $3 \mu\text{L}$ smjese za zaustavljanje reakcija (kao što je opisano u poglavlju 3.2.4.1.). S obzirom na to da $aa\text{-tRNA}^{aa}$ i $tRNA^{aa}$ nije moguće odvojiti tankoslojnom kromatografijom, alikvote reakcijskih smjesa potrebno je tretirati P1 nukleazom. P1 nukleaza je enzim koji cijepa (aminoaciliranu) tRNA na 5'-mononukleotide. Najznačajniji produkti razgradnje su terminalni AMP i aa-AMP (slika 3.5) koji nose radioaktivnu oznaku te ih je moguće odvojiti tankoslojnom kromatografijom. AMP predstavlja neaminoaciliranu, a aa-AMP aminoaciliranu tRNA.



Slika 3.5. Lijevo – radioaktivno obilježeni AMP (produkt razgradnje neaminoacilirane tRNA), desno – radioaktivno obilježeni aa-AMP (produkt razgradnje aminoacilirane tRNA).

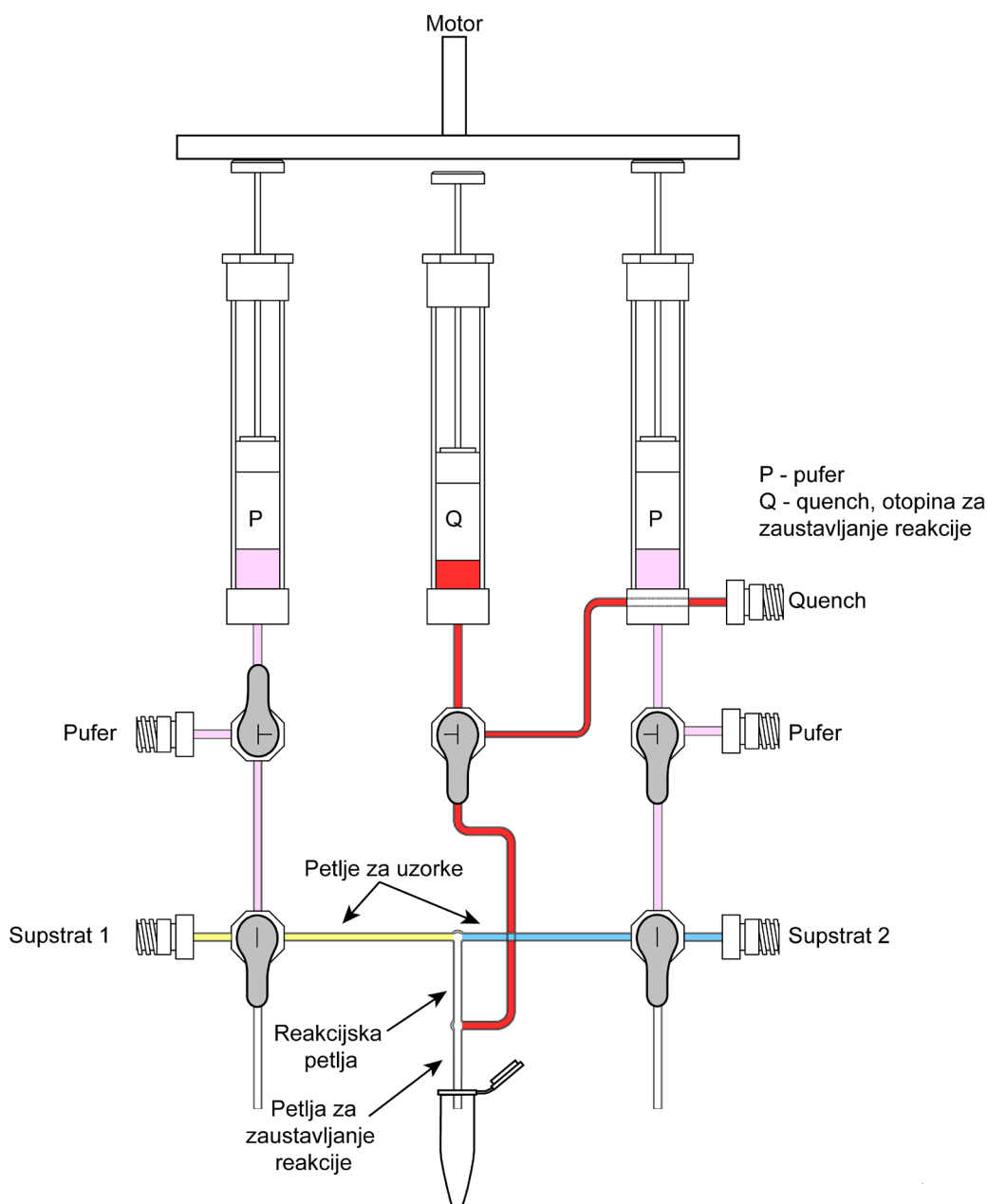
Alikvot zaustavljene reakcijske smjese volumena 1,5 μL pomiješa se s 3 μL otopine P1 nukleaze sastava: P1 nukleaza $> 0,01 \text{ U}/\mu\text{L}$, $c(\text{CH}_3\text{COONa}) = 300 \text{ mmol}/\text{dm}^3$ $\text{pH} = 5,0$ i $c(\text{ZnCl}_2) = 0,15 \text{ mmol}/\text{dm}^3$. Smjesa se inkubira 30-60 min pri sobnoj temperaturi. Alikvot 1-3 μL tretirane smjese nanese se na polietileniminske pločice za tankoslojnu kromatografiju. Kromatografija se odvija u puferu sastava $c(\text{CH}_3\text{COONH}_4) = 100 \text{ mmol}/\text{dm}^3$ i $\varphi(\text{CH}_3\text{COOH}) = 5 \%$. Daljnji postupak dobivanja i obrade rezultata analogan je postupku za reakciju aktivacije. Opisani postupak dobivanja rezultata vrijedi i u narednim metodama koje se oslanjaju na korištenje $[^{32}\text{P}]\text{-tRNA}^{\text{aa}}$ kao biljega. Opaženi koeficijenti brzine reakcije računaju se iz jednadžbe $k_{\text{obs}} = \frac{v_0}{[E]_0}$ gdje je v_0 izmjerena brzina reakcije, a $[E]_0$ koncentracija dodanog enzima u reakcijsku smjesu.

3.2.4.3. Prijenos aminokiseline na tRNA u uvjetima jednog obrtaja enzima

Standardno mjerenje brzine enzimski katalizirane reakcije odvija se u uvjetima ustaljenog stanja. U tim uvjetima koncentracija kompleksa enzim-supstrat je konstantna, a dobiveni koeficijenti predstavljaju složenu funkciju koeficijenata brzine svih pojedinih koraka reakcije. U najjednostavnijem modelu dva najvažnija koraka su sama kemijska reakcija te disocijacija produkta, odnosno regeneracija enzima za sljedeći krug enzimske reakcije/obrtaj. Ako je korak disocijacije produkta sporiji od same kemijske reakcije, opaženi koeficijent brzine u većoj mjeri odražavat će brzinu disocijacije nego brzinu kemijske reakcije. Tome se može doskočiti na način da se reakcija prati u uvjetima jednog kruga (engl. *single turnover*). Dakle, ako se u reakcijskoj smjesi nalazi znatno više enzima nego supstrata tada se prati samo jedan enzimski obrtaj. Time je eliminiran korak regeneracije enzima za sljedeći krug te se osigurava mjerenje isključivo koeficijenta brzine nastajanja produkta u aktivnom mjestu enzima. Valja naglasiti kako i vezanje supstrata na enzim može biti ograničavajući korak reakcije. No, upotrebom dovoljno visokih koncentracija enzima i supstrata ovaj problem se eliminira pa se kao rezultat eksperimenta dobiva koeficijent brzine koji odgovara kemijskoj reakciji, u ovom slučaju prijenosu aminokiseline na tRNA.

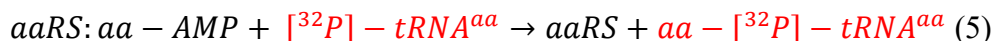
Reakcije mjerene u uvjetima jednog kruga uglavnom su jako brze ($t_{1/2} < 0,5 \text{ s}$) pa je za njihovo praćenje potrebno koristiti uređaj za brzo miješanje i zaustavljanje reakcije (engl. *rapid chemical quench*) RQF-3 (KinTek Corp.). Shema uređaja prikazana je na slici 3.6. Temeljni način rada uređaja može se svesti na dva koraka. U prvom koraku, platforma pogonjena motorom potiskuje šprice u kojima je pohranjen pufer (slika 3.6, rozo). Pufer potiskuje uzorke

(slika 3.6, žuto i plavo) iz petlji za uzorke u reakcijsku petlju u kojoj dolazi do kemijske reakcije. U drugom koraku motora platforma potiskuje šprice s puferima i otopinom za zaustavljanje reakcije (slika 3.6, crveno). Posljedično dolazi do miješanja reakcijske smjese i otopine za zaustavljanje reakcije u petlji za zaustavljanje reakcije. Na taj način reakcije se zaustavljaju nakon točno određenog vremena. Uzorci se sakupe i analiziraju kao što je prethodno opisano za reakciju aminoaciliranja. Mrtvo vrijeme uređaja iznosi 2,5 ms što omogućava praćenje reakcija i $k > 200 \text{ s}^{-1}$.



Slika 3.6. Shema uređaja za brzo miješanje i zaustavljanje reakcije RQF-3. Preuzeto i prilagođeno prema [157].

Kako bi se pratio izolirani korak prijenosa aminokiseline na tRNA potrebno je prirediti eksperimentalni postav u kojem se miješa prethodno formirani nekovalentni kompleks aaRS:aa-AMP s tRNA^{aa} (reakcija 5).



Za miješanje jednakih volumena predformiranog kompleksa IleRS:aa-AMP i tRNA^{Ile} korišten je uređaj RQF-3. Kompleks je priređen inkubacijom aminokiseline i enzima 5 min pri 37 °C u reakcijskom puferu sastava: c (Hepes) = 50 mmol/dm³, c (MgCl₂) = 10 mmol/dm³, c (NH₄Cl) = 150 mmol/dm³, c (ATP) = 10 mmol/dm³, γ (BSA) = 0,01 mg/mL i TIPP 0,008 U/ μ L. U puferu istog sastava pripremljen je i dio reakcijske smjese s tRNA^{Ile}. Finalne koncentracije nakon miješanja bile su c (IleRS) = 10 μ mol/dm³ i c (tRNA^{Ile}) = 1 μ mol/dm³. Aminokiseline su dodavane u velikom suvišku: c (Ile) = 2 mmol/dm³, c (Val/Nva) = 30 mmol/dm³ i c ((F_n)Abu) = 100 mmol/dm³. Kao što je prethodno opisano, reakcijske smjese zaustavljane su u određenim vremenskim točkama miješanjem s otopinom za zaustavljanje reakcije (c (CH₃COONa) = 3 mol/dm³ pH = 4,5) do konačne koncentracije 2 mol/dm³. Zaustavljene reakcijske smjese sakupljane su u Eppendorf epruvete u kojima su pomiješane sa SDS-om do konačne koncentracije γ (SDS) = 1 mg/mL. Reakcijske smjese tretirane su kao što je opisano za reakciju aminoaciliranja: alikvot zaustavljene reakcijske smjese pomiješan je s P1, nakon razgradnje smjesa je nanosena na TLC pločice koje su razvijene te izložene na ploče s uskladištenim fosforom koja je nakon izlaganja kvantificirana. Iz dobivene ovisnosti udjela aa-tRNA^{Ile} u ukupnoj tRNA^{Ile} o vremenu određen je koeficijent brzine reakcije prvog reda koji predstavlja prijenos aminokiseline na tRNA, k_{trans} . Podaci se najbolje utočnjavaju nelinearnom regresijom na monoeksponencijalnu krivulju prema jednadžbi $y = Y_0 + A \times (1 - e^{k_{trans} \times t})$; y predstavlja udio aminoacilirane tRNA, Y_0 odsječak na y-osi, A amplitudu aminoacilirane tRNA, a t vrijeme.

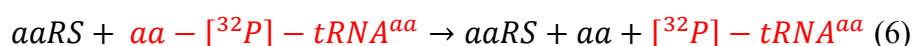
3.2.4.4. Priprema misaminoaciliranih tRNA^{Ile} za reakciju hidrolize

Kako bi se pripravile misaminoacilirane tRNA molekula koje se koriste kao supstrati u reakciji hidrolize (vidi kasnije) korištena je modificirana metoda aminoaciliranja uz [³²P]-tRNA^{Ile}. Korišten je standardni reakcijski pufer, mutant IleRS s ugašenim popravkom pogreške nakon prijenosa T243R/D342A (izuzev u slučaju priređivanja pripadnog para Ile-tRNA^{Ile} kada je korišten WT IleRS) u množinskoj koncentraciji 5 μ mol/dm³, tRNA^{Ile} 20 μ mol/dm³

(suplementirana s $[^{32}\text{P}]\text{-tRNA}^{\text{Ile}}$ do maksimalno polovine ukupnog volumena reakcijske smjese), dok su aminokiseline korištene u koncentracijama: Ile 1 mmol/dm³, Val, Nva, Met, Nle i Thr 2 mmol/dm³, Leu 0,2 mmol/dm³, Ala, Abu i Ser 10 mmol/dm³ te F₂Abu i F₃Abu 20 mmol/dm³. Reakcija se odvijala 20 min nakon čega je suplementirana sa 100 mmol/dm³ natrijevog acetata pH 4,5 radi stabilizacije esterske veze, a misaminoacilirana tRNA je pročišćena postupkom uz fenol-kloroform kao što je opisano u poglavlju 3.2.1.9. Misacilirane tRNA^{Ile} nužno je renaturirati prije korištenja u kinetičkim eksperimentima. Misacilirane tRNA^{Ile} su renaturirane zagrijavanjem 3 min na 85 °C, nakon čega slijedi dodatak jednakog volumena magnezijevog klorida ($c = 20 \text{ mmol/dm}^3$) zagrijanog na 85 °C te sporo hlađenje u ugašenom termobloku do sobne temperature. U slučaju F₂Abu-tRNA^{Ile} hlađenje se odvijalo na ledu jer je primijećeno kako prilikom sporog hlađenja dolazi do spontane neenzimske hidrolize esterske veze između aminokiseline i tRNA^{Ile}.

3.2.4.5. Reakcija hidrolize (mis)aminoacilirane tRNA u uvjetima jednog obrtaja

Analogno reakciji prijenosa aminokiseline na tRNA, praćenje reakcije deacilacije aa-tRNA^{aa} (reakcija 6) u uvjetima jednog kruga omogućava određivanje brzine hidrolize esterske veze između aminokiseline i tRNA^{aa}. S obzirom na to da je u ovom slučaju potrebno pomiješati aaRS s predformiranom aa-tRNA^{aa} ono što se ustvari mjeri jest brzina popravka pogreške poslije prijenosa *in trans*.



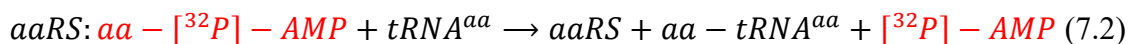
Priprema aa-tRNA^{aa} opisana je u poglavlju 3.2.4.4. Kako se radi o uvjetima jednog kruga, korištena koncentracija enzima bila je barem 10 puta veća od koncentracije aa-tRNA^{aa}. Kao i u slučaju reakcije prijenosa, većinom se radi o brzim reakcijama koje je potrebno pratiti uz uređaj za brzo miješanje i zaustavljanje reakcije. U slučaju reakcija čiji je koeficijent brzine $k_{\text{deacyl}} < 0,1 \text{ s}^{-1}$ eksperimenti su izvođeni ručno.

Reakcija deacilacije/hidrolize praćena je tako da su na RQF-3 uređaju pomiješani jednaki volumeni 20 μmol/dm³ enzima u puferu sastava: $c(\text{Hepes}) = 400 \text{ mmol/dm}^3$ pH = 7,5, $c(\text{MgCl}_2) = 40 \text{ mmol/dm}^3$, $c(\text{NH}_4\text{Cl}) = 150 \text{ mmol/dm}^3$, $c(\text{DTT}) = 10 \text{ mmol/dm}^3$, $\gamma(\text{BSA}) = 0,02 \text{ mg/mL}$ i renaturirane aa-tRNA^{aa} koncentracije 0,2-1 μmol/dm³ u otopini $c(\text{CH}_3\text{COONa}) = 10 \text{ mmol/dm}^3$ pH = 4,5. Finalni pH reakcijske smjese bio je cca 7,5. Reakcija je praćena pri 37 °C. S obzirom na to da je teorijska pozadina i tehnička izvedba ove metode

gotovo identična onoj za prijenos aminokiseline na tRNA, izvođenje eksperimenata, zaustavljanje reakcije i daljnji tretman reakcijske smjese odvijao se kao što je opisano u 3.2.4.3. Iz dobivene ovisnosti udjela aa-tRNA^{aa} u ukupnoj tRNA^{aa} o vremenu određen je koeficijent brzine hidrolize aminoacilirane tRNA, k_{deacyl} . Podaci se najbolje utočnjavaju nelinearnom regresijom na monoeksponecijalnu krivulju prema jednadžbi $y = Y_0 + A \times e^{-k_{deacyl} \times t}$; y predstavlja udio aminoacilirane tRNA, Y_0 odsječak na y-osi, A amplitudu aminoacilirane tRNA, a t vrijeme.

3.2.4.6. Paralelno praćenje nastanka AMP-a i (mis)aminoacilirane tRNA

Povećani utrošak ATP-a, odnosno nestehiometrijski utrošak u odnosu na reakciju aminoaciliranja, kod aaRS je indikacija aktivnih mehanizama popravka pogreške prije i/ili poslije prijenosa aminokiseline na tRNA. Utrošak ATP-a moguće je pratiti korištenjem radioaktivnog [³²P]-ATP-a. Ako se u reakcijsku smjesu doda [³²P]-ATP, moguće je pratiti brzinu njegove potrošnje te brzine nastajanja [³²P]-aa-AMP i [³²P]-AMP (reakcije 7.1 i 7.2). [³²P]-aa-AMP je rezultat aktivacije aminokiseline, dok [³²P]-AMP nastaje uslijed prijenosa aktivirane aminokiseline na tRNA^{aa} ili uslijed popravka pogreške prije prijenosa (hidroliza aa-AMP).



Kada je aktivnost mehanizama popravka pogreške niska tada je stehiometrijski omjer nastalih [³²P]-AMP i aa-tRNA^{aa} približno jednak 1. U suprotnom, primjećuje se omjer nastalih [³²P]-AMP i aa-tRNA^{aa} veći od 1. Što su popravci pogreške aktivniji to je taj omjer veći. Drugim riječima, da bi se sintetizirala ista količina aa-tRNA^{aa} mora se odviti puno više reakcijskih ciklusa, odnosno dolazi do odvijanja suvišnih ciklusa u kojima se troši ATP-a, ali nema akumulacije aa-tRNA^{aa}. Ako se ova reakcija odvija uz dodatak tRNA^{aa} tada se prati ukupni popravak pogreške. Ako se reakcija odvija bez dodatka tRNA^{aa} tada se prati samo tRNA-neovisni popravak pogreške prije prijenosa aminokiseline.

Ako se u dvije reakcijske smjese istog sastava koriste različite radioaktivne oznake, [³²P]-ATP u jednoj i [³²P]-tRNA^{aa} u drugoj, moguće je paralelno praćenje utroška ATP-a i nastanka aa-tRNA^{aa}. Paralelno praćenje ovih reakcija daje bolji uvid u aktivnost mehanizama popravka pogreške. Nadalje, ako se u reakcijsku smjesu dodaje i elongacijski faktor Tu

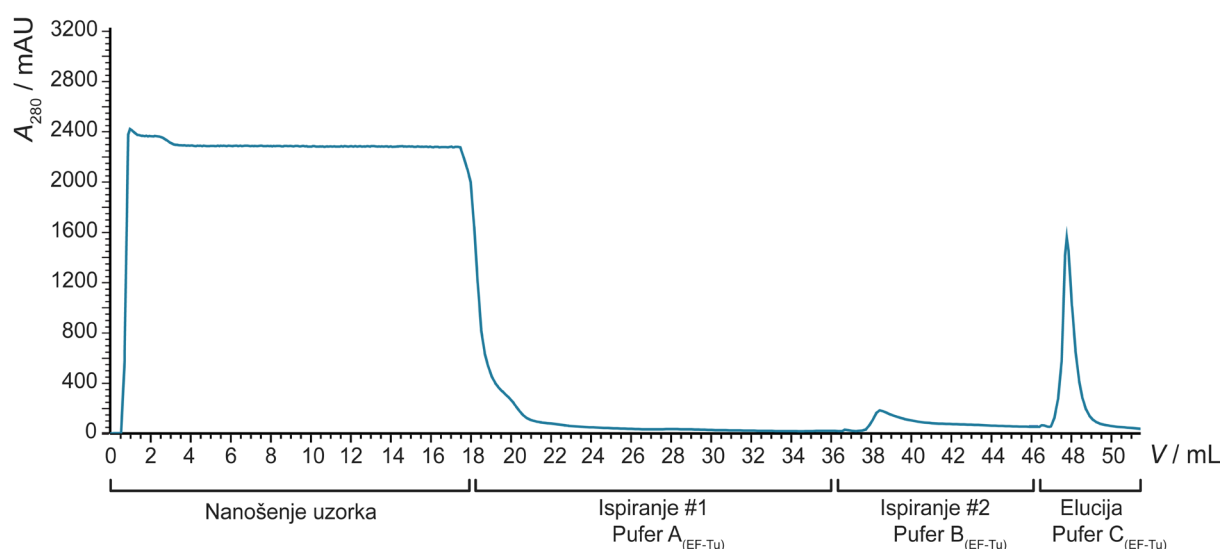
(EF-Tu), protein koji veže aa-tRNA^{aa}, moguće je odrediti odvija li se popravak pogreške poslije prijenosa *in cis* ili *in trans* (detaljnije opisano u Rezultatima).

Reakcije su se odvijale pri 37 °C u puferu sastava: c (Hepes) = 50 mmol/dm³ pH = 7,5, c (MgCl₂) = 20 mmol/dm³, c (DTT) = 2 mmol/dm³, γ (BSA) = 0,1 mg/mL i 0,004 U/ μ L TIPP. Koncentracija enzima iznosila je (IleRS, ValRS i LeuRS) 2 μ mol/dm³, tRNA^{aa} 10-15 μ mol/dm³, [³²P]-ATP 1 mmol/dm³ (0,01-0,1 mCi/mL), a aminokiselina u slučaju Ile 2 mmol/dm³, Val 20 mmol/dm³ te Nva/Thr 30 mmol/dm³. U reakcijama u kojima je korišten EF-Tu koncentracija aktivnog EF-Tu bila je 8-12 μ mol/dm³. Reakcija je zaustavljena miješanjem 1,5 μ L alikvota reakcijske smjese s 3 μ L otopine za zaustavljanje reakcije (c (CH₃COONa) = 600 mmol/dm³ pH = 4,5, γ (SDS) = 1,5 mg/mL). Razdvajanje [³²P]-ATP, [³²P]-AMP i aa-[³²P]-AMP postiže se tankoslojnom kromatografijom na polietilenimskim pločicama u puferu sastava c (CH₃COONH₄) = 100 mmol/dm³ i φ (CH₃COOH) = 5 %. Reakcijske smjese s [³²P]-ATP direktno su nanošene na TLC pločice, a smjese s [³²P]-tRNA^{aa} tretirane su kao što je opisano za reakciju aminoaciliranja. Pločice su izložene, snimane, a rezultati obrađeni prema standardnom postupku.

§ 4. REZULTATI

4.1. Proizvodnja i pročišćavanje proteina

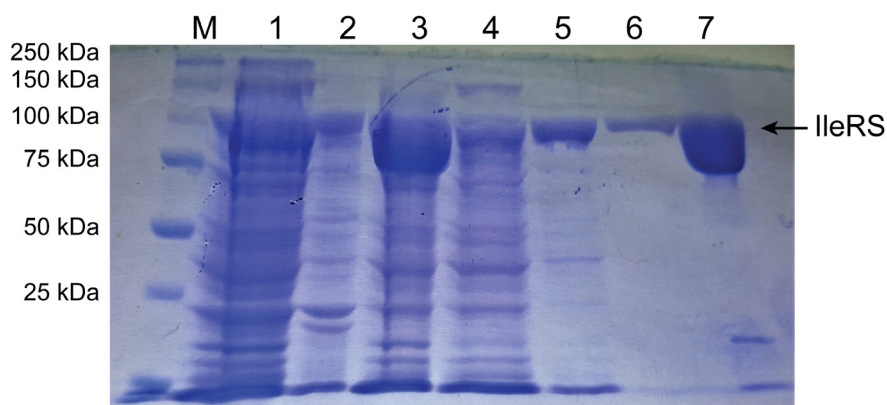
U poglavlju 3.2.2.1. detaljno je opisan postupak prekomjerne ekspresije rekombinantnih proteina. Ukratko, proteini su proizvedeni pomoću pET sustava uz ekspresiju potaknutu IPTG-om ($c = 0,25 \text{ mmol/dm}^3$ za aaRS i $c = 0,2 \text{ mmol/dm}^3$ za EF-Tu) u bakterijskom soju *E. coli* BL21(DE3). Prekomjerna ekspresija odvijala se 2-3 h u slučaju aaRS i 4 h u slučaju EF-Tu pri 37°C . U poglavlju 3.2.2.3. opisan je postupak pročišćavanja proteina afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA kolonama. Tijek pročišćavanja na Akta Pure uređaju prikazan je kromatogramom na slici 4.1.



Slika 4.1. Kromatogram pročišćavanja EF-Tu afinitetnom kromatografijom prema metodi opisanoj u tablici 3.4. Na slici su naznačene pojedine faze pročišćavanja proteina.

Tijekom faze nanošenja uzorka opaža se široka vrhova izrazito velike apsorbancije. Ona odgovara nevezanim staničnim proteinima u proteinskom ekstraktu. U fazi ispiranja puferom A ($c(\text{imidazol}) = 10 \text{ mmol/dm}^3$) ne opaža se povećanje apsorbancije što sugerira jedno od sljedećeg: i) nema nespecifično vezanih proteina na kolonu, ii) njihova koncentracija je ispod granica detekcije ili iii) korištena koncentracija imidazola nije dostatna za ispiranje nespecifično vezanih proteina. Uz pufer B ($c(\text{imidazol}) = 20 \text{ mmol/dm}^3$) uočljiva je mala vrhova koja sugerira da dolazi do: i) elucije nespecifično vezanih proteina, ii) elucije određene količine proteina od interesa ili iii) kombinacije prvog i drugog. Tijekom elucije uz mobilnu fazu

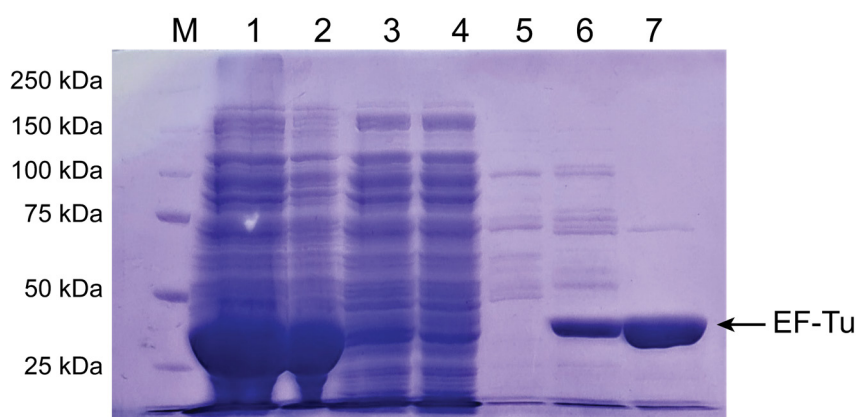
C ($c(\text{imidazol}) = 200 \text{ mmol/dm}^3$) opaža se vrpca koja sugerira da postoji velika količina proteina koja se pritom eluira. S obzirom na to da svi proteini apsorbiraju pri 280 nm, iz kromatograma nije moguće odrediti njihovu čistoću, odnosno homogenost sakupljene frakcije. Čistoća je provjerena SDS gel-elektroforezom, a rezultatni gel u slučaju pročišćavanja WT IleRS prikazan je na slici 4.2.



Slika 4.2. Gel dobiven SDS-PAGE metodom za analizu uspješnosti pročišćavanja WT IleRS. U jažicama se redom nalaze: M – marker, 1 – suspenzija stanica nakon soniciranja, 2 – talog netopljivih staničnih komponenti, 3 – proteinski ekstrakt, 4 – nevezana frakcija, 5 – ispiranje puferom A, 6 – ispiranje puferom B, 7 – eluirani protein.

Iz gela je moguće vidjeti kako vrlo mala količina proteina zaostaje u talogu (jažica 2) uslijed sonikacije, dok se većina nalazi u topljivom proteinskom ekstraktu (jažica 3). To sugerira kako prilikom prekomjerne ekspresije ne dolazi do stvaranja inkluzijskih tijela i da je sonikacija uspješno provedena. U jažici 4 vidi se velik broj vrpca, a one predstavljaju nevezane stanične proteine. U jažicama 5 i 6 vidi se relativno mala vrpca koja sugerira da je mala količina ciljanog proteina eluirana s povišenjem koncentracije imidazola u mobilnoj fazi te da je vrlo mali broj proteina koji su nespecifično vezani na kolonu. U posljednjoj jažici vidljiva je velika vrpca (pri cca. 100 kDa) koja predstavlja WT IleRS u ovom, odnosno aaRS od interesa u ostalim slučajevima. Izostanak ostalih vrpca (izuzev vrlo male pri dnu gela) sugerira da je eluirani protein vrlo čist. Pročišćavanje svih aaRS i njihovih mutanata bilo je jednako uspješno, a prinos je iznosio oko 30 mg/L uzgojene bakterijske kulture.

Pročišćavanje EF-Tu bilo je manje uspješno, a rezultat SDS gel-elektroforeze prikazan je na slici 4.3.

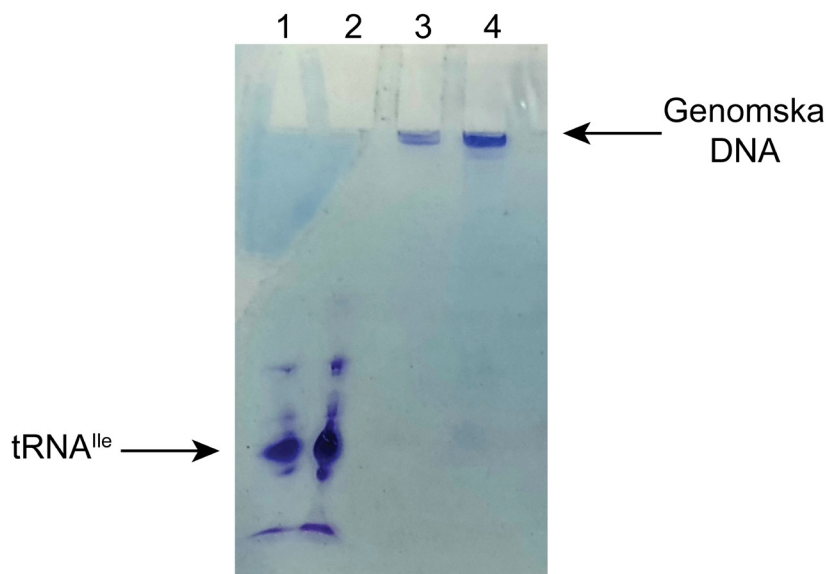


Slika 4.3. Gel dobiven SDS-PAGE metodom za analizu uspješnosti pročišćavanja EF-Tu. U jažicama se redom nalaze: M – marker, 1 – suspenzija stanica nakon soniciranja, 2 – talog netopljivih staničnih komponenti, 3 – proteinski ekstrakt, 4 – nevezana frakcija, 5 – ispiranje puferom A, 6 – ispiranje puferom B, 7 – eluirani protein.

Tijekom ekspresije EF-Tu velika količina proteina zaostaje u talogu (jažica 2) što je posljedica ili neuspješnog soniciranja ili stvaranja inkluzijskih tijela tijekom prekomjerne ekspresije EF-Tu. S obzirom na to da optimizacija sonikacije nije polučila bolje rezultate, vjerojatnije je kako uzrok leži u potonjem razlogu. Kao i kod pročišćavanja aaRS, u jažici 4 vidljiv je velik broj vrpce koje predstavljaju ostale stanične proteine. Ispiranje mobilnom fazom A (jažica 5) eluira mali broj nespecifično vezanih proteina. Isto vrijedi i za ispiranje mobilnom fazom B (jažica 6) uz razliku da se već pri toj koncentraciji imidazola eluira određena količina EF-Tu (vrpca pri dnu gela). U konačnici, elucijom uz mobilnu fazu C izlazi jako čist EF-Tu (jažica 7). Unatoč tome što velika količina EF-Tu zaostaje u talogu, pročišćavanjem je generirana dostatna količina proteina zadovoljavajuće čistoće pa postupak nije dodatno modificiran.

4.2. Proizvodnja i pročišćavanje tRNA^{aa}

Detaljan postupak proizvodnje i pročišćavanja tRNA opisan je u poglavlju 3.2.1.5. Kao i proteini, tRNA su prekomjerno eksprimirane pomoću pET sustava u bakterijskom soju *E. coli* BL21(DE3) te izolirane i pročišćene standardnom metodom za izolaciju nukleinskih kiselina ekstrakcijom s fenol-kloroformom. Nukleinske kiseline velikih molekulskih masa (prvenstveno genomska DNA) uklonjene su taloženjem uz PEG₈₀₀₀. Uspješnost pročišćavanja provjerena je denaturirajućom gel elektroforezom uz dodatak ureje (slika 4.4).

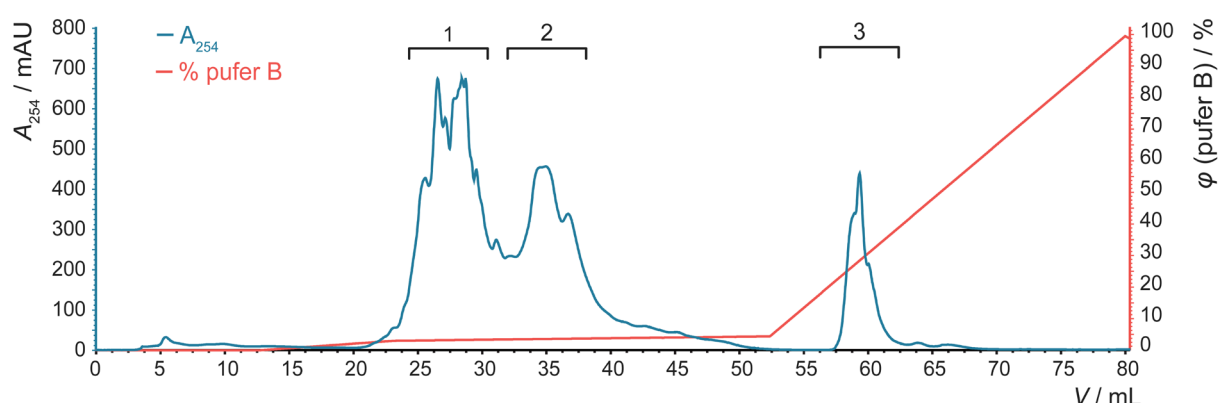


Slika 4.4. Urea-PAGE gel za provjeru uspješnosti izolacije prekomjerno eksprimirane $tRNA^{Ile}$. Jažice 1 i 2 sadrže supernatant dobiven nakon taloženja uz PEG_{8000} . Jažice 3 i 4 sadrže talog dobiven nakon taloženja uz PEG_{8000} . U jažicama 2 i 4 nalazi se dvostruko više uzorka nego u jažicama 1 i 3.

U jažicama 1 i 2 dominira jedna vrpca koja predstavlja prekomjerno eksprimiranu $tRNA^{aa}$ od interesa dok ostale vrpce uglavnom predstavljaju ostale stanične tRNA. Pročišćene tRNA podvrgnute su deacilaciji i dijalizi. U jažicama 3 i 4 nalazi se talog uslijed taloženja uz PEG_{8000} . Opaža se jedino vrpca na dnu jažice (na vrhu gela) koja predstavlja genomsku DNA koja je prevelika da uđe u pore gela. Izostanak drugih vrpca sugerira kako nisu istaložene nukleinske kiseline malih masa (u koje se svrstava i tRNA).

Kako bi se provjerila homogenost i funkcionalnost pročišćenih tRNA, smjesama je određena tzv. akceptorska aktivnost. Akceptorska aktivnost predstavlja udio $tRNA^{aa}$ od interesa koja može biti aminoacilirana u ukupnoj smjesi nukleinskih kiselina. Postupak određivanja akceptorske aktivnosti opisan je u poglavlju 3.2.4.2.1., a svodi se na aminoaciliranje $tRNA^{aa}$ uz pripadnu aaRS i $[^{14}C]$ -aminokiselinu. AaRS može aminoacilirati samo pripadnu joj $tRNA^{aa}$. Kao rezultat eksperimenta dobiva se koncentracija $[^{14}C]$ -aminoacilirane $tRNA^{aa}$. Udio $[^{14}C]$ -aminoacilirane $tRNA^{aa}$ u ukupnoj koncentraciji nukleinskih kiselina dodanih u reakcijsku smjesu je akceptorska aktivnost, odnosno udio aktivne $tRNA^{aa}$ od interesa. U slučaju $tRNA^{Val}$ i $tRNA^{Leu}$ akceptorska aktivnost iznosila je $> 90 \%$, dok je u slučaju $tRNA^{Ile}$ bila oko 50% . Mala akceptorska aktivnost $tRNA^{Ile}$ posljedica je činjenice da je ona potpuno funkcionalna tek uslijed odgovarajućih posttranskripcijskih modifikacija u bakteriji *E. coli*. Pretpostavlja se da tijekom prekomjerne ekspresije $tRNA^{Ile}$, stanična mašinerija ne može modificirati svu $tRNA^{Ile}$

pa je potreban dodatni korak odvajanja vjerojatno nemodificirane/hipomodificirane od potpuno modificirane tRNA^{Ile}. Dodatno pročišćavanje vrši se kromatografijom obrnutih faza prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.1.8. Kromatogram pročišćavanja prikazan je na slici 4.5. Poznato je kako je samo frakcija 1 u potpunosti kinetički aktivna [158] pa je ona sakupljana i određena joj je akceptorska aktivnost koja je iznosila 80-90 %. Potencijalni uzrok cijepanja vrpce 1 može biti zastupljenost različitih konformacija tRNA^{Ile}. Vrpca 2 predstavlja vjerojatno nemodificiranu/hipomodificiranu tRNA^{Ile}, a vrpca 3 predstavlja razna onečišćenja uzorka koja se supročišćavaju zajedno s tRNA.



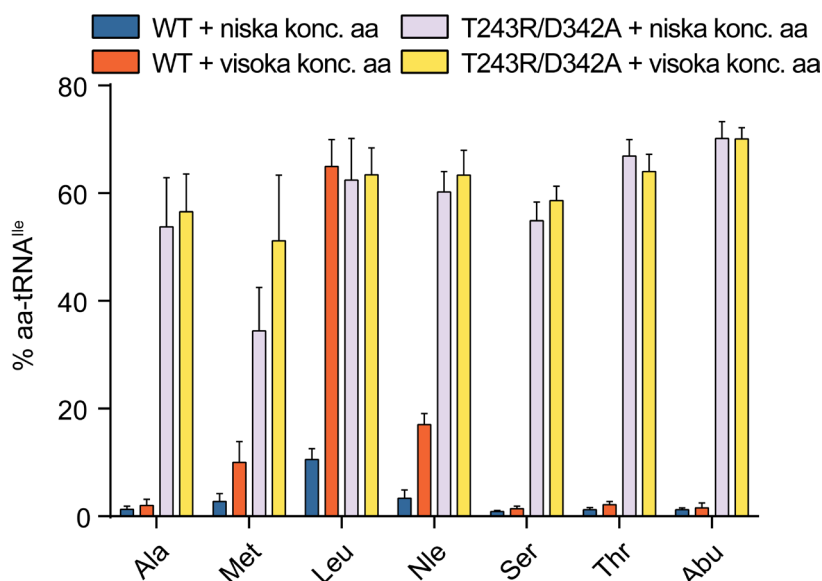
Slika 4.5. Preparativno pročišćavanje prekomjerno eksprimirane tRNA^{Ile} kromatografijom obrnutih faza prema metodi opisanoj u tablici 3.3.

4.3. Provjera čistoće komercijalnih uzoraka aminokiselina

U posebno dizajniranom eksperimentu, reakcijom misaminoaciliranja provjerena je čistoća komercijalnih uzoraka aminokiselina. U ovom eksperimentalnom postavu korišteni su WT IleRS i IleRS T243R/D342A u koncentraciji 1 $\mu\text{mol/dm}^3$, tRNA^{Ile} u koncentraciji 5 $\mu\text{mol/dm}^3$ i aminokiseline u dvjema različitim koncentracijama (razlika je iznosila 10 puta). Cilj eksperimenta bio je pratiti plato nastajanja misaminoacilirane tRNA^{Ile}. Visoka koncentracija IleRS i niska koncentracija tRNA^{Ile} (u odnosu na standardni eksperimentalni postav) omogućavaju jednostavniju detekciju platoa. Rezon je bio sljedeći, s obzirom na to da je pokazano kako WT IleRS ne akumulira aa-tRNA^{Ile} uz istraživane aminokiseline (izmjereno u uvjetima ustaljenog stanja, vidi kasnije), opažanje bilo kakvog platoa bi sugeriralo potencijalnu kontaminaciju nepripadne aminokiseline pripadnim izoleucinom. Da bi se provjerilo kako eventualno opaženi plato doista predstavlja kontaminaciju, odnosno Ile-tRNA^{Ile}, a ne akumulaciju misaminoacilirane tRNA^{Ile} uslijed osobitih eksperimentalnih uvjeta (visoka koncentracija enzima), misaminoaciliranje je provedeno uz dvije koncentracije nepripadne

aminokiseline. Dva su moguća ishoda. Prvo, ako uz WT IleRS nastaje misaminoacilirana tRNA^{Ile}, a razlika u platoima za dvije različite koncentracije aminokiseline ne odgovara omjeru tih koncentracija (nije 10 puta), vjerojatnije je kako nema kontaminacije. U drugom slučaju, omjer među platoima jednak je omjeru koncentracija dodanih aminokiselina (10 puta). Tada se može s većom vjerojatnošću pretpostaviti kako je nastala aa-tRNA^{Ile} ustvari Ile-tRNA^{Ile}. Zaključak proizlazi iz dvije pretpostavke. Prvo, povećanje koncentracije nepripadne aminokiseline deset puta ne bi smjelo uzrokovati istovrsno povećanje platoa jer se aminokiselina u nižoj koncentraciji već nalazi u znatnom suvišku u odnosu na tRNA^{Ile} i za očekivati je da se s nižom koncentracijom već ostvaruje maksimalna brzina misaminoaciliranja (iza koje slijedi popravak pogreške). Drugo, ako postoji kontaminacija u obliku izoleucina, onda se ona nalazi u stehiometrijski usporedivoj količini u odnosu na tRNA^{Ile} i može rezultirati opisanim povećanjem platoa. Mutant IleRS T243R/D342A korišten je kao svojevrsna kontrola u kojoj dolazi do nastajanja misaminoaciliranih tRNA^{Ile}.

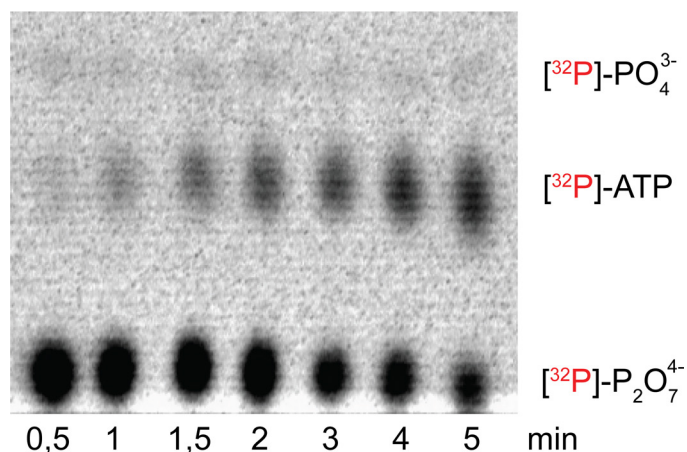
Rezultati su prikazani na slici 4.6. Prikazani stupići predstavljaju plato nastale aa-tRNA^{Ile}. U slučaju Abu, Ala, Ser i Thr količina aa-tRNA^{Ile} je vrlo mala i podjednaka je za obje koncentracije aminokiseline što sugerira da ovi uzorci nisu onečišćeni pripadnim Ile. U slučaju Met i Nle, razlika u količini nastale aa-tRNA^{Ile} je oko 3 puta što sugerira da se vjerojatno ne radi o kontaminaciji, već pri ovim uvjetima dolazi do akumulacije određene količine aa-tRNA^{Ile} uslijed vrlo visoke koncentracije enzima. No, radi predostrožnosti ove rezultate treba uzimati s dozom opreza. U konačnici, najveća razlika primjećuje se u slučaju Leu. Ona ovdje iznosi oko 5 puta, ali vjerojatno je i puno veća jer je uz višu koncentraciju Leu postignuta maksimalna moguća koncentracija aa-tRNA^{Ile} (podsjetnik - tRNA^{Ile} ne može se uvijek aminoacilirati do 100 %, što ovisi o čistoći tRNA, odnosno njenoj akceptorskoj aktivnosti te eksperimentalnim uvjetima). Iako plato nije 10 puta veći, na temelju rezultata ovih eksperimenata Leu je isključen iz analize reakcije aktivacije.



Slika 4.6. Plato nastale (mis)aminoacilirane-tRNA^{Ile} uz WT i T243R/D342A mutant IleRS te dvije različite koncentracije aminokiseline. Prikazane vrijednosti izražene su kao srednja vrijednost ± standardna pogreška dobivene iz najmanje tri neovisna eksperimenta.

4.4. IleRS uspješno diskriminira nepripadne aminokiseline u sintetskom mjestu

Praćenje reakcije aktivacije aminokiseline zasniva se na njenom sprezanju s povratnom reakcijom pirofosforolize. Kao što je opisano u poglavlju 3.2.4.1., u reakcijsku smjesu se osim enzima, aminokiseline i ATP-a, dodaje i pirofosfat (PP_i, P₂O₇³⁻) u velikom suvišku, suplementiran s radioaktivno obilježenim [³²P]-PP_i ([³²P]-P₂O₇³⁻). Nakon aktivacije, [³²P]-PP_i reagira s nastalim aa-AMP-om, a rezultat je radioaktivno obilježeni [³²P]-ATP i aminokiselina koja može ponovno biti aktivirana. S obzirom na to da je pirofosforoliza puno brža reakcija od aktivacije, mjerenjem brzine pirofosforolize ustvari se određuje brzina aktivacije. Vjerojatnost da [³²P]-ATP sudjeluje u reakciji aktivacije je zanemarivo mala jer je njegov udio u ukupnom ATP-u dodanom u reakcijsku smjeru izrazito malen. Supstrati i produkti odvajaju se tankoslojnom kromatografijom i vizualiziraju pomoću ploča s uskladištenim fosforom i laserskog skenera *Typhoon* (GE Healthcare). Kromatogram je kvantificiran u programu ImageQuant 8.1. Tipična TLC pločica prikazana je na slici 4.7.

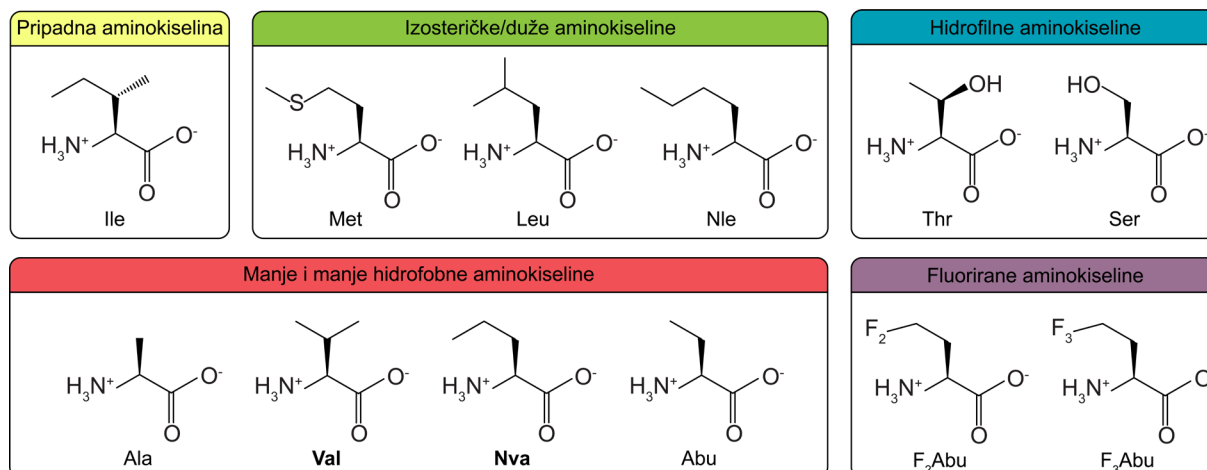


Slika 4.7. TLC kromatogram za reakciju aktivacije.

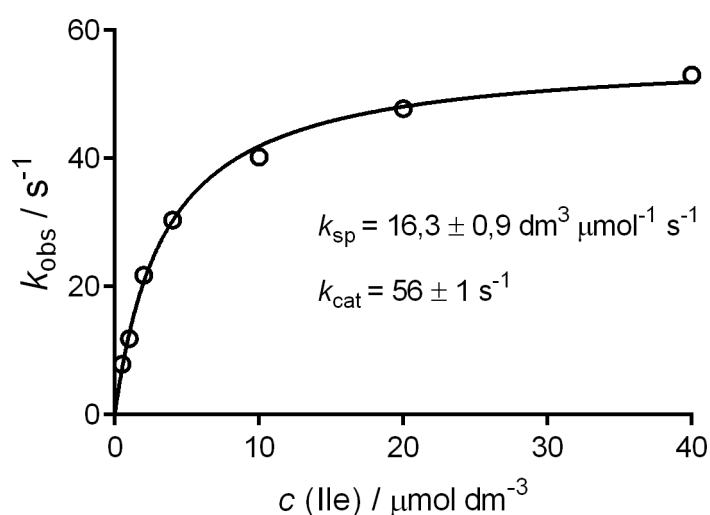
U svakoj vremenskoj točki nalaze se tri signala: $[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$, $[^{32}\text{P}]\text{-PP}_i$ i $[^{32}\text{P}]\text{-PO}_4^{3-}$. Brzina se računa kao promjena koncentracije $[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ u vremenu. Koncentracija $[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ se određuje iz udjela intenziteta signala $[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ u zbroju intenziteta signala $[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ i $[^{32}\text{P}]\text{-PP}_i$ te poznate koncentracije dodanog PP_i : $c([^{32}\text{P}]\text{-ATP}) = \frac{I([^{32}\text{P}]\text{-ATP})}{I([^{32}\text{P}]\text{-ATP}) + I([^{32}\text{P}]\text{-PP}_i)} \times c(\text{PP}_i)$. Radioaktivno obilježeni fosfat, $[^{32}\text{P}]\text{-PO}_4^{3-}$ nastaje vrlo sporo uslijed spontane hidrolize $[^{32}\text{P}]\text{-PP}_i$. S obzirom na to da se koncentracija $[^{32}\text{P}]\text{-PO}_4^{3-}$ ne mijenja u vremenu tijekom kojega se prati reakcija aktivacije, njega se zanemaruje.

Prethodna istraživanja pokazala su kako IleRS može aktivirati aminokiseline valin i norvalin [20]. Da bi se bolje istražili mehanizmi kojima se ostvaruje enzimska specifičnost prema aminokiselinskim supstratima u sintetskom mjestu, praćena je aktivacija cijelog niza neprikladnih aminokiselina različitih fizikalno-kemijskih svojstava (slika 4.8). Iz ovisnosti početne brzine reakcije, odnosno opaženog koeficijenta brzine reakcije o koncentraciji supstrata određeni su: obrtni broj – k_{cat} , konstanta specifičnosti – k_{sp} ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$) i Michaelisova konstanta – K_{M} za svaku aminokiselinu. Primjer Michaelis-Menteninog modela prikazan je na slici 4.9. Kao što je objašnjeno u poglavlju 3.2.4.1., radi veće točnosti određenih parametara (osobito konstante specifičnosti) korištena je modificirana Michealis-Menten jednačba –

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_{\text{sp}} \times c(\text{Met})}{1 + \frac{k_{\text{sp}} \times c(\text{Met})}{k_{\text{cat}}}}$$



Slika 4.8. Aminokiseline istražene u reakcijama izoleucil-tRNA-sintetaze podijeljene na temelju fizikalno-kemijskih svojstava u odnosu na Ile. Aminokiseline označene podebljanim slovima su prethodno djelomično okarakterizirane [20].



Slika 4.9. Aktivacija Ile uz WT IleRS. Krivulja je utočnjena prema modificiranoj Michaleis-

$$\text{Menten} \text{ jednadžbi } k_{\text{obs}} = \frac{k_{\text{sp}} \times c(\text{Met})}{1 + \frac{k_{\text{sp}} \times c(\text{Met})}{k_{\text{cat}}}}$$

Michaelis-Menten parametri za analizirane aminokiseline prikazani su u tablici 4.1. Također, u tablici je prikazan i diskriminacijski faktor. Diskriminacijski faktor govori koliko puta je neka nepripadna aminokiselina lošiji supstrat od pripadne, u ovom slučaju Ile, a računa se kao

$$D = \frac{k_{\text{sp}, \text{pripadna aminokiselina}}}{k_{\text{sp}, \text{nepripadna aminokiselina}}}$$

Tablica 4.1. Kinetički parametri za aktivaciju aminokiselina uz WT IleRS.

Aminokiselina	$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	$k_{\text{sp}} / \text{dm}^3 \text{mmol}^{-1} \text{s}^{-1}$	$K_{\text{m}} / \text{mmol dm}^{-3}$	D
Ile	$56,7 \pm 0,3$	$(16,6 \pm 0,4) \times 10^3$	$(3,41 \pm 0,06) \times 10^{-3}$	1
Val ^a	36 ± 6	77	$0,47 \pm 0,03$	156
Nva ^b	41 ± 1	50	$0,82 \pm 0,07$	239
Abu	23 ± 3	$1,6 \pm 1$	15 ± 1	10 375
F ₂ Abu	$6,9 \pm 0,7$	$0,45 \pm 0,8$	16 ± 2	36 888
F ₃ Abu	$5,3 \pm 0,8$	$0,19 \pm 0,02$	28 ± 2	87 368
Ala	10 ± 1	$0,10 \pm 0,02$	100 ± 9	166 000
Ser ^c	N.O.	$0,016 \pm 0,005$	N.O.	1 037 500
Thr	32 ± 2	$0,82 \pm 0,04$	39 ± 2	20 243
Met	$10,6 \pm 0,4$	$7,6 \pm 0,7$	$1,4 \pm 0,1$	2184
Nle	$4,8 \pm 0,4$	$1,6 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,6$	10 375
Leu	$28,7 \pm 0,7$	26 ± 3	$1,1 \pm 0,1$	N.O. ^d

Prikazane vrijednosti izražene su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška dobivene iz najmanje tri neovisna eksperimenta.

^aPodaci preuzeti iz [11]. Konstanta specifičnosti prikazana je bez standardne pogreške zbog drugačije metode određivanja.

^bPodaci preuzeti iz [20]. Konstanta specifičnosti prikazana je bez standardne pogreške zbog drugačije metode određivanja.

^cIzračunato kao nagib pravca – $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ uslijed vrlo niske aktivnosti.

^dNije određeno zbog vjerojatne kontaminacije pripadnim izoleucinom (vidi kasnije). Procijenjena vrijednost > 640 .

Analizirane aminokiseline mogu se podijeliti u četiri skupine na temelju njihovih fizikalno-kemijskih svojstava: i) veličinom manje i manje hidrofobne aminokiseline (Val, Nva, Abu i Ala), ii) izosteričke/duže aminokiseline (Leu, Nle i Met), iii) hidrofilne aminokiseline (Thr i Ser) i iv) fluorirane aminokiseline (F₂Abu i F₃Abu). Iz skupine manjih aminokiselina, Val i Nva analizirani su u prethodnim istraživanjima te je pokazano kako je Val diskriminiran faktorom 156, a Nva 239 [11,20]. Zbog tako niskog diskriminacijskog faktora Val i Nva su najveća prijetnja točnosti IleRS (podsjetnik: ako je diskriminacijski faktor manji od 3300 smatra se da aminokiselina stvara prijetnju točnosti ukupnom procesu translacije). Strukturno gledano radi se o izomerima, pri čemu je Val razgranata, a Nva linearna aminokiselina, a od Ile su manje za jednu metilensku/metilnu skupinu. Iz toga slijedi da gubitak interakcija između aminokiselina i aktivnog mjesta uslijed gubitka jedne metilenske/metilne skupine doprinosi diskriminaciji supstrata faktorom od otprilike 200. U sklopu ovog rada postavljeno je pitanje

koliko gubitak sljedećih metilenskih/metilnih skupina doprinosi faktoru diskriminacije? Stoga su okarakterizirani Abu i Ala. Abu je prirodna neproteinogena aminokiselina koja je za jednu metilnu skupinu manja od Val/Nva. Ala je pak za jednu metilnu skupinu manji od Abu. Vrijedi spomenuti i kako sve četiri aminokiseline (Val, Nva, Abu i Ala) spadaju među najzastupljenije aminokiseline u Weber-Millerovim pokusima s električnim izbojem, odnosno među one koje su pronađene na Murchisonovom meteoritu [21]. Ta istraživanja ukazuju na to kako su ove aminokiseline vrlo vjerojatno bile prisutne tijekom cijelog procesa evolucije života, a samim time i tijekom evolucije IleRS. Time je, osim zbog fizikalno-kemijske sličnosti izoleucinu, njihovo istraživanje zanimljivo jer su u nekom trenutku evolucije mogle predstavljati prijetnju točnosti IleRS ili čak potencijalne supstrate u fazi statističke translacije. Diskriminacijski faktor za Abu iznosi 10 375, dok za Ala iznosi 166 000. Dakle, gubitak druge metilne skupine u slučaju Abu (u odnosu na Ile) ne doprinosi diskriminaciji faktorom od 156 do 239 (*D* za Val i Nva) već s faktorom od 66, odnosno 43 (doprinos određen kao omjer diskriminacijskog faktora Abu i diskriminacijskog faktora Nva ili Val). Gubitak treće metilne skupine u slučaju Ala doprinosi diskriminaciji faktorom 16. Ergo, doprinos diskriminaciji najveći je u slučaju prve metilne skupine (cca. 200), a zatim se smanjuje s gubitkom sljedećih metilnih skupina (cca. 50 za drugu, odnosno 16 za treću). U rezultatima nije prikazana aminokiselina Gly, koja nema metilnih skupina na bočnom ogranku i samim time ne može ostvarivati hidrofobne interakcije u sintetskom mjestu IleRS. Razlog tome jest činjenica da s Gly nije bilo moguće detektirati enzimsku aktivnost, što sugerira da i posljednja metilna skupina i dalje nekako doprinosi prepoznavanju aminokiselina, ali je vrlo teško odrediti njen doprinos. Nadalje, valja obratiti pozornost na to kako u slučaju svih manjih aminokiselina većinski doprinos diskriminaciji potječe iz povećanja K_M i seže do gotovo 30 000 u slučaju Ala. S druge strane, maksimalni doprinos kroz k_{cat} iznosi svega 5,7 puta (u slučaju Ala) dok je u slučaju Nva gotovo nepromijenjen (smanjenje 1,4 puta). Efekti na K_M i k_{cat} sugeriraju kako hidrofobne interakcije (ostvarene između alifatskog bočnog ogranka i bočnih ogranaka sintetskog mjesta) gotovo da i ne doprinose pravilnom pozicioniranju supstrata u aktivno mjesto, već isključivo služe prepoznavanju pripadnog supstrata s dovoljno visokom specifičnošću.

Sljedeća analizirana skupina obuhvaća izosteričke i/ili dulje aminokiseline, Leu, Nle i Met. Iako izmjereni kinetički parametri sugeriraju kako je Leu diskriminiran faktorom oko 640, to vjerojatno nije točno. Naime, dodatna istraživanja čistoće aminokiselina pokazala su kako su komercijalni uzorci Leu vjerojatno kontaminirani pripadnom aminokiselinom Ile. Već i vrlo

male kontaminacije pripadnom aminokiselinom mogu uzrokovati velike kinetičke artefakte u istraživanju reakcije aktivacije, kao što je pokazano i na LeuRS [79], stoga je Leu isključen iz analize sintetskog mjesta. Ipak, Leu će biti analiziran u istraživanjima korektivnog mjesta jer u tim eksperimentalnim uvjetima kontaminacija pripadnom aminokiselinom predstavlja puno manji problem. Kod Nle i Met vjerojatnost kontaminacije je nešto manja, ali svejedno je rezultate potrebno razmatrati s dozom rezerve. Norleucin je ravnolančani strukturni izomer izoleucina i leucina. Radi se o drevnoj (pojavljuje se u Weber-Millerovom eksperimentu) prirodnoj neproteinogenoj aminokiselini koja u stanici može nastati kao produkt biosintetskog puta leucina i ugrađivati se u proteine na mjesto Met [159]. Također, Nle je toksičan za stanicu, ali ne zbog ugradnje u proteine, već zbog toga što uslijed izrazite sličnosti metioninu djeluje kao kompetitivni inhibitor u reakcijama nastajanja *S*-adenozil-metionina koji je važan u reakcijama prijenosa metilne skupine [160]. Diskriminacijski faktor za Nle jednak je diskriminacijskom faktoru za Abu – 10 375. Zanimljivo, isti diskriminacijski faktori proizlaze iz obratnih efekata. Dok je kod Abu efekt temeljno na K_M (povećanje 4400 puta), a manje na k_{cat} (smanjenje 2,5 puta), kod Nle je efekt na K_M pet puta manji (povećanje 909 puta), na k_{cat} pet puta veći (smanjenje 12 puta). Dakle, izgleda kako produljivanje bočnog ogranka supstrata u odnosu na skraćivanje značajnije utječe na mispozicioniranje katalitički važnih elemenata. Posljednja analizirana aminokiselina ove skupine je Met. Kao i Nle, Met je ravnolančana aminokiselina, volumenom gotovo jednaka Ile/Leu/Nle, ali nešto manje hidrofobna zbog toga što umjesto jedne metilenske skupine ima atom sumpora. S diskriminacijskim faktorom 2184 Met se pokazao kao najveća prijetnja točnosti IleRS (među aminokiselinama analiziranim u ovom radu). Kao i kod svih ostalih aminokiselina, efekt većinski proizlazi iz povećanja K_M od 410 puta, dok je k_{cat} smanjen oko 5 puta. Sintetsko mjesto IleRS je hidrofobno pa je veći afinitet prema hidrofilnijem Met, u odnosu na Nle, suprotan očekivanjima. Potencijalno objašnjenje nalazi se u sumpor-aromatskim interakcijama koje se mogu ostvarivati između sumpora Met i bočnih ogranka Trp u sintetskom mjestu IleRS. Iako se rijetko spominju, sumpor-aromatske interakcije dobro su opisane i pronađene u čak 70 % dostupnih struktura u PDB-u [161]. Za kraj, treba spomenuti da su prethodne analize diskriminacije nepripadnih supstrata aaRS pokazale kako su veće/drugačije razgranate aminokiseline diskriminirane faktorom većim od 10^4 [18], dok se u slučaju IleRS primjećuje barem red veličine lošija diskriminacija. Doduše zbog mogućnosti da je i Met kontaminiran pripadnim Ile ovaj zaključak također treba uzeti s dozom opreza.

Sljedeće su analizirane hidrofilne aminokiseline Thr i Ser. Thr je strukturni analog Val, koji umjesto jedne metilne ima hidroksilnu skupinu. Diskriminacijski faktor za Thr iznosi 22 243. Očekivano, najveći efekt je na K_M – 11 436 puta, dok je k_{cat} smanjen samo 1,8 puta, a gotovo je identičan vrijednosti za Val. Smanjeni afinitet je očekivan jer je aktivno mjesto IleRS hidrofobno. S druge strane, Ser (analog Abu) je diskriminiran faktorom od čak 1 037 500 puta. Pojedinačni efekti na kinetičke parametre za Ser nisu određeni jer je zbog tako niske aktivnosti bilo moguće odrediti samo omjer k_{cat}/K_M . Omjer k_{cat}/K_M se određuje se iz lineranog dijela ovisnosti početne brzine reakcije o koncentraciji supstrata. Pri koncentraciji supstrata $[S] \ll K_M$ Michaelis-Menten jednadžba $v_0 = \frac{V_m \times [S]}{K_M + [S]}$ aproksimira se kao $v_0 = \frac{V_m}{K_M} \times [S]$ pa je iz nagiba pravca moguće izračunati k_{cat}/K_M . Zanimljivo, oba supstrata su oko 100 puta lošiji supstrati od svojih hidrofobnih analoga, Val i Abu, čime je kvantificiran doprinos zamjene metilne za hidroksilnu skupinu.

U konačnici, istraživani su fluorirani analozi Abu – γ,γ -difluoro- α -aminobutirat (F_2 Abu) i γ,γ,γ -trifluoro- α -aminobutirat (F_3 Abu). Fluorirane aminokiseline zanimljive su iz više razloga. Prvo, fluoriranje povećava hidrofobnost što bi trebalo omogućiti jednostavnije istraživanje doprinosa hidrofobnosti supstrata na njegovo prepoznavanje/diskriminaciju. Drugo, fluorirane aminokiseline su sintetskog podrijetla, to jest ne pojavljuju se u prirodi pa nisu mogle predstavljati prijetnju točnosti IleRS. Dakle, njihovim istraživanjem može se dobiti uvid u to kako se IleRS „nosi“ s aminokiselinama prema kojima nikada nije mogla optimirati aktivno mjesto. U konačnici, fluorirane aminokiseline su od velikog interesa u području biotehnologije. Ugradnja fluoriranih aminokiselina u proteine može imati značajne beneficiane efekte na njihova svojstva [162]. Kako su u procesu proizvodnje takvih proteina neizbježne aaRS, karakterizacija interakcija fluoriranih aminokiselina i aaRS može pružiti nova i vrijedna znanja za napredak navedenog područja. Diskriminacijski faktori za F_2 Abu i F_3 Abu iznose 36 888 i 87 368. Uspoređujući s Abu ne opaža se efekt na K_M u slučaju F_2 Abu, dok je u slučaju F_3 Abu K_M povećan dva puta. Dakle, fluoriranje, odnosno povećanje hidrofobnosti, ne čini Abu boljim supstratom. Ovaj rezultat je u suprotnosti s očekivanjima jer su prethodna istraživanja pokazala kako je F_3 Abu hidrofobnošću i veličinom gotovo identičan Val [162], aminokiselini koja je najveća prijetnja točnosti IleRS. Dva su moguća razloga za to, i) hidrofobnost supstrata ne igra toliku ulogu u njegovom vezanju u sintetsko mjesto IleRS te ii) fluor je mali atom velike elektronegativnosti, a C-F veza je obrnutog dipolnog momenta u odnosu na C-H vezu što za

posljedicu može imati odbijajuće interakcije u aktivnom mjestu. S druge strane, fluoriranje smanjuje k_{cat} 3-5 puta u odnosu na Abu. I u ovom slučaju ističu se dva moguća objašnjenja, i) induktivnim djelovanjem fluora smanjuje se nukleofilnost α -karboksilne skupine te ii) interakcije fluora i aktivnog mjesta dovode do mispozicioniranja katalitički važnih elemenata.

Kako bi se pokušao bolje razlučiti utjecaj fluora na diskriminaciju aminokiselina, F₂Abu i/ili F₃Abu okarakterizirani su u reakciji aktivacije uz druge dvije aaRS razreda Ia LeuRS i ValRS (tablica 4.2). S obzirom na to da LeuRS i osobito ValRS diskriminiraju Abu puno lošije (s puno manjim diskriminacijskim faktorom) nego IleRS, utjecaj fluora bi trebao biti izraženiji.

Tablica 4.2. Kinetički parametri za aktivaciju aminokiselina uz WT LeuRS i WT ValRS.

Enzim	Aminokiselina	$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	$k_{\text{sp}} / \text{dm}^3 \text{mmol}^{-1} \text{s}^{-1}$	$K_{\text{m}} / \text{mmol dm}^{-3}$	D
LeuRS	Leu	71 ± 9	3000 ± 1000	$0,030 \pm 0,007$	1
	Abu	49 ± 5	$0,7 \pm 0,1$	74 ± 9	4285
	F ₂ Abu	11 ± 2	$0,45 \pm 0,03$	27 ± 5	6667
	F ₃ Abu	6 ± 1	$0,51 \pm 0,08$	12 ± 2	5882
ValRS	Val	71 ± 9	1500 ± 300	$0,048 \pm 0,005$	1
	Abu	36 ± 6	11 ± 3	$3,6 \pm 0,4$	136
	F ₃ Abu	$3,0 \pm 0,2$	$0,100 \pm 0,002$	30 ± 3	15 000

Prikazane vrijednosti izražene su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška dobivene iz najmanje tri neovisna eksperimenta.

U slučaju ValRS, Abu je diskriminiran faktorom od samo 136, dok je F₃Abu (istog volumena i hidrofobnosti kao pripadni Val) diskriminiran faktorom 15 000 pri čemu se dodatna diskriminacija podjednako manifestira na oba kinetička parametra (10 puta). Dakle, u slučaju ValRS fluoriranje čini Abu red veličine lošijim supstratom nego što je to slučaj kod IleRS (100 vs 10 puta), što sugerira da u sintetskom mjestu ValRS postoje značajnije steričke i/ili kemijske smetnje. Gledajući diskriminacijske faktore u slučaju LeuRS primjećuje se kako je razlika između Abu i F_nAbu vrlo mala. Ipak, ističe se da LeuRS ima veći prividni afinitet prema fluoriranim analozima (niži K_{M}), ali je njihov k_{cat} također niži.

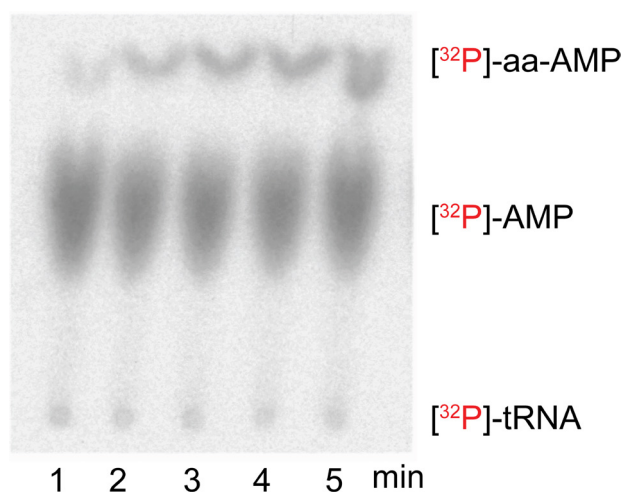
U konačnici može se zaključiti kako kod IleRS, LeuRS i ValRS fluoriranje Abu smanjuje k_{cat} što sugerira mispozicioniranje i/ili promjenu kemijskih svojstava aminokiseline. Utjecaj na K_{M} puno je složeniji. Dok se kod IleRS ne mijenja, kod LeuRS se smanjuje, a kod ValRS raste. To sugerira da će efekt biti negativniji u slučajevima kada supstrat bolje pristaje u

aktivno mjesto enzima. Za detaljnije objašnjenje utjecaja fluora na kinetičke parametre potrebna su detaljnija kinetička, termodinamička i/ili strukturna istraživanja.

4.5. Popravak pogreške nakon prijenosa sprečava nastajanje misaminoaciliranih tRNA^{Ile}

Nakon što je ustanovljeno kako je većina nepripadnih aminokiselina uspješno diskriminirana u reakciji aktivacije, istražena je reakcija ukupnog aminoaciliranja. Prije samih rezultata vrijedi istaknuti kako uspješna diskriminacija u aktivaciji znači da aminokiselina ne predstavlja prijetnju točnosti IleRS u staničnim uvjetima, odnosno kako nadalje određeni kinetički parametri nemaju veliku biološku relevantnost. Ipak, to ne znači kako nisu vrijedni istraživanja. S jedne strane, daljnja kinetička karakterizacija aminokiselina različitih fizikalno-kemijskih svojstava nedvojbeno pruža bolji uvid u mehanizme djelovanja samog enzima. S druge strane, ne smije se zanemariti mogućnost da su neke od istraživanih aminokiselina nekada tijekom evolucije mogle predstavljati prijetnju točnosti nekom ancestralnom obliku IleRS.

Praćenje reakcije aminoaciliranja obuhvaća praćenje akumulacije aa-tRNA^{Ile} u vremenu. Akumulacija aa-tRNA^{Ile} posljedica je svih reakcija koje IleRS katalizira – aktivacije, prijenosa i mehanizama popravka pogreške. Valja podsjetiti kako su prethodna istraživanja pokazala da je u slučaju aaRS razreda I limitirajući korak reakcije aminoaciliranja otpuštanje aminoacilirane tRNA [3] pa samim time taj korak najviše doprinosi izmjerenom koeficijentu brzine reakcije. Tipična TLC pločica dobivena za reakciju aminoacilacije prikazana je na slici 4.10.



Slika 4.10. TLC kromatogram za reakciju aminoaciliranja.

U svakoj vremenskoj točki nalaze se tri signala: $[^{32}\text{P}]\text{-tRNA}$, $[^{32}\text{P}]\text{-AMP}$ i $[^{32}\text{P}]\text{-aa-AMP}$. S obzirom na to da $[^{32}\text{P}]\text{-aa-AMP}$ predstavlja aminoaciliranu tRNA, a $[^{32}\text{P}]\text{-AMP}$ neaminoaciliranu tRNA (vidi Materijale i metode, poglavlja 3.2.4.2.), brzina se računa kao promjena koncentracije $[^{32}\text{P}]\text{-aa-AMP}$ u vremenu. Koncentracija $[^{32}\text{P}]\text{-aa-AMP}$ određuje se iz udjela intenziteta signala $[^{32}\text{P}]\text{-aa-AMP}$ u zbroju intenziteta signala $[^{32}\text{P}]\text{-aa-AMP}$ i $[^{32}\text{P}]\text{-AMP}$

$$c([^{32}\text{P}]\text{aa} - \text{tRNA}) = \frac{I([^{32}\text{P}]\text{-aa-AMP})}{I([^{32}\text{P}]\text{-aa-AMP}) + I([^{32}\text{P}]\text{-AMP})} \times c(\text{tRNA}). \quad \text{Signal} \quad [^{32}\text{P}]\text{-tRNA}$$

predstavlja aminoaciliranu i neaminoaciliranu tRNA koje P1 nukleaza nije razgradila te se zanemaruje u računu zbog izrazito niskog intenziteta. Dijeljenjem brzine s koncentracijom enzima kao rezultat dobiva se opaženi koeficijent brzine reakcije k_{obs} . Aminoaciliranje se rutinski prati u uvjetima ustaljenog stanja – uz malu koncentraciju enzima te visoke koncentracije ostalih supstrata (ATP, tRNA^{Ile} i aminokiseline) kako bi se osiguralo zasićenje enzima. Idealno, svi supstrati pa tako i aminokiseline bili bi korišteni u koncentraciji koja iznosi barem $10 \times K_M$ u aminoaciliranju. No, ovdje to nije bilo moguće jer su K_M vrijednosti za neke aminokiseline u aktivaciji bile izrazito visoke, a poznato je kako prisutnost tRNA^{Ile} može povećati K_M u aktivaciji za 10 puta [24]. S druge strane, iako pravilnije, to ipak nije posve nužno jer je ukupna reakcija aminoaciliranja znatno sporija od reakcije aktivacije pa podzasićenje ne mora imati efekt na opaženi koeficijent brzine reakcije aminoaciliranja. Ipak, treba imati na umu kako zbog toga ovi eksperimenti prvenstveno daju kvalitativne informacije o tome što se događa s aminokiselinama u ukupnom reakcijskom putu IleRS, dok bi usporedba koeficijenata brzine za različite aminokiseline bila pogrešna jer se ne postiže svugdje jednako zasićenje.

Prvo je praćeno nastajanje misaminoaciliranih tRNA^{Ile} uz WT IleRS. No, u svim slučajevima količina nastalog produkta bila je ispod granica detekcije te nije bilo moguće odrediti k_{obs} . Dakako iznimka je pripadni Ile za koji je opažen koeficijent brzine aminoaciliranja $k_{\text{obs}} = 1,3 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$ što je u skladu s prethodnim istraživanjima. Dakle, ovaj rezultat govori kako WT IleRS ne akumulira misaminoacilirane tRNA^{Ile} . S obzirom na to da je poznato kako WT IleRS aktivira aminokiseline, izostanak akumulacije misaminoaciliranih tRNA^{Ile} može biti posljedica dviju stvari, i) aminokiseline bivaju dodatno diskriminirane u reakciji prijenosa do te razine da je spriječeno nastajanje misaminoaciliranih tRNA^{Ile} ili ii) aminoaciliranje biva spriječeno uslijed efikasnih mehanizama popravka pogreške. Otprije je poznato kako IleRS ne

diskriminira nepripadne Val i Nva u reakciji prijenosa [20] pa se u fokusu pronašao popravak pogreške nakon prijenosa.

Kako bi se istražilo utječe li mehanizam popravka pogreške nakon prijenosa na sposobnost IleRS da akumulira misaminoacilirane tRNA^{Ile}, praćena je reakcija misaminoaciliranja uz mutant IleRS T243R/D342A koji ima ugašen popravak pogreške nakon prijenosa [20]. Opaženi koeficijenti brzine prikazani su u tablici 4.3.

Tablica 4.3. Opaženi koeficijenti brzine misaminoaciliranja uz mutant s ugašenim popravkom pogreške nakon prijenosa IleRS T243R/D342A.

Aminokiselina	$k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$
Ile	$0,51 \pm 0,01$
Abu	$0,56 \pm 0,06$
Ala	$0,027 \pm 0,005$
Met	$0,006 \pm 0,002$
Nle	$0,13 \pm 0,03$
Ser	$0,0049 \pm 0,0004$
Thr	$0,14 \pm 0,03$
F ₂ Abu	$0,15 \pm 0,01$
F ₃ Abu	$0,035 \pm 0,003$

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška barem tri nezavisna eksperimenta.

Uz IleRS T243R/D342A određeni su opaženi koeficijenti brzine aminoaciliranja za gotovo sve aminokiseline, što nije bilo moguće uz WT IleRS. Iz ovog rezultata proizlazi zaključak da je popravak pogreške nakon prijenosa zaslužan za sprečavanje akumulacije misaminoacilirane tRNA^{Ile} uz WT IleRS, odnosno kako sve nepripadne aminokiseline podilaze toj reakciji.

4.5.1. Isoleucil-tRNA-sintetaza ne diskriminira aminokiseline u reakciji prijenosa

Iako nastajanje misaminoaciliranih tRNA^{Ile} uz mutant s ugašenim popravkom pogreške nakon prijenosa govori kako istraživane aminokiseline podilaze reakciji prijenosa, ona je pomnije istražena uz nekoliko odabranih aminokiselina (Abu, F₂Abu i F₃Abu). Kako bi se mogao pratiti izolirani korak prijenosa aminokiseline na tRNA^{Ile} potrebno je zadovoljiti dva uvjeta. Prvo, reakcija treba započeti miješanjem tRNA^{Ile} s predformiranim kompleksom IleRS i aktivirane aminokiseline (IleRS:aa-AMP) – time je osigurano da se ne prati reakcija aktivacije. Drugo,

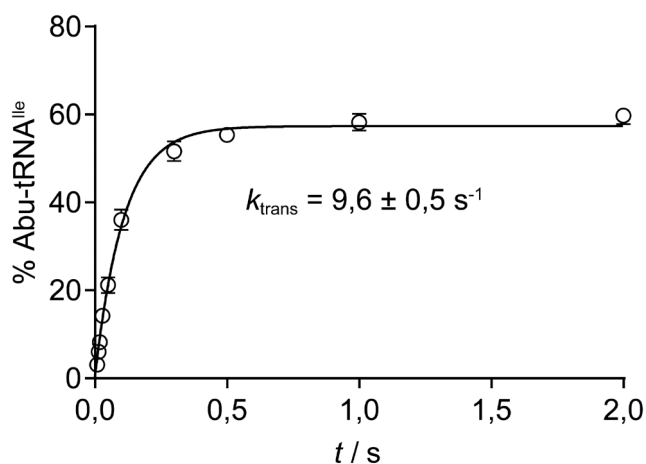
reakcija se mora odvijati u uvjetima jednog kruga kako bi se osiguralo da izmjereni koeficijent brzine odgovara prijenosu aminokiseline, a ne nekom sporijem koraku nakon nastanka aminoacilirane tRNA poput regeneracije enzima za idući reakcijski ciklus.

Izmjereni koeficijenti brzine prijenosa aminokiseline izračunati su utočnjavanjem podataka nelinearnom regresijom na monoeksponencijalnu krivulju opisanu jednadžbom $y = Y_0 + A \times (1 - e^{k_{trans} \times t})$ (vidi poglavlje 3.2.4.3.), a prikazani su u tablici 4.4. Reprezentativna krivulja prikazana je na slici 4.11.

Tablica 4.4. Koeficijenti brzine prijenosa aminokiseline na tRNA^{Ile} uz mutant IleRS T243R/D342A. Podaci za Val i Nva preuzeti iz [20].

Aminokiselina	k_{trans} / s^{-1}
Ile	$2,0 \pm 0,2$
Val ^a	$0,88 \pm 0,01$
Nva ^a	11 ± 1
Abu	$9,7 \pm 0,4$
F ₂ Abu	$8,3 \pm 0,1$
F ₃ Abu	$0,9 \pm 0,2$
Ile + WT IleRS	$9,4 \pm 0,2$

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška barem tri nezavisna eksperimenta.



Slika 4.11. Prijenos Abu na tRNA^{Ile} uz mutant IleRS s ugašenim popravkom pogreške nakon prijenosa T243R/D342A.

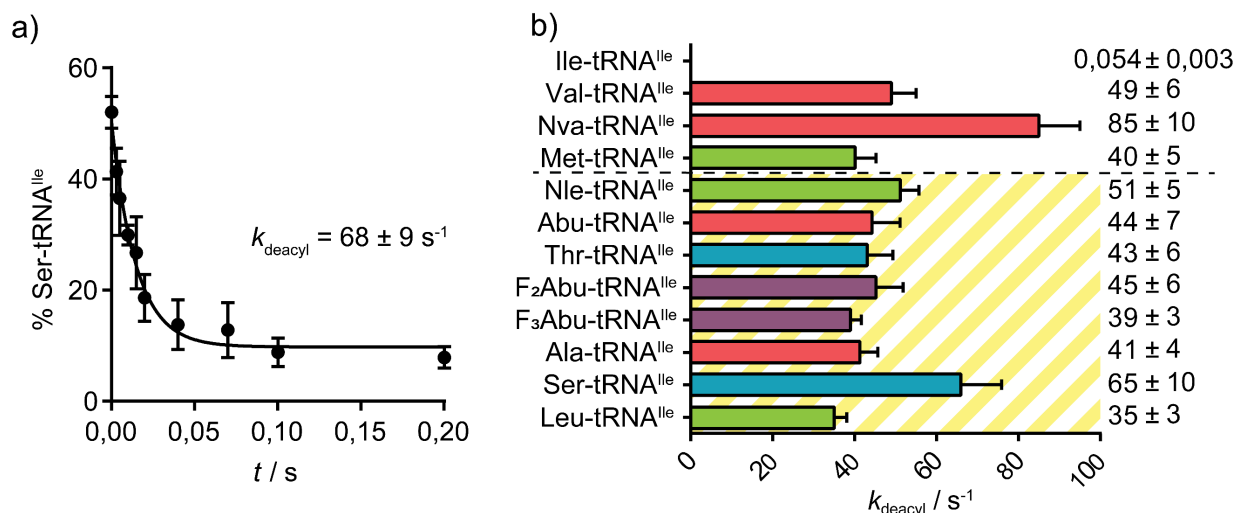
Slične brzine prijenosa za sve aminokiseline dodatno potvrđuju prethodna saznanja da ne postoji dodatna diskriminacija u koraku prijenosa kod IleRS. Zanimljivo opažanje jest da Nva, Abu i F₂Abu bivaju 4-5 puta brže, a Val i F₃Abu 2 puta sporije prenesene na tRNA^{Ile} od

pripadnog Ile. Potencijalno objašnjenje za to opažanje jest da su aktivirani oblici Nva, Abu i F₂Abu nestabilniji od ostalih aa-AMP što bi značilo da su energetski bliže prijelaznom stanju u reakciji prijenosa, a to za posljedicu ima manju energiju aktivacije, odnosno veći koeficijent brzine reakcije. Nadalje, može se primijetiti kako se izosterički Val i Nva razlikuju čak 10 puta u brzini prijenosa, dok za jednu metilnu skupinu manji Abu ima isti brzinu kao Nva. Što se fluoriranja tiče, u slučaju F₂Abu ono gotovo da ne utječe na brzinu prijenosa dok je u slučaju F₃Abu brzina 10 puta smanjena. Za kraj, može se zaključiti kako u prijenosu aminokiseline nema direktne i/ili jednostavno objašnjive korelacije između veličine i/ili hidrofobnosti te brzine prijenosa.

4.6. Korektivno mjesto IleRS prepoznaje sve nepripadne aminokiseline

Izostanak nastajanja misaminoacilirane tRNA^{Ile} uz WT IleRS i njena akumulacija uz mutant s ugašenim popravkom pogreške nakon prijenosa IleRS T243R/D342A, snažno upućuju na zaključak kako sve nepripadne aminokiseline bivaju prepoznate u korektivnom mjestu. To je neobično opažanje jer s evolucijskog gledišta nema potrebe da korektivno mjesto prepoznaje aminokiseline koje su efikasno eliminirane u sintetskom mjestu, pa kako bi se to nedvojbeno potvrdilo, istražena je izolirana reakcija hidrolize misaminoaciliranih tRNA^{Ile}. U tu svrhu priređene su i pročišćene misaminoacilirane tRNA^{Ile} što je opisano u poglavlju 3.2.4.2.2. Sama izvedba eksperimenta sastoji se od miješanja enzima i misaminoacilirane tRNA^{Ile} u uvjetima jednog kruga (koncentracija enzima je barem 10 puta veća od koncentracije aa-tRNA^{Ile}). Kako bi se reakcija pratila na milisekundnoj skali korišten je uređaj za brzo miješanje i zaustavljanje protoka – RQF-3.

Reprezentativna krivulja hidrolize misaminoacilirane tRNA^{Ile} uz WT IleRS prikazana je na slici 4.12a, a objedinjeni rezultati na slici 4.12b. Koeficijenti brzine hidrolize izračunati su utočnjavanjem podataka nelinearnom regresijom na monoeksponencijalnu krivulju opisanu jednadžbom $y = Y_0 + A \times e^{-k_{deacyl} \times t}$ (vidi poglavlje 3.2.4.5.).



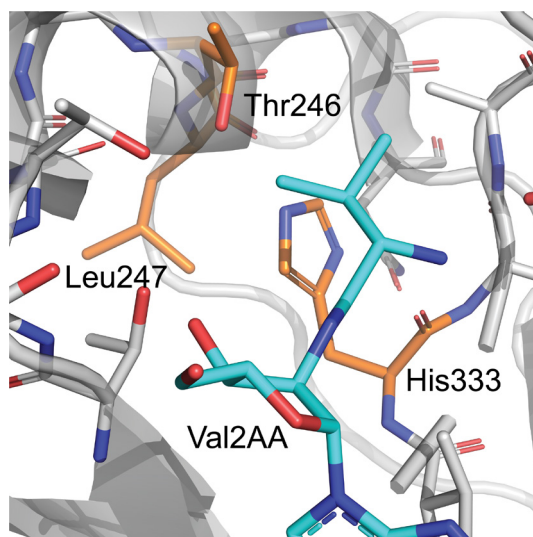
Slika 4.12. a) Hidroliza Ser-tRNA^{Ile} uz WT IleRS. b) Opaženi koeficijenti brzine reakcije prvog reda koja predstavlja hidrolizu (mis)aminoaciliranih tRNA^{Ile} uz WT IleRS. Prikazane vrijednosti izražene su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška dobivene iz najmanje tri neovisna eksperimenta. Podaci za Val i Nva preuzeti iz [20].

Iako bi bilo za očekivati kako je korektivno mjesto optimirano da efikasno hidrolizira tRNA^{Ile} misaminoaciliranu samo onim aminokiselinama koje nisu dovoljno dobro diskriminirane u sintetskom mjestu (Val, Nva i potencijalno Met), može se primijetiti kako to nije slučaj. Dakle, tRNA^{Ile} misaminoacilirana svim aminokiselinama biva hidrolizirana vrlo sličnom, kinetički relevantnom brzinom u mjestu za popravak pogreške ($35\text{--}85 \text{ s}^{-1}$). Uspoređujući diskriminacijske faktore u reakciji aktivacije i opažene brzine hidrolize misaminoaciliranih tRNA^{Ile}, može se vidjeti kako ne postoji nikakva korelacija među tim vrijednostima. Primjerice, od hidrolize Ser-tRNA^{Ile} brža je samo hidroliza Nva-tRNA^{Ile} iako je Ser najbolje diskriminirana aminokiselina u sintetskom mjestu (diskriminacijski faktor oko 10^6). Zanimljivo, ne postoji ni korelacija između brzine hidrolize i fizikalno-kemijskih svojstava aminokiselina. Otprilike jednako dobro su hidrolizirane izosterička Leu-tRNA^{Ile}, hidrofilnija Thr-tRNA^{Ile}, manja Ala-tRNA^{Ile} te fluorirana F₂Abu-tRNA^{Ile}. U konačnici, mjesto za popravak pogreške ne radi ni značajnu razliku između proteinogenih (Ala, Val, Leu, Met, Thr, Ser), prirodnih neproteinogenih (Nle, Nva, Abu) i sintetskih aminokiselina (F₂Abu, F₃Abu). Očekivano, Ile-tRNA^{Ile} biva vrlo sporo hidrolizirana ($0,054 \text{ s}^{-1}$). Ova opažanja sugeriraju kako je evolucija selektivnosti mjesta za popravak pogreške manjim dijelom gonjena optimizacijom prema neprikladnim aminokiselinama koje predstavljaju prijetnju točnosti IleRS, a veći efekt imala je težnja za usporavanjem hidrolize pripadne Ile-tRNA^{Ile}. Stoga je sljedeći korak u ovom radu bio istražiti kako, unatoč u nekim slučajevima izrazito velikoj fizikalno-kemijskoj sličnosti,

korektivno mjesto IleRS uspješno odbacuje Ile-tRNA^{Ile}, dok sve misaminoacilirane tRNA^{Ile} bivaju efikasno hidrolizirane.

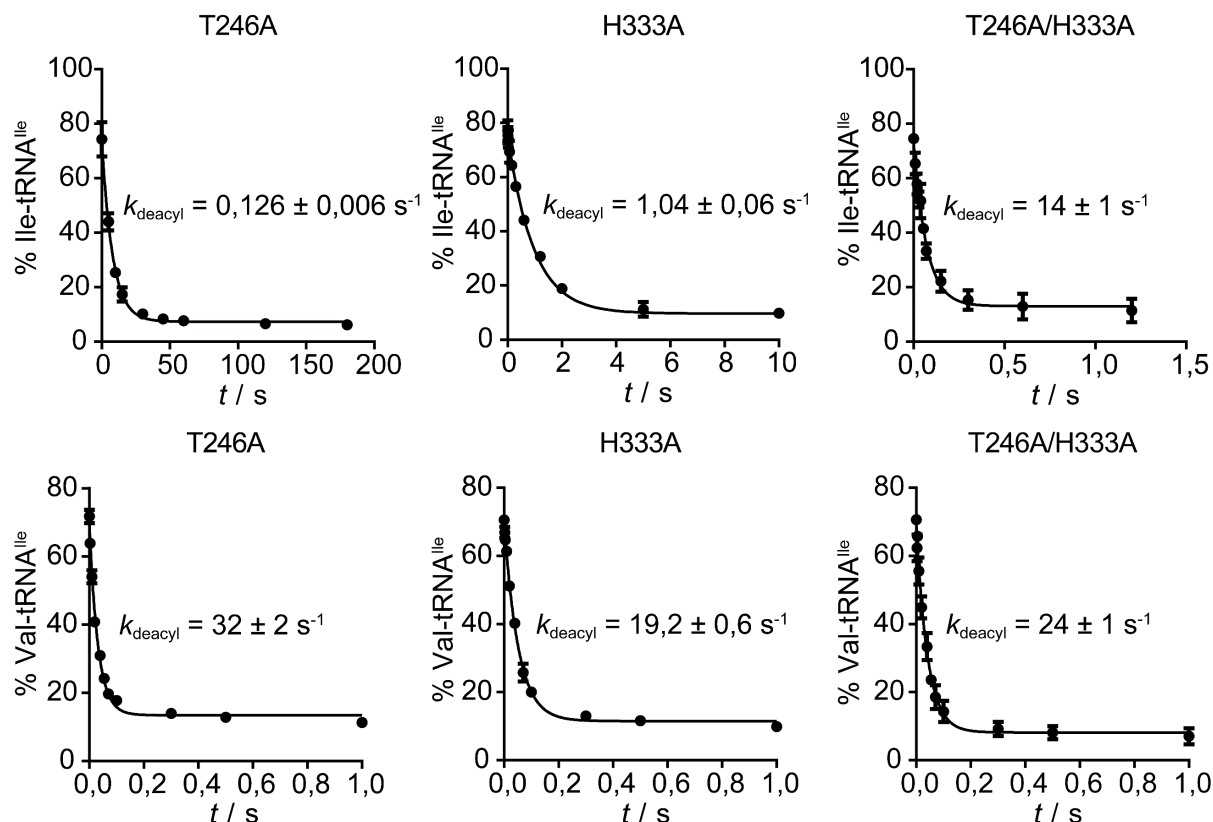
4.7. His333, u sinergiji s Thr246, diskriminira Ile-tRNA^{Ile} u korektivnom mjestu

U poglavlju 2.3. Literaturnog pregleda detaljno su opisana do sada poznata saznanja o mehanizmu prepoznavanja aminokiselinskog dijela supstrata aa-tRNA^{Ile} u korektivnom mjestu IleRS. Ukratko, prethodna istraživanja identificirala su Thr246 i His333 (označeni narančasto na slici 4.13) kao aminokiseline zaslužne za diskriminaciju Ile-tRNA^{Ile}, ali zbog tehničkih nedostataka tadašnjih istraživanja (primjena pogrešnih eksperimentalnih uvjeta, detaljnije opisano u Literaturnom pregledu) njihov pojedinačni doprinos nije razjašnjen.



Slika 4.13. Mjesto za popravak pogreške *T. thermophilus* IleRS (PDB: 1WNZ) s vezanim analogom supstrata 2'VAA. Bočni ogranci koji su mutirani u ovom radu označeni su narančastom bojom Ile-tRNA^{Ile}.

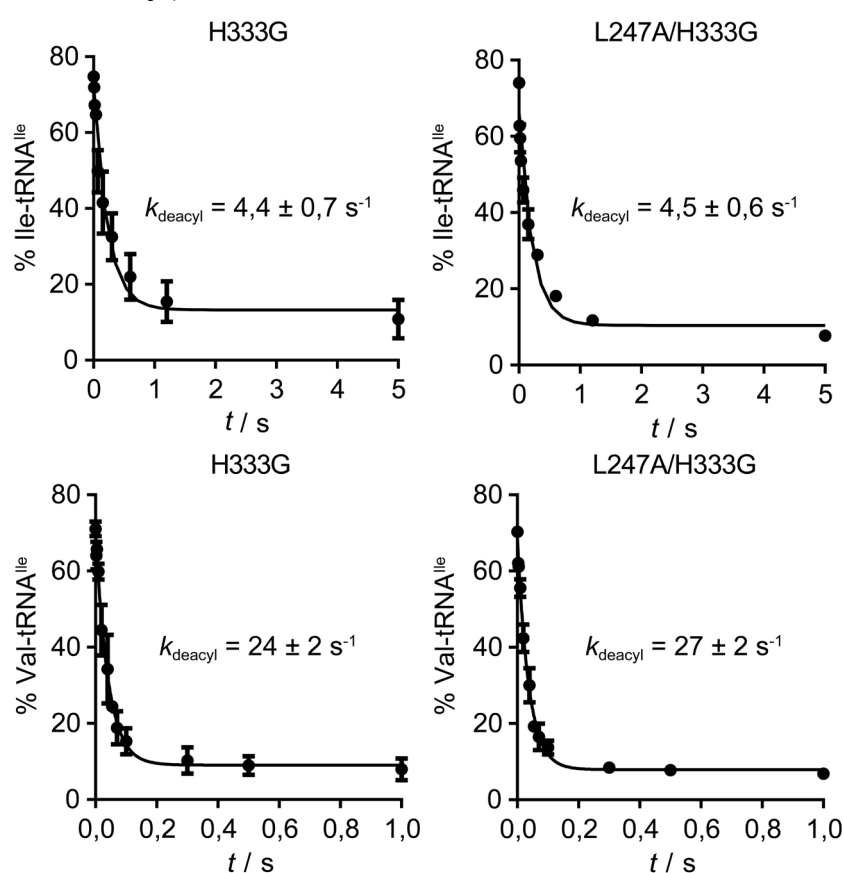
Kako bi se taj problem razriješio, pripremljeni su i pročišćeni mutanti T246A, H333A i T246A/H333A. U uvjetima jednog kruga mjerena je brzina hidrolize pripadne Ile-tRNA^{Ile} i nepripadne Val-tRNA^{Ile}. Mjerenje brzine hidrolize Val-tRNA^{Ile} napravljeno je kao kontrola koja ukazuje na očuvanost osnovne funkcije mjesta za popravak pogreške uslijed uvođenja mutacija. Dobiveni rezultati prikazani su na slici 4.14.



Slika 4.14. Hidroliza pripadne Ile-tRNA^{Ile} (gore) i nepripadne Val-tRNA^{Ile} (dolje) uz mutante IleRS: T246A, H333A i T246A/H333A. Koeficijenti brzine hidrolize uz WT IleRS iznose k_{deacyl} (Ile-tRNA^{Ile}) = $0,054 \pm 0,003$ s⁻¹ i k_{deacyl} (Val-tRNA^{Ile}) = 49 ± 6 s⁻¹. Prikazane vrijednosti izražene su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška dobivene iz najmanje tri neovisna eksperimenta.

Mutant T246A pokazuje samo dva puta veću brzinu hidrolize pripadne Ile-tRNA^{Ile} u odnosu na WT IleRS ($0,126$ vs $0,054$ s⁻¹), dok je ta brzina čak dvadeset puta veća uz mutant H333A i iznosi $1,04$ s⁻¹. Ovaj rezultat je u suprotnosti s prethodnim istraživanjima koja su sugerirala kako oba mutanta hidroliziraju Ile-tRNA^{Ile} jednakom brzinom. Zanimljivo, dvostruki mutant T246A/H333A pokazuje dodatno povećanje brzine hidrolize te je ona 260 puta veća nego uz WT IleRS (14 vs $0,054$ s⁻¹). Svi mutanti pokazuju najviše dvostruko usporavanje hidrolize Val-tRNA^{Ile} (slika 4.14 dolje) što sugerira kako korektivno mjesto i dalje može efikasno uklanjati misaminoacilirane tRNA^{Ile}, odnosno da uvedene mutacije ne narušavaju njegovu osnovnu funkciju. Iz ovih rezultata valja izdvojiti dva važna opažanja, i) diskriminacija pripadne Ile-tRNA^{Ile} ostvaruje se drugačijim mehanizmom nego kod srodnog LeuRS u čijem je slučaju Thr252, (analog Thr246 u IleRS) glavni element diskriminacije te ii) His333 osigurava diskriminaciju pripadnog Ile-tRNA^{Ile} pri čemu to radi u sinergiji s Thr246.

U sljedećem koraku istraživanja pokušalo se odgovoriti na pitanje kojim mehanizmom His333 odbacuje Ile-tRNA^{Ile} iz mjesta za popravak pogreške? Kako bi se provjerilo je li njegovo djelovanje temeljno steričke prirode napravljen je novi mutant H333G, čime je aktivno mjesto dodatno povećano u odnosu na H333A. Izmjereno je dodatno ubrzanje hidrolize četiri puta (slika 4.15 gore) što sugerira da je diskriminacija, barem donekle, steričke prirode. Proučavanjem strukture korektivnog mjesta uočeno je kako bi Leu247 (istaknut narančasto na slici 4.13) mogao zauzeti prostor oslobođen mutacijom His i simulirati djelovanje His333 u mutantima H333A i H333G te na taj način umanjiti opaženi efekt na brzinu reakcije. Stoga je priređen mutant L247A/H333G, a izmjerena brzina hidrolize Ile-tRNA^{Ile} bila je jednaka kao kod jednostrukog mutanta H333G (slika 4.15 gore). Ovaj rezultat sugerira kako Leu247 ipak ne zauzima mjesto His333, odnosno da izmjereni efekt uklanjanja His333 odražava njegov stvarni utjecaj na brzinu hidrolize pripadne Ile-tRNA^{Ile}. Za oba mutanta napravljene su kontrolne reakcije hidrolize Val-tRNA^{Ile} koje su u skladu s prethodno okarakteriziranim mutantima (slika 4.15 dolje).

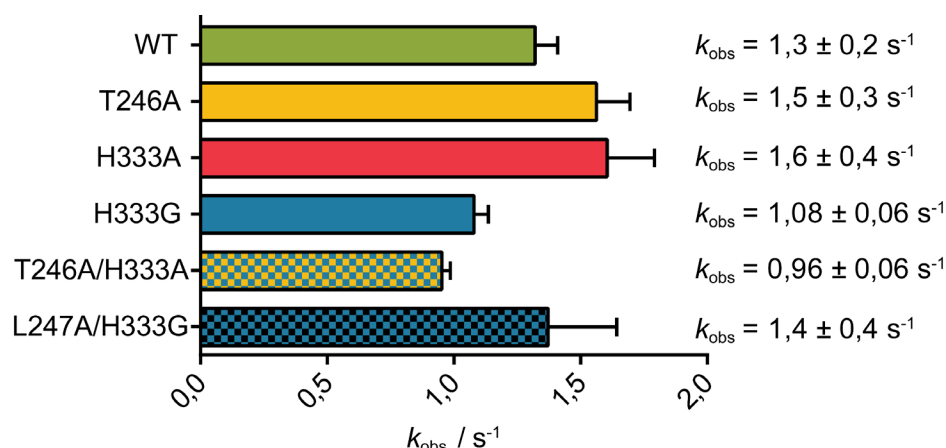


Slika 4.15. Hidroliza pripadne Ile-tRNA^{Ile} (gore) i nepripadne Val-tRNA^{Ile} (dolje) uz mutante IleRS H333G i L247A/H333G. Prikazane vrijednosti izražene su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška dobivene iz najmanje tri neovisna eksperimenta.

U konačnici može se zaključiti da Ile-tRNA^{Ile} u korektivnom mjestu temeljno biva odbačena djelovanjem His333 koji svoj maksimalni diskriminacijski potencijal postiže u sinergiji s Thr246. Daljnje mutacije His333 ukazuju na to kako je njegovo djelovanje temeljno steričke prirode, ali iz ovih istraživanja nije moguće jednoznačno zaključiti djeluje li His333 slično kao Thr252 u slučaju LeuRS i sprečava vezanje Ile-tRNA^{Ile} u produktivnoj konformaciji. Za takve detaljnije zaključke potrebne su visoko kvalitetne strukture i simulacije molekularne dinamike.

4.8. Mutanti IleRS koji hidroliziraju Ile-tRNA^{Ile} koriste *in trans* popravak

Kako bi se detaljnije okarakterizirali pripremljeni mutanti, određeni su opaženi koeficijenti brzine reakcije aminoaciliranja u uvjetima ustaljenog stanja. Dobiveni rezultati bili su iznenađujući (slika 4.16) jer su pokazali kako postoji relativno mala razlika u brzini aminoaciliranja između WT IleRS i mutanata za koje je pokazano kako primjenjuju manje ili više brzu hidrolizu pripadnog para Ile-tRNA^{Ile}.

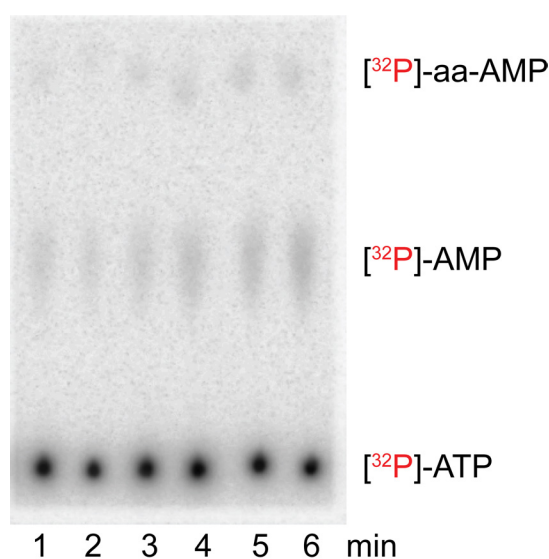


Slika 4.16. Opaženi koeficijenti brzine za reakciju aminociliranja (nastajanja Ile-tRNA^{Ile}) uz WT IleRS i mutante: T246A, H333A, H333G, T246A/H333A i L246A/H333A. Prikazane vrijednosti izražene su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška dobivene iz najmanje tri neovisna eksperimenta.

Čak i dvostruki mutant T246A/H333A koji hidrolizira Ile-tRNA^{Ile} brzinom oko 14 s^{-1} je u ovim uvjetima aminoacilirao tRNA^{Ile} izoleucinom svega 25 % sporije nego WT IleRS. Uslijed ovih opažanja bilo je potrebno preispitati dobivene rezultate. Za početak valja se podsjetiti na koje sve načine nastala aa-tRNA^{aa} može biti hidrolizirana. U Literaturnom pregledu bilo je govora o dva mehanizma popravka pogreške nakon prijenosa – *in cis* i *in trans*. Tijekom *in cis* popravka pogreške, 3' kraj aminoacilirane tRNA izravno se translocira u korektivno mjesto u kojemu

zatim može doći do hidrolize esterske veze između aminokiseline i tRNA. U slučaju *in trans* popravka, aa-tRNA^{aa} prvo disocira s enzima da bi se potom ponovno na njega vezala i to na način da se 3' kraj smješta u korektivno mjesto u kojemu može doći do hidrolize već spomenute veze. Alternativno, disociranu aa-tRNA^{aa} može vezati EF-Tu koji je zatim odnosi na ribosom u procesu biosinteze proteina. Kao što je već spomenuto, u ovim eksperimentima (slika 4.16) aminoaciliranje je rađeno u uvjetima ustaljenog stanja (koncentracija supstrata puno veća od koncentracije aaRS) u kojima je moguće opaziti samo popravak *in cis*, ali ne i *in trans*. Naime, to je posljedica činjenice da ako se popravak odvija *in cis*, aa-tRNA^{aa} će biti hidrolizirana prije disocijacije i neće biti njene akumulacije (aminoaciliranja). No, ako se radi o popravku *in trans*, aa-tRNA^{aa} prvo mora disocirati s aaRS, ali zbog rada u uvjetima ustaljenog stanja (niska koncentracija enzima!) nije favorizirano njeno ponovno vezanje, a samim time niti hidroliza te se kao rezultat opaža aminoaciliranje – nastajanje Ile-tRNA^{Ile}. Dakle, kao objašnjenje akumulacije Ile-tRNA^{Ile} u uvjetima ustaljenog stanja uz mutante koji je brzo hidroliziraju u uvjetima jednog kruga, nameće se odvijanje popravka *in trans* koji je prethodno opažen samo kod aaRS razreda II.

Za istraživanje ove hipoteze korišten je posebno dizajnirani kinetički eksperiment paralelnog praćenja utroška ATP-a i aminoaciliranja s i bez dodatka EF-Tu. Prije detaljnijeg pregleda eksperimentalnog postava treba prokomentirati reakciju utroška ATP-a. Kao što je opisano u poglavlju 3.2.4.5., reakcija se temelji na suplementiranju ATP-a radioaktivnim [³²P]-ATP-om. Tipičan TLC kromatogram prikazan je na slici 4.17.



Slika 4.17. TLC kromatogram za reakciju utroška ATP-a.

U svakoj vremenskoj točki nalaze se tri signala: $[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$, $[^{32}\text{P}]\text{-AMP}$ i $[^{32}\text{P}]\text{-aa-AMP}$. Signal $[^{32}\text{P}]\text{-aa-AMP}$ predstavlja aktiviranu aminokiselinu koja je otpuštena u otopinu ili se u trenutku zaustavljanja reakcije nalazi vezana u sintetsko mjesto enzima. Signal je u ovim eksperimentima bio izrazito niskog intenziteta (uglavnom puno nižeg nego što je prikazano na slici) te se gotovo nije mijenjao u vremenu pa je njegov doprinos zanemaren. Utrošak ATP-a računa se kao promjena koncentracije $[^{32}\text{P}]\text{-AMP}$ -a u vremenu. Koncentracija $[^{32}\text{P}]\text{-AMP}$ -a određuje se iz udjela intenziteta signala $[^{32}\text{P}]\text{-AMP}$ -a u zbroju intenziteta signala $[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ -a i $[^{32}\text{P}]\text{-AMP}$ -a te poznate koncentracije dodanog ATP-a: $c([^{32}\text{P}] - \text{AMP}) = \frac{I([^{32}\text{P}] - \text{AMP})}{I([^{32}\text{P}] - \text{AMP}) + I([^{32}\text{P}] - \text{ATP})} \times c(\text{ATP})$. Reakcija aminoaciliranja prati se kao što je opisano u poglavlju 4.5.

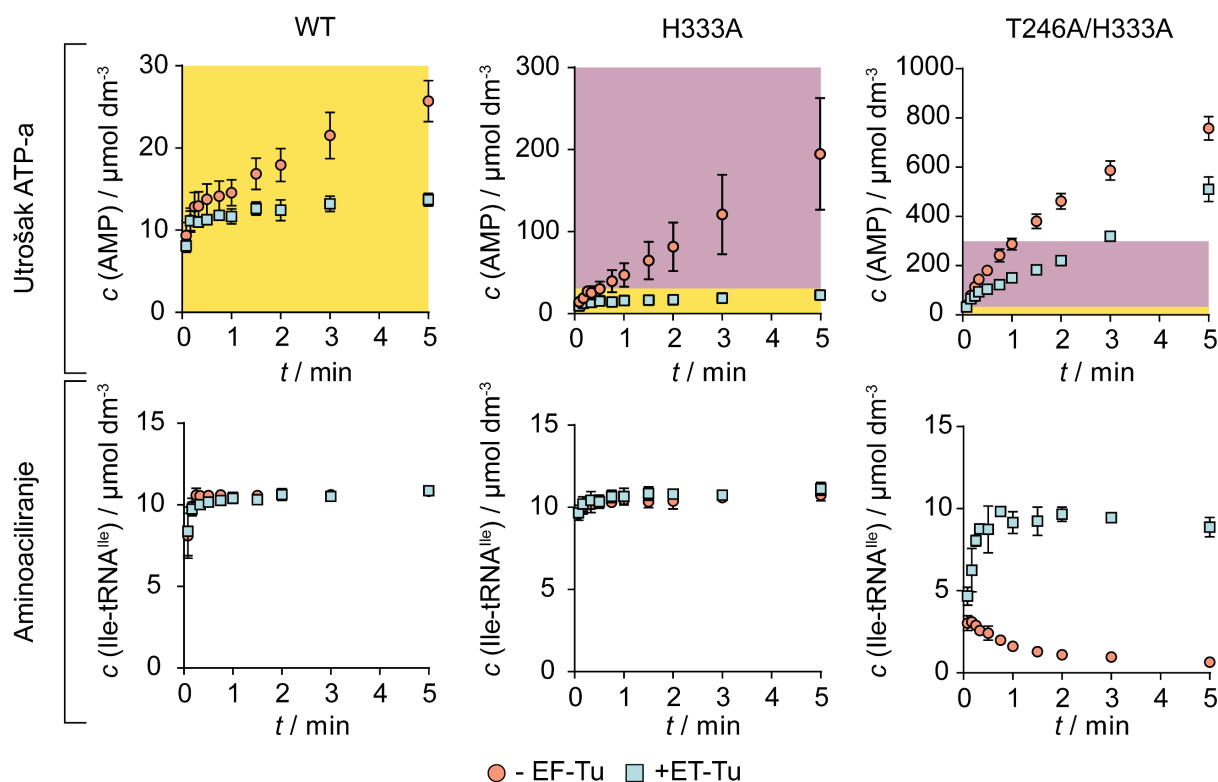
Na početku treba spomenuti kako su u ovim eksperimentima korištene IleRS varijante u koncentraciji $2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Ova koncentracija je odabrana iz dva razloga, i) radi se o koncentraciji pri kojoj popravak *in trans* ne bi trebao biti defavoriziran te ii) IleRS se u staničnim uvjetima nalazi pri toj koncentraciji što rezultatima daje na biološkoj relevantnosti [163]. Općenito, paralelno praćenje utroška ATP-a i aminoaciliranja bazira se na sljedećoj ideji. Tijekom reakcije aminoaciliranja dolazi do stehiometrijskog utroška ATP-a – omjer utrošenog ATP-a naspram nastale aa-tRNA^{aa} jednak je 1. Ako nakon aminoaciliranja dolazi do hidrolize aminoacilirane tRNA (popravka pogreške nakon prijenosa), to znači da su se aminokiselina i tRNA regenerirale za novi aminoacilacijski ciklus. Posljedica toga je nestehiometrijski utrošak ATP-a, to jest omjer potrošenog ATP-a naspram nastale aa-tRNA^{aa} veći od 1. Dakle, ovakvim eksperimentalnim postavom može se pokazati postojanje popravka pogreške. Nadalje, dodatkom EF-Tu moguće je odrediti radi li se o popravku *in cis* ili *in trans*. Kada se u reakcijskoj smjesi nalazi EF-Tu, on veže slobodnu aa-tRNA^{aa} koja tada postaje nedostupna za aaRS. Ako aaRS primjenjuje popravak *in trans*, primjećuje se smanjenje omjera potrošenog ATP-a naspram nastale aa-tRNA^{aa} u odnosu na reakciju bez dodanog EF-Tu. Razlog tome je što u otopini postoji manja količina dostupnog supstrata za reakciju popravka pogreške, odnosno manje tRNA se regenerira za novi aminoacilacijski ciklus. Ako dodatak EF-Tu ne utječe na promjenu omjera potrošenog ATP-a i nastale aa-tRNA^{aa}, dominantan je popravak *in cis*.

Vremenski tijekovi utroška ATP-a (nastajanja AMP-a) i aminoaciliranja za WT IleRS te mutante H333A i T246A/H333A prikazani su na slici 4.18, a radi jednostavnijeg tumačenja

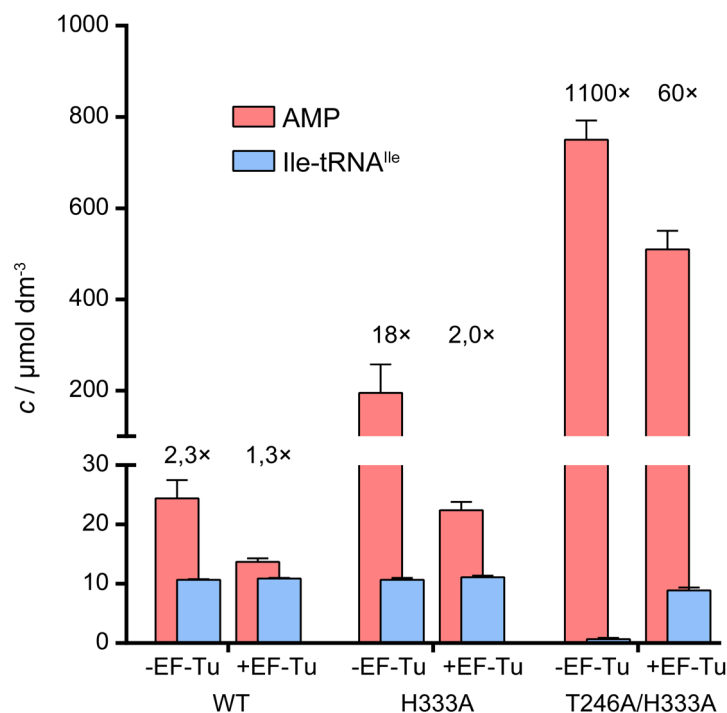
prikazanih rezultata, na slici 4.19 prikazane su samo koncentracije AMP-a i Ile-tRNA^{Ile} u točki $t = 5$ min. Iz dobivenih rezultata proizlazi nekoliko zaključaka. Prvo, bez dodanog EF-Tu za svaku varijantu IleRS omjer $[AMP]/[Ile-tRNA^{Ile}]$ veći je od 1. Za WT, H333A i T246A/H333A omjeri redom iznose 2,3, 18 i 1100. Dakle, sva tri enzima pokazuju nestehiometrijski utrošak ATP-a što je u skladu s očekivanjima s obzirom na brzine hidrolize Ile-tRNA^{Ile} izmjerene u uvjetima jednog kruga (vidi prije). U skladu s izmjerenim brzinama je i količina utrošenog ATP-a koja je daleko najveća za T246A/H333A, nekoliko puta manja za H333A i daleko najmanja za WT IleRS (razlike u skalama y-osi na slici 4.18 istaknute su drugačijim pozadinskim bojama). Drugo, WT očekivano i H333A mutant iznenađujuće akumuliraju Ile-tRNA^{Ile}. Unatoč istom opažanju u uvjetima ustaljenog stanja, akumulacija uz H333A je neočekivana zbog relativno brze hidrolize Ile-tRNA^{Ile} ($1,04\text{ s}^{-1}$) i velikog utroška ATP-a. No, izgleda kako hidroliza ipak nije dovoljno brza da bi nadvladala aminoaciliranje. Također očekivano, mutant T246A/H333A, koji Ile-tRNA^{Ile} hidrolizira s brzinom 14 s^{-1} , ne akumulira istu. Doduše, pri samom početku reakcije, opaža se određeni maksimum koncentracije akumulirane Ile-tRNA^{Ile} (cca. $3,5\text{ }\mu\text{mol/dm}^3$) što je vjerojatno posljedica uspostavljanja ravnoteže između aminoaciliranja i hidrolize Ile-tRNA^{Ile}, nakon čega prevladava potonja. Dodatak EF-Tu, u svim slučajevima, smanjuje utrošak ATP-a (slika 4.18), dok promjena na razini Ile-tRNA^{Ile} (veća akumulacija) postoji samo u slučaju T246A/H333A. Važno je spomenuti kako promjene u aminoaciliranju u slučaju WT i H333A IleRS nema jer je maksimalni plato već dosegnut bez EF-Tu, a ne jer EF-Tu u njihovom slučaju ne štiti Ile-tRNA^{Ile}. Dapače, već je smanjenje utroška ATP-a indirektni pokazatelj da EF-Tu doista štiti Ile-tRNA^{Ile} od hidrolize, jedino što je kod T246A/H333A to dodatno potkrepljeno višim aminoacilacijskim platoom. Posljedica ovih promjena je smanjenje omjera $[AMP]/[Ile-tRNA^{Ile}]$ u sva tri slučaja (slika 4.19), a efekt očekivano korelira s brzinom hidrolize Ile-tRNA^{Ile} (1,8 puta manji za WT, 9 za H333A i 18 za T246A/H333A). Dakle, ovi rezultati sugeriraju kako se hidroliza Ile-tRNA^{Ile} odvija *in trans* što je prvo takvo opažanje na nekoj aaRS razreda I. Vrijedi komentirati i opažanje da hidroliza Ile-tRNA^{Ile} nije u potpunosti ugašena dodatkom EF-Tu kod T246A/H333A mutanta. Dva najvjerojatnija objašnjenja su, i) EF-Tu ne može posve kompetirati brzoj hidrolizi te ii) dio popravka se odvija *in cis* na što dodatak EF-Tu ne može utjecati.

Iz opisanih rezultata uslijedila su dva nova pitanja na koja, ovaj rad pokušava odgovoriti. Prvo pitanje je utječe li brzina hidrolize pripadnog para Ile-tRNA^{Ile} na rast stanica?

Ono proizlazi iz neobičnog opažanja da u *in vivo*-simulirajućim uvjetima (dodatak EF-Tu i visoka koncentracija IleRS) oba mutanta uspijevaju akumulirati Ile-tRNA^{Ile}, vršiti svoju staničnu funkciju, na sličnoj razini kao WT IleRS, usprkos brznoj hidrolizi u mjestu za popravak pogreške. Drugo pitanje istražuje je li popravak *in trans* specifičan: i) samo za hidrolizu Ile-tRNA^{Ile}, ii) samo za IleRS ili iii) postoji i kod ostalih aaRS razreda Ia?



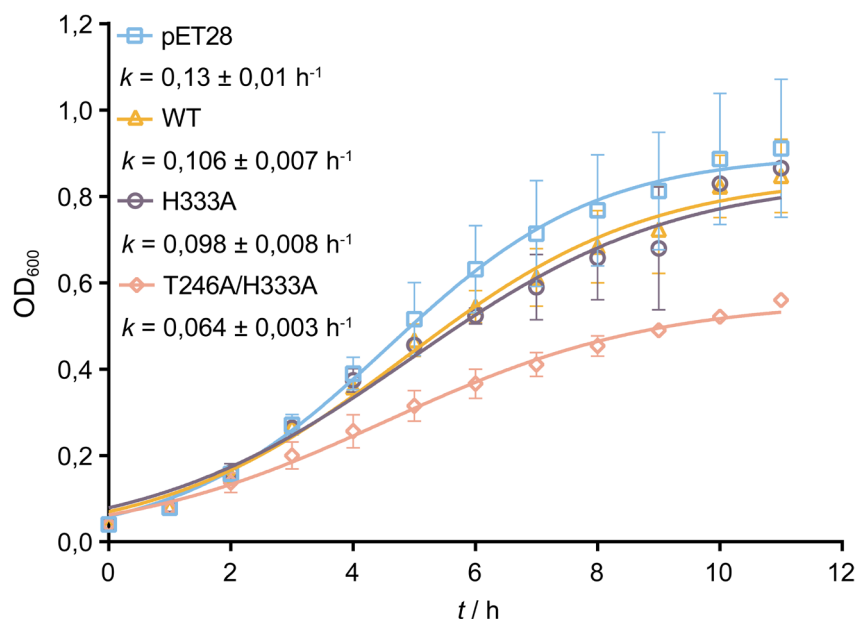
Slika 4.18. Utrošak ATP-a praćen kroz nastajanje AMP-a (gore) i aminoaciliranje tRNA^{Ile} izoleucinom (dolje) uz dodatak (plavi kvadratići) i bez (rozi kružići) EF-Tu za WT, H333A i T246A/H333A IleRS. Pozadinskim bojama istaknuta je velika razlika u skali kod utroška ATP-a uz različite mutante. Prikazane vrijednosti izražene su kao srednja vrijednost ± standardna pogreška dobivene iz najmanje tri neovisna eksperimenta.



Slika 4.19. Količina nastalog AMP-a (plavo) i Ile-tRNA^{Ile} (rozo) nakon 5 minuta za WT, H333A i T246A/H333A IleRS. Brojevi iznad stupaca predstavljaju omjer [AMP]/[Ile-tRNA^{Ile}]. Prikazane vrijednosti izražene su kao srednja vrijednost ± standardna pogreška dobivene iz najmanje tri neovisna eksperimenta.

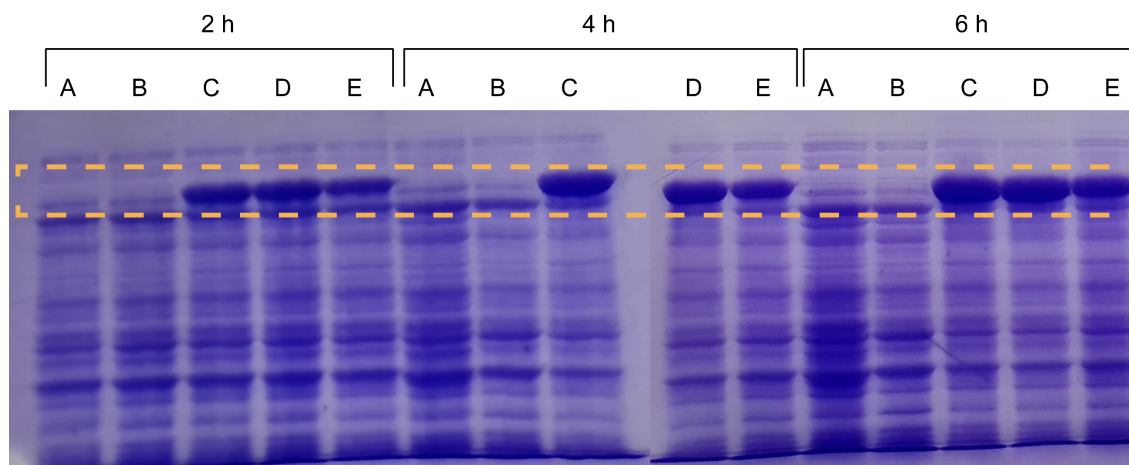
4.9. Suvišni obrtaj ATP-a uslijed hidrolize Ile-tRNA^{Ile} usporava rast stanica

Da bi se istražilo do koje mjere hidroliza pripadnog para Ile-tRNA^{Ile} utječe na rast bakterijskih stanica, praćen je uzgoj *E. coli* uz ekspresiju različitih varijanti IleRS. Ukratko, u bakterijski soj *E. coli* BL21(DE3) ubačen je plazmid pET28b u kojemu se nalazi gen za IleRS (WT, H333A ili T246A/H333A) pod kontrolom T7 inducibilnog promotora. Ekspresija proteina potaknuta je dodatkom IPTG-a do konačne koncentracije 100 μmol/dm³. Rast stanica praćen je tijekom 12 h mjerenjem optičke gustoće pri $\lambda = 600$ nm, a rezultati su prikazani na slici 4.20. Kao kontrola korišten je prazan pET28b plazmid, odnosno plazmid uz koji neće doći do ekspresije proteina.



Slika 4.20. Krivulje rasta različitih *E. coli* uz eksprimirane varijante IleRS. pET28 predstavlja kontrolni uzgoj – soj s praznim pET28b plazmidom i dodatkom $100 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ IPTG-a. Prikazane vrijednosti izražene su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška dobivene iz najmanje tri neovisna eksperimenta.

Rezultati pokazuju kako bakterije s eksprimiranim WT i H333A IleRS rastu gotovo jednakom brzinom (koeficijenti brzine rasta su WT – 0.106 h^{-1} i H333A – 0.098 h^{-1}). S druge strane, soj s eksprimiranim dvostrukim mutantom T2446A/H333A raste s koeficijentom brzine 0.064 h^{-1} , što je čak 40 % sporije nego WT, odnosno 35 % sporije od H333A mutanta. Koeficijent brzine rasta kontrolnog soja iznosio je 0.13 h^{-1} i ukazuje na to da sama ekspresija proteina ne uzrokuje značajno usporavanje rasta stanica. Radi provjere razine ekspresije pojedinih varijanti, u određenim vremenskim točkama uzimani su alikvoti bakterijskih kultura te su analizirani SDS-PAGE-om čiji su rezultati prikazani na slici 4.21. Iz prikazanog gela vidljivo je kako je razina ekspresije T246A/H333A nešto manja nego što je u slučaju WT i H333A. To sugerira kako je opaženi efekt dvostrukog mutanta potencijalno i podcijenjen u usporedbi s WT i H333A IleRS. Treba istaknuti jedan nezanemariv nedostatak ovog eksperimentalnog postava. Radi se o tome da svi analizirani sojevi u sebi i dalje nose endogeni gen za WT IleRS koji eksprimiraju na standardnoj bazalnoj razini i koji normalno sudjeluje u staničnim procesima. Nažalost, s obzirom na to da je taj gen dio esencijalnog operona, direktno unošenje mutacija u genom je u ovom slučaju tehnički gotovo neizvedivo. Ipak, njegova razina je izrazito mala u usporedbi s eksprimiranim proteinima te stoga puno manje doprinosi rastu stanice i nema izraziti utjecaj na rezultate.



Slika 4.21. SDS-PAGE gel s nanesenim alikvotima stanica tijekom uzgoja uz ekspresiju raznih varijanti IleRS radi usporedbe razine ekspresije proteina. U jažicama se redom nalaze sojevi s:

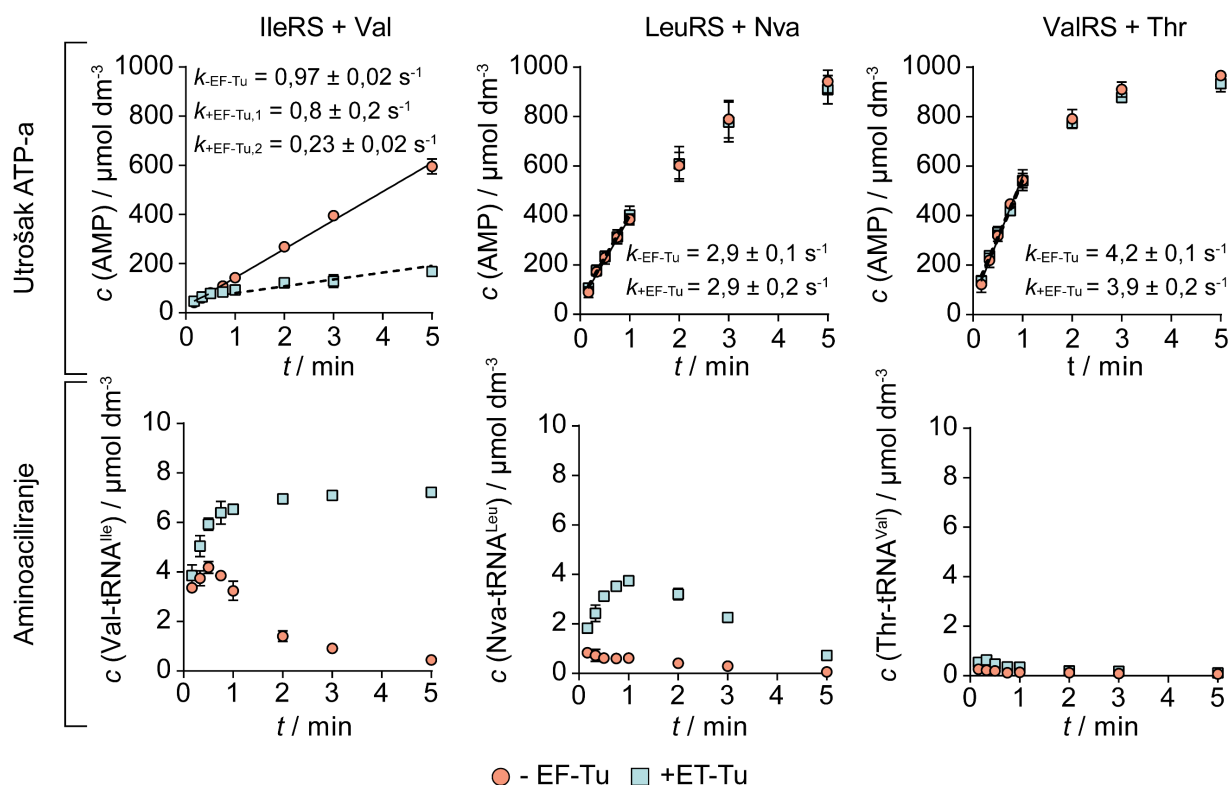
A) praznim pET28b plazmidom bez dodatka IPTG-a, B) praznim pET28b plazmidom uz dodatak $100 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ IPTG-a, C) eksprimiranim WT IleRS, D) eksprimiranim IleRS H333A i E) eksprimiranim IleRS T246A/H333A. U narančastom iscrtkanom pravokutniku uokvirena je vrpca IleRS.

Rezultati pokazuju kako dvostruki mutant T246A/H333A uzrokuje sporiji rast bakterije *E. coli*. Kako je u prethodnom poglavlju pokazano da u *in vivo*-simulirajućim uvjetima (stanične koncentracije IleRS i tRNA^{Ile} te prisutnost EF-Tu) ovaj mutant može gotovo normalno akumulirati Ile- tRNA^{Ile} , najvjerojatnije objašnjenje jest da do usporavanja rasta dolazi zbog velikog uzaludnog utroška ATP-a. Drugim riječima, T246A/H333A troši znatno više ATP-a (glavni stanični oblik energije) da bi sintetizirao istu količinu Ile- tRNA^{Ile} (supstrat biosinteze proteina) nego što to rade WT i H333A, što dovodi do sporijeg rasta bakterijske kulture. To sugerira kako je evolucija prema usporavanju hidrolize pripadnog para Ile- tRNA^{Ile} bila ponajviše gonjena potrebom za smanjenjem broja suvišnih ciklusa utroška ATP-a.

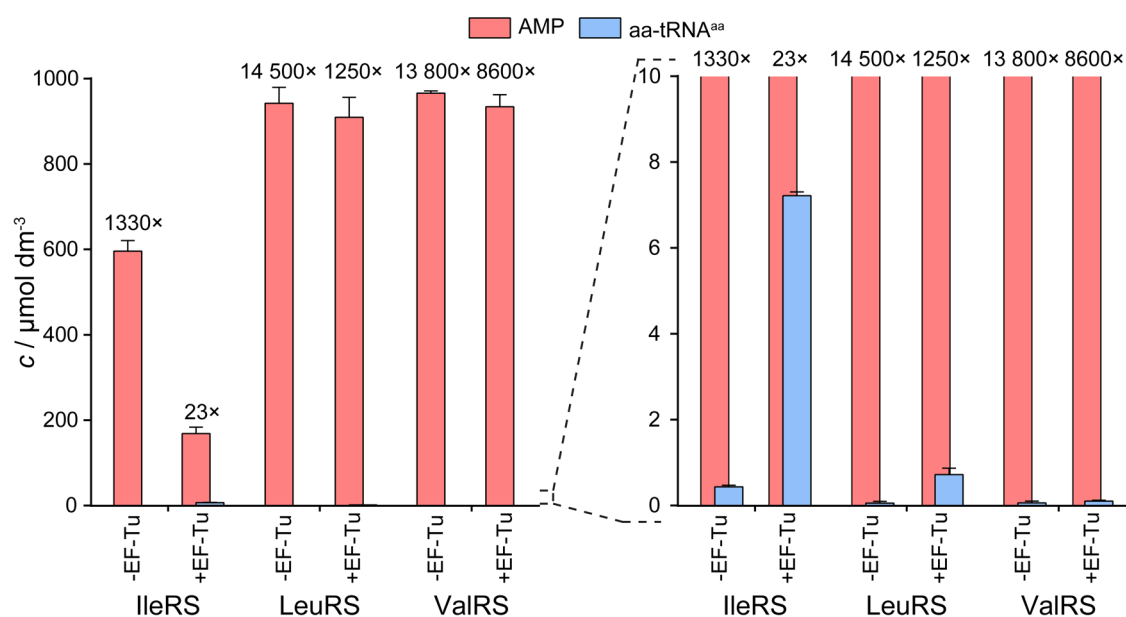
4.10. Isoleucil-tRNA-sintetaza koristi *in trans* popravak

Posljednji problem kojim se ovaj rad bavi jest pitanje popravka *in trans* kod aaRS razreda Ia. Naime, u Literaturnom pregledu spomenuto je kako je popravak *in trans* do sada pokazan jedino za aaRS razreda II. U ovom radu je pokazano kako IleRS primjenjuje *in trans* popravak u slučaju hidrolize pripadnog para Ile- tRNA^{Ile} . Stoga, nameću se dva pitanja, i) primjenjuje li IleRS popravak *in trans* i uz misaminoacilirane tRNA^{Ile} koje su zapravo pravi supstrati te reakcije te ii) koriste li ostale aaRS razreda Ia, odnosno LeuRS i ValRS, popravak *in trans*?

Eksperimentalni postav i ideja u pozadini kinetičkog eksperimenta gotovo su identični onome opisanom u poglavlju 4.8. Najvažnija razlika odnosi se na aminokiseline korištene u eksperimentima. Ovaj put korištene su aminokiseline za koje je prethodno pokazano kako su najveća prijetnja točnosti pojedinom enzimu: za IleRS korišten je Val, za LeuRS Nva, a za ValRS Thr. Vremenski tijekovi utroška ATP-a i nastajanja misaminoacilirane tRNA^{aa} prikazani su na slici 4.22, a koncentracije AMP-a i aa-tRNA^{aa} u točki $t = 5$ min na slici 4.23.



Slika 4.22 Utrošak ATP-a prikazan kao nastajanje AMP-a (gore) i misaminoaciliranje tRNA s neprikladnim aminokiselinama (dolje) uz dodatak (plavi kvadratići) i bez (rozi kružići) EF-Tu za IleRS, LeuRS i ValRS. Prikazane vrijednosti izražene su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška dobivene iz najmanje tri neovisna eksperimenta.



Slika 4.23. Količina nastalog AMP-a (plavo) i Ile-tRNA^{Ile} (rozo) nakon 5 minuta za IleRS, LeuRS i ValRS. Brojevi iznad stupaca predstavljaju omjer [AMP]/[aa-tRNA^{aa}]. Prikazane vrijednosti izražene su kao srednja vrijednost ± standardna pogreška dobivene iz najmanje tri neovisna eksperimenta.

Radi jednostavnosti rezultate je najbolje analizirati enzim po enzim. U slučaju IleRS vidljivo je kako dodatak EF-Tu usporava utrošak ATP-a te se povećava količina akumulirane Val-tRNA^{Ile}. Iz toga slijedi i značajno smanjenje (oko 60 puta) omjera [AMP]/[Val-tRNA^{Ile}], što sugerira kako IleRS i uz Val temeljno primjenjuje popravak *in trans*.

Sljedeći enzim bio je LeuRS kod kojega nema razlike u utrošku ATP-a bez i uz dodatak EF-Tu. No, uz dodatak EF-Tu ipak postoji određena mala akumulacija Nva-tRNA^{Leu} koja nestaje s vremenom. Nestajanje postaje značajnije kako se količina dostupnog ATP-a smanjuje pa hidroliza prevladava aminoacilaciju. Unatoč jednakom utrošku ATP-a, povećana akumulacija Nva-tRNA^{Leu} uz dodatak EF-Tu je razlog zašto se opaža smanjenje omjera [AMP]/[Nva-tRNA^{Leu}] od cca. 12 puta. Ipak, tako visoka akumulacija Nva-tRNA^{Leu} usprkos izrazito velikoj brzini njene hidrolize (228 s⁻¹ [31]) pobudila je sumnju povodom čega je napravljen eksperiment kojim je provjerena kontaminacija aminokiseline. Rezultati tog eksperimenta ukazuju na to kako je komercijalni Nva vjerojatno djelomično kontaminiran pripadnim Leu te je stvarni utjecaj EF-Tu vjerojatno manji od opaženog. Provjera kontaminacije pokazala je kako se korištenjem 3 puta manje koncentracije Nva (30 vs 10 mmol/dm³) postiže 2-3 puta manji plato nastale aa-tRNA^{Leu} (3,7-4,0 vs 1,5-1,8 μmol/dm³)

usprkos velikom suvišku aminokiseline. Unatoč tome, na temelju utroška ATP-a jasno je kako se LeuRS temeljno oslanja na popravak *in cis*, a popravak *in trans*, ako postoji, odvija se u puno manjoj mjeri.

U konačnici, utrošak ATP-a uz ValRS i Thr pokazuje isti trend kao i za LeuRS, odnosno nema razlike ovisno o dodatku EF-Tu. Uz dodatak EF-Tu postoji vrlo malo povećanje akumulirane Thr-tRNA^{Val} zbog koje se opaža smanjenje omjera $[AMP]/[Thr-tRNA^{Val}]$, ali svega približno 1,5 puta. Za razliku od Nva, pokazano je da Thr nije kontaminiran, ali u sustavu se ipak nalazila određena količina Val zbog supročišćavanja u sintetskom mjestu ValRS. Naime, unatoč dodatnom pročišćavanju, procjenjuje se kako je oko 20 % ValRS kontaminirano Val ili Val-AMP-om što odgovara količini nastale aa-tRNA^{Val}. Kao i kod LeuRS, kontaminacija više dolazi do izražaja uz EF-Tu koji može zaštititi nastalu i disociranu pripadnu aa-tRNA^{aa}. Usprkos kontaminaciji, jednak utrošak ATP-a te vrlo mala razlika u omjerima $[AMP]/[Thr-tRNA^{Val}]$ uz i bez dodatka EF-Tu nedvojbeno ukazuju na to da je kod ValRS dominantan popravak *in cis*.

Unatoč određenim nedostacima ovog kinetičkog postava, osobito uslijed kontaminacija, pokazano je da je IleRS jedina aaRS razreda Ia koja temeljno popravak pogreške nakon prijenosa vrši *in trans* mehanizmom, dok se njeni najbliži srodnici, LeuRS i ValRS, temeljno oslanjaju na popravak *in cis*.

§ 5. RASPRAVA

5.1. Specifičnost sintetskog mjesta izoleucil-tRNA-sintetaze

U sklopu ovog rada detaljno su okarakterizirane sintetske reakcije IleRS uz široki spektar aminokiselinskih supstrata različitih fizikalno-kemijskih svojstava. Iz prethodnih istraživanja bilo je poznato kako su aminokiseline Val i Nva najveća prijetnja točnosti IleRS što je posljedica toga da se radi o vrlo sličnim supstratima pripadnom Ile. Oba su od Ile manja za jednu metilensku/metilnu skupinu. Sada je pokazano kako IleRS može aktivirati i ostale aminokiseline Ala, Abu, Leu, Nle, Met, Thr, Ser, F₂Abu i F₃Abu. Ipak, sve istraživane aminokiseline (izuzev djelomično Met) loši su supstrati reakcije aktivacije, diskriminacijski faktori uglavnom se kreću u rasponu od 10^3 do 10^6 . To je daleko više od 3300 za koji se smatra da predstavlja granični diskriminacijski faktor iznad kojega aminokiselina više ne predstavlja prijetnju točnosti aaRS. Unatoč tome što izgleda kako ovi rezultati nisu biološki relevantni, oni daju nove spoznaje o načinima ostvarivanja specifičnosti u sintetskom mjestu IleRS.

Utjecajem smanjenja supstrata na enzimsku specifičnost bavio se i Pauling koji je izračunao kako gubitak jedne metilenske skupine povećava diskriminacijski faktor 3-19 puta [164]. Istraživanja na Nva i Val pokazala su kako je kod IleRS taj faktor veći za barem red veličine i iznosi oko 200. U ovom radu pokazano je kako gubitak sljedeće metilenske/metilne skupine (Abu) doprinosi diskriminacijskom faktoru oko 50 puta. Gubitak još jedne metilne skupine (Ala) povećava diskriminacijski faktor još 16 puta. Oba rezultata su znatno više u skladu s Paulingovim predviđanjima nego što je to slučaj kod Val i Nva. Dakle, doprinos vezanju u sintetsko mjesto IleRS nije jednak za svaku metilensku/metilnu skupinu i postaje sve manji sa svakom sljedećom skupinom. Za kraj, treba spomenuti kako je za sve manje supstrate opažen minimalni efekt na obrtni broj te većina diskriminacije proizlazi iz povećanja Michaelisove konstante. Ako se obrtni broj poistovjeti s koeficijentom brzine reakcije, a Michaelisova konstanta s prividnom mjerom afiniteta prema supstratu, tada se može zaključiti kako prepoznavanje metilenske/metilne skupine ima mali utjecaj na samu katalizu. To je donekle očekivano jer se kataliza odvija na karboksilnom dijelu aminokiseline.

Prethodna istraživanja su pokazala kako drugačija razgranatost supstrata uslijed steričkih sudara rezultira izrazito velikim diskriminacijskim faktorima. Ogledni primjerak je LeuRS u čijem je sintetskom mjestu Ile diskriminiran faktorom 31 000 [79]. Slično se opaža i prilikom povećanja supstrata pa tako AlaRS diskriminira Abu (za jednu metilensku skupinu veći od Ala) faktorom 17 000 [78]. U prosjeku, diskriminacijski faktor prouzročen steričkim sudarima kod aaRS iznosi 19 000 [18]. Stoga je posve neobično da IleRS diskriminira Met i Nle faktorima samo 2200, odnosno 10 400. Svakako treba imati na umu da postoji mogućnost kako su diskriminacijski faktori zapravo veći ukoliko postoji kontaminacija pripadnim izoleucinom. Iako diskriminacijski faktor i ovdje temeljno proizlazi iz povećanja Michaelisove konstante, veći je efekt na obrtni broj nego kod manjih aminokiselina. Ovi rezultati upućuju na to da je sintetsko mjesto dovoljno fleksibilno da se u njega smjeste i drugačije razgranati (linearni) bočni ogranci, ali pod cijenu mispozicioniranja supstrata i usporavanja brzine reakcije.

Prisutnost hidroksilne skupine kod nepripadnih supstrata aaRS može imati zanimljive efekte. Jedan od najpoznatijih je takozvani hidroksilni, odnosno serinski paradoks [165]. Prethodno je spomenuto kako AlaRS vrlo dobro diskriminira Abu koji je veći za jednu metilnu skupinu. S druge strane, Ser koji je veći za jednu hidroksilnu skupinu predstavlja najveću prijetnju točnosti AlaRS i diskriminiran je faktorom svega 500 [78]. Ovaj paradoks posljedica je vodikove veze koju hidroksilna skupina Ser ostvaruje s izrazito očuvanim Asp koji služi pozicioniranju α -amino skupine supstrata. Ipak, kod IleRS se ne opaža takav paradoks i Thr, a osobito Ser dobro su diskriminirani. Ser je daleko najbolje diskriminirana analizirana aminokiselina (diskriminacijski faktor oko 10^6). To sugerira kako hidroksilna skupina Ser ostvaruje odbijajuće interakcije u aktivnom mjestu. Thr je značajno manje diskriminiran (diskriminacijski faktor oko 20 200) od Ser, ali i dalje znatno iznad razine koja bi predstavljala prijetnju točnosti. Ako se usporede diskriminacijski faktori Thr i Ser s njihovim izosteričkim analogima Val (160) i Abu (10 400), može se zaključiti kako uvođenje hidroksilne na mjesto metilne skupine rezultira povećanjem diskriminacijskog faktora 100 puta.

Posljednji istraživani efekt bio je utjecaj hidrofobnosti supstrata na prepoznavanje u sintetskom mjestu. U tu svrhu korišteni su di- i tri- γ -fluorirani analozi Abu. Fluoriranje povećava hidrofobnost pa je tako F₃Abu veličinom i hidrofobnošću analogan Val, dok se F₂Abu nalazi između Abu i Val [162]. Ipak, obje aminokiseline su bolje diskriminirane od očekivanog.

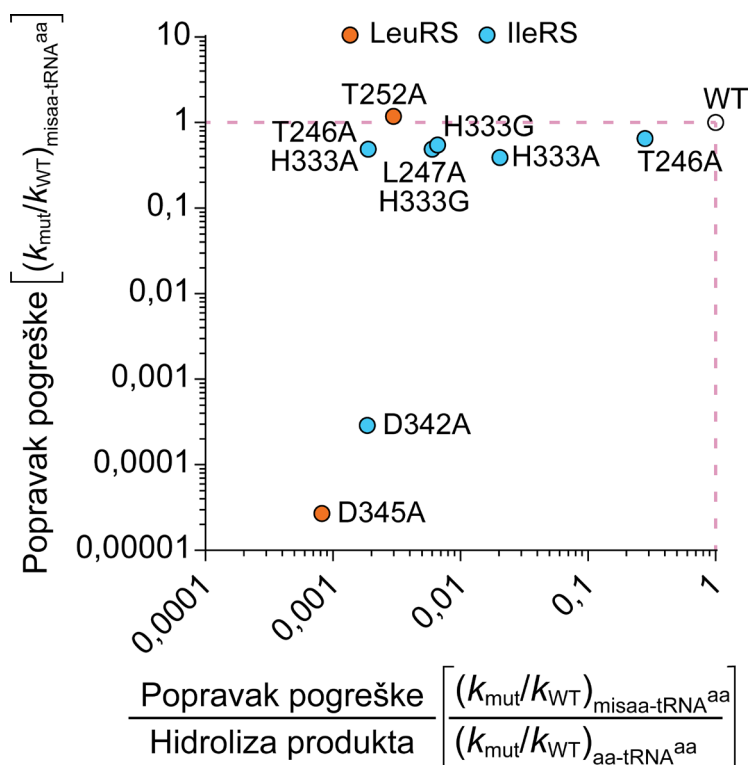
F₂Abu je 3,5 bolje diskriminiran nego Abu dok je F₃Abu čak 430 puta bolje diskriminiran od Val. U odnosu na Abu, dodatna diskriminacija fluoriranih aminokiselina proizlazi iz smanjenja obrtnog broja. F₂Abu i F₃Abu analizirani su i u reakcijama LeuRS i ValRS, a kod njih je efekt nešto drugačiji. Kod LeuRS pokazuju slične diskriminacijske faktore kao i kod Abu, s time da imaju značajno manji obrtni broj, ali se vežu s većim afinitetom (niža Michaelisova konstanta). Kod ValRS je F₃Abu još 100 puta lošiji od Abu s podjednakim efektom na oba kinetička parametra. Različita opažanja kod IleRS, LeuRS i ValRS vjerojatno su posljedica osobite prirode fluora. Naime, fluor je izrazito elektronegativan element vrlo male polarizabilnosti, a zamjena vodika fluorom uzrokuje obrat i jačanje dipolnog momenta C-H, odnosno C-F veze. U slučaju vezanja fluoriranih spojeva na proteine, često se koristi i pojam polarne hidrofobnosti [166]. Ova pojava je posljedica mogućnosti da fluor ostvaruje usmjerene elektrostatske interakcije, dok istovremeno fluorougljici pokazuju veću hidrofobnost od ugljikovodika [167]. Za kraj, može se zaključiti kako hidrofobnost nije glavna sila koja usmjerava vezanje supstrata u aktivno mjesto IleRS, ali zbog dvojne prirode fluora vezanje fluoriranih aminokiselina može izrazito ovisiti od slučaja do slučaja.

Unatoč vrlo širokom spektru „prijetnji“ koje postoje u stanici, sintetsko mjesto IleRS razvilo je vrlo dobre mehanizme prepoznavanja supstrata. Izuzev Nva, Val i potencijalno Met, sve aminokiseline dobro su diskriminirane i ne predstavljaju prijetnju točnosti IleRS.

5.2. Specifičnost korektivnog mjesta IleRS

Za razliku od sintetskog mjesta, mjesto za popravak pogreške pokazuje značajno širu supstratnu selektivnost. Neovisno o njihovim različitim fizikalno-kemijskim svojstvima, sve pripravljene misaminoacilirane tRNA^{Ile} izrazito su brzo hidrolizirane. Jedina iznimka je dakako pripadna Ile-tRNA^{Ile}. Sprečavanje hidrolize pripadne Ile-tRNA^{Ile} u korektivnom mjestu gonjeno je interakcijama s Thr246 i temeljno His333. Iz ovih opažanja proizlazi zaključak kako se korektivno mjesto oslanja na negativnu selekciju/negativnu katalizu. Koncept negativne selekcije/katalize kaže kako se kroz pozitivne interakcije sa supstratom i/ili prijelaznim stanjem može postići samo određena razina enzimske specifičnosti. Kako bi se osigurala što uža selektivnost, odnosno što specifičnije odbijanje neželjenih supstrata [145] te sprječavanje neželjenih reakcija (alternativnih reakcija kojima može podleći supstrat u aktivnom mjestu) [168,169], enzimi su evolucijski razvili posebne bočne ogranke kojima ostvaruju ciljane negativne interakcije. U idealnom slučaju, negativni element prepoznavanja je bočni ogranak

koji ne utječe na vezanje željenog supstrata ili na katalizu željene reakcije, već ostvaruje isključivo negativne interakcije kojima sprečava vezanje neprikladnih supstrata ili onemogućava odvijanje alternativnih reakcija. S druge strane, klasični katalitički bočni ogranak utječe i na željenu i neželjenu reakciju, odnosno doprinosi vezanju prikladnog i neprikladnog supstrata te odvijanju željene reakcija, ali i svih alternativnih neželjenih reakcija [168]. Priroda bočnog ogranka može se iščitati iz grafa aktivnosti i specifičnosti (slika 5.1).



Slika 5.1. Utjecaj mutacije na specifičnost i aktivnost bočnih ogranaka korektivnog mjesta IleRS i LeuRS. Aktivnost popravka pogreške, prikazana na y-osi, izražena je kao omjer koeficijenata brzine hidrolize misaminoacilirane tRNA za mutant i divlji tip enzima. Aktivnost hidrolize produkta, odnosno neželjene hidrolize pripadno aminoacilirane tRNA izražena je kao omjer koeficijenata brzine hidrolize pripadne aa-tRNA^{aa} za mutant i divlji tip enzima. Specifičnost enzima, prikazana na x-osi, izražena je kao omjer aktivnosti popravka pogreške i hidrolize produkta, a govori koliko određena mutacija utječe na promjenu specifičnosti prema supstratu.

Na primjeru IleRS i LeuRS pokazano je kako mutacije Thr246 i His333 kod IleRS te Thr252 kod LeuRS utječu isključivo na specifičnost (ubrzavanje reakcije hidrolize pripadne aa-tRNA^{aa}) korektivnog mjesta dok je aktivnost (hidroliza misaminoacilirane tRNA^{aa}) gotovo nepromijenjena. U prilog ovoj hipotezi ide činjenica da su kinetička, termodinamička i računalna istraživanja LeuRS pokazala kako Thr252 ima ulogu mispozicioniranja pripadne Leu-tRNA^{Leu} u aktivnom mjestu što uzrokuje vezanje u katalitički neproduktivnoj konformaciji

[31]. S druge strane, mutacija Asp342Ala (IleRS) i Asp345Ala (LeuRS) ima značajan utjecaj i u reakciji popravka pogreške i u hidrolizi pripadnog para aa-tRNA^{aa} što potvrđuje opću katalitičku ulogu tih Asp. Iz kristalnih struktura poznato je kako ti konzervirani Asp imaju ulogu pozicioniranja α -amino skupine aminokiselinskog dijela (mis)aminoacilirane tRNA. Iako nedostaju parametri za ValRS, ovi rezultati sugeriraju kako je negativna selekcija prema pripadnom paru aa-tRNA^{aa} zajedničko svojstvo aaRS razreda Ia. Zašto baš negativna selekcija, a ne bolje prepoznavanje ciljanih supstrata mjesta za popravak pogreške IleRS – Val-tRNA^{Ile} i Nva-tRNA^{Ile}? Najjednostavnije objašnjenje kaže kako IleRS nije mogla postići zadovoljavajuću razinu specifičnosti prema Val-tRNA^{Ile} i Nva-tRNA^{Ile} u odnosu na Ile-tRNA^{Ile} isključivo na temelju pozitivnih interakcija. Ako se tome pridoda činjenica da ne postoji negativni evolucijski pritisak za usporavanje hidrolize tRNA^{Ile} aminoacilirane neprikladnim aminokiselinama koje ne predstavljaju prijetnju točnosti IleRS, negativna selekcija postavlja se kao najelegantnije rješenje. Izuzev slične brzine hidrolize Val-tRNA^{Ile} i Nva-tRNA^{Ile}, i sve ostale misaa-tRNA^{Ile} bivaju hidrolizirane sličnom brzinom. Zašto? Vjerojatni odgovor na to pitanje leži u činjenici da je supstrat korektivnog mjesta aminokiselina vezana na tRNA^{Ile}. Veliko tijelo tRNA^{Ile} ostvaruje veliki broj interakcija s enzimom i tako u puno većoj mjeri doprinosi ukupnom afinitetu vezanja misaa-tRNA^{Ile} na IleRS nego što to čini aminokiselinski dio supstrata, kao što je pokazano za vezanje Nva- i Leu-tRNA^{Leu} na LeuRS [31]. Nadalje, mehanizam reakcije hidrolize oslanja se na kinetiku potpomognutu supstratom, odnosno tRNA^{Ile} direktno sudjeluje u reakciji [24] što zahtijeva njeno precizno pozicioniranje neovisno o tome koja aminokiselina je na nju vezana, dokle god to nije Ile.

Kako je došlo do pojavljivanja domene za popravak pogreške? Za razumijevanje tog problema potrebno je promotriti zajednički predak IleRS, LeuRS i ValRS – Ile/Leu/ValRS. S obzirom na to da sva tri enzima dijele vrlo sličnu strukturu, pretpostavlja se kako je u pre-LUCA uvjetima postojao njihov zajednički predak Ile/Leu/ValRS koji se sastojao samo od katalitičke srži [170–172], a za zadatak je imao statistički pripajati jednu od te tri razgranate hidrofobne aminokiseline s tRNA. Kako su u tim uvjetima Nva i Abu bile među najzastupljenijim aminokiselinama [21] moguće je za zamisliti kako su i one podilazile reakciji aminoaciliranja. Opažanje da sva tri današnja enzima (IleRS, LeuRS i ValRS) hidroliziraju Nva-AMP sugerira kako je već Ile/Leu/ValRS koristila popravak pogreške prije prijenosa kako bi spriječila ulazak Nva u biosintezu proteina [20,131]. Pod pretpostavkom da je s vremenom translacija postajala brža i točnija, popravak prije prijenosa nije bio dostatan za uspješno eliminaciju Nva i Abu te

je Ile/Leu/ValRS evolucijski usvojila domenu za popravak pogreške nakon prijenosa. Valja napomenuti kako potreba za eliminacijom Nva nije isključivo posljedica učestalosti pri tadašnjim uvjetima, već i činjenice da je njegova ugradnja na izoleucinske pozicije u proteinu toksičnija od ugradnje Val na ista mjesta [20]. Nadalje, poznato je kako sve tri aaRS razreda Ia hidroliziraju Nva-tRNA^{aa}. Dok kod IleRS [20] i LeuRS [31] zbog nedostatne eliminacije Nva u sintetskom mjestu (diskriminacijski faktor < 3300) postoji potreba za tom aktivnošću, kod ValRS [20] to nije slučaj što sugerira da se radi o latentnoj ancestralnoj aktivnosti. Isto se može pretpostaviti i za hidrolizu Abu-tRNA^{Ile} uz IleRS koja je pokazana u sklopu ovog rada. Sve navedeno vodi k zaključku kako je domena za popravak pogreške usvojena od strane Ile/Leu/ValRS prije duplikacije i divergencije na zasebne IleRS, LeuRS i ValRS, a vjerojatno s ciljem eliminacije Nva i potencijalno Abu iz puta biosinteze proteina.

Iako je početna evolucija mjesta za popravak pogreške nedvojbeno gonjena potrebom za smanjenjem pogreške u aminoacilaciji, postavlja se pitanje zašto je došlo baš do razine specifičnosti koja se danas opaža? Rezultati paralelnog praćenja utroška ATP-a i nastajanja Ile-tRNA^{Ile} te *in vivo* eksperimenata sugeriraju kako bi IleRS mogla sintetizirati zadovoljavajuću količinu pripadne Ile-tRNA^{Ile} i u slučaju kada bi njena hidroliza bila znatno veća. Ipak, brža hidroliza pripadne Ile-tRNA^{Ile} praćena je povećanom potrošnjom ATP-a – glavnog staničnog oblika energije. Dakle, može se pretpostaviti kako je potreba za usporavanjem hidrolize pripadne Ile-tRNA^{Ile} proizašla uglavnom iz težnje stanice da što manje uzaludno troši energiju.

5.3. Popravak pogreške nakon prijenosa kod aminoacil-tRNA-sintetaza razreda Ia

Za kraj, ova disertacija odgovara na pitanje kako se popravak pogreške nakon prijenosa odvija kod aaRS razreda Ia? Poznata su dva oblika popravak pogreške, *in cis* i *in trans*. Potonji je dosada pokazan samo za aaRS razreda II dok se smatralo kako aaRS razreda Ia ekskluzivno koriste *in cis* popravak. Rezultati u sklopu ovog rada upućuju na suprotno i kažu kako IleRS temeljno koristi *in trans* popravak. LeuRS i ValRS temeljno se oslanjaju na *in cis* popravak, pri čemu postoji mogućnost da LeuRS koristi *in trans* u malom obujmu. Popravak *in trans* ima smisla kod aaRS razreda II koje koriste samostojeće domene za popravak pogreške, ali to nije slučaj kod IleRS. Dapače, disocijacija (mis)aminoacilirane tRNA^{Ile} prije (provjere) popravka za posljedicu može imati veću pogrešku u aminoaciliranju jer (mis)aminoaciliranu tRNA^{Ile} može vezati EF-Tu koji je zatim odvodi k ribosomu za biosintezu proteina. Osim što koristi *in*

trans popravak, IleRS se od LeuRS i ValRS razlikuje i utoliko što je kod nje popravak pogreške prije prijenosa značajan oblik popravka pogreške i doprinosi i do 30 % ukupnoj aktivnosti [23]. Upravo je postojanje *in trans* popravka potencijalno objašnjenje za tako izraženu aktivnost popravka prije prijenosa. Drugim riječima, kako bi dodatno umanjila mogućnost pogreške u aminoaciliranju prouzročenu postojanjem *in trans* popravka, IleRS je evoluirala ili zadržala postojeći popravak pogreške prije prijenosa.

U konačnici, ova disertacija postavlja i mnoga pitanja. Zašto postoji *in trans* popravak kod IleRS? Je li to inherentna posljedica interakcija IleRS i aa-tRNA^{Ile} koje vode k bržoj disocijaciji od translokacije? Ili pak postoje neki, još neotkriveni, biološki razlozi zbog kojih je IleRS specifično evolucijski razvila *in trans* popravak? Postoji li negativna selekcija u mjestu za popravak pogreške i kod ValRS? Postoji li negativna selekcija i u sintetskom mjestu IleRS čime je osigurana specifičnost veća od očekivane? Ova pitanja otvaraju nove istraživačke smjerove na koje će možda odgovoriti neki drugi radovi i neke nove disertacije.

§ 6. ZAKLJUČAK

- Jedina prijetnja točnosti aminoaciliranja IleRS u fiziološkim uvjetima su prethodno poznati Val i Nva. Ostale aminokiseline dobro su diskriminirane neovisno o njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima ili o tome jesu li mogle predstavljati prijetnju točnosti IleRS tijekom evolucije (sintetske aminokiseline su vrlo dobro diskriminirane).
- Gubitak prve metilenske/metilne skupine ima najveći utjecaj na faktor diskriminacije, a gubitak svake sljedeće skupine povećava faktor za 15-40 puta. Suprotno očekivanjima, veće/duže aminokiseline su relativno slabo diskriminirane (u odnosu na ostale aaRS), ali se za njih primjećuje veći utjecaj na obrtni broj što je vjerojatno posljedica mispozicioniranja katalitički važnih dijelova supstrata. Zamjena metilne skupine hidroksilnom doprinosi diskriminaciji faktorom 100. Povećanje hidrofobnosti supstrata fluoriranjem ne čini aminokiseline boljim supstratom u reakciji aktivacije IleRS. Zbog neobičnih svojstava fluora (polarna hidrofobnost) utjecaj fluoriranja izrazito ovisi od slučaja do slučaja (IleRS, LeuRS i ValRS pokazuju različitu diskriminaciju F_nAbu) i teško je predvidiv.
- Unatoč uspješnoj diskriminaciji sve aminokiseline su vrlo dobri supstrati korektivnog mjesta. Brzina hidrolize misaminoacilirane tRNA ne ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima aminokiseline koja je na nju vezana niti o diskriminacijskom faktoru te aminokiseline u reakciji aktivacije. Jedino pripadna Ile-tRNA^{Ile} biva sporo hidrolizirana.
- Korektivno mjesto IleRS koristi negativnu katalizu kako bi osiguralo sporu hidrolizu pripadne Ile-tRNA^{Ile}. Glavna negativna diskriminanta je His333 koji svoj maksimalni potencijal postiže u sinergiji s Thr246. Iako LeuRS također koristi negativnu selekciju, mehanizam diskriminacije kod IleRS je nešto složeniji.
- Mutanti H333A i T246A/H333A mogu akumulirati Ile-tRNA^{Ile} u *in vivo*-simulirajućim uvjetima unatoč brznoj hidrolizi iste. Pri tome mutant T246A/H333A koristi puno više ATP-a po jedinici sintetizirane Ile-tRNA^{Ile}. Prekomjerna ekspresija mutanta H333A ne utječe na rast bakterija dok prekomjerna ekspresija T246A/H333A usporava rast do 40 %. Iz svega navedenog zaključuje se da je glavna sila koja je pokretala evoluciju

specifičnosti korektivnog mjesta prema usporavanju hidrolize Ile-tRNA^{Ile} bila potreba za smanjenjem suvišnog utroška ATP-a/energije.

- U ovom radu prvi je put pokazan *in trans* popravak za neki enzim razreda Ia – IleRS. Ovaj rezultat može objasniti jedinstveno svojstvo IleRS – izražen popravak pogreške prije prijenosa unatoč tome što koristi i popravak nakon prijenosa. Ostali pripadnici razreda Ia, LeuRS i ValRS koriste *in cis* popravak pri čemu postoji mogućnost da LeuRS koristi *in trans* popravak u jako malom obujmu.

§ 7. POPIS OZNAKÂ KRATICÂ I SIMBOLÂ

Popis aminokiselina:

Simbol	Aminokiselina
Abu	α -aminobutirat
Ala (A)	Alanin
Arg (R)	Arginin
Asn (N)	Asparagin
Asp (D)	Aspartat
Cys (C)	Cistein
F ₂ Abu	γ,γ -difluoro- α -aminobutirat
F ₃ Abu	γ,γ,γ -trifluoro- α -aminobutirat
Gln (Q)	Glutamin
Glu (E)	Glutamat
Gly (G)	Glicin
His (H)	Histidin
Ile (I)	Izoleucin
Leu (L)	Leucin
Lys (K)	Lizin
Met (M)	Metionin
Nle	Norleucin
Nva	Norvalin
Phe (F)	Fenilalanin
Pro (P)	Prolin
Ser (S)	Serin
Thr (T)	Treonin
Trp (W)	Triptofan
Tyr (Y)	Tirozin
Val (V)	Valin

Popis kratica:

α -[^{32}P]ATP: ATP koji na α -položaju sadrži radioaktivni izotop fosfora ^{32}P

[^{14}C]aa: aminokiselina koja sadrži radioaktivni izotop ugljika ^{14}C

aa: aminokiselina

aa-AMP: aminoacil-adenilat

aaRS: aminoacil-tRNA-sintetaza, kratica točno određene aaRS umjesto „aa“ sadrži troslovnu ili jednoslovnu kraticu aminokiseline koju koristi kao pripadni supstrat

aa-tRNA^{aa}: aminoacilirana-tRNA

AMP: adenzin-5'-monofosfat (adenilat)

APS: amonijev persulfat

ATP: adenzin-5'-trifosfat

BSA: albumin iz goveđeg seruma, engl. *Bovine serum albumine*

CP1: engl. *Connective peptide 1*

CP2: engl. *Connective peptide 2*

CP3: engl. *Connective peptide 3*

D: dihidrouridin

D: diskriminacijski faktor

DNA: deoksiribonukleinska kiselina

DTT: ditiotreitol

EDTA: etilendiamintetraoctena kiselina

EF: elongacijski faktor

GDP: gvanozin-5'-difosfat

GTP: gvanozin-5'-trifosfat

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

Ile-AMS: 5'-*N*-[*N*-(*L*-izoleucil)sulfamoil]adenozin

IPTG: izopropil- β -tiogalaktozid

k_{cat} : obrtni broj

K_{d} : konstanta disocijacije

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

K_{M} : Michaelisova konstanta

k_{obs} : opaženi koeficijent brzine reakcije

k_{sp} : konstanta specifičnosti

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

L: lizidin

LB: Luria-Bertani medij, kompletni medij za uzgoj bakterije *Escherichia coli*

M9: minimalni medij

misaa-tRNA: misaminoacilirana-tRNA

mRNA: glasnička ribonukleinska kiselina, engl. *messenger RNA*

Ni-NTA: nikal-nitrilotriocetna kiselina

OD₆₀₀: gustoća mikrobioloških kultura, mjerena spektrofotometrijski pri $\lambda = 600$ nm

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

PEG₈₀₀₀: polietilenglikol 8000

PMSF: fenilmetilsulfonil-fluorid

P_i: ortofosfat, PO₄³⁻

PP_i: pirofosfat, P₂O₇⁴⁻

RF: faktor otpuštanja, engl. *release factor*

RNA: ribonukleinska kiselina

rRNA: ribosomska ribonukleinska kiselina

tRNA: transfer RNA

tRNA^{aa}: tRNA za određenu aminokiselinu

TCA: triklorooctena kiselina

Val2AA: 2'-amino-2'-L-valildeoksiadenozin

WT: divlji tip, engl. *wild type*

§ 8. LITERATURNI IZVORI

- [1] J. J. Perona, I. Gruic-Sovulj, *Top. Curr. Chem.* **2014**, *344*, 1–41.
- [2] G. Eriani, M. Delarue, O. Poch, J. Gangloff, D. Moras, *Nature* **1990**, *347*, 203–206.
- [3] C. M. Zhang, J. J. Perona, K. Ryu, C. Francklyn, Y.-M. M. Hou, *J. Mol. Biol.* **2006**, *361*, 300–311.
- [4] B. E. Griffin, M. Jarman, C. B. Reese, J. E. Sulston, D. R. Trentham, *J. Phys. A Math. Theor.* **1966**, *5*, 3638–3649.
- [5] J. S. Weinger, S. A. Strobel, *Biochemistry* **2006**, *45*, 5939–5948.
- [6] R. B. Loftfield, D. Vanderjagt, *Biochem. J.* **1972**, *128*, 1353–1356.
- [7] G. Nass, G. Stooffler, *Molec. Gen. Genet.* **1967**, *100*, 378–382.
- [8] R. Giege, M. Sissler, C. Florentz, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 5017–5035.
- [9] R. Giege, G. Eriani, *eLS* **2014**, DOI 10.1002/9780470015902.a0000531.pub3.
- [10] I. A. Vasil'eva, N. A. Moor, *Biochem.* **2007**, *72*, 247–263.
- [11] M. Dulic, N. Cvetesic, J. J. Perona, I. Gruic-Sovulj, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 23799–23809.
- [12] S. Cusack, A. Yaremchuk, M. Tukalo, *EMBO J.* **2000**, *19*, 2351–2361.
- [13] L. F. Silvan, J. Wang, T. A. Steitz, *Science (80-.)*. **1999**, *285*, 1074–1077.
- [14] S. Fukai, O. Nureki, S. Sekine, A. Shimada, J. Tao, D. G. Vassylyev, S. Yokoyama, *Cell* **2000**, *103*, 793–803.
- [15] T. Crepin, A. Yaremchuk, M. Tukalo, S. Cusack, *Structure* **2006**, *14*, 1511–1525.
- [16] O. Kotik-Kogan, N. Moor, D. Tworowski, M. Safro, *Structure* **2005**, *13*, 1799–1807.
- [17] J. Ling, B. R. So, S. S. Yadavalli, H. Roy, S. Shoji, K. Fredrick, K. Musier-Forsyth, M. Ibba, *Mol. Cell* **2009**, *33*, 654–660.
- [18] D. S. Tawfik, I. Gruic-Sovulj, *FEBS J.* **2020**, *287*, 1284–1305.
- [19] A. R. Fersht, *Biochemistry* **1977**, *16*, 1025–1030.
- [20] M. Bilus, M. Semajski, M. Mocibob, I. Zivkovic, N. Cvetesic, D. S. Tawfik, A. Toth-Petroczy, B. Macek, I. Gruic-Sovulj, *J. Mol. Biol.* **2019**, *431*, 1284–1297.
- [21] A. L. Weber, S. L. Miller, *J. Mol. Evol.* **1981**, *17*, 273–284.
- [22] J. Soini, C. Falschlehner, C. Liedert, J. Bernhardt, J. Vuoristo, P. Neubauer, *Microb. Cell Fact.* **2008**, *7*, 30.

- [23] M. Dulic, J. J. Perona, I. Gruic-Sovulj, *Biochemistry* **2014**, *53*, 6189–6198.
- [24] N. Cvetic, M. Bilus, I. Gruic-Sovulj, *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 13981–13991.
- [25] A. R. Fersht, C. Dingwall, *Biochemistry* **1979**, *18*, 2627–2631.
- [26] H. Roy, J. Ling, M. Irnov, M. Ibba, *EMBO J.* **2004**, *23*, 4639–4648.
- [27] R. Fukunaga, S. Fukai, R. Ishitani, O. Nureki, S. Yokoyama, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 8396–8402.
- [28] R. Fukunaga, S. Yokoyama, *J. Mol. Biol.* **2006**, *359*, 901–912.
- [29] T. L. Hendrickson, T. K. Nomanbhoy, V. De Crécy-Lagard, S. Fukai, O. Nureki, S. Yokoyama, P. Schimmel, *Mol. Cell* **2002**, *9*, 353–362.
- [30] P. O'Donoghue, Z. Luthey-Schulten, P. O. Donoghue, Z. Luthey-Schulten, *Society* **2003**, *67*, 550–573.
- [31] M. Dulic, N. Cvetic, I. Zivkovic, A. Palencia, S. Cusack, B. Bertosa, I. Gruic-Sovulj, *J. Mol. Biol.* **2017**, *430*, 1–16.
- [32] S. Bakshi, A. Siryaporn, M. Goulian, J. C. Weisshaar, *Mol. Microbiol.* **2012**, *85*, 21–38.
- [33] D. L. Nelson, M. M. Cox, *Principles of Biochemistry Lehninger*, W.H. Freeman And Company, New York, **2013**.
- [34] B. S. Schuwirth, M. A. Borovinskaya, C. W. Hau, W. Zhang, A. Vila-Sanjurjo, J. M. Holton, J. H. D. Cate, *Science (80-.)*. **2005**, *310*, 827–834.
- [35] G. W. Muth, L. Ortoleva-Donnelly, S. A. Strobel, *Science (80-.)*. **2000**, *289*, 947–950.
- [36] N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Science (80-.)*. **2000**, *289*, 905–920.
- [37] P. Nissen, J. Hansen, N. Ban, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Science (80-.)*. **2000**, *289*, 920–930.
- [38] S. Klinge, F. Voigts-Hoffmann, M. Leibundgut, S. Arpagaus, N. Ban, *Science (80-.)*. **2011**, *334*, 941–948.
- [39] T. Ahmed, Z. Yin, S. Bhushan, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–13.
- [40] B. J. Greber, P. Bieri, M. Leibundgut, A. Leitner, R. Aebersold, D. Boehringer, N. Ban, *Science (80-.)*. **2015**, *348*, 303–308.
- [41] T. A. Steitz, P. B. Moore, *Trends Biochem. Sci.* **2003**, *28*, 411–418.
- [42] D. S. Goodsell, “70S Ribosomes,” DOI 10.2210/rcsb_pdb/mom_2010_1 can be found under <https://pdb101.rcsb.org/motm/121>, **2010**.

- [43] M. V. Rodnina, *Quality Control of mRNA Decoding on the Bacterial Ribosome*, Elsevier Inc., **2012**.
- [44] M. Kozak, *Microbiol. Rev.* **1983**, *47*, 1–45.
- [45] H. W. Dickerman, E. Steers, B. G. Redfield, H. Weissbach, *J. Biol. Chem.* **1967**, *242*, 1522–1525.
- [46] M. H. de Smit, J. van Duin, *J. Mol. Biol.* **1994**, *235*, 173–184.
- [47] S. M. Studer, S. Joseph, *Mol. Cell* **2006**, *22*, 105–115.
- [48] P. P. Dennis, H. Bremer, *EcoSal Plus* **2008**, *3*, DOI 10.1128/ecosal.5.2.3.
- [49] J. M. Ogle, D. E. Brodersen, W. M. Clemons, M. J. Tarry, A. P. Carter, V. Ramakrishnan, *Science (80-.)*. **2001**, *292*, 897–902.
- [50] H. Stark, M. V. Rodnina, H. J. Wieden, F. Zemlin, W. Wintermeyer, M. Van Heel, *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9*, 849–854.
- [51] M. Valle, T. Pape, M. V Rodnina, B. Kraal, W. Wintermeyer, K. Nierhaus, R. Agrawal, J. Frank, W. Zhang, P. Penczek, V. Ramakrishnan, C. Spahn, *EMBO J.* **2002**, *21*, 3557–3567.
- [52] E. Villa, J. Sengupta, L. G. Trabuco, J. LeBarron, W. T. Baxter, T. R. Shaikh, R. A. Grassucci, P. Nissen, M. Ehrenberg, K. Schulten, J. Frank, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, *106*, 1063–1068.
- [53] D. A. Hiller, V. Singh, M. Zhong, S. A. Strobel, *Nature* **2011**, *476*, 236–239.
- [54] S. Petry, D. E. Brodersen, F. V Murphy, C. M. Dunham, M. Selmer, M. J. Tarry, A. C. Kelley, V. Ramakrishnan, *Cell* **2005**, *123*, 1255–1266.
- [55] A. Korostelev, H. Asahara, L. Lancaster, M. Laurberg, A. Hirschi, J. Zhu, S. Trakhanov, W. G. Scott, H. F. Noller, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 19684–9.
- [56] T. J. Bullwinkle, N. M. Reynolds, M. Raina, A. Moghal, E. Matsa, A. Rajkovic, H. Kayadibi, F. Fazlollahi, C. Ryan, N. Howitz, K. F. Faull, B. A. Lazazzera, M. Ibba, *Elife* **2014**, *3*, e02051.
- [57] J. W. Lee, K. Beebe, L. A. Nangle, J. Jang, C. M. Longo-Guess, S. A. Cook, M. T. Davisson, J. P. Sundberg, P. Schimmel, S. L. Ackerman, *Nature* **2006**, *443*, 50–55.
- [58] H. D. Becker, D. Kern, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 12832–12837.
- [59] J. M. Schrader, S. J. Chapman, O. C. Uhlenbeck, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 5215–5220.

- [60] N. Cvetesic, I. Akmačić, I. Gruic-Sovulj, *Croat. Chem. Acta* **2013**, 86, 73–82.
- [61] H. S. Zaher, R. Green, *Nature* **2009**, 457, 161–166.
- [62] H. S. Zaher, R. Green, *Cell* **2009**, 136, 746–62.
- [63] B. Ruan, S. Palioura, J. Sabina, L. Marvin-Guy, S. Kochhar, R. A. LaRossa, D. Soll, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, 105, 16502–16507.
- [64] H. H. Lee, M. N. Molla, C. R. Cantor, J. J. Collins, *Nature* **2010**, 467, 82–85.
- [65] M. Meyerovich, G. Mamou, S. Ben-Yehuda, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, 107, 11543–11548.
- [66] N. M. Reynolds, B. A. Lazazzera, M. Ibba, *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, 8, 849–856.
- [67] F. H. Crick, *Symp Soc Exp Biol* **1958**, 12, 138–163.
- [68] R. W. Holley, G. A. Everett, J. T. Madison, A. Zamir, *J. Biol. Chem.* **1965**, 240, 2122–2128.
- [69] R. W. Holley, J. Apgar, G. A. Everett, J. T. Madison, M. Marquisee, S. H. Merrill, J. R. Penswick, A. Zamir, *Science (80-.)*. **1965**, 147, 1462–1465.
- [70] P. P. Chan, T. M. Lowe, *Nucleic Acids Res.* **2009**, 37, 93–97.
- [71] P. P. Chan, T. M. Lowe, *Nucleic Acids Res.* **2016**, 44, D184–D189.
- [72] M. Ibba, S. Morgan, A. W. Curnow, D. R. Pridmore, U. C. Vothknecht, W. Gardner, W. Lin, C. R. Woese, D. Söll, *Science (80-.)*. **1997**, 278, 1119–1122.
- [73] A. Ambrogelly, D. Korencic, M. Ibba, *J. Bacteriol.* **2002**, 184, 4594–4600.
- [74] S. Cusack, *Nature* **1995**, 2, 824–831.
- [75] L. Ribas de Pouplana, P. Schimmel, *Cell* **2001**, 104, 191–193.
- [76] L. Aravind, V. Anantharaman, E. V. Koonin, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2002**, 48, 1–14.
- [77] M. Sprinzl, F. Cramer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1975**, 72, 3049–3053.
- [78] W. C. Tsui, A. R. Fersht, *Nucleic Acids Res.* **1981**, 9, 4627–4638.
- [79] N. Cvetesic, A. Palencia, I. Halasz, S. Cusack, I. Gruic-Sovulj, *EMBO J.* **2014**, 33, 1639–1653.
- [80] M. I. Valencia-Sánchez, A. Rodríguez-Hernández, R. Ferreira, H. A. Santamaría-Suárez, M. Arciniega, A. C. Dock-Bregeon, D. Moras, B. Beinsteiner, H. Mertens, D. Svergun, L. G. Brieba, M. Grötli, A. Torres-Larios, *J. Biol. Chem.* **2016**, 291, 14430–14446.
- [81] R. Sankaranarayanan, A. C. Dock-Bregeon, B. Rees, M. Bovee, J. Caillet, P. Romby,

- C. S. Francklyn, D. Moras, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, 7, 461–465.
- [82] R. Sankaranarayanan, A. C. Dock-Bregeon, P. Romby, J. Caillet, M. Springer, B. Rees, C. Ehresmann, B. Ehresmann, D. Moras, *Cell* **1999**, 97, 371–381.
- [83] R. Fukunaga, S. Yokoyama, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 29937–29945.
- [84] J. F. Chen, N. N. Guo, T. Li, E. D. Wang, Y. L. Wang, *Biochemistry* **2000**, 39, 6726–6731.
- [85] L. Lin, S. P. Hale, P. Schimmel, *Nature* **1996**, 384, 33–34.
- [86] Y. Hagiwara, O. Nureki, M. Tateno, *FEBS Lett.* **2009**, 583, 825–830.
- [87] Y. Hagiwara, M. J. Field, O. Nureki, M. Tateno, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 2751–2758.
- [88] M. Boero, *J. Phys. Chem. B* **2011**, 115, 12276–12286.
- [89] M. Sokabe, T. Ose, A. Nakamura, K. Tokunaga, O. Nureki, M. Yao, I. Tanaka, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, 106, 11028–11033.
- [90] M. Sokabe, A. Okada, M. Yao, T. Nakashima, I. Tanaka, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, 102, 11669–11674.
- [91] Z. Pasman, S. Robey-Bond, A. C. Mirando, G. J. Smith, A. Lague, C. S. Francklyn, *Biochemistry* **2011**, 50, 1474–1482.
- [92] A. C. Dock-Bregeon, B. Rees, A. Torres-Larios, G. Bey, J. Caillet, D. Moras, *Mol. Cell* **2004**, 16, 375–386.
- [93] T. Hussain, V. Kamarthapu, S. P. Kruparani, M. V. Deshmukh, R. Sankaranarayanan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, 107, 22117–22121.
- [94] I. Ahel, D. Korencic, M. Ibba, D. Söll, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, 100, 15422–15427.
- [95] T. Hussain, S. P. Kruparani, B. Pal, A. C. Dock-Bregeon, S. Dwivedi, M. R. Shekar, K. Sureshbabu, R. Sankaranarayanan, *EMBO J.* **2006**, 25, 4152–4162.
- [96] J. Ling, S. S. Yadavalli, M. Ibba, *Rna* **2007**, 13, 1881–1886.
- [97] P. J. Beuning, K. Musier-Forsyth, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, 97, 8916–8920.
- [98] F. C. Wong, P. J. Beuning, C. Silvers, K. Musier-Forsyth, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 52857–52864.
- [99] I. Ahel, C. Stathopoulos, A. Ambrogelly, A. Sauerwald, H. Toogood, T. Hartsch, D. Söll, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 34743–34748.
- [100] S. An, K. Musier-Forsyth, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 42359–42362.

- [101] O. Vargas-Rodriguez, K. Musier-Forsyth, *J. Biol. Chem.* **2013**, 288, 14391–14399.
- [102] Z. Liu, O. Vargas-Rodriguez, Y. Goto, E. M. Novoa, L. Ribas De Pouplana, H. Suga, K. Musier-Forsyth, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, 112, 6027–6032.
- [103] L. Chen, A. Tanimoto, B. R. So, M. Bakhtina, T. J. Magliery, V. H. Wysocki, K. Musier-Forsyth, *Nucleic Acids Res.* **2019**, 47, 929–940.
- [104] S. Kumar, M. Das, C. M. Hadad, K. Musier-Forsyth, *J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 3175–3184.
- [105] B. R. So, S. An, S. Kumar, M. Das, D. A. Turner, C. M. Hadad, K. Musier-Forsyth, *J. Biol. Chem.* **2011**, 286, 31810–31820.
- [106] H. E. Umbarger, *Amin. Acids, Pept. Proteins Org. Chem.* **1978**, 1, 119–161.
- [107] O. Nureki, D. G. Vassilyev, M. Tateno, A. Shimada, T. Nakama, S. Fukai, M. Konno, T. L. Hendrickson, P. Schimmel, S. Yokoyama, *Science (80-.)*. **1998**, 280, 578–582.
- [108] R. M. Starzyk, T. A. Webster, P. Schimmel, *Science (80-.)*. **1987**, 237, 1614–1618.
- [109] X. L. Zhou, B. Zhu, E. D. Wang, *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 36608–36616.
- [110] O. Nureki, T. Kohno, K. Sakamoto, T. Miyazawa, S. Yokoyama, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 15368–15373.
- [111] B. Xu, B. Trawick, G. A. Krudy, R. M. Phillips, L. Zhou, P. R. Rosevear, *Biochemistry* **1994**, 33, 398–402.
- [112] J. A. Landro, E. Schmidt, P. Schimmel, D. L. Tierney, J. E. Penner-Hahn, *Biochemistry* **1994**, 33, 14213–14220.
- [113] T. Muramatsu, S. Yokoyama, N. Horie, A. Matsuda, T. Ueda, Z. Yamaizumi, Y. Kuchino, S. Nishimura, T. Miyazawa, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 9261–9267.
- [114] M. Yarus, B. G. Barrell, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1971**, 43, 729–734.
- [115] Y. Kuchino, S. Watanabe, F. Harada, S. Nishimura, *Biochemistry* **1980**, 19, 2085–2089.
- [116] O. Nureki, T. Niimi, T. Muramatsu, H. Kanno, T. Kohno, C. Florentz, R. Giege, S. Yokoyama, *J. Mol. Biol.* **1994**, 236, 710–724.
- [117] H. Jakubowski, A. R. fersht, *Nucleic Acids Res.* **1981**, 9, 3105–3117.
- [118] R. B. Loftfield, E. A. Eigner, *J. Biol. Chem.* **1965**, 240, PC1482–PC1484.
- [119] A. N. Baldwin, P. Berg, *J. Biol. Chem.* **1966**, 241, 839–845.
- [120] E. W. Eldred, P. Schimmel, *J. Biol. Chem.* **1972**, 247, 2961–2964.
- [121] E. A. First, M. Ibba, Michael, Francklyn, Christopher, S. Cusack, Stephen, *The*

- Aminoacyl-TRNA Synthetases*, Landes Bioscience, Georgetown, TX, **2005**.
- [122] S. Fukai, O. Nureki, S. I. Sekine, A. Shimada, D. G. Vassylyev, S. Yokoyama, *Rna* **2003**, *9*, 100–111.
- [123] A. Palencia, T. Crépin, M. T. Vu, T. L. Lincecum, S. A. Martinis, S. Cusack, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, *19*, 677–684.
- [124] M. T. Vu, S. A. Martinis, *Biochemistry* **2007**, *46*, 5170–5176.
- [125] J. Horowitz, W. C. Chu, W. B. Derrick, J. C. H. Liu, M. Liu, D. Yue, *Biochemistry* **1999**, *38*, 7737–7746.
- [126] M. Sprinzl, T. Hartmann, J. Weber, J. Blank, R. Zeidler, *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, r1–r172.
- [127] G. Tocchini-Valentini, M. E. Saks, J. Abelson, *J. Mol. Biol.* **2000**, *298*, 779–793.
- [128] D. C. Larkin, A. M. Williams, S. A. Martinis, G. E. Fox, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 2103–2113.
- [129] A. R. Fersht, M. M. Kaethner, *Biochemistry* **1976**, *15*, 3342–3346.
- [130] A. R. Fersht, C. Dingwall, *Biochemistry* **1979**, *18*, 1238–1245.
- [131] N. Cvetic, J. J. Perona, I. Gruic-Sovulj, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 25381–25394.
- [132] Y. Tang, D. A. Tirrell, *Biochemistry* **2002**, *41*, 10635–10645.
- [133] M. T. Boniecki, M. T. Vu, A. K. Betha, S. A. Martinis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 19223–19228.
- [134] S. W. Lue, S. O. Kelley, *Biochemistry* **2005**, *44*, 3010–3016.
- [135] L. Hedstrom, *Enzyme Specificity and Selectivity*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, **2010**.
- [136] A. R. Fersht, *Structure and Mechanism in Protein Science*, John Wiley & Sons, Ltd, New York, **1999**.
- [137] A. Chang, L. Jeske, S. Ulbrich, J. Hofmann, J. Koblit, I. Schomburg, M. Neumann-Schaal, D. Jahn, D. Schomburg, *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, D498–D508.
- [138] M. Kanehisa, M. Furumichi, Y. Sato, M. Ishiguro-Watanabe, M. Tanabe, *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, D545–D551.
- [139] A. Bar-Even, E. Noor, Y. Savir, W. Liebermeister, D. Davidi, D. S. Tawfik, R. Milo, *Biochemistry* **2011**, *50*, 4402–4410.
- [140] L. Hedstrom, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4501–4523.
- [141] R. Huber, D. Kukla, W. Bode, P. Schwager, K. Bartels, J. Deisenhofer, W.

- Steigemann, *J. Mol. Biol.* **1974**, 89, 73–101.
- [142] L. Gráf, A. Jancsó, L. Szilágyi, G. Hegyi, K. Pintér, G. Náray-Szabó, J. Hepp, K. Medzihradszky, W. J. Rutter, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1988**, 85, 4961–4965.
- [143] J. R. Knowles, *J. Theor. Biol.* **1965**, 9, 213–228.
- [144] D. M. Shotton, H. C. Watson, *Nat. Publ. Gr.* **1970**, 225, 811–816.
- [145] D. S. Tawfik, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, 21, 73–80.
- [146] Y. Tsai, K. A. Johnson, *Biochemistry* **2006**, 45, 9675–9687.
- [147] K. A. Johnson, *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 26297–26301.
- [148] K. A. Johnson, *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, 62, 685–713.
- [149] S. S. Patel, I. Wong, K. A. Johnson, *Biochemistry* **1991**, 30, 511–525.
- [150] A. D. Wolfson, O. C. Uhlenbeck, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, 99, 5965–5970.
- [151] N. Cvetic, I. Gruic-Sovulj, *Methods* **2017**, 113, 13–26.
- [152] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248–254.
- [153] R. Calendar, P. Berg, *Biochemistry* **1966**, 5, 1681–1690.
- [154] C. S. Francklyn, E. A. First, J. J. Perona, Y.-M. M. Hou, *Methods* **2008**, 44, 100–118.
- [155] F. X. Cole, P. R. Schimmel, *Biochemistry* **1970**, 9, 480–489.
- [156] K. A. Johnson, *Beilstein J. Org. Chem.* **2019**, 15, 16–29.
- [157] J. Farr, “KinTek Corp RQF3 RQF4 Instruction Manual,” can be found under https://bio.pnpi.nrcki.ru/wp-content/uploads/2020/01/KinTek-RQF-3_Manual.pdf, **2016**.
- [158] N. Cvetic, Kloniranje, prekomjerna ekspresija te pročišćavanje molekula tRNAIle i tRNAVal iz bakterije Escherichia Coli, Sveučilište u Zagrebu. Prirodoslovno-matematički fakultet. Biološki odsjek., **2010**.
- [159] G. Bogosian, B. N. Violand, E. J. Dorward-King, W. E. Workman, P. E. Jung, J. F. Kane, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 531–539.
- [160] D. G. Barker, C. J. Bruton, *J. Mol. Biol.* **1979**, 133, 217–231.
- [161] D. S. Weber, J. J. Warren, *Arch. Biochem. Biophys.* **2019**, 672, DOI 10.1016/j.abb.2019.07.018.
- [162] A. A. Berger, J.-S. S. Völler, N. Budisa, B. Koks, *Acc. Chem. Res.* **2017**, 50, 2093–2103.
- [163] H. Jakubowski, E. Goldman, *J. Bacteriol.* **1984**, 158, 769–776.
- [164] L. Pauling, in *Festschrift Fur Prof. Dr. Arthur Stoll*. (Ed.: A. Birkhauser), Birkhauser

- Verlag, Basel, **1958**, pp. 597–602.
- [165] M. Guo, Y. E. Chong, R. Shapiro, K. Beebe, X. L. Yang, P. Schimmel, *Nature* **2009**, *462*, 808–812.
- [166] J. C. Biffinger, H. W. Kim, S. G. DiMagno, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 622–627.
- [167] V. H. Dalvi, P. J. Rossky, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 13603–13607.
- [168] B. Vögeli, T. J. Erb, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2018**, *47*, 94–100.
- [169] J. Rétey, *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1990**, *29*, 355–361.
- [170] Y. Pham, B. Kuhlman, G. L. Butterfoss, H. Hu, V. Weinreb, C. W. Carter, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 38590–38601.
- [171] P. Schimmel, B. Henderson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 11283–11286.
- [172] L. Li, C. Francklyn, C. W. Carter, *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 26856–26863.

§ 9. ŽIVOTOPIS

Datum i mjesto rođenja:

26. svibnja 1992., Zagreb

Obrazovanje:

2014.-2016. Diplomski studij kemije, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Diplomski rad: *Mehanizam diskriminacije leucina u mjestu za popravak pogreške leucil-tRNA-sintetaze* izrađen u Zavodu za biokemiju i Zavodu za fizikalnu kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Ite Gruić Sovulj i prof. dr. sc. Branimira Bertoše

2011.-2014. Preddiplomski studij kemije, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2007.-2011. Prirodoslovna gimnazija, Prirodoslovna škola Vladimira Preloga, Zagreb

Radno iskustvo:

2016.- Asistent u Zavodu za biokemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Znanstvene publikacije:

1. Živković, Igor; Moschner, Johann; Koksche, Beate; Gruić Sovulj, Ita; Mechanism of discrimination of isoleucyl-tRNA synthetase against nonproteinogenic alpha-aminobutyrate and its fluorinated analogues; *The FEBS Journal*, **287** (2020), 800-813
2. Biluš, Mirna; Šemanjski, Maja; Močibob, Marko; Živković, Igor; Cvetešić, Nevena; Tawfik, Dan; Toth-Petroczy, Agnes; Maček, Boris; Gruić Sovulj, Ita; On the Mechanism and Origin of Isoleucyl-tRNA Synthetase Editing against Norvaline; *Journal of molecular biology*, **431** (2019), 6; 1284-1297
3. Dulić, Morana; Cvetešić, Nevena; Živković, Igor; Palencia, Andres; Cusack, Stephen; Bertoša, Branimir; Gruić Sovulj, Ita; Kinetic Origin of Substrate Specificity in Post-Transfer Editing by Leucyl-tRNA Synthetase; *Journal of molecular biology*, **430** (2018), 1; 1-16

Sudjelovanja na konferencijama:

1. Živković, Igor; Gruić Sovulj, Ita, Isoleucyl-tRNA synthetase editing domain accepts broad range of amino acids that are efficiently discriminated at the synthetic active site, The 45th FEBS Congress: Molecules of Life: Towards New Horizons, virtualno, 2021. (poster)
2. Živković, Igor; Gruić Sovulj, Ita, Isoleucyl-tRNA synthetase editing domain accepts broad range of amino acids that are efficiently discriminated at the synthetic active site, The 20th FEBS Young Scientists' Forum 2021, virtualno, 2021. (poster)
3. Živković, Igor; Gruić Sovulj, Ita, Isoleucil-tRNA-sintetaza hidrolizira tRNA misacilirane aminokiselinama koje su efikasno diskriminirane u sintetskom mjestu, Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a, Zagreb, 2020. (usmeno priopćenje)
4. Živković, Igor; Gruić Sovulj, Ita, What tailors discrimination against smaller hydrophobic amino acids in isoleucyl-tRNA synthetase?, Advanced Course Trends in Enzymology and Biocatalysis, Rim, 2019. (poster)
5. Živković, Igor; Gruić Sovulj, Ita, How hydrophobicity modulates amino acid discrimination by isoleucyl-tRNA synthetase?, 26. hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, Šibenik, 2019. (poster)
6. Živković, Igor; Gruić Sovulj, Ita, Discrimination of α -aminobutyrate and its fluorinated analogues in the synthetic and editing reactions of isoleucyl-tRNA synthetase, Molecular Biophysics: ABC of the puzzle of Life, Zagreb, 2019. (poster)
7. Živković, Igor; Gruić Sovulj, Ita, Mehanizmi diskriminacije izoleucil-tRNA-sintetaze prema α -aminobutiratu i njegovim fluoriranim analogima, Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a, Zagreb, 2019. (poster)
8. Živković, Igor; Gruić Sovulj, Ita, Kinetička razdioba u sintetskom mjestu izoleucil-tRNA-sintetaze određuje mehanizam diskriminacije neprikladnih aminokiselina, Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a, Zagreb, 2019. (poster)
9. Živković, Igor; Dulić, Morana; Cvetešić, Nevena; Bertoša, Branimir; Gruić-Sovulj, Ita, Exclusion of the cognate substrate from the leucyl -tRNA synthetase editing pathway, 25. hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, Poreč, 2017. (poster)