

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno matematički fakultet, Biološki odsjek

Kate Ivković

Izoleucil-tRNA-sintetaza popravlja vlastitu pogrešku tijekom biosinteze proteina drugačije od evolucijski srodnih aminoacil-tRNA-sintetaza razreda Ia

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za biokemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod neposrednim vodstvom Igora Živkovića, mag. chem. i mentorstvom prof. dr. sc. Ite Gruić Sovulj i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2020./2021.

Sadržaj rada:

1. UVOD.....	1
1.1. Escherichia coli	1
1.2. Prijenos genetičke informacije.....	1
1.1.1. Transkripcija	1
1.1.2. Translacija	2
1.1.3. EF-Tu.....	6
1.3. tRNA.....	9
1.1.4. Vežanje tRNA za aaRS	11
1.4. Aminoacil-tRNA-sintetaze.....	12
1.1.5. Izoleucil-tRNA sintetaza	18
1.1.6. Leucil-tRNA-sintetaza	22
1.1.7. Valil-tRNA-sintetaza.....	24
2. HIPOTEZA.....	27
3. MATERIJALI I METODE	28
3.1. MATERIJALI	28
3.1.1. Standardne kemikalije	28
3.1.2. Aminokiseline i nukleotidi	28
3.1.3. Boje.....	28
3.1.1. Radioaktivno obilježeni spojevi.....	28
3.1.2. Enzimi, proteini i nukleinske kiseline	28
3.1.3. Markeri veličine	29
3.1.4. Medij za uzgoj bakterija	29
3.1.5. <i>E. coli</i> soj i plazmidi	29
3.1.6. Ostali materijali	29
3.2. METODE	29
3.2.1. Metode rada s proteinima	29
3.2.1.1. Uzgoj i prekomjerna ekspresija proteina	29
3.2.1.2. Izolacija proteina.....	31
3.2.1.3. Pročišćavanje uz afinitetnu kromatografiju	31
3.2.1.4. Skladištenje proteina	32
3.2.1.5. Dodatno pročišćavanje pirofosforolizom.....	32

3.2.1.6.	Poliakrilamidna gel elektroforeza u prisustvu natrijevog dodecil-sulfata	33
3.2.1.7.	Ugušćivanje proteina i mjerenje koncentracije	33
3.2.1.8.	Aktivacija EF-Tu.....	34
3.2.2.	Metode rada s RNA	34
3.2.2.1.	Uzgoj i prekomjerna ekspresija tRNA	34
3.2.2.2.	Izolacija i pročišćavanje tRNA	34
3.2.2.3.	Denaturirajuća poliakrilamidna gel-elektroforeza u prisustvu ureje.....	35
3.2.2.4.	Mjerenje koncentracije tRNA	36
3.2.2.5.	Ugušćivanje tRNA.....	36
3.2.2.6.	Dodatno pročišćavanje tRNA ^{Ile} kromatografijom obrnutih faza	36
3.2.2.7.	Renaturacija tRNA ^{Leu} i tRNA ^{Val}	37
3.2.2.8.	Priprema radioaktivno obilježene tRNA.....	37
3.2.3.	Kinetičke metode	38
3.2.3.1.	Provjera akceptorske aktivnosti tRNA	38
3.2.3.2.	Paralelno praćenje reakcije aminoaciliranja i utroška ATP-a	39
4.	REZULTATI.....	41
4.1.	Pročišćavanje proteina	41
4.2.	Priprema i karakterizacija tRNA	45
4.2.1.	Provjera čistoće izoliranih tRNA poliakrilamidnom gel-elektroforezom uz dodatak ureje .	45
4.2.2.	Dodatno pročišćavanje tRNA ^{Ile}	47
4.2.3.	Kinetička karakterizacija tRNA	48
4.2.3.1.	tRNA ^{Ile} prije pročišćavanja kromatografijom obrnutih faza	49
4.2.3.2.	tRNA ^{Ile} nakon pročišćavanja kromatografijom obrnutih faza	49
4.2.3.3.	tRNA ^{Leu}	50
4.2.3.4.	tRNA ^{Val}	51
4.3.	Praćenje potrošnje ATP-a i akumulacije aa-tRNA.....	51
4.3.1.	IleRS	52
4.3.2.	LeuRS	54
4.3.3.	ValRS.....	56
5.	RASPRAVA.....	59
6.	ZAKLJUČCI.....	61
7.	ZAHVALE	62

8. POPIS LITERATURE	63
9. SAŽETAK.....	70
10. SUMMARY	71

1. UVOD

1.1. *Escherichia coli*

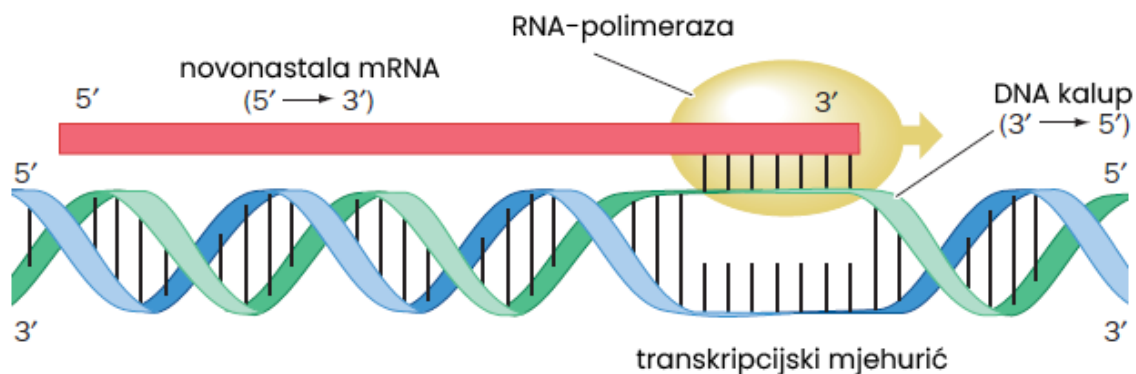
Escherichia coli je vrsta bakterija iz obitelji Enterobacteriaceae (Allocati *i sur.*, 2013.). Spada u gram negativne fakultativne anaerobe, a ime je dobila po Theodoru Escherichu, pedijatru koji ju je otkrio 1884. godine (Blount, 2015.). Većina bakterija vrste *E. coli* prirodno se nalazi u crijevima ljudi i toplokrvnih životinja, ali postoje i patogeni sojevi. Patogene bakterije *E. coli* pretežito uzrokuju infekcije intestinalnog i urinarnog trakta. Zbog mogućnosti jednostavnog uzgoja, sekvenciranog i dostupnog cijelog genoma te sposobnosti da raste u aerobnim i anaerobnim uvjetima, često se koristi u biotehnoškoj i znanstvenoj svrhi. Principi osnovnih bioloških fenomena: genetičkog koda (Crick *i sur.*, 1961.), replikacije DNA (Lehman *i sur.*, 1958.), transkripcije (Stevens, 1960.), regulacije gena (Englesberg *i sur.*, 1965.; Jacob i Monod, 1961.) i brojni drugi, istraženi su korištenjem *E. coli* kao modelnog organizma.

1.2. Prijenos genetičke informacije

Proteini su biomakromolekule ključne za život jer obavljaju brojne funkcije poput: biokatalize kemijskih reakcija (enzimi), djeluju kao antitijela, sudjeluju u staničnoj signalizaciji i građevni su materijal stanica. Uputa za biosintezu proteina zapisana je u molekulama deoksiribonukleinskih kiselina (DNA) u obliku slijeda četiriju nukleotida (deoksiadenilata, deoksigvanilata, deoksicitidilata i timidilata). Procesi translacije i transkripcije služe prevođenju slijeda nukleotida u slijed aminokiselina, osnovnih građevnih jedinica proteina. Aminokiseline su kodirane tripletom nukleotida u DNA koji nazivamo kodom. Genetičkim kodom kodirano je 20 proteinogenih aminokiselina, a uz njih se u nekim proteinima mogu naći i nestandardne aminokiseline selenocistein i pirolizin.

1.1.1. Transkripcija

Transkripcija je prepisivanje genetičke informacije iz molekule DNA u slijed nukleotida u molekuli glasničke RNA (engl. *messenger RNA*, mRNA) pomoću DNA-ovisne RNA-polimeraze. RNA-polimeraza katalizira sintezu mRNA lanca komplementarnog lancu DNA koji služi kao kalup. Mjesto početka transkripcije određeno je promotorskim slijedom koji se nalazi na molekuli DNA i na kojemu se veže RNA-polimeraza. Zbog asimetričnosti promotorskog slijeda, RNA-polimeraza može se vezati samo u jednoj orijentaciji i tako započeti transkripciju. Transkripcija se može odvijati na oba lanca DNA, ali uvijek u smjeru od 5' kraja prema 3' kraju RNA (slika 1).



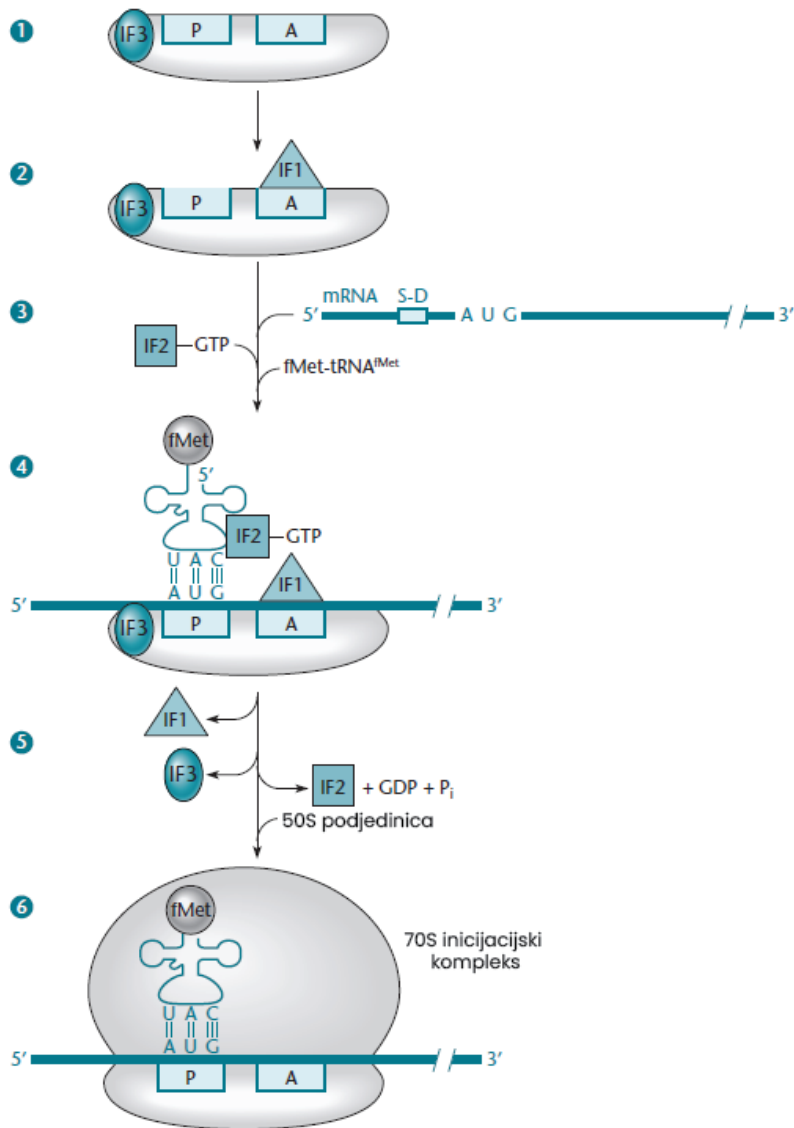
Slika 1. Shematski prikaz transkripcije. Preuzeto i prilagođeno iz (Voet i Voet, 2010.).

Transkripcija se odvija u tri faze: inicijacija, elongacija i terminacija. Inicijacija počinje vezanjem RNA-polimeraze na promotor koji prepoznaje njena σ podjedinica. Vezanje dovodi do odvijanja dvolančane DNA te započinje transkripcija. Procesivna elongacija započinje nakon disocijacije σ podjedinice i traje dok RNA-polimeraza ne dođe do DNA slijeda koji sadrži stop signal, što uzrokuje terminaciju. Stop signal je regija DNA bogata GC parovima baza iza koje slijedi AT bogata regija što omogućava nastanak ukosnice, zaustavljanje transkripcije i disocijaciju RNA-polimeraze. Također, terminacija transkripcije može se odvijati uz pomoć p -faktora, helikaze koja potpomaže disocijaciju RNA-polimeraze. Ovisno o načinu na koji se odvija terminacija, dijelimo je na p -neovisnu i p -ovisnu (Nelson i Cox, 2013.; Voet i Voet, 2010.).

1.1.2. Translacija

Translacija je prevođenje genetičke informacije iz mRNA u slijed aminokiselina. Kao i transkripcija, odvija se u tri faze: inicijacija, elongacija i terminacija. Kod prokariota se procesi transkripcije i translacije odvijaju istovremeno u citoplazmi, dakle nisu prostorno odvojeni. Općenito se translacija odvija na ribosomima, makromolekulskim kompleksima sastavljenim od dvije podjedinice. Mala podjedinica ribosoma (30S, S predstavlja sedimentacijski faktor) sastoji se od 16S ribosomske RNA (rRNA) i 21 polipeptidnog lanca, a velika podjedinica (50S) od 23S rRNA, 5S rRNA i 33 polipeptidna lanca (Schuwirth *i sur.*, 2005.). Uz ribosom, za svaki korak transkripcije potrebne su transportne RNA (engl. *transfer RNA*, tRNA) i dodatni proteini. Tijekom translacije, dolazi do komplementarnog sparivanja baza kodona (triplet nukleotida) na mRNA s antikodonom na tRNA. Molekule aminoacilirane tRNA (aa-tRNA) na svom 3' kraju imaju vezanu aminokiselinu koja odgovara kodonu mRNA koji prepoznaju i na taj način omogućavaju pravilnu translaciju mRNA. Vezanje aminokiseline na tRNA, tj. aminoacilacija tRNA je jako bitna zbog toga što stvaranje veza između slobodnih aminokiselina nije termodinamski povoljno pa je potrebna aktivacija aminokiseline koju obavljaju aminoacil-tRNA-

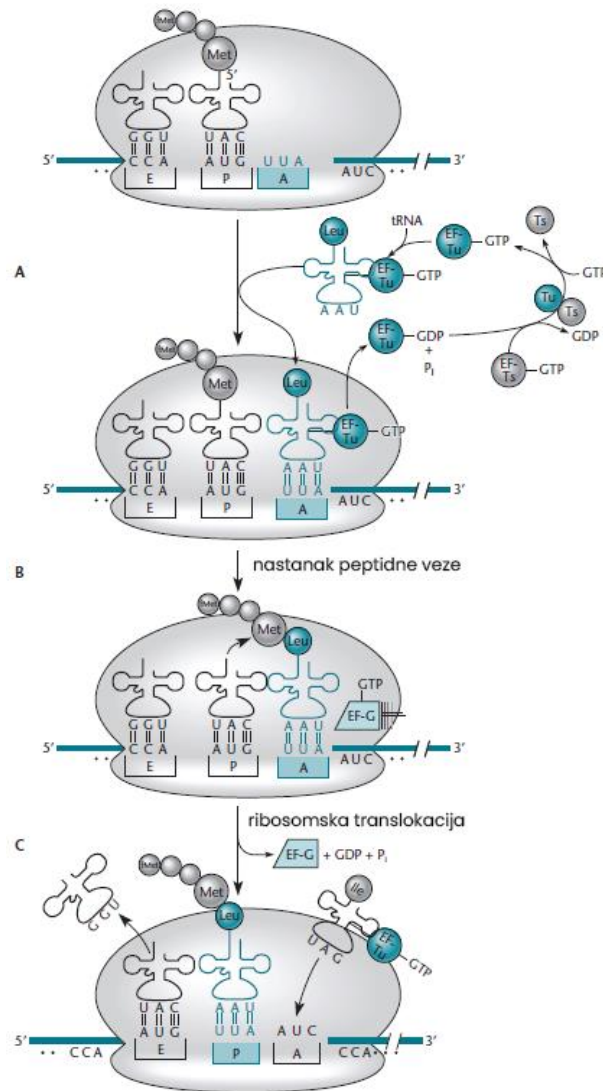
sintetaze (aaRS). Ribosomski kompleks se veže za mRNA, prihvaća molekule aminoacilirane tRNA i katalizira nastanak peptidnih veza među aminokiselinama. Na ribosomu postoje tri vezna mjesta za različite oblike tRNA: aminoacil mjesto (A) u koje se veže aminoacilirana tRNA, peptidil mjesto (P) u koje se veže tRNA na koju je vezan rastući polipeptidni lanac i izlazno mjesto (E, engl. *exit*) u koje se veže neaminoacilirana tRNA. Inicijacijski korak translacije bitan je zbog spajanja male i velike podjedinice ribosoma i formiranja 70S ribosoma. Pravilno smještanje ribosoma na mRNA osigurava Shine-Dalgarno sekvenca (očuvani slijed od 4-9 purinskih baza uzvodno od start kodona) na mRNA koja se sparuje s 3' krajem 16S rRNA. Prilikom inicijacije (slika 2) na malu podjedinicu ribosoma 30S vežu se inicijacijski faktori IF1 i IF3. IF1 veže se u A mjesto i sprječava prerano vezanje tRNA, a IF3 blokira vezanje 50S i 30S podjedinica ribosoma. IF2 donosi inicijatorsku tRNA^{fMet} u P mjesto ribosoma. Inicijatorska tRNA^{fMet} na sebi ima vezan formilmetionin te prepoznaje start kodon AUG. Faza inicijacije završava disocijacijom inicijacijskih faktora i vezanjem 50S podjedinice ribosoma.



Slika 2. Inicijacija translacije. (1) Vezanje IF3 na 30S podjedinicu. (2) IF1 se veže u A mjesto. (3) Formiranje kompleksa IF2:GTP:fMet-tRNA^{fMet}. (4) Vezanje kompleksa IF2:GTP:fMet-tRNA^{fMet} u P mjesto ribosoma. (5) Disocijacija IF1 i IF3 te hidroliza GTP-a i dolazak 50S podjedinice. (6) Formirani 70S ribosomski inicijacijski kompleks. Preuzeto i prilagođeno iz (Snyder *i sur.*, 2013.).

Elongacija (slika 3) je korak translacije tijekom kojeg nastaje polipeptidni lanac. Za elongaciju su, osim aa-tRNA, potrebni i elongacijski faktori: EF-Tu, EF-G i EF-Ts. Elongacija započinje dolaskom nove aa-tRNA u A mjesto ribosoma, koju do tamo dovodi EF-Tu (detaljniji pregled EF-Tu u poglavlju 1.2.3.). Pravilno sparivanje kodona mRNA s antikodonom tRNA izaziva konformacijsku promjenu koja potiče GTPaznu aktivnost EF-Tu, a nastali EF-Tu:GDP disocira s ribosoma. Nastanak peptidne veze događa se unutar velike podjedinice ribosoma u peptidil-transferaznom centru (PTC), građenom od 23S rRNA. U PTC-u amino skupina aminokiseline (vezane na tRNA u A mjestu) nukleofilno napada estersku vezu rastućeg polipeptida i tRNA (u P mjestu) pri čemu se polipeptid prebacuje na aminoaciliranu tRNA u A

mjestu. Nakon nastanka nove peptidne veze tRNA bivaju translocirane tako da tRNA iz mjesta P odlazi u mjesto E, a tRNA s vezanim polipeptidom pomiče se iz A mjesta u P mjesto ribosoma. A mjesto se oslobađa za dolazak nove aa-tRNA. Istovremeno, molekula mRNA se povlači tako da se u mjesto A smješta kodon za novu aminokiselinu. U tom procesu pomaže translokaza EF-G koja hidrolizom GTP-a daje potrebnu energiju. Zadnji od faktora koji sudjeluje u elongaciji je EF-Ts koji potpomaže zamjenu GDP-a za GTP u EF-Tu.

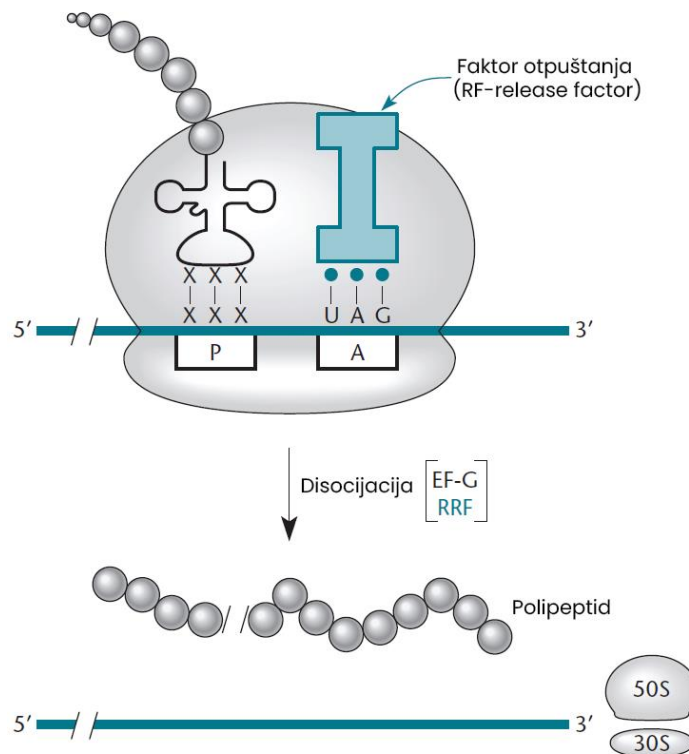


Slika 3. Elongacijska faza translacije. (A) Aminoacilirana tRNA, vezana na EF-Tu, dolazi do A mjesta ribosoma. (B) Peptidiltransferaza katalizira nastanak peptidne veze. (C) EF-G katalizira translokaciju, tRNA u mjestu P prelazi na mjesto E prije disocijacije s ribosoma i dolazi nova aminoacilirana tRNA.

Preuzeto i prilagođeno iz (Snyder *i sur.*, 2013.).

Elongacija se odvija dok se u A mjesto ribosoma ne pozicionira stop kodon (UGA, UAA ili UAG). Stop kodon ne prepoznaje niti jedna tRNA već ih prepoznaju faktori otpuštanja (engl. *release factor*, RF). Ovisno o stop kodonu veže se RF1 (UAG, UAA) ili RF2 (UGA, UAA). Vezanje RF uzrokuje konformacijske promjene koje se prenose do PTC te dolazi do hidrolize

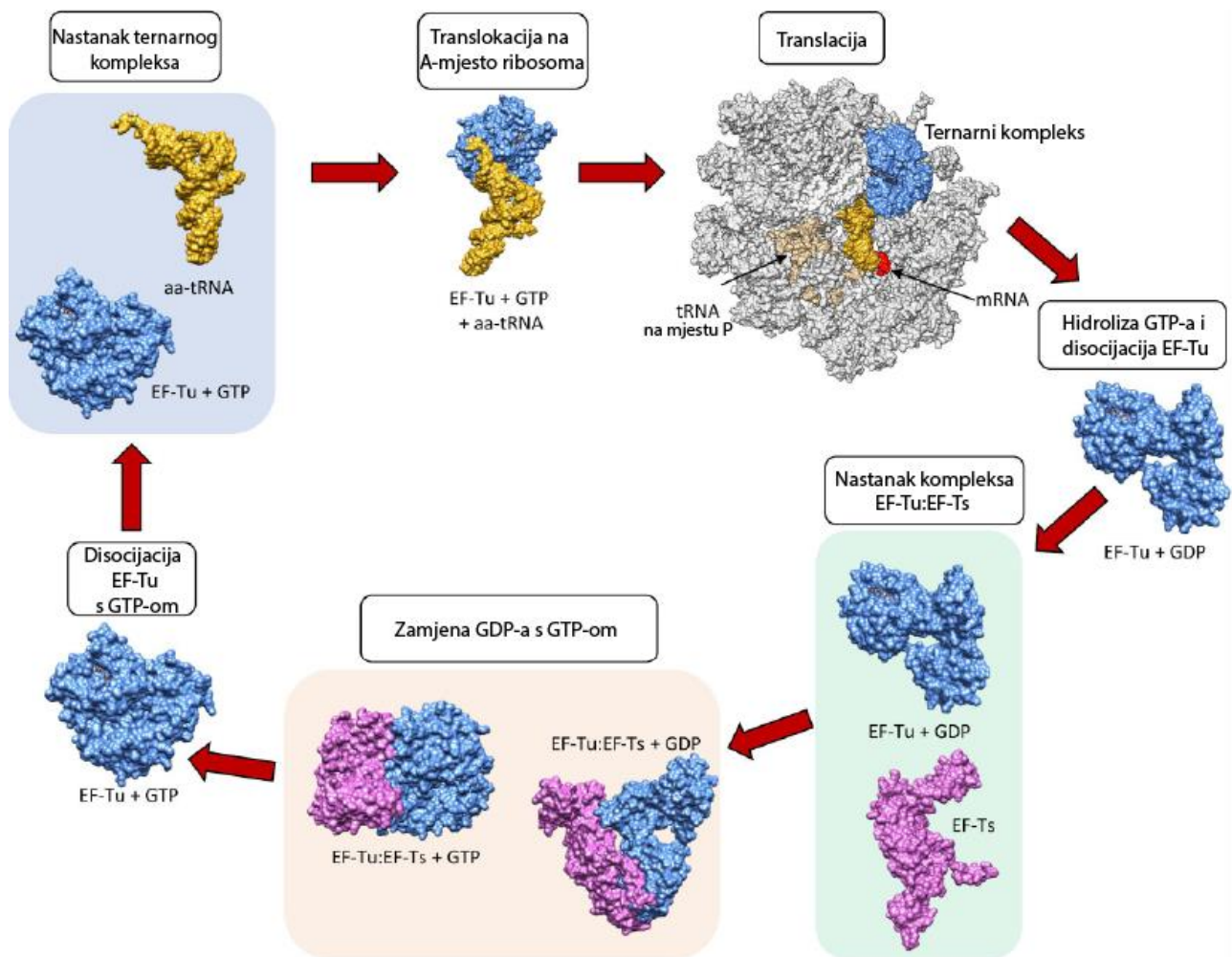
esterske veze između polipeptida i tRNA. Otpuštanje podjedinica ribosoma potpomaže faktor recikliranja ribosoma (engl. *ribosome recycling factor*, RRF). Taj događaj označava kraj biosinteze proteina (slika 4). Da bi proteini postali funkcionalni, oni moraju proći kroz proces smatanja u kojemu poprimaju nativnu konformaciju. Također, mnogi proteini se posttranslacijski dorađuju; npr. može doći do reverzibilne modifikacije njihovih bočnih ogranaka poput: acetilacije, fosforilacije, metilacije ili glikozilacije (Nelson i Cox, 2013.; Voet i Voet, 2010.).



Slika 4. Terminacija translacije. Vezanje faktora otpuštanja (RF) na jedan od stop kodona i disocijacija ribosomskog kompleksa uz pomoć faktora recikliranja ribosoma (RRF). Preuzeto i prilagođeno iz (Snyder i sur., 2013.).

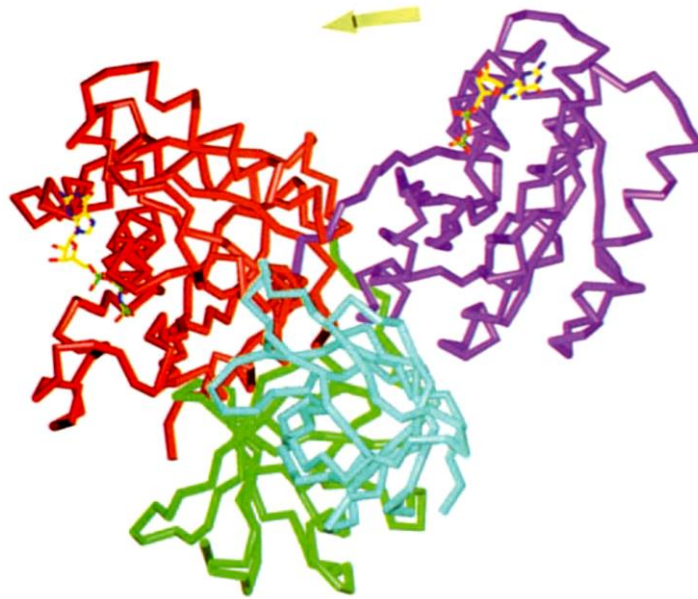
1.1.3. EF-Tu

Elongacijski faktor Tu (engl. *thermal unstable*, termički nestabilan) je GTPaza koja veže aa-tRNA i dovodi je do ribosoma te omogućava vezanje aa-tRNA u A mjesto ribosoma. EF-Tu s GTP-om i aa-tRNA formira aktivan ternarni kompleks (slika 5). Neaktivan oblik EF-Tu ima na sebi vezan GDP, a izmjenu GDP-a za GTP provodi elongacijski faktor Ts (engl. *thermal stable*, termički stabilan).



Slika 5. Kanonska uloga EF-Tu pri translaciji proteina. Preuzeto i prilagođeno iz (Harvey *i sur.*, 2019.)

EF-Tu jedan je od najzastupljenijih proteina u bakterijama i čini čak 6% ukupnih eksprimiranih proteina u *E. coli* (Furano, 1975.). Građen je od tri proteinske domene (domena 1, domena 2 i domena 3) koje su međusobno povezane fleksibilnim peptidima (Harvey *i sur.*, 2019.). Da bi se uspješno vezao na aa-tRNA potrebno je približavanje domene 1 domenama 2 i 3 što se događa prilikom vezanja GTP-a. Nakon što aa-tRNA i mRNA ostvare pravilne kodon:antikodon interakcije, EF-Tu hidrolizira GTP što pokreće obrnutu konformacijsku promjenu (udaljavanje domene 1 od domena 2 i 3) i dovodi do otpuštanja aa-tRNA i odlaska EF-Tu od ribosomskog kompleksa (Harvey *i sur.*, 2019.). Konformacijska promjena koja se događa prilikom vezanja GTP-a i prilikom njegove hidrolize odgovara pomicanju domene 1 za otprilike 90° u jednom ili drugom smjeru u odnosu na domene 2 i 3 (Kjeldgaard *i sur.*, 1993.). Na slici 6 prikazana je usporedba konformacije EF-Tu u GDP i GMPPNP (analog GTP-a koji se ne može hidrolizirati) veznom obliku.



Slika 6. Usporedba struktura EF-Tu u kompleksu sa GDP, odnosno GMPPNP. Domena 1 crvene je boje u kompleksu s GMPPNP, a ljubičaste u kompleksu s GDP. Domene 2 (zelena) i 3 (cijan) iste su orijentacije u oba kompleksa. Preuzeto i prilagođeno iz (Voet i Voet, 2010.)

EF-Tu je čest supstrat posttranslacijskih modifikacija, a u slučaju *E. coli* zabilježena je fosforilacija treonina na poziciji 382 koja se nalazi na sučelju između domena 1 i 3 (Lippmann *i sur.*, 1993.). Fosforilacija EF-Tu dovodi do smanjenja afiniteta vezanja za GTP, a posljedično i do smanjenja translacije proteina. No, pokazano je kako fosforilacija onemogućava vezanje specifičnog inhibitora EF-Tu, kiromicina. Također, smatra se jednim od načina prilagođavanja na stresne uvjete za vrijeme infekcije (Harvey *i sur.*, 2019.). Uz fosforilaciju, zabilježena je i metilacija lizina na poziciji 56 koja smanjuje GTPaznu aktivnost i pretpostavlja se da na taj način povećava točnost translacije (Van Noort *i sur.*, 1986.).

S obzirom na to da je glavna funkcija elongacijskog faktora Tu transport aminoaciliranih tRNA do ribosoma, bitno je da razlikuje aminoaciliranu od neaminoacilirane tRNA, što uspješno radi. Također, EF-Tu može razlikovati i neke pogrešno aminoacilirane tRNA i na taj način pridonositi točnosti translacije. Razlikuje prirodno prisutne misacilirane tRNA koje su intermedijeri u sintezi glutamina (Glu-tRNA^{Gln}) (Cathopoulis *i sur.*, 2008.) ili asparagina (Asp-tRNA^{Asn}) (Becker i Kern, 1998.) od pripadnih parova (Gln-tRNA^{Gln}, to jest Asn-tRNA^{Asn}) i isključuje ih iz translacije. Međutim, iz translacije ne isključuje uspješno sve misacilirane tRNA. Pokazano je da EF-Tu sa sličnim afinitetom veže Leu-tRNA^{Leu} i Nva-tRNA^{Leu} (Cvetesic *i sur.*, 2013.) te Phe-tRNA^{Phe} i Tyr-tRNA^{Phe} (Ling *i sur.*, 2007.). U ovom istraživanju EF-Tu je korišten za vezanje aminoacilirane tRNA u kinetičkim pokusima jer čvrsto veže aa-tRNA i umanjuje vjerojatnost ponovnog vezanja aa-tRNA na aaRS.

1.3. tRNA

Kao što je već navedeno, tRNA je poseban oblik ribonukleinske kiseline koji služi za prijenos aminokiseline do translacijske mašinerije i prepoznavanje kodona na mRNA. Kao adapterska molekula prilagođena je interakcijama s brojnim partnerima (ribosom, mRNA, EF-Tu, aaRS).

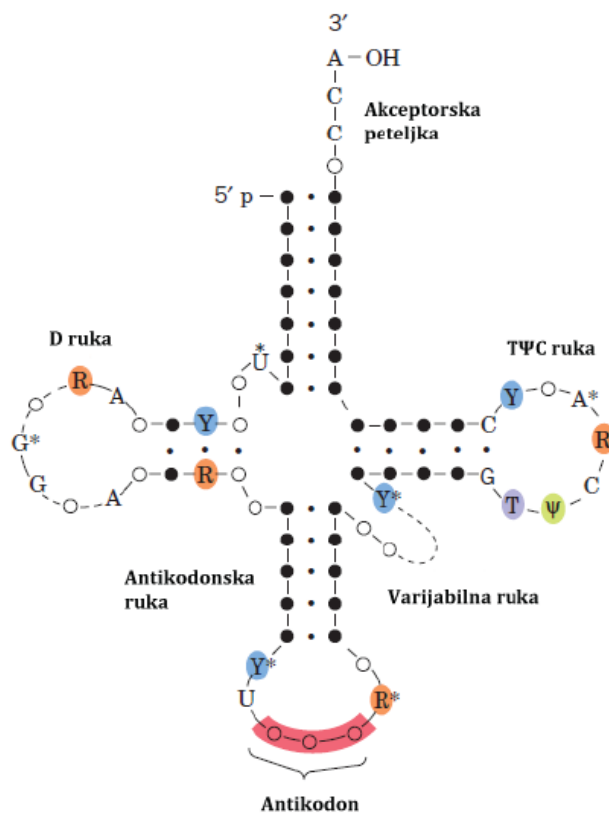
U poglavlju 1.2. spomenuto je da genetički kod čini kombinacija tripleta četiriju različitih nukleotida i da svaki triplet nukleotida kodira samo jednu aminokiselinu. Iz toga slijedi da je moguća 61 kombinacija tripleta (61 kodon), a aminokiselina kodiranih genetičkim kodom je samo 20. Dakle, većinu aminokiselina kodira više od jednog kodona (iznimke su metionin i triptofan) (tablica 1), a to svojstvo zovemo degeneriranost genetičkog koda.

Tablica 1. Tablica standardnog genetičkog koda. Preuzeto iz (Živković, 2016.).

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

Zbog degeneriranosti genetičkog koda postoji više molekula tRNA koje vežu istu aminokiselinu i one spadaju u istu izoakceptorsku skupinu, a razlikuju se po nukleotidnom slijedu antikodona pa i prepoznaju drugačije kodone. Primijećeno je da kod sparivanja kodona s antikodonom, prva baza antikodona i treća baza kodona ne moraju nužno ostvarivati Watson-Crickove interakcije da bi prepoznavanje bilo uspješno. To svojstvo zove se svojstvo kolebljive baze i omogućava prepoznavanje više različitih kodona od strane jedne molekule tRNA. Na mjestu kolebljive baze (prva baza antikodona) na tRNA, osim standardnih baza, može se pronaći i modificirana baza inozin (I) koja se sparuje s bazama A, C i U. Zbog kolebljive baze u antikodonu tRNA, organizmi ne trebaju imati 61 različitu tRNA molekulu. Primjerice, kod *E. coli* su identificirane 43 različite tRNA (Rudorf i Lipowsky, 2015.).

Iako su sve tRNA jednonlačane, velik dio molekule tvori dvolančane strukture. Duljina molekula tRNA je u rasponu od 54 do 100 nukleotida, ali većina ih ima oko 76 (Voet i Voet, 2010.). Njezina sekundarna struktura najčešće se opisuje modelom djeteline (slika 7). Sve tRNA sadrže slične elemente sekundarne strukturne. Na 5' kraju nalazi se terminalna fosfatna grupa. Zatim slijedi akceptorska ili aminokiselinska peteljka koja se sastoji od 7 parova baza i slobodnog 3' CCA kraja. Na 3' terminalni adenozin (A76) može biti vezana aminokiselina. Sljedeća peteljka sadrži omču u kojoj često pronalazimo modificiranu bazu dihidrouridin po kojoj se peteljka i omča zovu D-ruka. Triplet baza komplementaran kodonu (antikodon) uvijek se nalazi u antikodonskoj petlji. Peteljka s omčom, koja često sadrži slijed nukleotida TΨC (Ψ-pseudouridin), naziva se prema tome TΨC ili T ruka. Postoji još jedan strukturni element, koji se zbog svoje raznolikosti među tRNA naziva varijabilna ruka. Ona se nalazi između antikodonske i T ruke, a može imati od 3 do 21 nukleotida (Voet i Voet, 2010.).

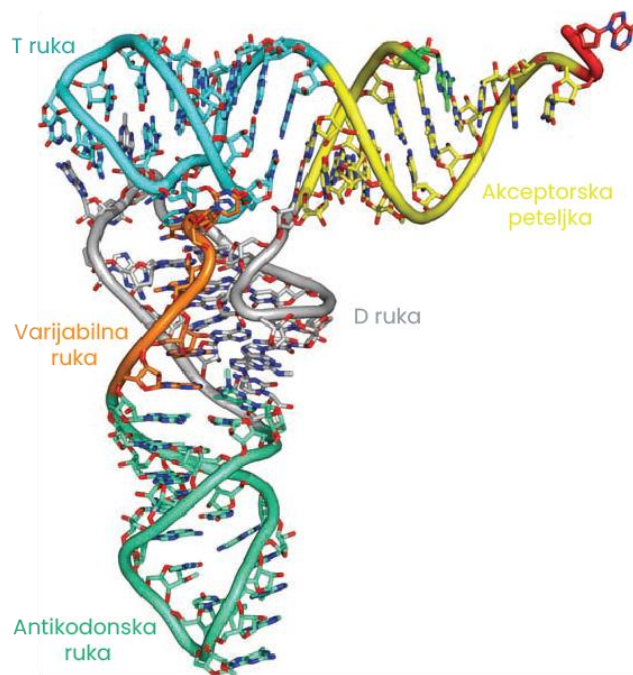


Slika 7. Sekundarna struktura molekule tRNA (model djeteline) s označenim strukturnim elementima. Puni krugovi povezani točkama predstavljaju Watson-Crickove parove baza, a prazni krugovi povezani točkama predstavljaju baze koje ostvaruju netipične interakcije. R i Y predstavljaju sačuvane purinske, odnosno pirimidinske baze. Zvezdicom su označene često modificirane baze. Preuzeto i prilagođeno iz (Voet i Voet, 2010.).

Karakteristično za molekule tRNA jest da imaju velik udio modificiranih baza i nespecifične parove baza. Čak do 25% baza u molekulama tRNA je posttranskripcijski

modificirano ili hipermodificirano (Voet i Voet, 2010.). Modificirane baze služe za povećavanje translacijske točnosti. Metilacije tRNA sprječavaju sparivanje određenih baza čije bi sparivanje izazvalo nepravilnu sekundarnu strukturu, a neke modifikacije su bitni identifikacijski elementi za aminoacil-tRNA-sintetaze.

Tercijarna struktura molekule tRNA nalikuje slovu L (slika 8). Kraći krak slova L čine akceptorska peteljka i TΨC ruka, a duži krak antikodonska i D ruka. Širina molekule je 20-25 Å što je jako bitno jer u ribosomu tri molekule tRNA (A, P i E mjesto) moraju stati međusobno veoma blizu što zahtjeva relativno malu širinu molekule (Voet i Voet, 2010.).



Slika 8. Tercijarna struktura molekule tRNA s označenim strukturnim elementima. 5' kraj molekule je označen zelenom bojom, a 3' kraj crvenom. Preuzeto i prilagođeno iz (Voet i Voet, 2010.).

1.1.4. Vezanje tRNA za aaRS

Prepoznavanje tRNA od strane aaRS je iznimno bitno da bi se spojio pripadan par aminokiseline i tRNA. Većinom u organizmima postoji samo jedna aaRS za svaku aminokiselinu, a više izoakceptorskih tRNA. To dovodi do toga da jedna aaRS mora pravilno prepoznati i vezati sve izoakceptorske tRNA. Prepoznavanje omogućuju elementi identiteta koji mogu biti pozitivni ili negativni. Pozitivni elementi identiteta potiču sparivanje tRNA s aaRS, a negativni sprječavaju vezanje neodgovarajućih parova. Elementi identiteta najčešće su nukleotidi iz akceptorske peteljke, diskriminacijska baza na poziciji 73, modificirane baze, varijabilna omča i nukleotidi iz antikodonske omče (Muramatsu *i sur.*, 1988a.). Iako je antikodonska regija bitan element identiteta kod brojnih tRNA (tRNA^{Ile}, tRNA^{Val}) predstavlja problem kada postoji velika raznolikost kodona unutar izoakceptorske grupe (tRNA^{Leu}, tRNA^{Ser})

(Giege *i sur.*, 1998.). U tom slučaju antikodonska regija ne služi kao element identiteta i aaRS prepoznaju tRNA preko drugih elemenata kao npr. varijabilne ruke (tRNA^{Leu}, tRNA^{Ser}).

1.4. Aminoacil-tRNA-sintetaze

Aminoacil-tRNA-sintetaze su enzimi koji kataliziraju nastanak esterske veze između pravilnog para aminokiseline i tRNA te na taj način osiguravaju točan prijenos genetičke informacije. U većini stanica postoji 20 aaRS i svaka je specifična za jednu aminokiselinu i jednu ili više izoakceptorskih tRNA. Prema strukturnim i mehanističkim obilježjima, koja proizlaze iz evolucijske srodnosti, svaka aaRS može se svrstati u jedan od dva razreda (tablica 2). Iznimka je lizil-tRNA-sintetaza koja primarno pripada razredu II, ali kod većine arheja i nekih bakterija se svrstava u razred I (Ibba *i sur.*, 1997.).

Tablica 2. Podjela aminoacil-tRNA-sintetaza. Preuzeto iz (Živković, 2016.)

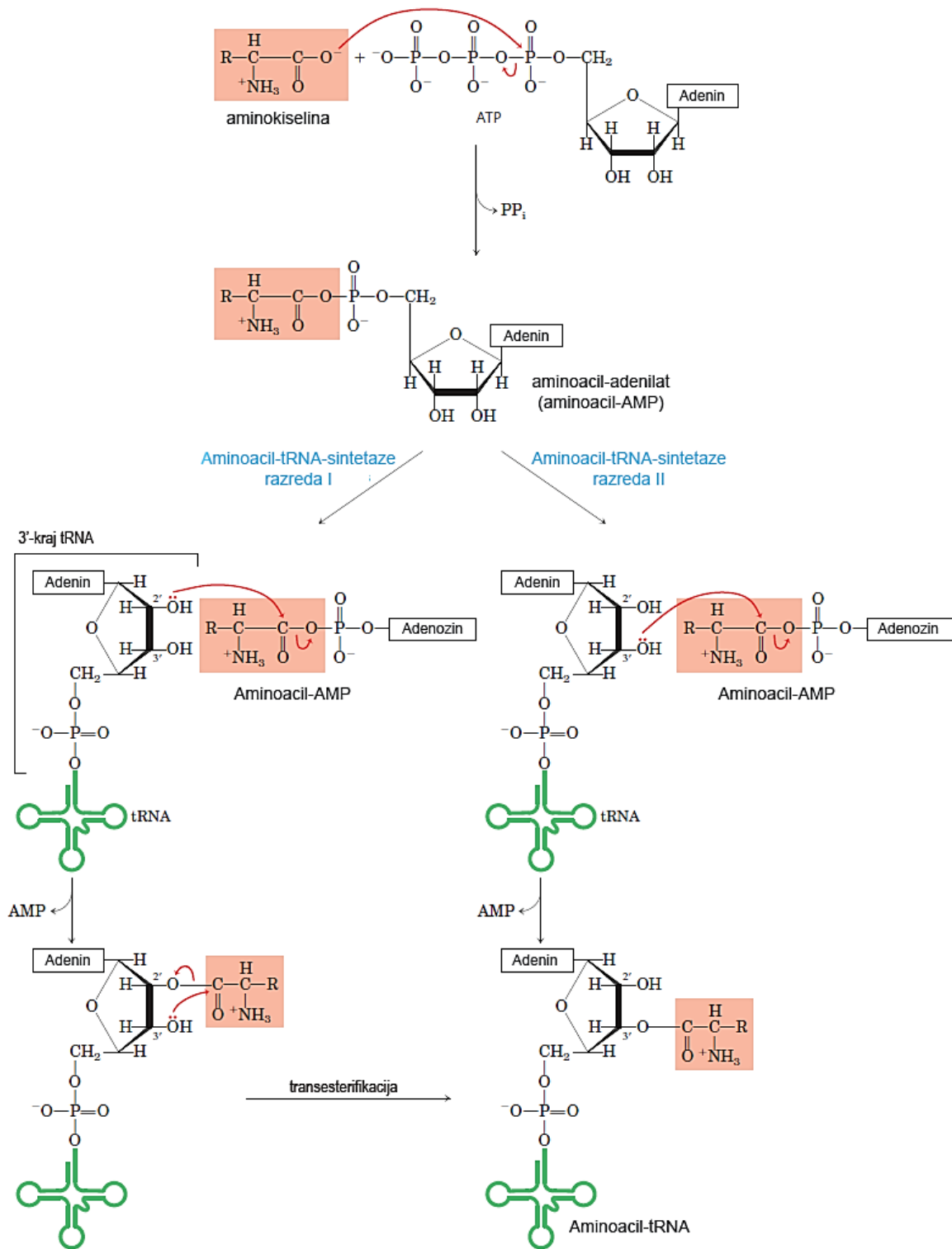
Razred I			Razred II		
Podrazred	Enzim	Kvaterna struktura	Podrazred	Enzim	Kvaterna struktura
IA	IleRS	α	IIA	GlyRS	α_2
	LeuRS	α		HisRS	α_2
	MetRS	α, α_2		ProRS	α_2
	ValRS	α		SerRS	α_2
IB	CysRS	α, α_2		ThrRS	α_2
	GlnRS	α			
	GluRS	α			
IC	TrpRS	α_2		IIB	AsnRS
	TyrRS	α_2	AspRS		α_2
			LysRS		α_2
ID	ArgRS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

Za primarnu funkciju aaRS, potrebna im je katalitička domena koja se kod aminoacil-tRNA sintetaza razreda I nalazi na N-kraju i sastoji od peteročlane paralelne β -ploče povezane α -zavojnica, koja pripada superporodici HUP (kratica dolazi od engl. *HIGH-signature proteins, UspA, and PP-ATPase*) (Aravind *i sur.*, 2002.) (Gruic-Sovulj *i sur.*, 2021., u postupku recenzije) i posjeduje strukturni motiv koji odgovara Rossmannovom motivu (Perona i Gruic-Sovulj, 2014.). Taj dobro poznati motiv karakterističan je za proteine koji vežu ATP ili NAD⁺. ATP se unutar te strukture veže pomoću dva očuvana slijeda: HIGH (slijed histidil-izoleucil-glicil-histidin) i KMSKS (slijed lizil-metionil-seril-lizil-serin). Većina aaRS razreda I su

monomerni proteini, osim tirozil- i triptofanil-tRNA-sintetaza (Perona i Gruic-Sovulj, 2014.). Enzimi se vežu na tRNA velikim dijelom svoje površine, a za razred I specifično je vezanje akceptorske peteljke sa strane malog utora. U tom položaju 3' kraj tRNA zauzima konformaciju ukosnice i veže se u aktivno mjesto enzima. U aktivnom mjestu enzimi esterificiraju 2' OH skupinu adenzina na 3' kraju tRNA, a zatim transesterifikacijom u otopini aminokiselina prelazi na 3' OH skupinu adenzina. Za enzime razreda I karakteristična je CP1 (engl. *connective peptide*) domena koja je umetnuta u katalitičku domenu. Ona je posebice zanimljiva kod enzima izoleucil-tRNA-sintetaze (IleRS), leucil-tRNA-sintetaze (LeuRS) i valil-tRNA-sintetaze (ValRS) (razred Ia) kod kojih je uvećana i posjeduje zasebnu katalitičku funkciju (vidi kasnije) (Perona i Gruic-Sovulj, 2014.).

Većina enzima razreda II su homodimeri i imaju tri sačuvana strukturna motiva: motiv 1, motiv 2 i motiv 3. Katalitičku domenu čine dijelovi motiva 2 i 3, a motiv 1 gradi dimerizacijsko sučelje tj. mjesto povezivanja dvaju podjedinica. Motiv 1 građen je od dugačke α -zavojnice, motiv 2 od dva antiparalelna β -lanca povezana petljom, a motiv 3 od β -lanca na kojeg se nastavlja α -zavojnica. Motivi 2 i 3 vežu ATP, a motiv 2 dodatno veže aminokiselinu i akceptorsku petlju tRNA (Cavarelli *i sur.*, 1994.). Za razliku od razreda I, aaRS razreda II tRNA vežu tako da aktivno mjesto prilazi sa strane velikog utora akceptorske petlje i katalizira aminoacilaciju direktno na 3' OH terminalnog adenzina (izuzev fenilalanil-tRNA-sintetaze koja prenosi aminokiselinu na 2' OH) (Perona i Gruic-Sovulj, 2014.).

Reakcija aminoaciliranja može se podijeliti na dva koraka (slika 9). Prvi korak je aktivacija aminokiseline i nastanak aminoacil-adenilata (aa-AMP-a). Drugi korak je prijenos aktivirane aminokiseline na pripadnu tRNA i nastanak aminoacilirane tRNA (aa-tRNA). Većina enzima aktivaciju aminokiseline može obavljati bez prisustva tRNA. Iznimka su glutamil-tRNA-sintetaza, arginil-tRNA-sintetaza, lizil-tRNA sintetaza razreda I i glicil-tRNA-sintetaza što ih čini ribonukleoproteinima (revijalno prikazano u Perona i Hadd, 2012.). U prvom koraku (aktivacija aminokiseline), α -karboksilni kisikov atom aminokiseline nukleofilno napada atom fosfora iz α -fosfatne skupine ATP-a. Tom reakcijom nastaje aa-AMP i oslobađa se pirofosfat. U drugom koraku (prijenos aminokiseline), 3' ili 2' hidroksilna skupina riboze terminalnog adenzina na 3' kraju tRNA, nukleofilno napada α -karbonilni ugljikov atom aminoacil-adenilata i aminokiselina se prenosi na tRNA, a oslobađa se AMP (Ibba i Soll, 2000.). Anorganska-pirofosfataza hidrolizira pirofosfat oslobođen prilikom prvog koraka što reakciju čini termodinamski povoljnom. Ukupna reakcija aminoaciliranja mehanistički se razlikuje između razreda I i II. Kod aaRS razreda I najsporiji korak u reakcijskom putu je disocijacija produkta, a kod razreda II je to neki raniji korak u reakciji povezan s nastajanjem aa-tRNA (Perona i Gruic-Sovulj, 2014.).

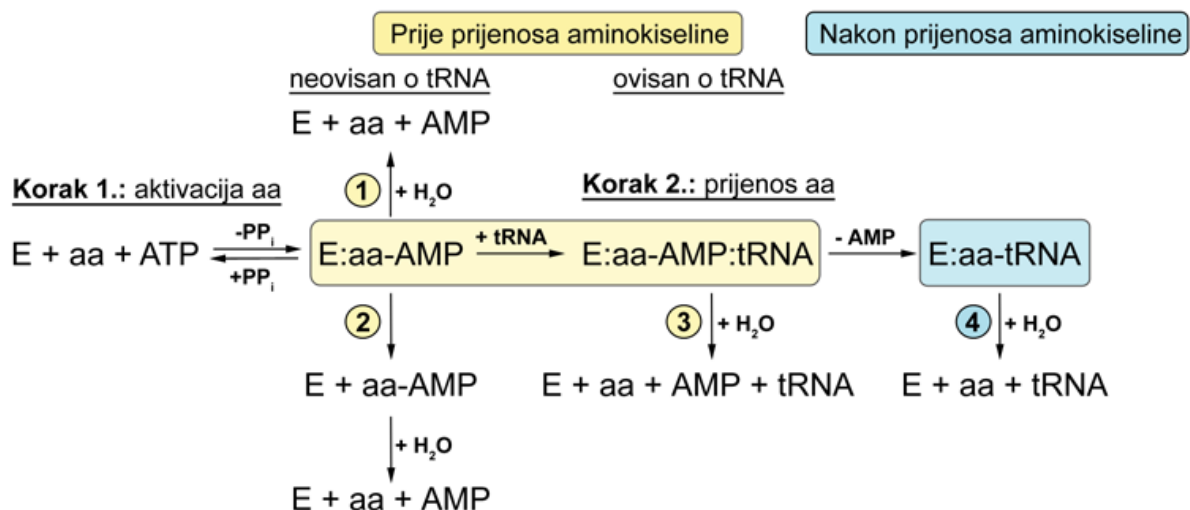


Slika 9. Shematski prikaz mehanizma aminoacilacije. Preuzeto i prilagođeno iz (Nelson i Cox, 2013.).

Da bi aaRS obavljale svoju funkciju, moraju prepoznati i vezati pripadne tRNA molekule i aminokiseline s visokom točnošću. S obzirom na veličinu tRNA, a samim time i veći broj mogućih interakcijskih mjesta, aaRS puno lakše prepoznaju pripadnu tRNA. S druge strane, velika strukturna i kemijska sličnost između nekih proteinogenih, ali i neproteinogenih aminokiselina, njihovo prepoznavanje često čini problematičnim za aaRS. Zbog održavanja

zadovoljavajuće vjernosti translacije proteina, aminoacil-tRNA-sintetaze trebaju biti što točniji enzimi. Procijenjena razina tolerancije pogreške pri translaciji iznosi 3 u 10 000 (Lofffield i Vanderjagt, 1972.). Stoga su one aaRS koje ne mogu prepoznavati pripadnu aminokiselinu na zadovoljavajućoj razini, evolucijski razvile mehanizme popravka pogreške. Radi se o: alanil-tRNA-sintetazi (AlaRS), LeuRS, IleRS, ValRS, metionil-tRNA-sintetaza (MetRS), seril-tRNA-sintetaza (SerRS), treonil-tRNA-sintetaza (ThrRS), prolil-tRNA-sintetaza (ProRS), fenilalanil-tRNA-sintetaza (PheRS) i lizil-tRNA-sintetaza razreda II (LysRS-II) (Perona i Gruic-Sovulj, 2014.).

Na slici 10 prikazana je ukupna reakcijska shema aaRS. Popravak pogreške može se odvijati prije ili nakon prijenosa aminokiseline. Popravak pogrešno aktivirane aminokiseline, odnosno popravak prije prijenosa može se odvijati na tri načina. Enzimi mogu otpustiti misaminoacil-adenilat, a zatim u otopini dolazi do neenzimske hidrolize nestabilnog miješanog anhidrida. Popravak pogreške prije prijenosa može biti i enzimski kataliziran, a u tom slučaju se odvija u sintetskom aktivnom mjestu (Cvetesic *i sur.*, 2015.). Dodatno se takav popravak dijeli prema prisutnosti tRNA, na tRNA-ovisan i tRNA-neovisan popravak (Jakubowski i R.fersht, 1981.). Razlika je u tome potiče li tRNA hidrolitičku aktivnost enzima ili ne. Inače, popravak pogreške prije prijenosa smatra se manje bitnim popravkom jer je zaslužan za manji postotak ukupnog popravka pogreške aaRS. Iznimke su: seril-tRNA-sintetaza, metionil-tRNA sintetaza i lizil-tRNA-sintetaza razreda II koje mogu provoditi samo popravak pogreške prije prijenosa, te donekle izoleucil-tRNA-sintetaza kod koje je tRNA-ovisan popravak prije prijenosa zaslužan za čak 30% ukupnog popravka (Dulic *i sur.*, 2014.).



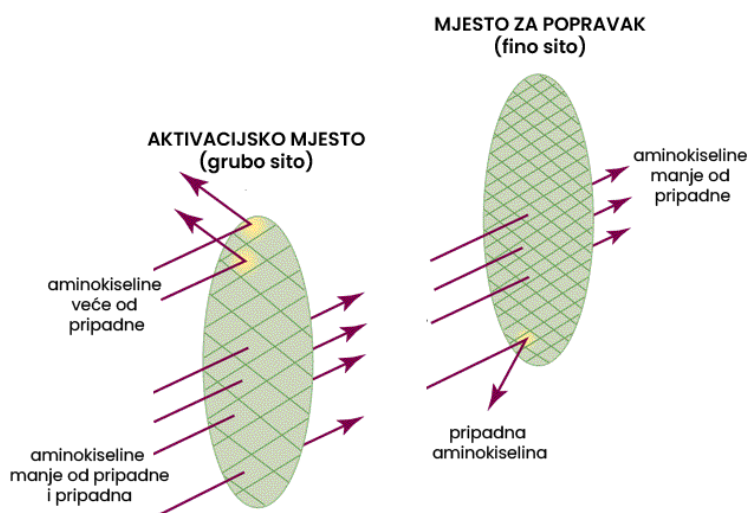
Slika 10. Shematski prikaz mogućih mehanizama popravka pogreške aaRS. (1) Popravak prije prijenosa u aktivnom mjestu enzima neovisan o tRNA. (2) Popravak prije prijenosa disocijacijom s enzima i hidrolizom u otopini. (3) Popravak prije prijenosa u aktivnom mjestu enzima ovisan o tRNA. (4) Popravak nakon prijenosa u specifičnoj domeni za popravak. Preuzeto i prilagođeno iz (Cvetesic *i sur.*, 2014.).

U slučaju da pogrešno aktivirana aminokiselina bude prenesena na tRNA, kao opcija preostaje popravak pogreške nakon prijenosa. Popravak pogreške nakon prijenosa odvija se u zasebnoj domeni koja je prisutna kod 7 od 10 aaRS koje mogu provoditi popravak (Perona i Gruic-Sovulj, 2014.). Pogrešno aminoacilirana tRNA može doći do domene za popravak na dva načina. U prvom slučaju, 3' kraj aminoacilirane tRNA direktno se premješta iz sintetskog aktivnog mjesta u aktivno mjesto domene za popravak pogreške bez disocijacije tRNA s enzima. U tom slučaju govorimo o *in cis* popravku pogreške nakon prijenosa. U drugom slučaju, kada je disocijacija aminoacilirane tRNA brži ili povoljniji korak od translokacije 3'-kraja aa-tRNA u domenu za popravak, pogreška se može popraviti *in trans* mehanizmom. U sklopu *in trans* mehanizma, aa-tRNA se nakon disocijacije ponovno veže na aaRS s 3' krajem smještenim u domenu za popravak pogreške. U domeni za popravak pogreške dolazi do hidrolize esterske veze između nepripadne aminokiseline i tRNA. *In trans* popravak pogreške može biti spriječen ukoliko se aa-tRNA veže na EF-Tu koji onemogućava njezino ponovno vezanje na aaRS.

Enzimi razreda I koji mogu obavljati popravak pogreške nakon prijenosa su IleRS, LeuRS i ValRS (podrazred Ia). Prethodno je spomenuto kako oni posjeduju uvećanu CP1 domenu, a upravo se u njoj odvija popravak pogreške nakon prijenosa. Udaljenost sintetskog mjesta i mjesta za popravak je otprilike 30-40 Å (Perona i Gruic-Sovulj, 2014.). Zbog toga što je disocijacija produkta najsporiji korak kod aaRS razreda I, smatra se da se kod njih popravak

pogreške nakon prijenosa odvija *in cis* putem. Za enzime razreda II smatra se da popravak pogreške nakon prijenosa većinom provode *in trans* mehanizmom (Ling *i sur.*, 2009.).

Eliminacija neprikladnih aminokiselina iz reakcijskog puta aaRS opisana je modelom dvostrukog sita (Fersht, 1977.). Prema tom modelu (slika 11), sintetsko aktivno mjesto je prvo sito u kojemu aminokiseline veće od pripadne bivaju diskriminirane steričkim smetnjama, a pripadna aminokiselina i one manje od nje se aktiviraju i prenose na tRNA. Mjesto za popravak pogreške predstavlja drugo sito i u njemu je obrnuta situacija. Organizirano je tako da se u njega vežu samo aminokiseline manje od pripadne, a pripadna biva isključena steričkim smetnjama. Ovaj model poprilično dobro opisuje ovaj odnos, ali postoje iznimke. Diskriminacija neprikladnih aminokiselina nije uvijek samo na temelju steričkih smetnji u aktivnom mjestu. Na primjeru treonil-tRNA-sintetaze, čija je najveća prijetnja točnosti valin (Val), vidimo da različite interakcije s bočnim ograncima aminokiselinskog supstrata mogu također imati ulogu u diskriminaciji. ThrRS u sintetskom mjestu ima ion cinka koji ostvaruje vezu s hidroksilnom skupinom pripadnog treonina (Thr), što nije moguće u slučaju neprikladnog Val (Sankaranarayanan *i sur.*, 1999.). Na taj način ThrRS efikasno razlikuje strukturno vrlo slične Thr i Val. Jedna od iznimaka je leucil-tRNA-sintetaza na kojoj je pokazano kako se i pripadna Leu-tRNA^{Leu} ipak može vezati u mjesto za popravak pogreške. No, prilikom vezanja pripadni leucin (Leu) zauzima katalitički neproduktivnu konformaciju pa se diskriminacija ne odvija kroz sprečavanje vezanja, već kinetički kroz drastično usporenu hidrolizu koja omogućava da u konačnici ispravno aminoacilirana tRNA disocira prije nego će biti hidrolizirana (Dulic *i sur.*, 2017.).

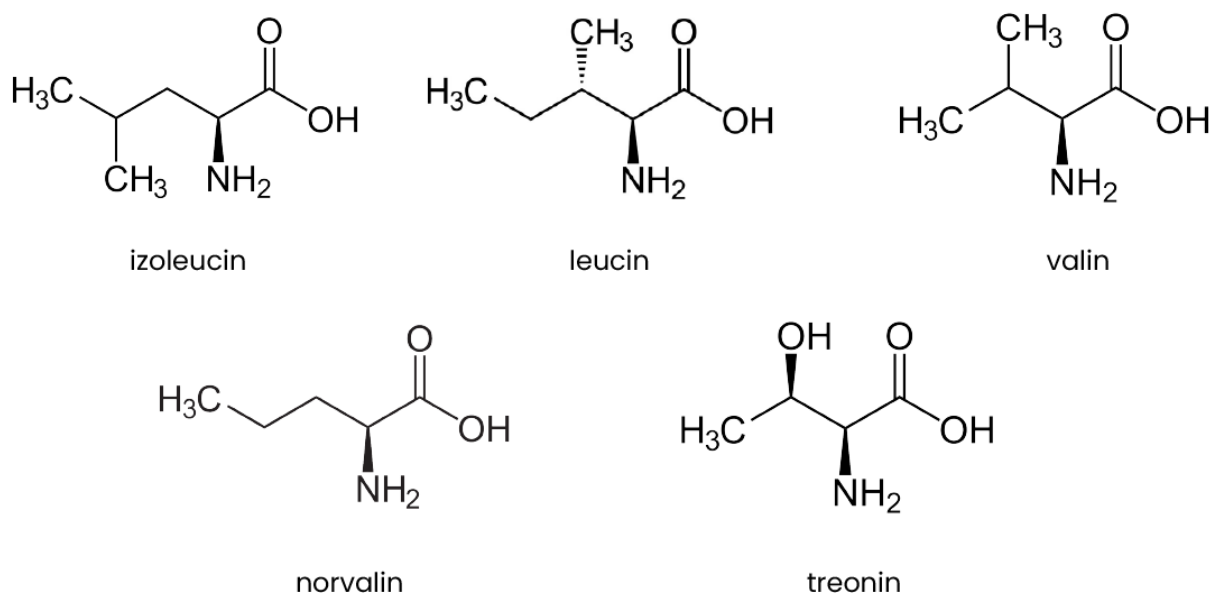


Slika 11. Shema modela dvostrukog sita. Preuzeto i prilagođeno iz (Fersht, 1998.).

Zbog bliske evolucijske srodnosti izoleucil-, leucil- i valil-tRNA sintetaza i CP1 domene za popravak pogreške koja je na razini primarne i tercijarne strukture vrlo slična među tim sintetazama, zanimljivo je proučavati njihove mehanizme popravka pogreške nakon prijenosa. Iz tih saznanja mogu se izvući zaključci o evoluciji mjesta za popravak i evoluciji selektivnosti CP1 domene prema različitim supstratima. IleRS, LeuRS i ValRS ne uspijevaju dovoljno dobro diskriminirati sve nepripadne aminokiseline u sintetskom mjestu te su zbog toga razvile mehanizme popravka pogreške. Zanimljivo, kod IleRS i ValRS pokazano je kako obavljaju popravak pogreške i kod supstrata koje veoma dobro diskriminiraju u aktivacijskom koraku (Bilus *i sur.*, 2019.; Živković *i sur.*, 2019.). Za IleRS je pokazano da uspješno hidrolizira brojne nepripadne supstrate (valil-, norvalil-, leucil-, metionil-, norleucil-, α -aminobutiril-, treonil-, alanil-, seril-tRNA^{Ile}) (Bilus *i sur.*, 2019., neobjavljeni rezultati Živković i Gruić Sovulj). ValRS popravak obavlja u slučaju treonil-, norvalil- i α -aminobutiril-tRNA^{Val} (Bilus *i sur.*, 2019.; Fersht i Dingwall, 1979a.), a LeuRS u slučaju norvalil- i izoleucil-tRNA^{Leu} (Cvetesic *i sur.*, 2012.). Uzevši u obzir strukturnu i kemijsku sličnost brojnih mogućih supstrata ovih enzima, činjenica da domena za popravak uspješno diskriminira samo pripadnu aminokiselinu, a popravak obavlja u slučaju drugih, je iznimno impresivna. Sada slijedi detaljniji opis izoleucil-tRNA-sintetaze (EC 6.1.1.5), leucil-tRNA-sintetaze (EC 6.1.1.4) i valil-tRNA sintetaze (EC 6.1.1.9), koje su proučavane u ovom radu.

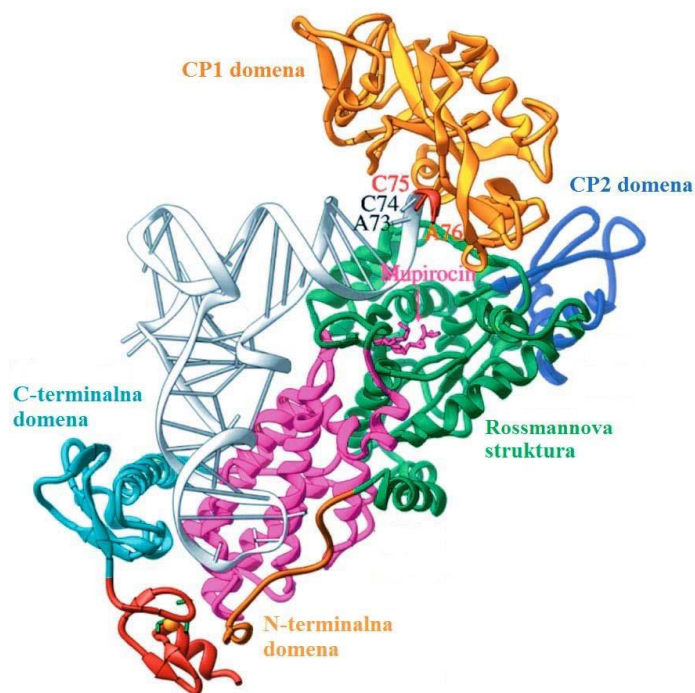
1.1.5. Izoleucil-tRNA sintetaza

Izoleucil-tRNA-sintetaza je monomerni protein koji pripada razredu Ia aminoacil-tRNA-sintetaza. Prethodno je spomenuto da u razred Ia spadaju i leucil-tRNA-sintetaza i valil-tRNA sintetaza. Ta tri enzima evolucijski su srodna te kataliziraju reakcije s razgranatim alifatskim aminokiselinama (slika 12).



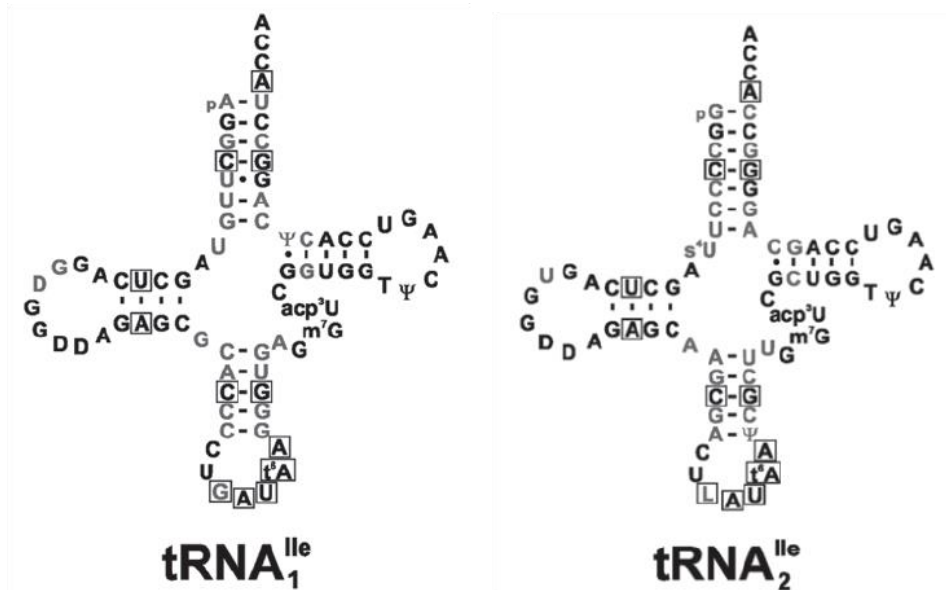
Slika 12. Najvažniji pripadni i nepripadni supstrati aaRS razreda Ia. U prvom redu prikazane su strukture pripadnih aminokiselina aaRS razreda Ia: izoleucin je pripadna aminokiselina za IleRS, leucin za LeuRS, a valin za ValRS. U drugom redu prikazane su strukture norvalina, nepripadne neproteinogene aminokiseline koju najčešće pogrešno aktivira LeuRS i treonina, proteinogene aminokiseline koja predstavlja najveću prijetnju točnosti aminoaciliranja ValRS. Za IleRS najveća prijetnja točnosti aminoaciliranja je valin.

Strukturno, IleRS se sastoji od N-terminalne katalitičke domene, dvije insercijske domene CP1 i CP2 te C-terminalne, odnosno tRNA-vezujuće domene (slika 13). Sintetsko aktivno mjesto nalazi se unutar domene HUP što je već prije opisano kod pregleda aminoacil-tRNA-sintetaza. Također, spomenuta je funkcija CP1 domene koja sadrži mjesto za popravak pogreške nakon prijenosa. CP2 domena za razliku od CP1, nema posebnu funkciju, ali je poznato da je potrebna za aktivnost enzima (Nureki *i sur.*, 1998.). IleRS je metaloenzim koji sadrži dva iona cinka (Zn^{2+}) koji imaju strukturnu ulogu. Kod IleRS iz bakterije *E. coli*, jedan ion cinka se nalazi na N-kraju, a drugi na C-kraju proteina. Oba iona su koordinirana s četiri cisteinska bočna ogranka. Bez iona cinka, IleRS nije katalitički aktivna (Nureki *i sur.*, 1993.).



Slika 13. Struktura IleRS iz bakterije *Staphylococcus aureus* u kompleksu s mupirocinom (ljubičasto) i tRNA^{Ile} (bijelo) (PDB ID: 1QU2). Na slici su označeni strukturni elementi. Preuzeto i prilagođeno iz (Silvian *i sur.*, 1999.).

Kao i ostatak monomernih sintetaza razreda I, IleRS se na tRNA veže sa strane malog utora akceptorske peteljke (Perona i Gruic-Sovulj, 2014.). Interakcijske determinante za antikodonsku petlju tRNA^{Ile} nalaze se na C-kraju enzima (Silvian *i sur.*, 1999.). Aminokiselina izoleucin kodirana je s tri različita kodona: AUU, AUA i AUC. Kod *E. coli* postoje dvije izoakceptorske tRNA^{Ile}. Glavna izoakceptorska tRNA₁^{Ile} sadrži antikodon GAU i prepoznaje kodone AUU i AUC, a sporedna tRNA₂^{Ile} sadrži antikodon LAU i prepoznaje kodon AUA (slika 14). Modificirana baza lizidin (L) u antikodonu tRNA₂^{Ile} predstavlja citozin kojem je posttranskripcijski dodan lizin na C2' položaj (Muramatsu *i sur.*, 1988b.).



Slika 14. Dvije izoakceptorske tRNA molekule za izoleucin iz *E.coli*. Glavni elementi identiteta označeni su kvadratićima. Preuzeto i prilagođeno iz (Nordin i Schimmel, 2005.).

Na slici 14 označeni su glavni elementi identiteta, a to su antikodonske baze, diskriminatorska baza A73 i parovi baza u akceptorskoj, D i antikodonskoj peteljci.

Pripadna aminokiselina IleRS je izoleucin. Zbog visoke strukturne sličnosti nekih aminokiselina, IleRS može pogrešno aktivirati nepripadne aminokiseline. Najznačajnija je valin, zbog toga što se radi o proteinogenoj aminokiselini koja se u staničnim uvjetima kod *E. coli* nalazi u visokoj koncentraciji (4 mmol dm^{-3}) (Park *i sur.*, 2016.). Aktivacija valina uz IleRS je svega oko 200 puta manje učinkovita nego aktivacija pripadnog izoleucina (Dulic *i sur.*, 2010.; Fersht, 1977.). Faktor kojim se određuje koliko je neki supstrat lošiji od drugog naziva

se diskriminacijski faktor i definira se kao: $D = \frac{\left(\frac{k_{cat}}{K_M}\right)_{pripadni\ supstrat}}{\left(\frac{k_{cat}}{K_M}\right)_{nepripadni\ supstrat}}$. Osim valina bitno je

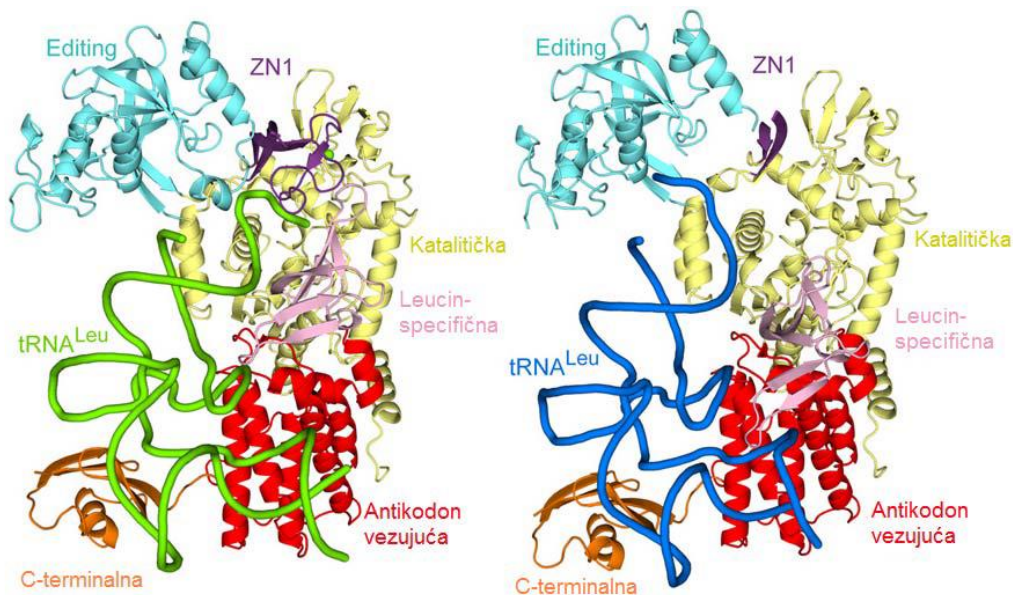
spomenuti još jednu nepripadnu aminokiselinu koja predstavlja problem za IleRS, a to je norvalin. Norvalin je neproteinogena aminokiselina koja nastaje kao nusprodukt biosinteze leucina, a u stanicama *E. coli* može se akumulirati prilikom rasta u mikroaerobnim uvjetima i do koncentracije od 1 mmol dm^{-3} (Soini *i sur.*, 2008.). Aktivacija norvalina u sintetskom aktivnom mjestu IleRS otprilike je jednaka aktivaciji valina (diskriminacijski faktor za norvalin iznosi 239, a za valin 159) (Bilus *i sur.*, 2019.). Niti jedna do sada testirana aminokiselina nije diskriminirana u koraku prijenosa na tRNA^{Ile} (Bilus *i sur.*, 2019.; Zivkovic *i sur.*, 2020.). Zbog niskog diskriminacijskog faktora, za sprečavanje pogrešnog aminoaciliranja uz obje aminokiseline nužan je popravak pogreške nakon prijenosa. Hidroliza Nva-tRNA^{Ile} je 2 puta brža nego Val-tRNA^{Ile} (Nva $85 \pm 10 \text{ s}^{-1}$, Val $49 \pm 6 \text{ s}^{-1}$). Istraživanja aminoaciliranja tRNA^{Ile} s nepripadnim valinom i norvalinom u *in vivo* uvjetima pokazala su da je norvalin toksičniji (niža

IC₅₀ vrijednost i manji broj CFU (engl. *colony-forming units*). Autori rada to predlažu kao moguće objašnjenje za opažanje brže hidrolize Nva-tRNA^{Ile} (Bilus *i sur.*, 2019.).

Na temelju strukture CP1 domene s vezanim supstratom iz *T. thermophilus* IleRS, identificirana je građa mjesta za popravak pogreške (Fukunaga *i sur.*, 2004.; Fukunaga i Yokoyama, 2006.). U džep sastavljen od Thr233, His319, Ala321 i Phe324 smješta se bočni ogranak aminokiselinskog dijela aa-tRNA^{Ile}. α -amino skupina elektrostatski interagira s aminokiselinama Asp328 i His319, dok Trp227 i His319 pozicioniraju molekulu vode koja ostvaruje vodikove veze s α -karboksilnom skupinom. Zanimljivo, kao i kod LeuRS, pokazano je da se pravilno aminoacilirana Ile-tRNA^{Ile} (Leu-tRNA^{Leu} kod LeuRS) hidrolizira u mjestu za popravak pogreške, ali je brzina hidrolize dovoljno mala (0.058 s⁻¹) da Ile-tRNA^{Ile} preferencijalno disocira s enzima (Cvetesic *i sur.*, 2015.). Ipak, to sugerira da ni mjesto za popravak pogreške IleRS ne diskriminira isključivo sprječavanjem vezanja na temelju steričkih smetnji, ali za detaljnu karakterizaciju tog fenomena potrebna su daljnja istraživanja. Zbog toga što je kod aaRS razreda I disocijacija produkta najsporiji korak u ukupnoj reakciji aminoaciliranja (Perona i Gruic-Sovulj, 2014.), smatralo se da se popravak pogreške nakon prijenosa preferentno odvija *in cis* mehanizmom. Neobjavljeni rezultati istraživačke grupe Gruic Sovulj, uočeni prilikom rada s mutantima IleRS kojima je izmijenjeno mjesto za popravak pogreške, dali su naslutiti da se dio popravka događa *in trans* mehanizmom. Uslijed tih opažanja osmišljen je ovaj rad kako bi se ispitaio mehanizam popravka pogreške nakon prijenosa kod svih aaRS razreda Ia.

1.1.6. Leucil-tRNA-sintetaza

Leucil-tRNA-sintetaza također pripada razredu Ia. Kao i ostali članovi tog razreda, LeuRS sadrži HUP domenu u kojoj se nalazi aktivno sintetsko mjesto te CP1 domenu u kojoj je mjesto za popravak pogreške nakon prijenosa. Uz te strukturne elemente, u LeuRS se nalaze i antikodon-vezujuća domena, leucin specifična domena, cink vezujuća domena (ZN1) i C-terminalna domena (Palencia *i sur.*, 2012.). Na slici je prikazana struktura LeuRS iz bakterije *E. coli* (slika 15).



Slika 15. Struktura leucil-tRNA-sintetaze iz *E. coli* u kompleksu s tRNA^{Leu} (PDB ID: 4AQ7). Na slici su prikazane dvije konformacije kompleksa. Lijeva konformacija je prisutna prilikom aminoaciliranja, kada se 3' kraj tRNA nalazi u aktivnom sintetskom mjestu, a desna konformacija je prilikom popravka pogreške nakon prijenosa, kada je 3' kraj tRNA u domeni za popravak (engl. editing). Preuzeto i prilagođeno iz (Palencia *i sur.*, 2012.).

U ZN1 domeni vezan je ion cinka koji ima strukturnu ulogu, a kao i kod IleRS koordiniran je cisteinskim bočnim ograncima. Leucin-specifičnu domenu posjeduje samo prokariotski tip LeuRS. Kod *E. coli*, ta domena je duga 51 aminokiselinu i sastoji se od pet β lanaca povezanih omčama, a njena funkcija nije još potpuno razjašnjena (Vu i Martinis, 2007.). C-terminalna domena sastavljena je od α zavojnica i β lanaca, a pretpostavlja se da ima ulogu u aminoaciliranju putem pozicioniranja tRNA. Antikodon vezujuća domena građena je od šest α -zavojnica i ostvaruje interakcije s antikodonskom rukom tRNA^{Leu}. S obzirom na to da je leucin, pripadna aminokiselina LeuRS, kodiran sa šest različitih kodona, antikodonske baze tRNA^{Leu} nisu element identiteta.

Postoji pet izoakceptorskih tRNA^{Leu}: tRNA^{Leu}_{CAG}, tRNA^{Leu}_{CAA}, tRNA^{Leu}_{GAG}, tRNA^{Leu}_{UAG} i tRNA^{Leu}_{UAA}. Najvažniji elementi identiteta preko kojih LeuRS prepoznaje tRNA^{Leu} su diskriminatorska baza A73, varijabilna ruka te baza U16 (Palencia *i sur.*, 2012.). Neke interakcije se mijenjaju ovisno o tome u kojoj se konformaciji nalazi kompleks enzima i tRNA. Prepoznavanje se ne događa preko antikodonske omče kao kod IleRS, a u interakcijama još sudjeluju domena ZN1, C-terminalna domena te leucin specifična domena (Palencia *i sur.*, 2012.).

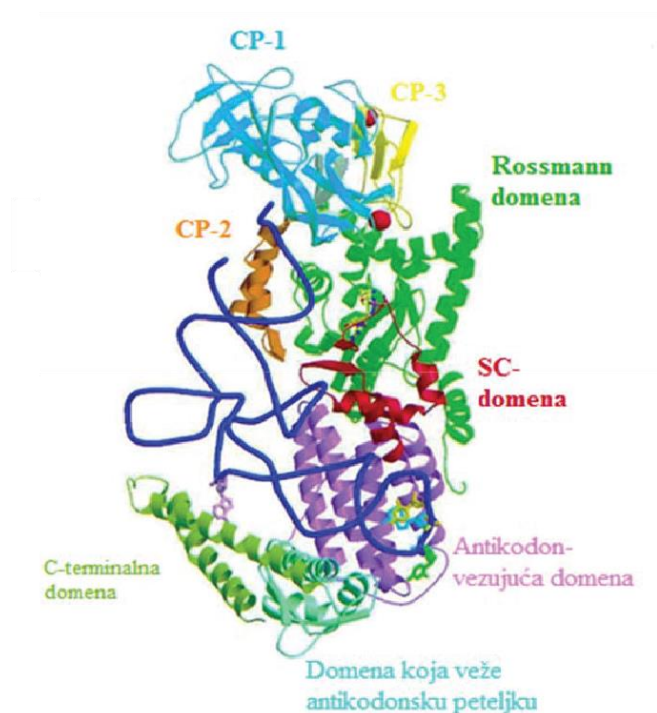
LeuRS aminoacilira tRNA^{Leu} pripadnom aminokiselinom leucinom. Zbog strukturne sličnosti, može pogrešno aktivirati valin, izoleucin i metionin od proteinogenih i norvalin,

norleucin i α -aminobutirat od neproteinogenih (Apostol *i sur.*, 1997.; Boniecki *i sur.*, 2008.; Chen *i sur.*, 2000.; Lincecum *i sur.*, 2003.; Lue i Kelley, 2005., 2007.; Martinis i Fox, 1997.; Tang i Tirrell, 2002.). Iako je zabilježeno da može aktivirati navedene aminokiseline, LeuRS većinu navedenih aminokiselina dovoljno dobro diskriminira i nema potrebe za dodatnim popravkom pogreške prema njima. Jedinu prijetnju predstavlja norvalin koji ima faktor diskriminacije od samo 116, ali se uspješno eliminira popravkom pogreške nakon prijenosa (Cvetesic *i sur.*, 2012.). Izoleucin je dugo smatran velikom prijetnjom točnosti aminoaciliranja LeuRS, ali 2014. godine je potvrđeno da je izoleucin dobro diskriminiran (faktor diskriminacije oko 31000) (Cvetesic *i sur.*, 2014.). Greške u kinetičkim mjerenjima koje su prethodno dovele do krivih zaključaka i varijabilnih rezultata bile su posljedica kontaminacije komercijalnih uzoraka izoleucina leucinom. Navedena kontaminacija, čak i u malim postotcima, može značajno utjecati na rezultate, osobito ako se radi o kinetici ustaljenog stanja.

Popravak pogreške nakon prijenosa odvija se u CP1 domeni. Kod LeuRS CP1 domena sadrži hidrolitički aktivno mjesto bogato treoninima, koje se zbog toga zove „regija bogata treoninom“. Brzina hidrolize Nva-tRNA^{Leu} iznosi $310 \pm 2 \text{ s}^{-1}$, a za Ile-tRNA^{Leu} iznosi $42 \pm 7 \text{ s}^{-1}$ (Cvetesic *i sur.*, 2012.) te se iz tog podatka može zaključiti da je mjesto za popravak prilagođeno norvalinu. Kao i za ostale sintetaze razreda Ia smatra se da je mehanizam popravka *in cis*.

1.1.7. Valil-tRNA-sintetaza

Valil-tRNA-sintetaza je posljednji član podrazreda Ia. Enzim je monomer sastavljen od šest strukturnih elemenata. HUP domena sadrži katalitičko mjesto, a uz nju su prepoznatljive CP domene kojih kod ValRS ima čak tri (CP1, CP2 i CP3), antikodon-vezujuća domena, središnja domena koja interagira s peteljkom tRNA (engl. *stem contact*, SC), domena koja veže antikodonsku peteljkicu i C-terminalna domena (slika 16) (Fukai *i sur.*, 2003.).



Slika 16. Struktura valil-tRNA-sintetaze iz *Thermus thermophilus* u kompleksu s tRNA^{Val} (PDB ID: 1IVS). Na slici su označeni strukturni elementi. Preuzeto i prilagođeno iz (Fukai *i sur.*, 2003.).

Bitni pozitivni elementi identiteta tRNA^{Val} su druga i treća baza antikodona: A35 i C36. Kolebljiva baza antikodona nije element identiteta tRNA^{Val}. Diskriminatorna baza na poziciji 73 može služiti kao pozitivni element identiteta ukoliko se na toj poziciji nalazi A, U ili C (Horowitz *i sur.*, 1999.). Osim nabrojanih, ValRS i tRNA^{Val} ostvaruju i brojne druge interakcije. Primjerice, SC domena ValRS je pozitivno nabijena i ostvaruje interakcije s fosfatnom okosnicom D-ruke tRNA^{Val} (Fukai *i sur.*, 2003.).

ValRS spaja valin i tRNA^{Val}. Zbog nedovoljne specifičnosti sintetskog aktivnog mjesta, ValRS ponekad radi pogreške i aktivira nepripadne aminokiseline. Aminokiseline koje ValRS najčešće pogrešno aktivira su proteinogeni treonin i cistein te neproteinogeni α -aminobutirat (Fersht i Dingwall, 1979b.). Iako aminokiselina valin predstavlja problem enzimu IleRS, obrnuti slučaj ne vrijedi i ValRS uspješno diskriminira izoleucin u aktivnom mjestu. Izoleucin je za jednu metilensku skupinu veća aminokiselina od valina te je njena diskriminacija u sintetskom aktivnom mjestu u skladu s modelom dvostrukog sita. Najveća prijetnja ispravnoj aminoacilaciji tRNA^{Val} je treonin, ali je zato treonin dobro prepoznat u domeni za popravak pogreške, a brzina hidrolize Thr-tRNA^{Val} iznosi $438 \pm 47 \text{ s}^{-1}$ (Bilus *i sur.*, 2019.).

Za ValRS je pokazano da provodi popravak pogreške prije prijenosa neovisan o tRNA (Dulic *i sur.*, 2010.), ali kao i kod prethodno opisanih IleRS i LeuRS, najvažniji je popravak

pogreške nakon prijenosa. Mjesto za popravak nalazi se u CP1 domeni, ali njena specifičnost postiže se na drugačiji način nego kod IleRS i LeuRS. Na temelju strukture ValRS iz *T. thermophilus* zaključeno je da aminokiselinski ogranci: Arg216, Thr219, Lys270, Thr272, Asp276 i Asp279, koji se nalaze u mjestu za popravak pogreške, čine hidrofilni džep. Treonin se u mjesto za popravak pogreške može dobro vezati jer, preko hidroksilne skupine bočnog ogranka, ostvaruje vodikove veze s hidrofilnim bočnim ograncima aminokiselina Lys270, Thr272 i Asp279 (Fukai *i sur.*, 2000.). S druge strane, pripadni valin nema tu mogućnost (nema hidroksilnu skupinu) te na taj način biva diskriminiran u mjestu za popravak pogreške. Postignuto rješenje u mjestu za popravak ValRS podsjeća na prethodno opisanu diskriminaciju valina u sintetskom mjestu ThrRS.

2. HIPOTEZA

Za razliku od ValRS i LeuRS, IleRS djeluje kao ribonukleoprotein koji koristi interakciju s tRNA za promjenu svojih kinetičkih svojstava. Naime, tRNA modulira afinitet IleRS prema aminokiselini te potiče hidrolizu reakcijskog intermedijera ukoliko on nastane s nepripadnom aminokiselinom (npr. Val-AMP). U skladu s uočenom mehanističkom razlikom između *E. coli* IleRS i evolucijski srodnih ValRS i LeuRS tijekom popravka pogreške prije prijenosa, hipoteza koju testiramo u ovom radu je da se IleRS razlikuje i u popravku pogreške poslije prijenosa tj. da ima izraženiji *in trans* popravak pogreške nakon prijenosa od LeuRS i ValRS.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Standardne kemikalije

Akrilamid (*Sigma*), amonijev acetat ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) (*Kemika*), amonijev klorid (NH_4Cl) (*Kemika*), amonijev peroksodisulfat (APS) (*Serva*), ampicilin (*Sigma*), 1,4-bis(2-(4-metil-5-fenil)oksazolil)benzen (POPOP) (*Calbiochem*), borna kiselina (*Kemika*), cinkov klorid (ZnCl_2) (*Sigma*), 2,5-difenil oksazol (PPO) (*Merck*), dimetilsulfoksid (DMSO) (*Sigma*), ditiotreitrol (DTT) (*Sigma*), etanol, (*Kemika*), etilendiamintetraoctena kiselina, EDTA (*Sigma*), fenilmetilsulfonil-fluorid (PMSF) (*Sigma*), fenol (*Kemika*), fosfoenolpiruvat (*Sigma*), glicerol (*Kemika*), glicin (*USB Corporation*), *N*-(2-hidroksietil)piperazin-*N*-2-etansulfonska kiselina (Hepes) (*USB Corporation*), imidazol (*Sigma*), izopropil- β -tiogalaktozid (IPTG) (*Sigma*), kanamicin (*Sigma*), kloridna kiselina (HCl) (*Kemika*), kloroform (*Kemika*), kvaščev ekstrakt (*BD Difco*), magnezijev acetat ($(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$) (*Sigma*), magnezijev klorid (MgCl_2) (*Fluka*), β -merkaptotanol (*Serva*), *N,N*-metilenbisakrilamid (*Merck*), natrijev acetat (CH_3COONa) (*Kemika*), natrijev dodecilsulfat (SDS) (*Merck*), natrijev klorid (NaCl) (*Kemika*), natrijev pirofosfat ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) (*Sigma*), octena kiselina (CH_3COOH) (*Kemika*), polietilenglikol 8000 (PEG₈₀₀₀) (*Sigma*), *N,N,N,N*-tetrametiletilendiamin (TEMED) (*Serva*), trifluoroctena kiselina (TFA) (*Sigma*), trikloroctena kiselina (TCA) (*Kemika*), toluen (*T. T. T.*), tripton (*BD Difco*), Tris(hidroksimetil)-aminometan (Tris) (*Sigma*), ureja (*Kemika*).

3.1.2. Aminokiseline i nukleotidi

ATP (*Sigma*), GDP (*Sigma*), GTP (*Sigma*), L-izoleucin (*Sigma*), L-leucin (*Sigma*), L-valin (*Sigma*), L-norvalin (*Sigma*), L-treonin (*Sigma*).

3.1.3. Boje

Bromfenol plavo (*Serva*), Coomassie Brilliant Blue R-250 (*Merck*), Coomassie Brilliant Blue G-250 (*Merck*), ksilencijanolo-fluorofosfat (XCFF) (*Serva*), toluidinsko modriilo (*Sigma*).

3.1.1. Radioaktivno obilježeni spojevi

α -[³²P]-ATP (*Perkin Elmer*), [¹⁴C]-L-izoleucin (*Perkin Elmer*), [¹⁴C]- L-leucin (*Perkin Elmer*), [¹⁴C]- L-valin (*Perkin Elmer*).

3.1.2. Enzimi, proteini i nukleinske kiseline

Albumin iz goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumin*; BSA) (*NEB*), DNaza I (*Sigma*), lizozim (*Sigma*), piruvat-kinaza (*Sigma*), termostabilna anorganska pirofosfataza (TIPP) (*NEB*), nukleaza P1 (*Sigma*).

3.1.3. Markeri veličine

Precision Plus Protein Standards, Unstained (Bio-Rad).

3.1.4. Medij za uzgoj bakterija

Tekuća hranjiva podloga Luria-Bertani (LB):

kvašćev ekstrakt ($\gamma = 5 \text{ g dm}^{-3}$), tripton ($\gamma = 10 \text{ g dm}^{-3}$), NaCl ($\gamma = 10 \text{ g dm}^{-3}$).

3.1.5. *E. coli* soj i plazmidi

E. coli soj BL21 (DE3) (*F ompT hsdS_B (r_B m_B) ga dcm* (DE3), Novagen)

Bakterije koje su korištene prethodno su transformirane plazmidima pET28b, pET21a ili pET3a.

3.1.6. Ostali materijali

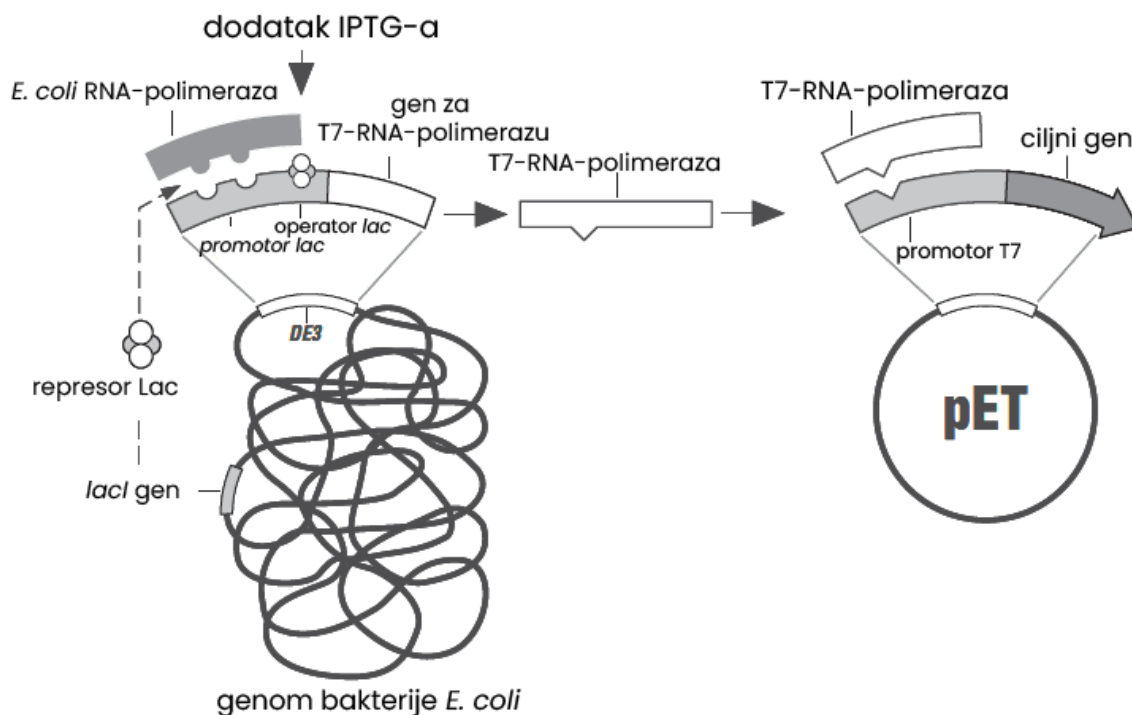
Centricon®-centrifugal filter device (Milipore), Ni-NTA agarozna (*Qiagen*), celulozna membrana za dijalizu (*Sigma*), filtracijski sustav *Sartorius* i sterilni filter papiri od celuloznog acetata promjera pora 0,22 μm (*Sartorius*), mikrotitarske pločice 96 jažica 280 μL (*Kisker*).

3.2. METODE

3.2.1. Metode rada s proteinima

3.2.1.1. Uzgoj i prekomjerna ekspresija proteina

Za prekomjernu ekspresiju proteina IleRS, LeuRS, ValRS i EF-Tu korištene su elektrokompetentne bakterije *E. coli* soja BL21(DE3). Takve stanice koriste se za ekspresiju proteina preko T7-RNA-polimeraznog sustava (slika 17). Deficijentne su za OmpT i Lon proteaze što omogućava sintezu velikih količina proteina i izolaciju nerazgrađenih rekombinantnih proteina. Bakterija je domaćin λ DE3 lizogena koji nosi gen za T7-RNA-polimerazu pod kontrolom *lacUV5* promotora ("BL21(DE3) | Expression strains | NZYTech," n.d.). Kao induktor tog promotora koristi se izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG). IPTG potiče ekspresiju T7-RNA-polimeraze koja zatim sjeda na T7-promotor pod kojim je kloniran ciljani gen i potiče ekspresiju tog gena. T7-promotor i ciljani gen nalaze se u vektoru serije pET, kojim su transformirane stanice. Geni za aaRS klonirani su u plazmidni vektor pET28b. U slučaju proteina EF-Tu korišten je vektor pET21 u kojem je gen *tufB* kloniran u pET21a između restrikcijskih mjesta *NdeI* i *XhoI*. Rezultat takvog kloniranja je EF-Tu s C-terminalnim His-privjeskom.



Slika 17. Shematski prikaz T7-RNA-polimeraznog sustava. Gen za T7-RNA-polimerazu ugrađen je kao lizogen u genom bakterije *E. coli* soja BL21 (DE3) i pod kontrolom je inducibilnog promotora *lac*. U genomu bakterije nalazi se i gen za represor Lac, koji se veže na operator *lac* i sprječava transkripciju gena za T7-RNA-polimerazu. Dodatkom IPTG-a aktivira se transkripcija T7-RNA-polimeraze, koja transkribira ciljane gene klonirane pod T7 promotora u jednom od vektora serije pET. Preuzeto i prilagođeno iz (Dwivedi, 2011.).

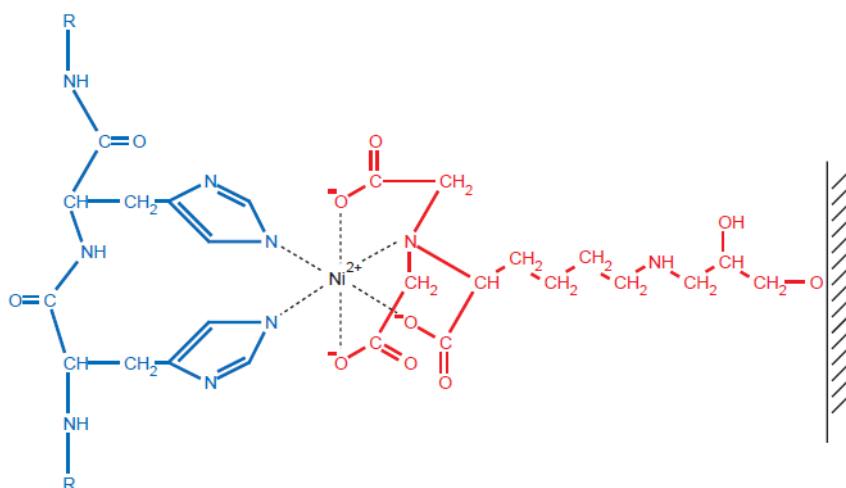
U tekućem LB mediju, pripremljeno je 10 mL pretkulture IleRS, LeuRS i ValRS i 20 mL pretkulture EF-Tu s dodanim odgovarajućim antibioticima ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$ kanamicina za aaRS, $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ampicilina za EF-Tu). Stanice su rasle preko noći u tresilici pri 250 rpm na temperaturi od 37°C . 5 mL pretkulture inokulirano je u 500 mL tekućeg LB medija s dodanim antibiotikom. Uzgoj se odvijao u Erlenmeyerovim tikvicama od 2 L, na temperaturi od 37°C pri 250 rpm. U trenutku kada je OD_{600} (optička gustoća, mjerena spektrofotometrom Evolution 60S (Thermo Scientific) na 600 nm) iznosio oko 0,1, u bakterijske kulture s genima za aaRS, dodan je ZnCl_2 u konačnoj množinskoj koncentraciji od 1 mmol dm^{-3} . Bakterije su zatim u istim uvjetima uzgajane do OD_{600} 0,5 - 0,8 (za aaRS) i 0,6-0,8 (za EF-Tu) kada je inducirana prekomjerna ekspresija proteina dodatkom IPTG-a u konačnoj množinskoj koncentraciji od $0,25 \text{ mmol dm}^{-3}$ za aaRS i $0,2 \text{ mmol dm}^{-3}$ za EF-Tu. Nakon indukcije bakterije su inkubirane još 3 sata u slučaju aaRS i 4 sata u slučaju EF-Tu. Uzgoj je završen taloženjem stanica centrifugiranjem na $10\,000 \times g$ 10 minuta pri 4°C . Talog je odvojen od supernatanta dekantiranjem te pohranjen na -20°C do korištenja.

3.2.1.2. Izolacija proteina

Talog stanica dobiven iz 1 L uzgoja u slučaju aaRS resuspendiran je u 10 mL pufera A ($c(\text{NaCl}) = 500 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{Hepes}) = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$ pH = 7,5, $c(\text{MgCl}_2) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{imidazol}) = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\beta\text{-merkptoetanol}) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$), a u slučaju EF-Tu u 20 mL pufera A_{EF-Tu} ($c(\text{NaCl}) = 500 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{Hepes}) = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$ pH = 7,5, $c(\text{MgCl}_2) = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{imidazol}) = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\beta\text{-merkptoetanol}) = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$, $\varphi(\text{glicerol}) = 5\%$, $c(\text{GDP}) = 100 \mu\text{mol dm}^{-3}$). U resuspendirani talog dodani su lizozim ($50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$), DNaza I ($3 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) i PMSF – inhibitor serinskih proteaza ($0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$). Stanice su lizirane sonikacijom 6 puta po minutu s minutom pauze između sonikacijskih pulsova. Tijekom cijelog procesa stanice su držane na ledu. Kako bi se odvojile otopljene od netopljivih komponenti, sonikat je centrifugiran pri $20\,000 \times g$, 2 h pri $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Supernatant je odvojen dekantiranjem i zatim filtriran protiskivanjem kroz sterilni filter s porama veličine $0,22 \mu\text{m}$. Tako pripremljeni ekstrakt proteina spreman je za pročišćavanje.

3.2.1.3. Pročišćavanje uz afinitetnu kromatografiju

Proteini od interesa pročišćeni su na kromatografskom sustavu Äkta Pure 25 (*GE Healthcare*). Korištena je metoda afinitetne kromatografije s imobiliziranim metalnim ionom. Konkretno, korištena je Ni-NTA agaroz s kojom se pročišćavanje temelji na reverzibilnom vezanju histidinskog privjeska proteina na ion nikla stacionarne faze. Kolona je punjena sefarozom na koju je kovalentno vezana nitrilotriocetna kiselina (NTA) koja ostvaruje interakcije s četiri koordinacijska mjesta Ni^{2+} iona. Dva koordinacijska mjesta ostaju slobodna te se na njih mogu vezati imidazolni prstenovi susjednih histidina u polihistidinskom privjesku (slika 18).



Slika 18. Interakcija histidinskog privjeska s Ni-NTA agarozom. Preuzeto iz (Dwivedi, 2011.).

Za navedenu kromatografsku metodu korištena je HisTrap HP 1 mL (*Cytiva*) kolona i puferi A, B i C. Sastav pufera A već je prije naveden u poglavlju 3.2.1.2. i razlikuje se za aaRS

i EF-Tu (pufer A_{EF-Tu}). Puferi B i C sličnog su sastava puferu A (u slučaju EF-Tu puferu A_{EF-Tu}). Jedina razlika je koncentracija imidazola. Pufer B sadrži 20 mmol dm⁻³ imidazola, a pufer C 200 mmol dm⁻³. Imidazol kompetira s histidinskim privjeskom za vezanje na kolonu; malim povećanjem koncentracije imidazola izaziva ispiranje nespecifično vezanih proteina, a velikim povećanjem koncentracije izaziva se elucija proteina koji su obilježeni s histidinskim privjeskom. Kromatografija se provodila pri temperaturi od 8 °C i protoku od 1 mL po minuti. Kolona je uravnotežena protokom 10 volumena kolone (CV) pufera A / A_{EF-Tu}. Uzorci su se nanosili ručno na kolonu pomoću šprice i propuštani su tri puta da bi se što više proteina vezalo. U prvom ispiranju kroz kolonu je ispušteno 10 CV pufera A, u drugom ispiranju 10 CV pufera B, a elucija je postignuta kroz 5 CV pufera C. Za vrijeme ispiranja sakupljane su frakcije od 1,5 mL, a prilikom elucije od 0,5 mL.

3.2.1.4. Skladištenje proteina

Pročišćenim proteinima promijenjen je pufer korištenjem komercijalnih gel-filtracijskih kolona PD10 (*GE Healthcare*) prema uputama proizvođača. Pufer za skladištenje proteina aaRS je sastava: $c(\text{Hepes}) = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$ pH = 7,5, $c(\text{NaCl}) = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{MgCl}_2) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\beta\text{-merkoptoetanol}) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$ i $\varphi(\text{glicerol}) = 10 \%$, a za EF-Tu: $c(\text{Hepes}) = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$ pH = 7,5, $c(\text{KCl}) = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{MgCl}_2) = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{GDP}) = 100 \mu\text{mol dm}^{-3}$, $c(\beta\text{-merkoptoetanol}) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$ i $\varphi(\text{glicerol}) = 50 \%$. Nakon promjene pufera proteini su spremljeni na -80 °C (-20 °C u slučaju EF-Tu) do korištenja.

3.2.1.5. Dodatno pročišćavanje pirofosforolizom

Aminoacil-tRNA-sintetaze nakon pročišćavanja mogu u aktivnom sintetskom mjestu imati vezane aminokiseline ili aminoacil-adenilat, koji, ako su prisutni u velikoj mjeri, mogu uzrokovati pogrešna kinetička mjerenja. Zbog toga je nekada potrebno dodatno pročistiti aminoacil-tRNA-sintetaze metodom pročišćavanja pirofosforolizom. Prvo se aaRS inkubiraju s pirofosfatom čime se potiče nastanak ATP-a i aminokiseline (obrnuta reakcija od aktivacije aminokiseline), koji zatim mogu disociirati s enzima. Inkubacija se odvija na sobnoj temperaturi 30 minuta u otopini sastava: $\gamma(\text{aaRS}) = 1 \text{ mg mL}^{-1}$, $c(\text{Hepes}) = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$ pH = 7,5, $c(\text{NaCl}) = 500 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{MgCl}_2) = 4 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7) = 2 \text{ mmol dm}^{-3}$. Nakon inkubacije potrebno je ukloniti pirofosfat, nastale aminokiseline i ATP što se postiže kromatografijom na Ni-NTA agarozu. Za kromatografiju je korišten sustav Äkta Pure 25 (*GE Healthcare*) i puferi A, A+PP_i i C. Puferi A i C isti su puferi kao kod osnovnog pročišćavanja afinitetnom kromatografijom (sastav naveden u prethodnim poglavljima), a pufer A+PP_i je sastavom jednak puferu A, osim što sadrži 2 mmol dm⁻³ natrijevog pirofosfata i nešto manju koncentraciju MgCl₂ ($c = 4 \text{ mmol dm}^{-3}$). Kromatografija je provedena pri 8 °C i protoku 1 mL po minuti. Kolona je uravnotežena protokom 10 CV pufera A+PP_i. Prvo ispiranje provedeno je

ispuštanjem 10 CV pufera A+PP_i što dodatno potiče reakciju pirofosforolize, a drugo ispiranje s puferom A (10 CV) uklanja disocirane produkte i pirofosfat. Elucija pročišćenog proteina postiže se kroz 5 CV pufera C.

3.2.1.6. Poliakrilamidna gel elektroforeza u prisustvu natrijevog dodecil-sulfata

Denaturirajuća poliakrilamidna gel elektroforeza uz dodatak natrijevog dodecil-sulfata (SDS-PAGE) korištena je za analizu proteina i praćenje tijeka pročišćavanja. Zbog stvaranja kompleksa sa SDS-om u uvjetima SDS-PAGE-a proteini su denaturirani, imaju jednak oblik i jednak omjer mase i naboja te se zbog toga razdvajaju na temelju mase. Za izradu gelova i provođenje elektroforeze korištena je aparatura Mini-PROTEAN Tetra (*Biorad*). Gelovi su napravljeni od dva dijela: gela za sabijanje (γ (akrilamid:bisakrilamid 29:1) = 40 mg mL⁻¹, c (Tris) = 0,125 mol dm⁻³ pH = 6,8 i γ (SDS) = 1 mg mL⁻¹) i gela za razdvajanje (γ (akrilamid:bisakrilamid 29:1) = 90 mg mL⁻¹, c (Tris) = 0,385 mol dm⁻³ pH = 8,8 i γ (SDS) = 1 mg mL⁻¹). Polimerizacija je potaknuta dodatkom inicijatorske molekule (γ (APS) = 0,7 μ g mL⁻¹) i katalizatora (ϕ (TEMED) = 0,05 %). Prije nanošenja na gel uzorci su pomiješani s puferom za nanošenje na gel (c (Tris) = 62,5 mmol dm⁻³, pH = 6,8, c (β -merkaptotanol) = 12,5 mmol dm⁻³, ϕ (glicerol) = 6,25 % , γ (SDS) = 1,25 mg mL⁻¹ i γ (bromfenol plavo) = 0,02 mg mL⁻¹) te denaturirani 5 min na 95 °C u termobloku. Elektroforeza je provedena u puferu (γ (glicin) = 14,4 g dm⁻³, γ (Tris) = 3,03 g dm⁻³, γ (SDS) = 1 mg mL⁻¹, pH = 8,3) 15 min pri 120 V, a zatim još 45 min pri 180 V. Proteini su vizualizirani bojanjem gela u otopini boje Coomassie Brilliant Blue-R (γ (Coomassie Brilliant Blue R-250) = 2,5 g dm⁻³, ϕ (octena kiselina) = 10 %, ϕ (EtOH) = 45 %) u trajanju 15 min i odbojavanjem u vreloj vodi do pojave jasnih vrpca.

3.2.1.7. Ugušćivanje proteina i mjerenje koncentracije

Za ugušćivanje uzoraka proteina, uzorci su centrifugirani na 6 000 \times g pri 4 °C u Centricon®-centrifugal filter device (Milipore) s porama koje propuštaju čestice manje od 10 kDa, 30 kDa ili 50kDa.

Koncentracija proteina mjerena je na uređaju NanoDrop One (*Thermo Scientific*) praćenjem apsorbancije pri 280 nm. Za određivanje koncentracije u uređaj je potrebno unijeti podatke o molekulskoj masi proteina i molarnom apsorpcijskom koeficijentu. Uređaj se nulira nanošenjem 2 μ L slijepe probe a za mjerenje se nanese 2 μ L proteinskog uzorka. Uređaj očita apsorbanciju uzorka i automatski preračuna u masenu koncentraciju proteina.

Zbog velike apsorbancije GDP-a pri 260 nm, a koja smeta preciznom očitavanju koncentracije proteina, u uzorku EF-Tu koncentracija izmjerena NanoDrop One instrumentom

provjerena je metodom po Bradfordu. Metoda se temelji na promjeni apsorbancije boje *Coomassie Brilliant Blue G-250* kada je vezana na proteine. Potrebno je pripremiti standardne otopine različitih masenih koncentracija ($0,2-1 \text{ mg mL}^{-1}$) albumina iz seruma goveda (BSA), pomiješati ih s Bradfordovim reagensom (γ (*Coomassie Brilliant Blue G-250*) = $0,1 \text{ g dm}^{-3}$, φ (EtOH) = 5 %, φ (H_3PO_4) = 8,5 %) (1 mL reagensa i 20 μL standarda), izmjeriti apsorbanciju i konstruirati baždarni pravac. Apsorbancija je izmjerena na valnoj duljini od 595 nm uređajem Evolution 60S (*Thermo Scientific*). Zatim se 20 μL uzorka proteina pomiješa s 1 mL Bradfordovog reagensa, izmjeri se apsorbancija i pomoću baždarnog pravca odredi se koncentracija.

3.2.1.8. Aktivacija EF-Tu

EF-Tu veže aa-tRNA kada je u svom aktivnom GTP-vezanom obliku, a s obzirom na to da se najčešće izolira u GDP-vezanom obliku potrebno ga je aktivirati prije korištenja u kinetičkim eksperimentima. Aktivacija kompleksa EF-Tu:GDP ($c = 200 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$) odvija se na temperaturi od 37 °C u aktivacijskom puferu (c (Hepes) = 70 mmol dm^{-3} , pH = 7,5, c ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$) = 52 mmol dm^{-3} , c ($(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2\text{Mg}$) = 8 mmol dm^{-3} , c (KCl) = 30 mmol dm^{-3} , c (DTT) = $0,8 \text{ mmol dm}^{-3}$, c (fosfoenolpiruvat) = 10 mmol dm^{-3} , c (GTP) = 1 mmol dm^{-3}) uz piruvat-kinazu ($0,08 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$) i traje 2 sata. EF-Tu se koristi odmah nakon aktivacije. Ovom metodom dobiva se 10-15 % aktivnog EF-Tu:GTP (Cvetesic *i sur.*, 2013.).

3.2.2. Metode rada s RNA

3.2.2.1. Uzgoj i prekomjerna ekspresija tRNA

Molekule tRNA prekomjerno su eksprimirane u bakterijama *E. coli* soja BL21(DE3). Geni za tRNA^{Ile}, tRNA^{Leu} i tRNA^{Val} klonirani su pod T7 promotorom unutar plazmida pET3a, kojima su transformirane bakterijske stanice. Za svaku tRNA, uzgojeno je 10 mL pretkulture u LB mediju s dodanim ampicilinom ($\gamma = 100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$). Stanice su rasle preko noći na tresilici pri 250 rpm i temperaturi od 37 °C. Zatim je 5 mL pretkulture inokulirano u 500 mL tekućeg LB medija s dodatkom ampicilina te su stanice inkubirane na 37 °C pri 250 rpm dok nisu postigle vrijednost OD₆₀₀ između 0,5-0,6. Potom je inducirana prekomjerna ekspresija dodatkom IPTG-a u konačnoj množinskoj koncentraciji od 1 mmol dm^{-3} . Nakon indukcije, bakterije su uzgajane 15 h na 30 °C i 250 rpm. Pri završetku uzgoja, stanice su istaložene centrifugiranjem 15 min na $5\,000 \times g$ i temperaturi 4 °C. Talog stanica se zatim iskoristio za izolaciju tRNA molekula.

3.2.2.2. Izolacija i pročišćavanje tRNA

Talog stanica dobiven iz 1 L uzgoja resuspendira se u 30 mL izolacijskog pufera (c (Tris-HCl) = 10 mmol dm^{-3} pH = 8,0, c ($(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$) = 10 mmol dm^{-3}). Smjesa se razdvoji na dva jednaka dijela, a u svaki dio doda se jednak volumen fenola zasićenog vodom. Smjesa se vorteksira 6

puta po 30 sekundi s pauzama (na ledu) od 30 sekundi. Da bi se odvojio fenolni i vodeni sloj smjesa se centrifugira 15 min na $7\ 000 \times g$ i $4\ ^\circ\text{C}$. Gornji vodeni sloj se pažljivo odvoji pipetom i doda mu se jednak volumen fenol-kloroform smjese (smjesa fenola zasićenog vodom i kloroforma u omjeru 1:1). Smjesa se miješa 2 puta po 5 min s 5 minuta pauze na ledu. Za miješanje je korišten rotator Multi Bio RS-24 (*Biosan*) pri 100 rpm. Zatim se ponovi korak centrifugiranja ($7\ 000 \times g$, 15 min, $4\ ^\circ\text{C}$), odvoji se gornji vodeni sloj i spremi na led. Da bi se povećao prinos izolirane tRNA, iz fenolnog i fenol-kloroformskog sloja se reekstrahira zaostala tRNA uz 5 mL izolacijskog pufera.

Nakon izolacije potrebno je istaložiti DNA i velike RNA molekule. U vodeni sloj koji zadrži izolirane nukleinske kiseline potrebno je dodati PEG_{8000} ($\gamma = 80\ \text{g dm}^{-3}$) i NaCl ($c = 500\ \text{mmol dm}^{-3}$) i dobro promiješati. Smjesa se inkubira 10 min na sobnoj temperaturi te se zatim centrifugira 15 min na $10\ 000 \times g$, također na sobnoj temperaturi. Odvoji se supernatant te se izdvoje alikvoti za analizu na poliakrilamidnom gelu s dodatkom ureje (poglavlje 3.2.2.3.). Na supernatant se zatim doda 1/10 volumena CH_3COONa ($2,5\ \text{mmol dm}^{-3}$) i 2,5 volumena hladnog etanola (96 %) te ostavi preko noći na $-20\ ^\circ\text{C}$. Sutradan se istaložena tRNA obori centrifugiranjem 2 h na $5\ 000 \times g$ pri $4\ ^\circ\text{C}$, ukloni se supernatant, a dobiveni talog osuši koristeći uređaj SpeedVac DNA120 (*ThermoSavant*). Osušeni talog otopi se u 1,5 mL redestilirane vode. Molekule tRNA izolirane iz bakterija potrebno je deacilirati prije korištenja u kinetičkim pokusima jer vezane aminokiseline onemogućavaju točna kinetička mjerenja. Radi se o alkalnoj hidrolizi esterske veze između tRNA i aminokiselina, a koja se postiže dodatkom otopine Tris-HCl, pH = 8,5-9,0 u konačnoj koncentraciji od $125\ \text{mmol dm}^{-3}$ i inkubacijom 1 h i 30 min na $37\ ^\circ\text{C}$. Reakcija deacilacije zaustavi se snižavanjem pH na otprilike 5, dodatkom octene kiseline. Da bi se uklonile neželjene soli i tRNA prevela u odgovarajući pufer, otopina tRNA je dijalizirana prema 1,5 L vodene otopine Hepesa ($c = 10\ \text{mmol dm}^{-3}$) u tri uzastopna ciklusa (dvije izmjene otopine Hepesa). Prvi i zadnji ciklus dijalize trajali su oko 3 h, a drugi preko noći. Za dijalizu su korištena celulozna crijeva koja su prethodno prokuhana 1 min u otopini EDTA ($c = 1\ \text{mmol dm}^{-3}$). Tako izolirane i pročišćene tRNA spremljene su na $-20\ ^\circ\text{C}$. Dodatno pročišćavanje potrebno je u slučaju tRNA^{le} što je opisano u poglavlju 3.2.2.4.

3.2.2.3. Denaturirajuća poliakrilamidna gel-elektroforeza u prisustvu ureje

Uspješnost uklanjanja DNA i velikih RNA iz otopine tRNA provjerena je poliakrilamidnom gel-elektroforezom uz dodatak ureje. Korištena je aparatura Mini PROTEAN TETRA (*Biorad*) i gelovi sastava: akrilamid:bisakrilamid 19:1 ($\gamma = 60\ \text{mg mL}^{-1}$), ureja ($c = 8\ \text{mol dm}^{-3}$), Tris ($c = 90\ \text{mmol dm}^{-3}$), borna kiselina ($c = 90\ \text{mmol dm}^{-3}$), EDTA ($c = 2\ \text{mmol dm}^{-3}$, pH = 8,0), APS ($\gamma = 0,7\ \mu\text{g mL}^{-1}$), TEMED ($\varphi = 0,05\ \%$). Prije nanošenja na gel uzorci su pomiješani s puferom za nanošenje (γ (urea) = $8\ \text{mol dm}^{-3}$, γ (bromfenol plavo) = $2\ \text{mg mL}^{-1}$,

γ (ksilencijanolfuorofosfat) = 2 mg mL⁻¹, c (EDTA) = 10 mmol dm⁻³, pH = 8,0) i denaturirani 5 min u termobloku na 90 °C. Elektroforeza je provođena 1 h na 120 V. Gel je obojan inkubacijom u otopini boje (γ (toluidinsko modrilo) = 40 μ g mL⁻¹, φ (etanol) = 50 % i φ (octena kiselina) = 0,1 %) u trajanju od 15 min i odbojavanjem u vreloj destiliranoj vodi.

3.2.2.4. Mjerenje koncentracije tRNA

Koncentracija tRNA mjerena je na uređaju NanoDrop One (*Thermo Scientific*). Apsorbancija se prati pri 260 nm, nanosi se 2 μ L uzorka i potrebno je nulirati uređaj s otopinom redestilirane vode.

3.2.2.5. Ugušćivanje tRNA

Prije dodatnog pročišćavanja, koncentracija tRNA u otopini izolirane i pročišćene tRNA^{le} povećana je korištenjem uređaja SpeedVac DNA120 (*ThermoSavant*). Ova metoda temelji se na uparavanju pod sniženim tlakom.

3.2.2.6. Dodatno pročišćavanje tRNA^{le} kromatografijom obrnutih faza

U otopini izolirane i pročišćene tRNA^{le} prisutne su dvije vrste tRNA koje se kinetički razlikuju. Jedna od njih nije potpuno kinetički aktivna, a smatra se da je razlog tome njena nepotpuna posttranskripcijska modifikacija (Cvetešić, 2010.). Zbog toga se te dvije vrste tRNA odvajaju kromatografijom obrnutih faza, što je moguće napraviti zbog različitih polarnosti tih dviju vrsta tRNA^{le}. Prije kromatografije potrebno je pripremiti uzorke tRNA volumena 50 μ L i koncentracije 60 mg mL⁻¹ te ih centrifugirati 15 min na 10 000 \times g pri 4 °C da bi se istaložile sitne nečistoće koje mogu ometati proces kromatografije. Za kromatografiju je korišten sustav Äkta Purifier 10 (*GE Healthcare*) i RPC kolona Jupiter® 5 μ m C4 300 Å, LC Column 250 x 4.6 mm (*Phenomenex*). Metoda se temelji na vezanju tRNA molekula na nepolarnu stacionarnu fazu kolone i eluciji smanjenjem polarnosti mobilne faze (povećanjem koncentracije etanola). Prvo iz kolone izlazi polarnija vrsta tRNA, a zatim manje polarna. Sastav pufera A je: c (amonijev acetat) = 20 mmol dm⁻³ pH 5,0, c ((CH₃COO)₂Mg) = 10 mmol dm⁻³ i c (NaCl) = 400 mmol dm⁻³ pH 5,0, a pufer B istog je sastava samo s dodatkom etanola (φ = 30 %). Kromatografija se provodila na sobnoj temperaturi prema protokolu navedenom u tablici 3. Uravnoteženje i ispiranje provode se kroz navedeno trajanje faze s puferom A, a elucija se postiže pomoću linearnog gradijenta etanola promjenjivog nagiba. Linearni gradijent etanola postiže se povećavanjem udjela pufera B u mobilnoj fazi.

1. elucijska faza: 0-0,9 % volumni udio etanola kroz 2,5 CV.
2. elucijska faza: 0,9-1,5 % volumni udio etanola kroz 10 CV.
3. elucijska faza: 1,5-30 % volumni udio etanola kroz 5 CV.

Dvije vrste tRNA se eluiraju u drugom koraku i frakcije se sakupe prema podacima dostupnim u prethodnim istraživanjima (Cvetešić, 2010.). Čistoća sakupljenih frakcija provjeri se aminoaciliranjem uz [¹⁴C]-aminokiseline, odnosno provjerom akceptorske aktivnosti (vidi kasnije). Treća faza elucije služi ispiranju kolone od čvrsto vezanih nepolarnih tvari.

Tablica 3. Protokol kromatografije obrnutih faza.

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

3.2.2.7. Renaturacija tRNA^{Leu} i tRNA^{Val}

Izolacijom tRNA iz stanica naruši se nativna konformacija molekulama tRNA^{Val} i tRNA^{Leu} te ih je prije upotrebe u kinetičkim pokusima potrebno renaturirati. U slučaju tRNA^{Leu} nije potrebno provoditi renaturaciju jer postupak izolacije i pročišćavanja ne utječe na njezinu nativnu konformaciju. Renaturacija se postiže inkubacijom uzorka tRNA 3 minute u termobloku na 85 °C. Potom se dodaje otopina MgCl₂ (zagrijana na istu temperaturu) u konačnoj množinskoj koncentraciji od 10 mmol dm⁻³ i uzorak se ostavlja u ugašenom termobloku da se postupno ohladi na sobnu temperaturu.

3.2.2.8. Priprema radioaktivno obilježene tRNA¹

U kinetičkim eksperimentima praćenja reakcije aminoaciliranja korištene su tRNA radioaktivno obilježene izotopom ³²P. Za obilježavanje tRNA koristi se enzim tRNA-nukleotidil-transferaza koja dodaje nukleotid na 3' kraj tRNA. Prethodno obilježavanju, potrebno je renaturirati tRNA postupkom opisanim u poglavlju 3.2.2.7. Priredi se prvi dio reakcijske smjese (tablica 4) za finalni volumen od 20 µL. Reakcija započinje dodatkom tRNA-nukleotidil-transferaze (CCA) i odvija se 1 min na 37 °C. U tom periodu, zbog velikog suviška pirofosfata, većinom se događa pirofosforoliza tj. odcjepljuje se terminalni adenzin s tRNA. Zatim se doda anorganska pirofosfataza (TIPP) koja hidrolizira pirofosfat, čime mijenja koncentracije sudionika reakcije i potiče reakciju ugradnje radioaktivno obilježenog ATP-a na 3' kraj tRNA. Reakcija se odvija 2 min na sobnoj temperaturi, nakon čega se zaustavi dodatkom jednakog

¹ Zbog nemogućnosti studentskog rada s radioaktivnim materijalom, laboratorijski posao koji je zahtijevao rukovanje s istim odradio je Igor Živković, mag. chem., a potrebnu pripremu za eksperimente, obradu i analizu podataka odradila sam ja, Kate Ivković.

volumena smjese fenola i vode i dobro promiješa. Zatim slijedi postupak ekstrakcije tRNA. Smjesa se centrifugira 5 min na $5\,000 \times g$ pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Odvoji se vodeni sloj te mu se doda jednak volumen fenol-kloroform smjese, dobro promiješa te opet centrifugira u istim uvjetima. Nakon ekstrakcije, prikupljeni vodeni sloj prebacuje se na gel-filtracijske kolonice Micro Bio-Spin 30 (*BioRad*) i centrifugira 4 min na $1\,000 \times g$ i $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Isti korak ponovi se još jednom nakon čega se filtrat sakupi i dijalizira preko noći u posudici za dijalizu u Hepesu (10 mmol dm^{-3} , pH 7,5). Pripremljene otopine pohranjuju se na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tako radioaktivno obilježena tRNA sadrži ^{32}P u fosfodieterskoj vezi između zadnja dva nukleotida na 3' kraju.

Tablica 4. Sastav reakcijske smjese za radioaktivno obilježavanje tRNA.

	Sastojak reakcijske smjese	Finalna koncentracija u reakcijskoj smjesi
1. dio reakcijske smjese	Tris pH 8,0	200 mmol dm^{-3}
	NaPP _i	6 mmol dm^{-3}
	MgCl ₂	$22,5\text{ mmol dm}^{-3}$
	DTT	$0,5\text{ mmol dm}^{-3}$
	tRNA	$5\text{ }\mu\text{mol dm}^{-3}$
	[³² P]-ATP	$\frac{1}{4}$ volumena reakcijske smjese
	CCA	$5\text{ }\mu\text{mol dm}^{-3}$
	TIPP	$0,1\text{ U }\mu\text{L}^{-1}$

3.2.3. Kinetičke metode

3.2.3.1. Provjera akceptorske aktivnosti tRNA

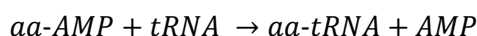
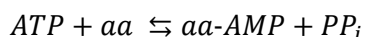
Nakon izolacije i pročišćavanja tRNA potrebno je provjeriti akceptorsku aktivnost tj. udio tRNA molekula koje se mogu aminoacilirati. Akceptorska aktivnost tRNA provjerena je koristeći metodu aminoaciliranja uz [¹⁴C]-aminokiseline. Aminoacilacija je postignuta inkubiranjem $5\text{ }\mu\text{mol dm}^{-3}$ tRNA s $5\text{ }\mu\text{mol dm}^{-3}$ odgovarajuće aaRS u reakcijskoj smjesi za aminoacilaciju ($c(\text{Hepes}) = 20\text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{MgCl}_2) = 10\text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{NH}_4\text{Cl}) = 150\text{ mmol dm}^{-3}$ (za aminoacilaciju tRNA^{Leu} korišten je kalijev klorid u istoj koncentraciji), $c(\text{ATP}) = 4\text{ mmol/dm}^3$, $\gamma(\text{BSA}) = 0,01\text{ mg mL}^{-1}$ i anorganska pirofosfataza TIPP $0,008\text{ U }\mu\text{L}^{-1}$) i dodatkom odgovarajuće smjese neradioaktivne i radioaktivne aminokiseline. Potrebne koncentracije aminokiselina izračunate su tako da budu barem 5 puta veće od K_m (Michaelisova konstanta – koncentracija supstrata pri kojoj je brzina reakcije jednaka polovici maksimalne brzine prema Michaelis-Menten kinetičkom modelu) u reakciji aktivacije i iznosile su: izoleucin

(30 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), a valin i leucin (250 $\mu\text{mol dm}^{-3}$). Specifična aktivnost smjese aminokiselina u reakcijskoj smjesi iznosila je 50-100 mCi mmol^{-1} .

Reakcija aminoaciliranja odvijala se pri 37 °C. Reakcija je započeta dodatkom enzima u reakcijsku smjesu i u 4 vremenske točke (3, 6, 9 i 12 min) uzet je alikvot volumena 9 μL te nanesen na kromatografske papiriće Whatman 3MM (*GE Healthcare*) dimenzija 2 × 1 cm, a reakcija je zaustavljena uranjanjem papirića u ledeno hladnu otopinu trikloroctene kiseline ($\varphi = 10\%$). U toj otopini papirići su ispirani 10 min, a zatim su dvaput isprani u otopini hladne trikloroctene kiseline ($\varphi = 5\%$) po 5 min. Prije sušenja su kratko namočeni u hladni etanol ($\varphi = 96\%$), a zatim osušeni u sušioniku 30 min na 70-80 °C. Za mjerenje radioaktivnosti korišten je scintilacijski brojač Tri-Carb 2900 TR (*Perkin Elmer*). Prethodno mjerenju, papirići su uronjeni u 2,5 mL scintilacijske otopine (toluenska otopina γ (2,5-difenil oksazol) = 5 g dm^{-3} i γ (1,4-bis (2 (metil-5-fenil) oksazolil) benzen) = 0,3 g dm^{-3}) u staklenim bočicama te su tako stavljeni u uređaj. U svrhu izrade baždarnog dijagrama izmjeren je radioaktivitet različitih volumena korištenih smjesa aminokiselina poznatih koncentracija (0, 3, 6, 9, 12, 15 i 20 μL). Scintilacijski brojač kao rezultat daje broj otkucaja koji je u linearno proporcionalan količini radioaktiviteta. Baždarni dijagram pokazuje ovisnost broja otkucaja o množini aminokiseline (koja je jednaka množini aminoacilirane tRNA) te se pomoću njega može izračunati koncentracija aminoacilirane tRNA.

3.2.3.2. Paralelno praćenje reakcije aminoaciliranja i utroška ATP-a

Radi lakšeg razumijevanja sljedeće metode bitno je ponoviti da se reakcija aminoacilacije odvija u dva koraka:



Produkti reakcije su aminoacilirana tRNA i AMP.

Za istraživanje popravka pogreške kod aaRS razreda Ia korišten je kinetički test paralelnog praćenja reakcije aminoaciliranja i utroška ATP-a u prisustvu i bez EF-Tu. Test se temelji na paralelnom praćenju odvojenih reakcijskih smjesa istog sastava (izuzev radioaktivne molekule koja se dodaje) u istim uvjetima. Jednoj reakcijskoj smjesi doda se radioaktivno obilježeni [^{32}P]-ATP-a ($c = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$, specifične aktivnosti 0,01-0,1 mCi mL^{-1}) preko kojeg se prati količina nastalog AMP-a (utrošak ATP-a). Prilikom reakcije aminoaciliranja tRNA nastaje radioaktivno obilježeni AMP koji se od ATP-a može odvojiti tankoslojnom kromatografijom. Drugoj reakcijskoj smjesi doda se radioaktivno obilježena [^{32}P]-tRNA (priprema opisana u poglavlju 3.2.2.8.) preko koje se prati nastanak aminoacilirane tRNA. Tankoslojnom kromatografijom nije moguće odvojiti aa-tRNA od tRNA te je korištena P1

nukleaza koja cijepa tRNA na 5'-mononukleotide pri čemu nastaju radioaktivno obilježeni terminalni aa-AMP ili AMP, ovisno o prisustvu aminoacilirane ili neaminoacilirane tRNA. Ti produkti mogu se odvojiti tankoslojnom kromatografijom te njihova kvantifikacija služi za određivanje količine akumulirane aminoacilirane tRNA.

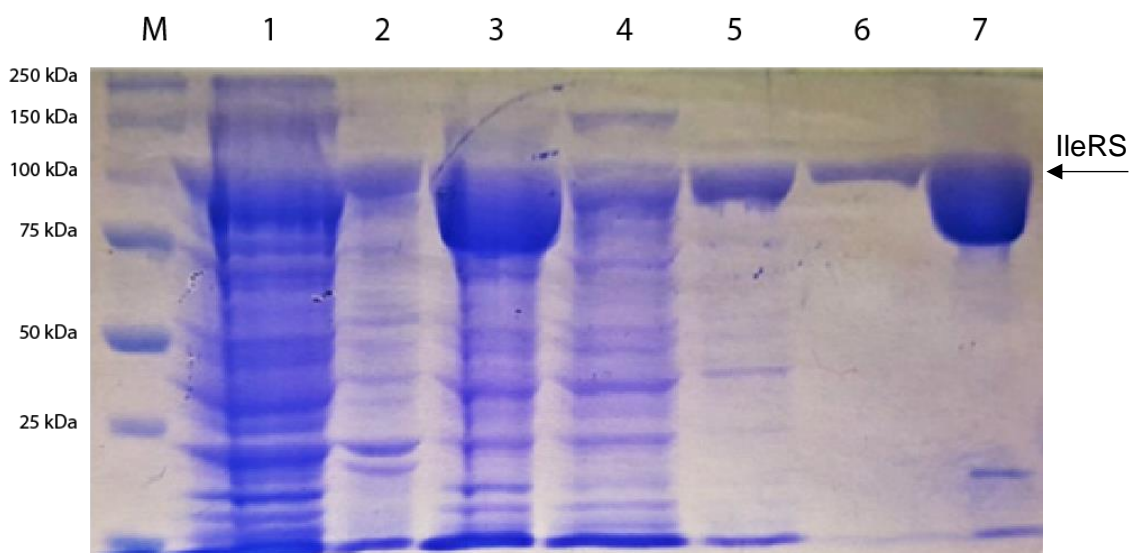
Osnovna reakcijska smjesa sastojala se od 2 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ enzima (IleRS/LeuRS/ValRS), odgovarajuće tRNA ($c = 10 \mu\text{mol dm}^{-3}$) i 30 mmol dm^{-3} nepripadne aminokiseline za koju je poznato da se uspješno aktivira u sintetskom mjestu i hidrolizira u mjestu za popravak (Val/Nva/Thr). Reakcija se odvijala pri 37 °C u puferu sastava: $c(\text{Hepes}) = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{MgCl}_2) = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{DTT}) = 2 \text{ mmol dm}^{-3}$, $\gamma(\text{BSA}) = 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ i 0,004 U μL^{-1} TIPP. Ukoliko je u reakcijsku smjesu dodan EF-Tu, koncentracija aktivnog EF-Tu iznosila je 8-12 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ (ukupna koncentracija EF-Tu bila je 80 $\mu\text{mol dm}^{-3}$, ali samo je 10-15 % aktivnog oblika). Reakcija je zaustavljena dodavanjem alikvota (1,5 μL) reakcijske smjese u 3 μL otopine za zaustavljanje reakcije ($c(\text{CH}_3\text{COONa}) = 600 \text{ mmol dm}^{-3}$ pH = 4,5, $\gamma(\text{SDS}) = 1,5 \text{ mg mL}^{-1}$) u vremenskim točkama: 10 s, 20 s, 30 s, 45 s, 1 min, 2 min, 3 min, 5 min, 10 min i 15 min. Alikvotima reakcijske smjese u kojoj se prati akumulacija aa-tRNA se zatim dodaje 3 μL otopine P1 nukleaze (P1 nukleaza > 0,01 U μL^{-1} , $c(\text{CH}_3\text{COONa}) = 300 \text{ mmol dm}^{-3}$ pH = 5,0 i $c(\text{ZnCl}_2) = 0,15 \text{ mmol dm}^{-3}$), a smjesa se inkubira 30-60 min pri sobnoj temperaturi nakon čega se provodi tankoslojna kromatografija. Alikvoti reakcijske smjese u kojoj se prati utrošak ATP-a odmah nakon zaustavljanja reakcije podvrgavaju se tankoslojnoj kromatografiji. Volumen od 1-2 μL zaustavljene reakcijske smjese nanosi se na polietileniminske pločice (*Macherey-Nagel*). Tankoslojna kromatografija odvija se dok fronta mobilne faze ($c(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 750 \text{ mmol dm}^{-3}$, pH = 3,5 i $c(\text{ureja}) = 4 \text{ mol dm}^{-3}$) ne dođe do ruba pločice koje se zatim posuše fenom i izlože preko noći na zaslonu za detekciju radioaktivnosti (*GE Healthcare*). Materijal od kojeg je građen zaslon posjeduje svojstvo fotostimulirajuće luminiscencije. Raspad radioaktivnog ^{32}P izaziva pobudu elektrona u više energetske stanje. Nakon izlaganja, zaslon se podvrgne elektromagnetskom zračenju unutar laserskog skenera Typhoon (*GE Healthcare*) što uzrokuje povratak elektrona u osnovno elektronsko stanje i luminiscenciju. Luminiscenciju detektira uređaj, a dobiveni kromatogrami se kvantificiraju pomoću programa ImageQuant 8.1 (*GE Healthcare*). Izmjerena luminiscencija proporcionalna je količini radioaktivnog zračenja na pločici. Obrada podataka izvršena je u programima Excel (*Microsoft*) i GraphPad Prism (*GraphPad Software Inc.*).

4. REZULTATI

4.1. Pročišćavanje proteina

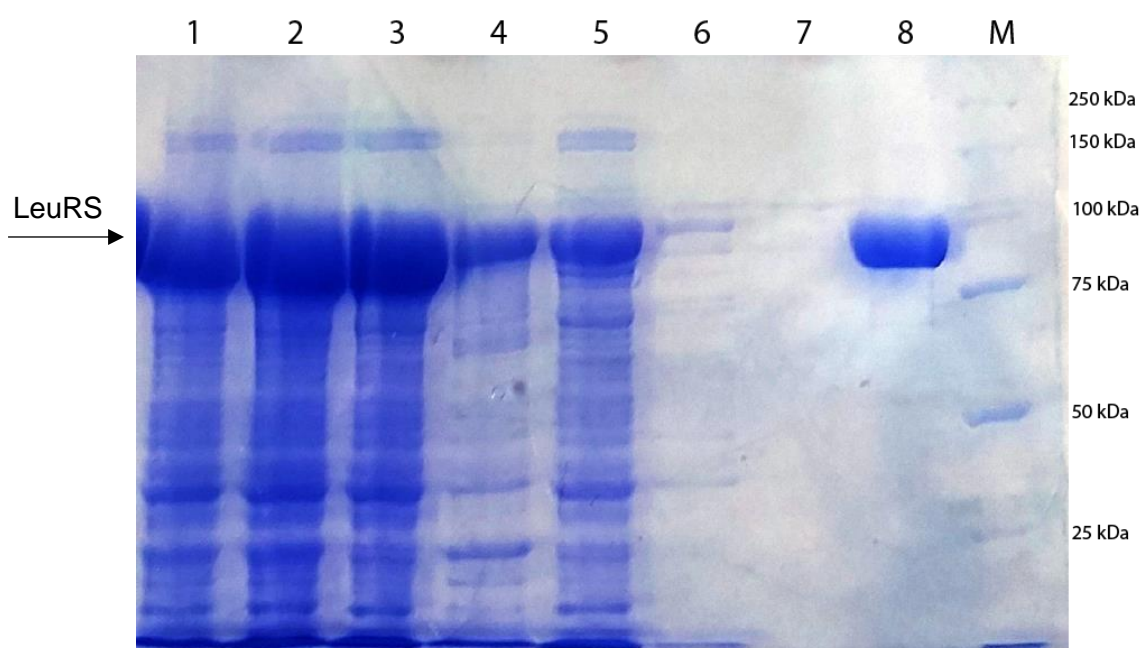
Pročišćavanje proteina od interesa provedeno je po postupku opisanom u poglavlju 3.2.1.3. Uspješnost postupka provjerena je SDS-poliakrilamidnom gel elektroforezom opisanom u poglavlju 3.2.1.6. Kao marker korišten je *Precision Plus Protein Standards, Unstained (Bio-Rad)*.

Gel na kojem pratimo tijek pročišćavanja IleRS prikazan je na slici 19. U jažici 3 nalazi se uzorak proteinskog ekstrakta prema kojem vidimo da je protein uspješno prekomjerno eksprimiran. U jažici 2 nanesen je talog nakon sonikacije. Na gelu je primjetno da IleRS nije zaostao u talogu u značajnoj količini što ukazuje na uspješnost sonikacije. Pri ispiranju s puferom A (jažica 5) (10 mmol dm⁻³ imidazola) iz kolone je izašla i mala količina IleRS. Također, u istom ispiranju izašla je i većina nespecifično vezanih proteina. Pri ispiranju s puferom B (20 mmol dm⁻³ imidazola) (jažica 6) ističe se vrpca koja odgovara IleRS, dok su vrpce ostalih proteina vrlo blijede što sugerira da su nespecifično i slabije vezani proteini uspješno eluirani s kolone s 10 mmol dm⁻³ imidazola. U jažici 7 nanesena je velika količina pročišćenog proteina IleRS kako bi se jasnije mogao odrediti udio onečišćenja. Iz slabog intenziteta preostalih vrpca jasno da je udio drugih proteina (onečišćenja) u uzorku pročišćenog IleRS vrlo mali.



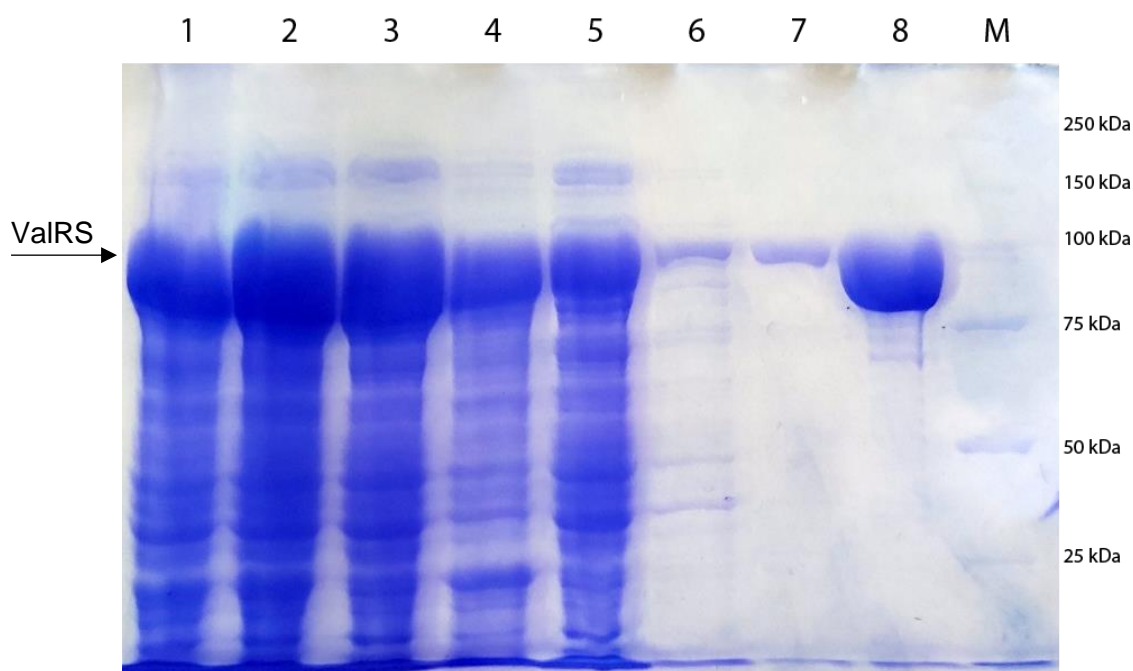
Slika 19. IleRS pročišćavanje. Raspored nanošenja uzoraka na gel : M – marker, 1 - suspenzija nakon soniciranja, 2 - talog netopljivih staničnih komponenti, 3 - proteinski ekstrakt, 4 - nevezana frakcija, 5 - ispiranje s puferom A, 6 - ispiranje s puferom B, 7 - pročišćeni protein.

Na slici 20 prikazan je gel na kojem smo pratili tijek pročišćavanja LeuRS. U uzorku proteinskog ekstrakta (jažica 3) očit je prekomjerno ekspimirani protein koji odgovara masi LeuRS. U talogu nakon sonikacije (jažica 4) zaostalo je malo proteina od interesa. Nakon nanošenja uzorka na kromatografsku kolonu dio proteina se nije uspješno vezao na kolonu i prisutan je u nevezanoj frakciji (engl. *flowthrough*) (jažica 5). Mogući razlog za prethodno opažanje je preopterećenje kolone nanošenjem veće količine LeuRS od kapaciteta kolone pri čemu se sva vezna mjesta na koloni popune i višak proteina LeuRS izlazi prilikom nanošenja uzorka. U prvom (jažica 6) i drugom (jažica 7) ispiranju zanemarive količine proteina od interesa su isprane s kolone, a čistoća izoliranog i pročišćenog proteina je vrlo visoka što se vidi u jažici 8.



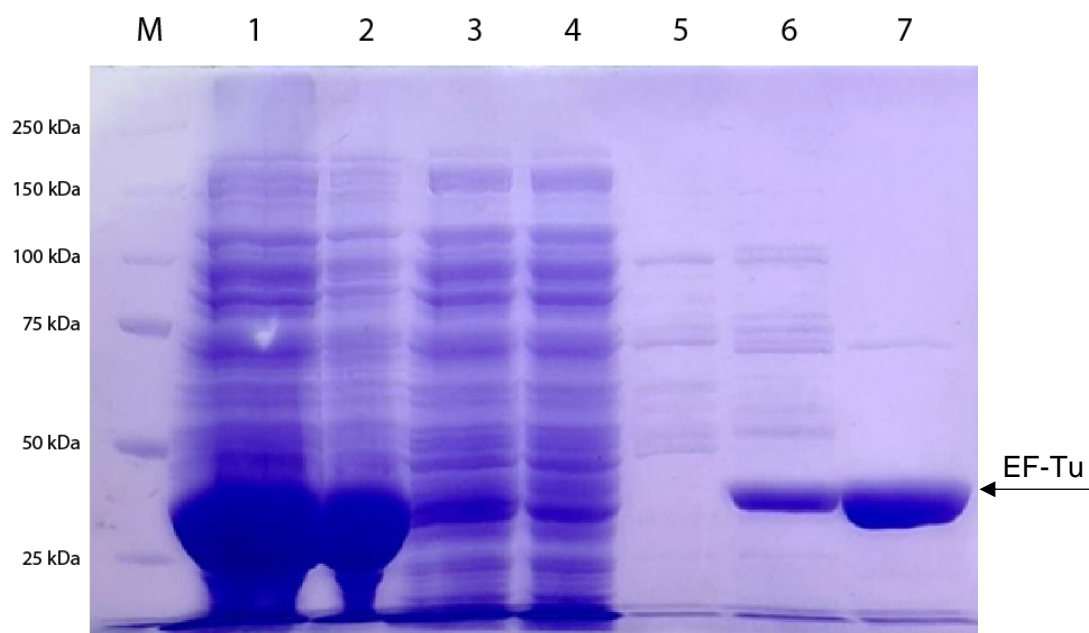
Slika 20. LeuRS pročišćavanje. Raspored nanošenja uzoraka na gel : 1 - suspenzija nakon resuspendiranja taloga stanica u puferu A, 2 - suspenzija nakon sonikiranja, 3 - proteinski ekstrakt, 4 - talog netopljivih staničnih komponenti, 5 - nevezana frakcija, 6 - ispiranje s puferom A, 7 - ispiranje s puferom B, 8 - pročišćeni protein, M - marker.

Gel na kojem smo pratili tijek pročišćavanja ValRS prikazan je na slici 21. U uzorku proteinskog ekstrakta (jažica 3) vidljivo je da je protein uspješno prekomjerno ekspimiran. Dio proteina zaostao je u talogu nakon sonikacije (jažica 4) što je pokazatelj da sonikacija nije bila idealna ili dio proteina zaostaje u inkluzijskim tijelima bakterije. Kod ispiranja nespecifično vezanih proteina dio proteina od interesa izašao je i s puferom A (jažica 6) i s puferom B (jažica 7). U jažici 8 vidi se pročišćeni ValRS koji ima malo kontaminacije s proteinima oko vrpce mase 75 kDa.



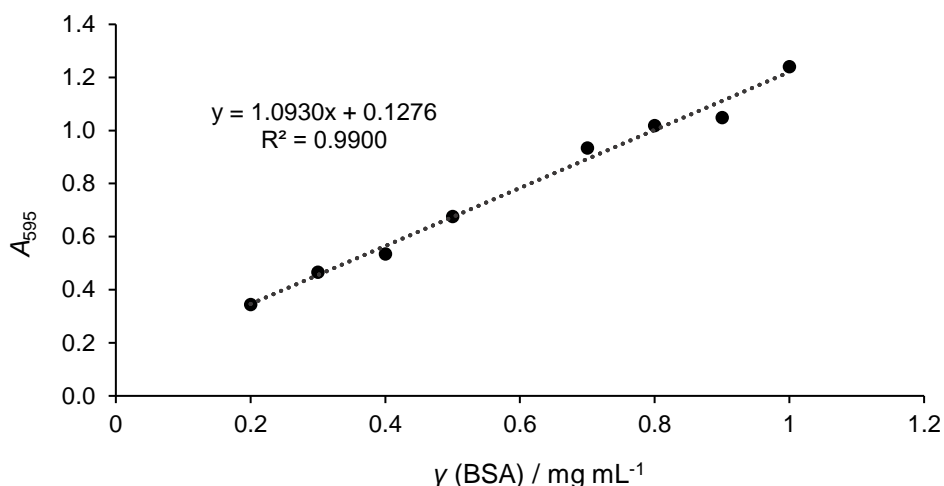
Slika 21. ValRS pročišćavanje. Raspored nanošenja uzoraka na gel : 1 - suspenzija nakon resuspendiranja taloga stanica u puferu A, 2 - suspenzija nakon soniciranja, 3 - proteinski ekstrakt, 4 – talog netopljivih staničnih komponenti, 5 - nevezana frakcija, 6 - ispiranje s puferom A, 7 - ispiranje s puferom B, 8 - pročišćeni protein, M - marker.

Na slici 22 prikazan je gel na kojem pratimo tijek pročišćavanja proteina EF-Tu. Puferi korišteni u ovom pročišćavanju razlikuju se od pufera iz prethodnih pročišćavanja po dodatku glicerola i GDP-a. Dodatak GDP-a je nužan za kasniju aktivaciju proteina, dok je glicerol potreban zbog nestabilnosti EF-Tu. U alikvotu uzorka suspenzije nakon sonikacije (jažica 1) vidljivo je da je protein uspješno prekomjerno eksprimiran, ali problem je što u velikoj količini zaostaje u talogu nakon centrifugiranja (jažica 2). Moguće je da sonikacija nije uspješno odrađena ili da protein zaostaje u inkluzijskim tijelima, koja se ne mogu razbiti prilikom sonikacije. Bez obzira na značajan gubitak proteina u tom koraku, uspješno je pročišćena dovoljna količina proteina za provođenje kinetičkih mjerenja. U proteinskom ekstraktu je puno manje vidljivo da je protein prekomjerno eksprimiran u usporedbi s pročišćavanjima aaRS. Dio proteina se nije uspješno vezao na kolonu prilikom nanošenja uzorka što se vidi u jažici 4. Uzrok može biti sastav pufera u kojem GDP ili vjerojatnije glicerol ometaju vezanje. Prilikom ispiranja uspješno su eluirani nespecifično vezani proteini, ali s drugim ispiranjem i određena količina EF-Tu. Pročišćeni protein je visoke čistoće (jažica 7).



Slika 22. Pročišćavanje EF-Tu. Raspored nanošenja uzoraka na gel: M - marker, 1 – suspenzija nakon sonikacije, 2 – talog nakon centrifugiranja, 3 - proteinski ekstrakt, 4 – nevezana faza, 5 – ispiranje s puferom A, 6 – ispiranje s puferom B, 7 – pročišćeni protein.

Nakon promjene pufera i ugušćivanja proteina koncentracije izmjerene pomoću instrumenta NanoDrop One (*Thermo Scientific*) pročišćenih proteina IleRS, LeuRS i ValRS iznose redom $153,8 \mu\text{mol dm}^{-3}$, $265,9 \mu\text{mol dm}^{-3}$ i $219,6 \mu\text{mol dm}^{-3}$. Koncentracija EF-Tu izmjerena instrumentom NanoDrop One (*Thermo Scientific*) iznosi $685 \mu\text{mol dm}^{-3}$, a preko Bradfordovog testa $675 \mu\text{mol dm}^{-3}$. Baždarni pravac za metodu po Bradfordu prikazan je na slici 23. Pomoću jednadžbe baždarnog pravca iz apsorbancije uzorka proteina EF-Tu izračuna se masena koncentracija proteina koja se zatim podijeli s molarnom masom proteina ($43\,000 \text{ g mol}^{-1}$) da bi se dobila množinska koncentracija. Protein EF-Tu ugušćen je do veće koncentracije od proteina aaRS zbog količine koju je potrebno staviti u reakcijsku smjesu da bi koncentracija aktivnog proteina iznosila oko $10 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (samo 10-15% proteina je aktivno nakon aktivacije).



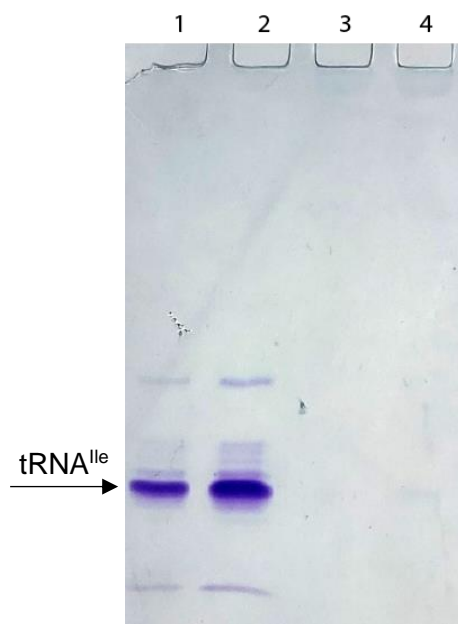
Slika 23. Baždarni pravac za određivanje koncentracije EF-Tu Bradfordovom metodom.

4.2. Priprema i karakterizacija tRNA

4.2.1. Provjera čistoće izoliranih tRNA poliakrilamidnom gel-elektroforezom uz dodatak ureje

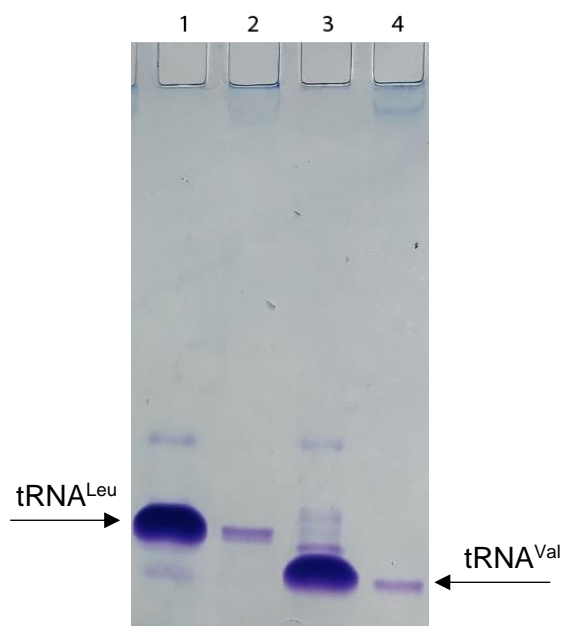
Prekomjerno eksprimirane tRNA pročišćene su od DNA i velikih RNA prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.2.2. Uspješnost taloženja DNA i velikih RNA provjerena je poliakrilamidnom gel-elektroforezom uz dodatak ureje.

Na slici 24 prikazan je gel s uzorcima supernatanta i uzorcima resuspendiranog taloga nakon taloženja uzorka prekomjerno eksprimirane tRNA^{lle} uz PEG₈₀₀₀. Zbog svoje veličine velike nukleinske kiseline teško ulaze u gel te se mogu detektirati pri samom vrhu gela uz jažicu ili u jažici. Na gelu s uzorcima tRNA^{lle}, zbog predugog odbojavanja gela, vrpce na samom dnu jažica su slabo vidljive, ali se mogu razlikovati jažice u kojima su prisutne i one u kojima nisu. Te vrpce se mogu detektirati u jažicama 3 i 4 u koje je stavljen resuspendirani talog. Da su iz uzorka uspješno istaložene velike nukleinske kiseline, možemo zaključiti iz nedostatka vrpce pri vrhu jažica 1 i 2. U tim jažicama vide se pruge prekomjerno eksprimirane tRNA^{lle} (najintenzivnije vrpce) i još nekoliko drugih vrsta RNA molekula (manje intenzivne vrpce na gelu). U talogu uzorka nisu zaostale tRNA molekule od interesa (jažice 3 i 4 nemaju vrpca osim onih pri vrhu jažice).



Slika 24. Poliakrilamidni gel s dodatkom ureje za provjeru uklanjanja velikih nukleinskih kiselina taloženjem iz uzorka tRNA^{Ile}. Redoslijed nanošenja uzoraka na gel: 1 – četiri puta razrijeđen supernatant, 2 – dva puta razrijeđen supernatant, 3 – četiri puta razrijeđen resuspendirani talog, 4 – dva puta razrijeđen resuspendirani talog.

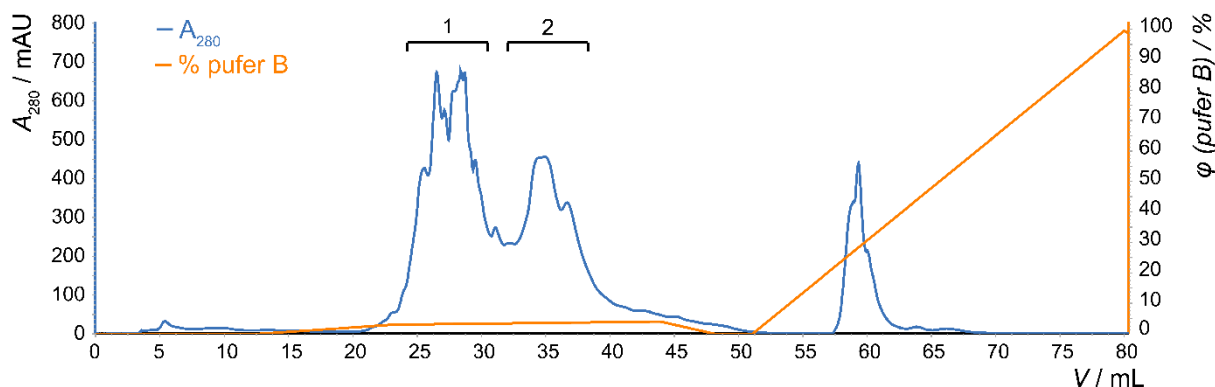
Na slici 25 su prikazani rezultati taloženja uzoraka prekomjerno eksprimiranih tRNA^{Leu} i tRNA^{Val}. Istaložene velike nukleinske kiseline vide se pri vrhu jažica (2 i 4) u kojima se nalaze resuspendirani talozi. U svim uzorcima taloga prisutno je i malo tRNA od interesa što je vjerojatno posljedica male količine zaostalog supernatanta prilikom odvajanja. U jažicama 1 i 3 su nanesen supernatanti nakon taloženja i u tim uzorcima su vidljive intenzivne vrpce koje predstavljaju prekomjerno eksprimirane tRNA^{Leu} (1) i tRNA^{Val} (3). Nedostatak vrpce pri vrhu tih jažica označava da su uzorci uspješno pročišćeni od velikih nukleinskih kiselina.



Slika 25. Poliakrilamidni gel s dodatkom ureje za provjeru uklanjanja velikih nukleinskih kiselina taloženjem iz uzorka tRNA^{Leu} i tRNA^{Val}. Redoslijed nanošenja uzoraka na gel: 1 – dva puta razrijeđen supernatant uzorka tRNA^{Leu}, 2 – dva puta razrijeđen resuspendirani talog uzorka tRNA^{Leu}, 3 – dva puta razrijeđen supernatant uzorka tRNA^{Val}, 4 – dva puta razrijeđen resuspendirani talog uzorka tRNA^{Val}.

4.2.2. Dodatno pročišćavanje tRNA^{Ile}

Osim osnovnog pročišćavanja uzorka tRNA od velikih nukleinskih kiselina koje je provedeno u slučaju sve tri tRNA, tRNA^{Ile} je potrebno dodatno pročititi koristeći kromatografiju obrnutih faza koja je opisana u poglavlju 3.2.2.6. U uzorku prekomjerno eksprimirane tRNA^{Ile} izolirane iz bakterije *E. coli* prisutne su dvije vrste tRNA^{Ile} od kojih jedna nije u potpunosti postranskripcijski modificirana. Molekule tRNA^{Ile}, koje zbog nedostatne modifikacije nisu jednako kinetički aktivne, potrebno je ukloniti iz uzorka. Na slici 26. prikazan je kromatogram pročišćavanja tRNA^{Ile} kromatografijom obrnutih faza. Narančasta linija označava udio pufera B u mobilnoj fazi. Elucija tRNA^{Ile} događa se prilikom ispiranja kolone gradijentom etanola prisutnim u linearnom gradijentu pufera B od 3-5 %. Vidljive su dvije kromatografske vrpce u tom području kromatograma. Prva označava polarniju vrstu tRNA^{Ile} (u potpunosti modificirana i kinetički aktivna vrsta tRNA^{Ile}), a druga manje polarnu tRNA^{Ile} koju želimo ukloniti ovom metodom. Cijepanje vrpce 1 vjerojatno predstavlja različitu konformaciju tRNA^{Ile}. Površine ispod vrpca su približno jednake što znači da je udio dviju vrsta tRNA^{Ile} u uzorku približno jednak. Pri kraju kromatograma vidi se velik broj kromatografskih vrpca koje su međusobno spojene. Taj dio predstavlja nepolarne nečistoće u uzorku koje su se jako vezale na kolonu i eluiraju se tek s 30% pufera B (9% etanola). Vjerojatno se radi o raznim malim molekulama koje su kopurificirale zajedno s tRNA.



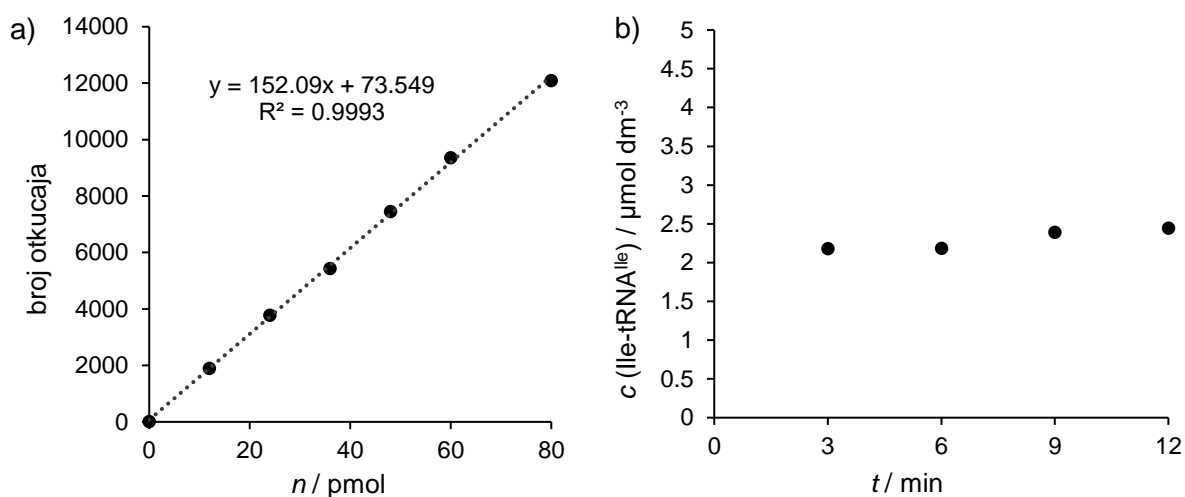
Slika 26. Kromatogram pročišćavanja uzorka tRNA^{Ile} kromatografijom obrnutih faza. (1) Kromatografska vrpca koja predstavlja eluciju vrste tRNA^{Ile} kraćeg vremena zadržavanja na koloni (polarnija vrsta), (2) kromatografska vrpca koja predstavlja eluciju vrste tRNA^{Ile} dužeg vremena zadržavanja na koloni (manje polarna vrsta).

4.2.3. Kinetička karakterizacija tRNA

Sakupljenim frakcijama kromatografske vrpce 1 provjerena je akceptorska aktivnost metodom aminoaciliranja uz [¹⁴C]-aminokiseline (opisano u poglavlju 3.2.3.1.). Akceptorska aktivnost predstavlja udio tRNA u uzorku koji se može aminoacilirati (potpuno je kinetički aktivan). Za konstruiranje baždarnog pravca izmjeren je broj otkucaja u ovisnosti o množini aminokiseline (izoleucin/leucin/valin) u dodanoj smjesi radioaktivne i neradioaktivne aminokiseline. Reakcija aminoaciliranja započeta je dodatkom enzima u reakcijsku smjesu. U četiri vremenske točke (3, 6, 9 i 12 min) alikvot reakcijske smjese nanesen je na kromatografski papirić te je reakcija zaustavljena trikloroocetnom kiselinom. Na papirić istalože makromolekule, a slobodne aminokiseline uklanjaju se ispiranjem opisanim u poglavlju 3.2.3.1. Scintilacijskim brojačem izmjeren je broj otkucaja svakog papirića. Od izmjerenog broja otkucaja oduzeta je vrijednost slijepe probe (ista reakcijska smjesa samo bez tRNA). U slijepoj probi izmjerena radioaktivnost odgovara vezanju aminokiseline na enzim i aminokiselini koja ostaje vezana na kromatografski papirić nakon ispiranja. S obzirom na to da korak ispiranja papirića u trikloroocetnoj kiselini uklanja većinu slobodne aminokiseline, izmjeren broj otkucaja za pojedini uzorak uz oduzetu slijepu probu odgovara radioaktivnosti aminokiselina kovalentno vezanih na tRNA, odnosno aminoaciliranoj tRNA. Pomoću jednadžbe baždarnog pravca, iz broja otkucaja izračunata je množina aminoacilirane tRNA. Volumen reakcijske smjese koji se nanosi na papiriće iznosi 9 μ L te kada se izračunata množina podijeli s tom vrijednošću dobije se koncentracija aminoacilirane tRNA u uzorku. Usporedbom s početnom koncentracijom tRNA u reakcijskoj smjesi može se odrediti udio aktivne tRNA od interesa u uzorku.

4.2.3.1. tRNA^{Ile} prije pročišćavanja kromatografijom obrnutih faza

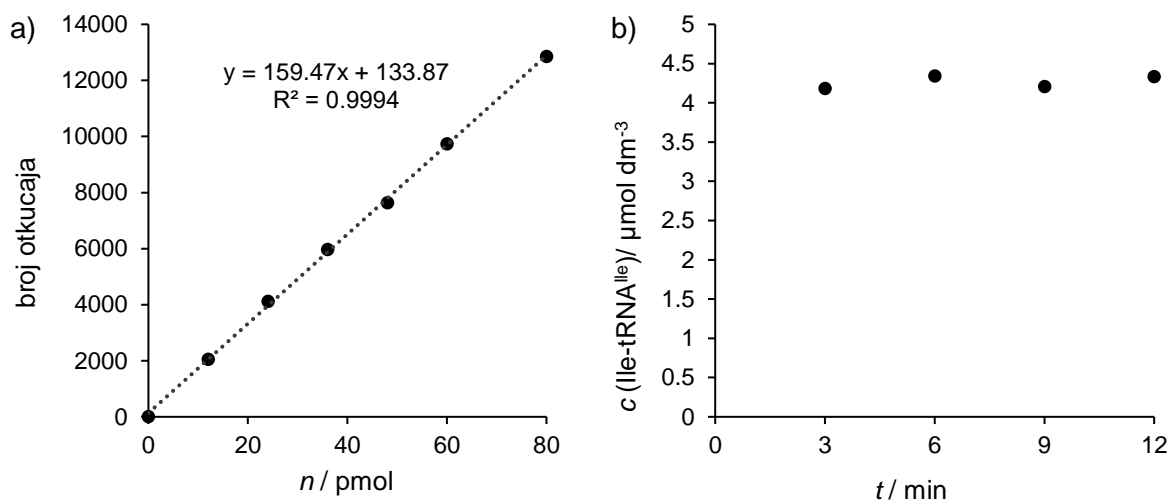
Na slici 27 a) prikazana je baždarna krivulja za izoleucin, a na 27 b) izračunate koncentracije aminoacilirane tRNA u četiri vremenske točke reakcije aminoaciliranja. Ovo mjerenje obavljeno je nakon osnovnog pročišćavanja uzorka tRNA^{Ile}, a prije pročišćavanja kromatografijom obrnutih faza. Izmjerena akceptorska aktivnost za uzorak tRNA^{Ile} iznosi 46% što znači da je malo manje od polovice tRNA^{Ile} molekula u uzorku potpuno kinetički aktivno.



Slika 27. a) Baždarni pravac za izoleucin i b) promjena koncentracije Ile-tRNA^{Ile} u vremenu (koncentracija dodane tRNA^{Ile} bila je 5 μmol dm⁻³).

4.2.3.2. tRNA^{Ile} nakon pročišćavanja kromatografijom obrnutih faza

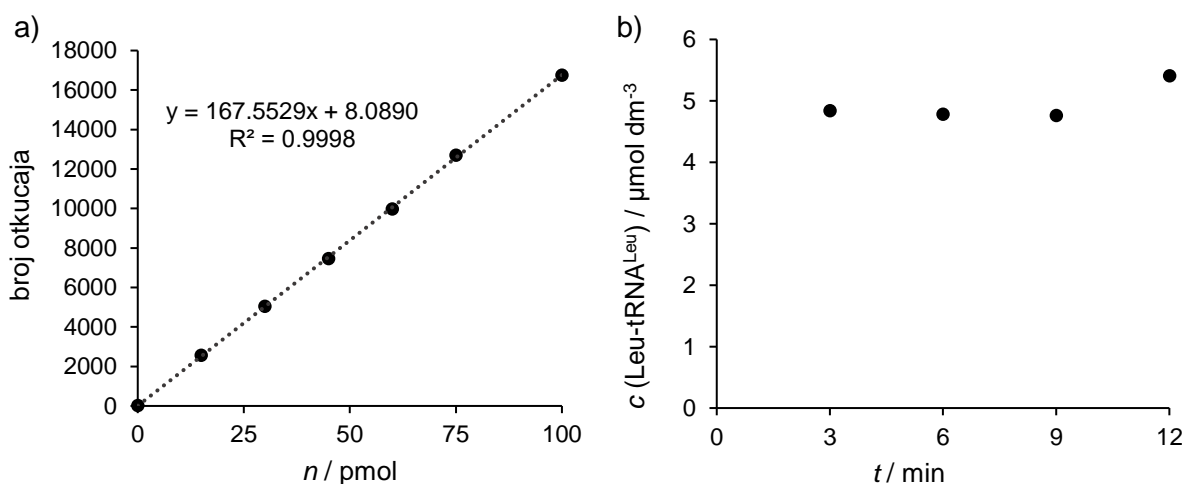
Na slici 28 prikazani su rezultati mjerenja akceptorske aktivnosti uzorka tRNA^{Ile} nakon pročišćavanja kromatografijom obrnutih faza. Izmjerena akceptorska aktivnost iznosi 85 %. Većina tRNA^{Ile} vrste s nepotpunom kinetičkom aktivnošću uspješno je uklonjena iz uzorka te je ovaj iznos akceptorske aktivnosti zadovoljavajući za provođenje kinetičkih mjerenja.



Slika 28. a) Baždarni pravac za izoleucin i b) promjena koncentracije Ile-tRNA^{Ile} u vremenu (koncentracija dodane tRNA^{Ile} bila je 5 $\mu\text{mol dm}^{-3}$).

4.2.3.3. tRNA^{Leu}

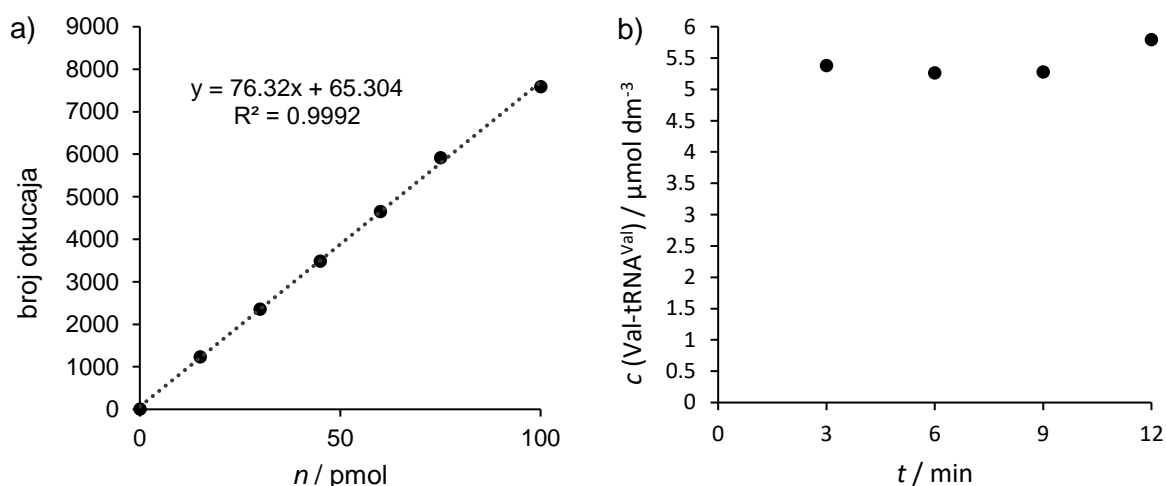
Rezultati mjerenja akceptorske aktivnosti uzorka tRNA^{Leu} prikazani su na slici 29. Izmjerena akceptorska aktivnost iznosi 99 %. U četvrtoj vremenskoj točki (12 min) na grafu 29 b) vrijednost akceptorske aktivnosti iznosi preko 100 % što nije moguće. Greška se dogodila ili prilikom pripreme reakcijske smjese (dodana kriva količina tRNA^{Leu} pa njena koncentracija iznosi > 5 $\mu\text{mol dm}^{-3}$) ili prilikom alikvotiranja reakcijske smjese u četvrtoj vremenskoj točki (aliquotirano više od 9 μL). S obzirom da ta vrijednost odskaače od ostalih više je vjerojatno da je pogreška bila u alikvotiranju.



Slika 29. a) Baždarni pravac za leucin i b) promjena koncentracije Leu-tRNA^{Leu} u vremenu (koncentracija dodane tRNA^{Leu} bila je 5 $\mu\text{mol dm}^{-3}$).

4.2.3.4. tRNA^{Val}

Baždarni pravac (slika 30 a) za računanje akceptorske aktivnosti tRNA^{Val} i izračunate koncentracije aminoacilirane tRNA^{Val} u vremenskim točkama reakcije (slika 30 b) prikazani su na slici 30. Izračunata akceptorska aktivnost za uzorak tRNA^{Val} iznosi 98 %. Kao i u slučaju s tRNA^{Leu} četvrta vremenska točka reakcije ima akceptorsku aktivnost preko 100 % što je posljedica jedne od prije opisanih pogrešaka (priprema reakcijske smjese ili alikvotiranje).



Slika 30. a) Baždarni pravac za valin i b) promjena koncentracije Val-tRNA^{Val} u vremenu (koncentracija dodane tRNA^{Val} bila je 5,54 μmol dm⁻³).

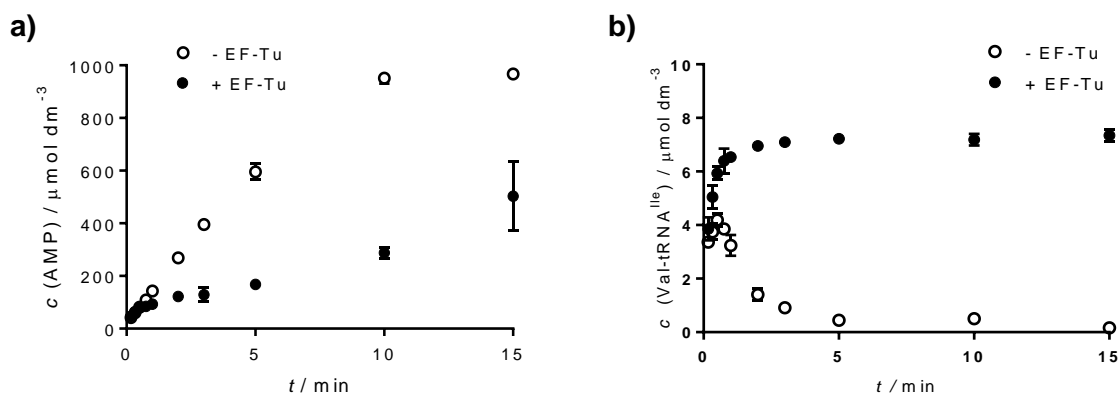
4.3. Praćenje potrošnje ATP-a i akumulacije aa-tRNA

Nakon potrebne pripreme (izolacije, pročišćavanja i karakterizacije enzima i tRNA) odrađena su kinetička mjerenja. Za istraživanje popravka pogreške kod aaRS razreda Ia odabrali smo eksperiment paralelnog praćenja potrošnje ATP-a i akumulacije aa-tRNA prilikom reakcije aminoaciliranja. Postupak izvođenja eksperimenata detaljno je opisan u sklopu metoda (poglavlje 3.2.3.2). U reakciji aminoaciliranja enzim (aaRS) troši jedan ATP za aktivaciju aminokiseline i otpušta AMP u koraku prijenosa aminokiseline na tRNA. Pri tome je stehiometrijski omjer ATP-a kao supstrata za reakciju i aa-tRNA kao produkta reakcije jednak 1. U slučaju da dolazi do popravka pogreške, produkt reakcije aminoaciliranja, aa-tRNA biva hidrolizirana u mjestu za popravak pogreške i prevodi se u slobodnu aminokiselinu i slobodnu tRNA. Nastala aminokiselina i tRNA su zatim na raspolaganju enzimu za ponovnu reakciju aminoaciliranja. Praćenjem promjene koncentracije AMP-a tijekom reakcije aminoaciliranja može se odrediti koncentracija utrošenog ATP-a koja bi trebala odgovarati koncentraciji tRNA u reakcijskoj smjesi (tRNA je ograničavajući faktor reakcije zato što su ostali supstrati, ATP i aminokiselina, dodani u suvišku). Ukoliko se uz reakciju aminoaciliranja odvija i reakcija popravka pogreške, praćenjem potrošenog ATP-a primjetit će se nestehiometrijski omjer (veći

od 1) utrošenog ATP-a i dodane tRNA. Do toga dolazi zato što se tRNA, koja je inače ograničavajući faktor reakcije, reciklira prilikom reakcije popravka pogreške te je time omogućena ponovna reakcija aminoaciliranja na već iskorištenim tRNA. Uz dokazivanje prisutnosti popravka pogreške, ukoliko se u reakcijsku smjesu doda EF-Tu, ovim eksperimentom moguće je i istražiti odvija li se popravak pogreške nakon prijenosa mehanizmom *in cis* ili *in trans*. Ukratko, *in cis* se odvija na način da se jednolančani 3'-kraj misacilirane tRNA translocira u mjesto za popravak pogreške bez disocijacije cjelokupne tRNA s aaRS, dok u slučaju mehanizma *in trans* misacilirana tRNA disocira s enzima te se ponovno veže pozicionirajući 3'-kraj u mjesto za popravak pogreške aaRS. U oba slučaja, 3'-kraj misacilirane tRNA smješta se u mjesto za popravak pogreške gdje dolazi do hidrolize esterske veze između aminokiseline i tRNA. S obzirom na to da EF-Tu veže aa-tRNA s velikim afinitetnom, njegovim dodatkom se smanjuje mogućnost ponovnog vezanja aa-tRNA na aaRS, odnosno utišava se *in trans* popravak pogreške nakon prijenosa. To se opaža kao smanjivanje količine potrošenog ATP-a zbog manje količine dostupnog supstrata (tRNA) što je posljedica smanjenog udjela popravka pogreške. Ako se pak reakcija popravka pogreške nakon prijenosa odvija *in cis* mehanizmom, enzimi popravak obavljaju bez otpuštanja aa-tRNA u otopinu i u tom slučaju dodatak EF-Tu nema utjecaj na utrošak ATP-a.

4.3.1. IleRS

Na slici 31 prikazani su rezultati paralelnog praćenja reakcije popravka pogreške i reakcije aminoaciliranja kod IleRS. Na slici 31 a) prikazani su rezultati praćenja potrošnje ATP-a kod IleRS bez i s EF-Tu u reakcijskoj smjesi. Bitno je naglasiti da je u reakcijsku smjesu dodan 1 mmol dm^{-3} ATP-a, $10 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ tRNA^{Ile} i 20 mmol dm^{-3} nepripadnog valina. Korišten je valin zato što je poznato da je on najveća prijetnja točnosti IleRS. K tome, IleRS ima dobro razvijen popravak pogreške nakon prijenosa usmjeren na valin. Bez dodatka EF-Tu koncentracija AMP-a dostiže plato oko desete minute pri vrijednosti od oko 1 mmol dm^{-3} što označava da je sav ATP u reakcijskoj smjesi potrošen. Nestehiometrijski omjer koncentracije ATP-a i tRNA je izuzetno izražen s tim da je potrošeno čak 100 puta više ATP-a nego je dodano tRNA u reakcijsku smjesu. Iz tog podatka možemo gotovo sa sigurnošću zaključiti da je prisutan popravak pogreške nakon prijenosa. Uz dodatak EF-Tu tijekom 15 min praćenja reakcije koncentracija potrošenog ATP-a dostiže vrijednost od otprilike $500 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ što je upola manje nego u reakciji bez EF-Tu, ali u usporedbi s početnom koncentracijom tRNA potrošenog ATP-a je 50 puta više. Manja potrošnja ATP-a vjerojatno je posljedica vezanja aa-tRNA na EF-Tu što ukazuje na prisutnost *in trans* popravka pogreške kod IleRS. Da bismo utvrdili da se uistinu radi o *in trans* popravku pogreške nakon prijenosa provjerili smo akumulaciju aa-tRNA prilikom reakcije aminoaciliranja.



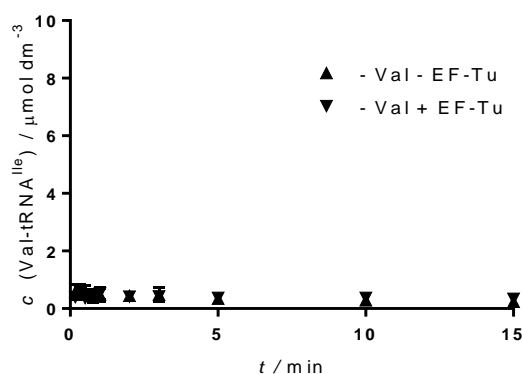
Slika 31. Rezultati paralelnog a) praćenja potrošnje ATP-a i b) akumulacije aa-tRNA prilikom reakcije aminoaciliranja u slučaju IleRS. Reakcijski uvjeti su $2 \mu\text{mol dm}^{-3}$ IleRS, $10 \mu\text{mol dm}^{-3}$ tRNA^{Ile}, 20mmol dm^{-3} valin i 1mmol dm^{-3} ATP. U reakcijskim smjesama s EF-Tu koncentracija aktivnog EF-Tu iznosi $8\text{--}12 \mu\text{mol dm}^{-3}$.

S obzirom na to da aaRS trebaju imati visoku točnost, aaRS razreda Ia u slučaju pogrešne aminoacilacije uspješno obavljaju popravak pogreške nakon prijenosa. Dakle, sva nastala misacilirana tRNA trebala bi se efikasno popravljati i ne bi trebalo doći do akumulacije aa-tRNA u reakcijskoj smjesi. Uz pomoć EF-Tu možemo provjeriti kako se odvija popravak tj. disocira li aminoacilirana tRNA s enzima prije popravka ili ne. Ukoliko se popravak odvija *in cis* mehanizmom, dodatak EF-Tu ne bi trebao promijeniti situaciju tj. aa-tRNA se ne akumulira. U slučaju *in trans* popravka misacilirana tRNA disocira s enzima i u tom trenutku se može vezati na EF-Tu ako je prisutan u reakcijskoj smjesi. Vezanje na EF-Tu onemogućava popravak i dovodi do akumulacije misacilirane tRNA koja se detektira praćenjem aminoaciliranja uz radioaktivno obilježenu tRNA. Zaključno, akumulacija aa-tRNA ukazuje na popravak pogreške *in trans*, dok u slučaju *in cis* popravka pogreške nakon prijenosa nemamo akumulaciju misacilirane tRNA.

Rezultati praćenja akumulacije aa-tRNA u slučaju IleRS prikazani su na slici 31 b). Bez EF-Tu u reakcijskoj smjesi prvih par minuta detektira se akumulacija aa-tRNA^{Ile} od oko $4 \mu\text{mol dm}^{-3}$ što je posljedica uspostavljanja ravnoteže između reakcija aminoaciliranja i popravka pogreške nakon prijenosa pri čemu potonji prevladava nakon otprilike 1 min. Uz dodatak EF-Tu oko treće minute količina aa-tRNA^{Ile} dostiže vrijednost od oko $7 \mu\text{mol dm}^{-3}$ i na toj vrijednosti ostaje kroz ostatak praćenja reakcije. Očita je akumulacija aa-tRNA u prisustvu EF-Tu dok je bez EF-Tu vrijednost koncentracije aa-tRNA^{Ile} nakon pete minute približno nula. Ako promotrimo potrošnju ATP-a u petoj minuti vidimo da je već više od pola ukupnog ATP-a u reakcijskoj smjesi potrošeno te je za očekivati da će se reakcija aminoaciliranja usporiti, a nakon potrošnje svog ATP-a biti će prisutna samo reakcija popravka pogreške. Rezultati ukazuju na prisutnost Val-tRNA^{Ile} u otopini koja se bez EF-Tu ponovno veže na enzim i

hidrolizira, a uz prisutnost EF-Tu je većim dijelom zaštićena od hidrolize. Ovi rezultati su u skladu s rezultatima praćenja potrošnje ATP-a kod IleRS i potvrđuju prisutnost *in trans* popravka pogreške nakon prijenosa kod IleRS.

Aminoacil-tRNA-sintetaze često supročišćavaju s vezanim pripadnim aminokiselinama ili aminoacil-adenilatom koji mogu utjecati na kinetička mjerenja. Kako bismo se uvjerali da ono što opažamo doista jest Val-tRNA^{Ile}, provjerili smo razinu kontaminacije IleRS pripadnom aminokiselinom. To smo napravili tako da smo pratili reakciju aminoaciliranja, ali bez dodatka aminokiseline u reakcijsku smjesu. Rezultati su prikazani na slici 32. Akumulacija aa-tRNA^{Ile} ($\approx 0,58 \mu\text{mol dm}^{-3}$) ukazuje da IleRS doista jest djelomično kontaminiran s pripadnim izoleucinom, ali ne do razine koja može uzrokovati značajne kinetičke artefakte u prethodnim eksperimentima jer je koncentracija izoleucina puno manja od opaženih koncentracija akumulirane aa-tRNA^{Ile} uz dodatak valina.



Slika 32. Rezultati praćenja akumulacije aa-tRNA u slučaju IleRS bez dodatka aminokiseline u reakcijsku smjesu. Reakcijski uvjeti su $2 \mu\text{mol dm}^{-3}$ IleRS, $10 \mu\text{mol dm}^{-3}$ tRNA^{Ile} i 1mmol dm^{-3} ATP. U reakcijskim smjesama s EF-Tu koncentracija aktivnog EF-Tu iznosi $8\text{-}12 \mu\text{mol dm}^{-3}$.

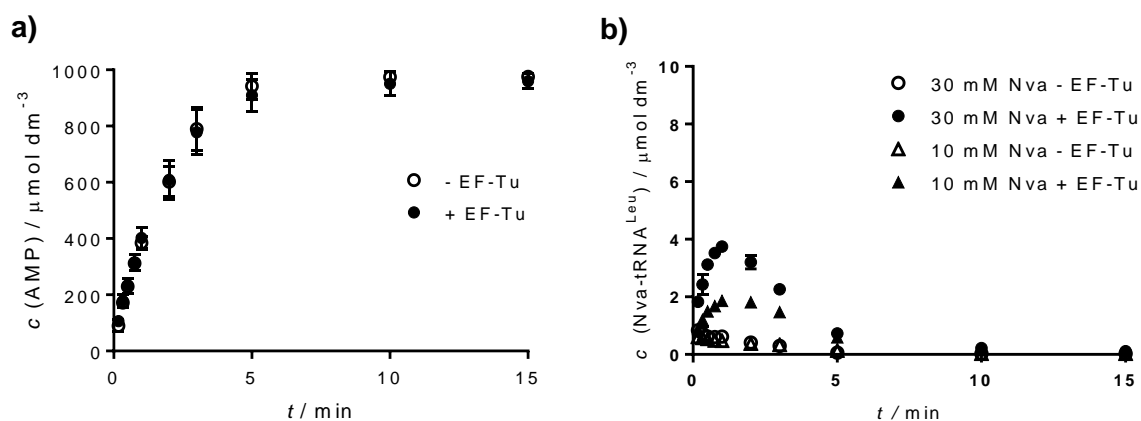
4.3.2. LeuRS

Rezultati paralelnog praćenja potrošnje ATP-a i akumulacije aa-tRNA u slučaju LeuRS prikazani su na slici 33. Pod 33 a) prikazano je praćenje potrošnje ATP-a bez i s EF-Tu u reakcijskoj smjesi. Kao aminokiselinski supstrat dodan je norvalin (30mmol dm^{-3}), neproteinogena aminokiselina koja predstavlja najveću prijetnju točnosti LeuRS. Ostali supstrati reakcije u istim su koncentracijama kao i kod IleRS. Dodatak EF-Tu nije utjecao na rezultate mjerenja. Nestehiometrijski omjer potrošenog ATP-a i tRNA^{Leu} u reakcijskoj smjesi ukazuje na prisutnost popravka pogreške te se plato postiže već oko pete minute što je ranije nego u slučaju s IleRS. Brža potrošnja ATP-a u slučaju LeuRS posljedica je bržeg popravka pogreške kod LeuRS nego kod IleRS (Cvetesic *i sur.*, 2012.). Plato dostiže vrijednost od oko 1mmol dm^{-3} što označava da je sav ATP u reakcijskoj smjesi potrošen. S obzirom da dodatak

EF-Tu ne uzrokuje pad u akumulaciji AMP, možemo pretpostaviti da se kod LeuRS popravak pogreške nakon prijenosa odvija mehanizmom *in cis*.

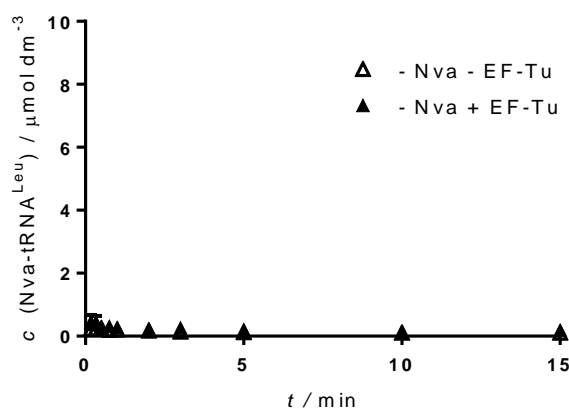
Da bi potvrdili pretpostavku, promatrali smo akumulaciju aa-tRNA^{Leu} prilikom reakcije aminoaciliranja. Rezultati su prikazani na slici 33 b). Bez EF-Tu nema značajne akumulacije aa-tRNA^{Leu}, a uz dodatak EF-Tu pri početku reakcije primjećuje se akumulacija aa-tRNA^{Leu} do oko 4 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ što sugerira da se dio aa-tRNA^{Leu} otpušta u otopinu. Nakon pete minute, kada je potrošen sav ATP, ne detektira se akumulacija aa-tRNA^{Leu} ni u jednoj reakcijskoj smjesi. Opažanje određene akumulacije aa-tRNA^{Leu} uz EF-Tu nije u skladu s rezultatima praćenja potrošnje ATP-a koji sugerira mehanizam *in cis*. To može biti posljedica kontaminacije smjese aminokiseline norvalina i/ili proteina s pripadnim leucinom ili se potencijalno ipak manji dio popravka pogreške kod LeuRS odvija *in trans*.

Da bismo utvrdili radi li se o kontaminaciji aminokiseline napravili smo dodatnu provjeru akumulacije aa-tRNA^{Leu} s manjom koncentracijom norvalina u reakcijskoj smjesi (10 mmol dm^{-3}). S obzirom na to da je Nva moguće, u malom postotku, kontaminiran s Leu, Leu je onda ograničavajući reaktant u reakciji i smanjenje njegove koncentracije, kao posljedica smanjenja koncentracije Nva s 30 na 10 mmol dm^{-3} , trebalo bi prouzročiti manju akumulaciju aa-tRNA^{Leu}. Nva je u obje reakcijske smjese u suvišku te promjena njegove koncentracije ne bi trebala utjecati na razinu akumulacije aa-tRNA^{Leu}. Rezultati su također prikazani na grafu 33 b). Akumulacija aa-tRNA^{Leu} detektira se samo u reakcijskoj smjesi s EF-Tu i u vremenskoj točki 1 min (gdje su zabilježene najveće vrijednosti) iznosi 1,86 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ (izračunata srednja vrijednost iz više mjerenja). Ako usporedimo s istom vremenskom točkom u reakcijskoj smjesi s 30 mmol dm^{-3} Nva u kojoj koncentracija aa-tRNA^{Leu} iznosi 3,74 $\mu\text{mol dm}^{-3}$, možemo primijetiti da je vrijednost otprilike 2 puta manja. S jedne strane, omjer 2:1 koncentracija akumulirane aa-tRNA^{Leu} uz različite koncentracije Nva sugerira kontaminaciju leucinom. S druge strane, činjenica da bez EF-Tu nema akumulacije aa-tRNA^{Leu} dovodi u pitanje nastaje li doista Leu-tRNA^{Leu} koja se znatno sporije hidrolizira te bi stoga očekivali barem djelomičnu akumulaciju pri početku reakcije. Nažalost, ovi eksperimenti ne mogu jednoznačno pružiti odgovor na ovo pitanje.



Slika 33. Rezultati paralelnog (a) praćenja potrošnje ATP-a i (b) akumulacije aa-tRNA prilikom reakcije aminoaciliranja u slučaju LeuRS. Reakcijski uvjeti su 2 μmol dm⁻³ LeuRS, 10 μmol dm⁻³ tRNA^{Leu}, 30 ili 10 mmol dm⁻³ norvalin i 1mmol dm⁻³ ATP. U reakcijskim smjesama s EF-Tu koncentracija aktivnog EF-Tu iznosi 8-12 μmol dm⁻³.

Kao provjeru moguće kontaminacije enzima pripadnom aminokiselinom obavili smo eksperiment aminoaciliranja bez dodatka aminokiseline. Rezultati su prikazani na slici 34. Mala akumulacija aa-tRNA^{Leu} (≈0,45 μmol dm⁻³) ukazuje da je LeuRS djelomično kontaminiran s pripadnom aminokiselinom leucinom, ali u usporedbi s koncentracijom nastale aa-tRNA^{Leu} uz dodatak norvalina, ta je kontaminacija zanemariva.

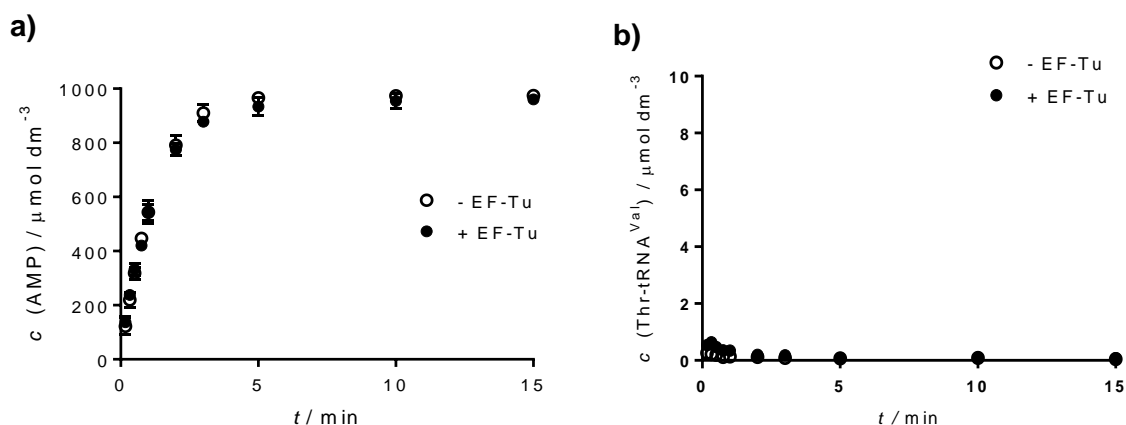


Slika 34. Rezultati praćenja akumulacije aa-tRNA u slučaju LeuRS bez dodatka aminokiseline u reakcijsku smjesu. Reakcijski uvjeti su 2 μmol dm⁻³ LeuRS, 10 μmol dm⁻³ tRNA^{Leu} i 1mmol dm⁻³ ATP. U reakcijskim smjesama s EF-Tu koncentracija aktivnog EF-Tu iznosi 8-12 μmol dm⁻³.

4.3.3. ValRS

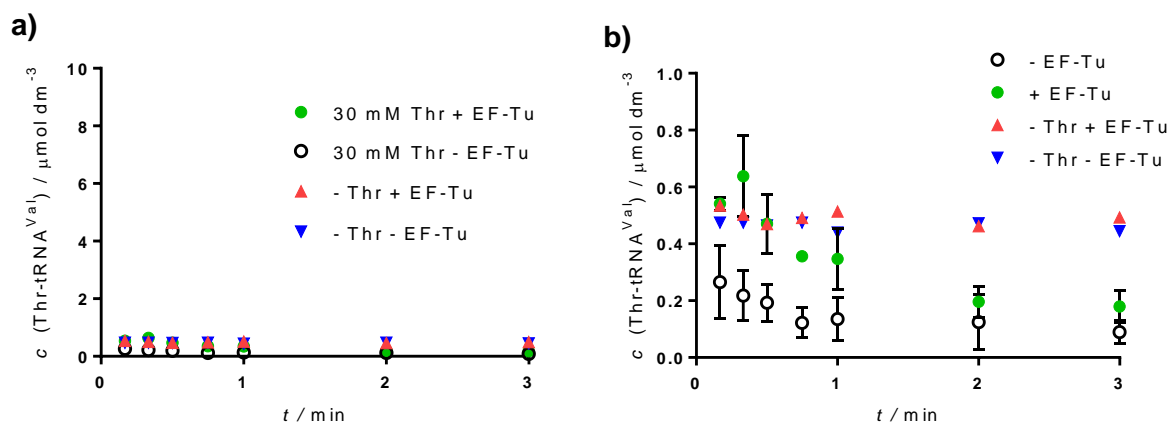
Rezultati paralelnog praćenja potrošnje ATP-a i akumulacije aa-tRNA tijekom reakcije aminoaciliranja u slučaju ValRS prikazani su na slici 35. U reakcijsku smjesu je dodano 30 mmol dm⁻³ treonina, aminokiseline koja je najveća prijetnja točnosti ValRS. Na slici 35 a) prikazano je praćenje potrošnje ATP-a. Kao i u slučaju s LeuRS, dodatak EF-Tu ne mijenja

rezultate te se u obje reakcijske smjese troši sav ATP već oko pete minute. Nestehiometrijski omjer potrošenog ATP-a i početne koncentracije tRNA u reakcijskoj smjesi ukazuje na prisutnost popravka pogreške, a s obzirom na to da EF-Tu ne mijenja ishod možemo pretpostaviti da se radi o *in cis* popravku pogreške nakon prijenosa. Praćenje akumulacije aa-tRNA^{Val} pokazuje da ona nastaje u vrlo malim količinama pri samom početku reakcije te je razlika u smjesi s i bez EF-Tu minimalna. Ovi rezultati sugeriraju *in cis* popravak pogreške nakon prijenosa kod ValRS.



Slika 35. Rezultati paralelnog a) praćenja potrošnje ATP-a i b) akumulacije aa-tRNA prilikom reakcije aminoaciliranja u slučaju ValRS. Reakcijski uvjeti su $2 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ValRS, $10 \mu\text{mol dm}^{-3}$ tRNA^{Val}, 30mmol dm^{-3} treonin i 1mmol dm^{-3} ATP. U reakcijskim smjesama s EF-Tu koncentracija aktivnog EF-Tu iznosi $8\text{-}12 \mu\text{mol dm}^{-3}$.

U svrhu provjere moguće kontaminacije enzima pripadnom aminokiselinom odrađena su mjerenja akumulacije aa-tRNA bez dodatka aminokiseline. Na slici 36 prikazani su rezultati. Bez dodatka aminokiseline akumulira se otprilike $0,5 \mu\text{mol dm}^{-3}$ aa-tRNA^{Val} neovisno o dodatku EF-Tu. S obzirom na to da je enzim dodan u koncentraciji od $2 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ova vrijednost akumulirane aa-tRNA znači da je oko 25 % enzima kontaminirano s pripadnim valinom i da sva akumulacija aa-tRNA u eksperimentima s ValRS vjerojatno potječe od pripadne Val-tRNA^{Val}. Enzim je dodatno pročišćen pročišćavanjem pirofosforolizom, ali nismo uspjeli smanjiti kontaminaciju ispod 25%. Početna kontaminacija bila je skoro 100% što nije začuđujuće uzevši u obzir da je valin jedna od najprisutnijih aminokiselina u staničnim uvjetima.



Slika 36. Rezultati praćenja akumulacije aa-tRNA u slučaju ValRS sa i bez dodatka aminokiseline u reakcijsku smjesu. Reakcijski uvjeti su $2 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ValRS, $10 \mu\text{mol dm}^{-3}$ tRNA^{Val} , 1mmol dm^{-3} ATP i 30mmol dm^{-3} treonina ukoliko je dodan. U reakcijskim smjesama s EF-Tu koncentracija aktivnog EF-Tu iznosi $8\text{-}12 \mu\text{mol dm}^{-3}$. Zbog preklapanja velikog broja točaka, za bolju preglednost su različiti skupovi podataka označeni različitim bojama. Na grafu pod a) su prikazani podaci za svih 15 minuta praćenja reakcije, a na grafu pod b) za prve 3 min sa smanjenom y osi.

5. RASPRAVA

Aminoacil-tRNA-sintetaze imaju veoma bitnu ulogu u održavanju translacijske točnosti te stoga trebaju imati visoku vjernost reakcije aminoaciliranja koju postižu na različite načine. Neke aaRS imaju iznimno malu pogrešku pri prepoznavanju supstrata te im nije potreban popravak pogreške, dok su druge, zbog nedovoljne specifičnosti pri prepoznavanju aminokiselina, razvile mehanizme popravka pogreške. Među njih svrstavamo i aaRS razreda Ia, odnosno IleRS, LeuRS i ValRS – evolucijski srodne enzime kod kojih je dominantan popravak pogreške nakon prijenosa koji se odvija u CP1 domeni. Smatra se da je kod sintetaza razreda I, zbog spore disocijacije produkta, dominantan *in cis* mehanizam popravka pogreške nakon prijenosa. Neobjavljeni rezultati istraživanja na mutantima IleRS (Živković i Gruić Sovulj) dali su naslutiti da se popravak pogreške nakon prijenosa kod IleRS odvija, barem djelomično, *in trans* mehanizmom. Ti rezultati potaknuli su nas da ispitamo mehanizme popravka pogreške nakon prijenosa kod sva tri enzima razreda Ia (IleRS, LeuRS i ValRS). Da bismo to ispitali u reakcijsku smjesu sa svakom aaRS dodana je odgovarajuća aminokiselina za koju znamo da je enzim pogrešno aktivira, prenosi na tRNA i popravlja pogrešku mehanizmom popravka pogreške nakon prijenosa. Kod sva tri enzima praćenjem potrošnje ATP-a zabilježen je nestehiometrijski omjer koncentracije potrošenog ATP-a i koncentracije nastale aa-tRNA u reakcijskoj smjesi. Tim zapažanjem potvrđena je prisutnost popravka pogreške kod IleRS, LeuRS i ValRS. Kod IleRS praćenjem potrošnje ATP-a uz dodatak EF-Tu primijećeno je smanjenje potrošnje ATP-a što je karakteristično u slučaju popravka pogreške *in trans* mehanizmom, a kod LeuRS i ValRS dodatak EF-Tu nije imao nikakav utjecaj na potrošnju ATP-a što je svojstveno *in cis* mehanizmu popravka pogreške nakon prijenosa. Iz tih rezultata možemo pretpostaviti da IleRS popravak pogreške obavlja *in trans*, a LeuRS i ValRS *in cis* mehanizmom.

Za dodatnu provjeru odlučili smo paralelno pratiti akumulaciju aa-tRNA. Bez dodatka EF-Tu jedino se u slučaju IleRS akumulirala aa-tRNA^{Ile} pri početku reakcije što smatramo da je posljedica uspostavljanja ravnoteže između reakcija aminoaciliranja i popravka pogreške nakon prijenosa koji je 5-10 puta sporiji kod IleRS u odnosu na LeuRS i ValRS. Dodatak EF-Tu u reakcijsku smjesu s IleRS prouzročio je akumulaciju aa-tRNA^{Ile} tijekom cijele reakcije što sugerira da je djelomično spriječen popravak pogreške. To je moguće samo u slučaju *in trans* popravka pogreške u kojem misacilirana tRNA disocira s enzima prije popravka pogreške. Time je potvrđeno da je kod IleRS prisutan *in trans* popravak pogreške. U slučaju LeuRS, uz dodatak EF-Tu akumulira se mala količina ($4 \mu\text{mol dm}^{-3}$) aa-tRNA^{Leu} koja nakon svega par minuta nestaje. Dodatne provjere sugeriraju djelomičnu kontaminaciju komercijalnog uzorka norvalina pripadnim leucinom. Međutim, rezultati nisu potpuno jednoznačni zbog toga što se bez EF-Tu ne akumulira aa-tRNA^{Leu} što bi očekivali u slučaju da se doista radi o pripadnoj Leu-

tRNA^{Leu} koja puno sporije biva hidrolizirana zbog čega može disocirati s enzima. Zaključno, rezultati upućuju na to kako se u slučaju LeuRS popravak pogreške odvija pretežito *in cis* putem, a u puno manjoj mjeri moguć je i *in trans* put. Kod ValRS je zabilježeno da je 25 % enzima kontaminirano valinom što sugerira da zabilježena akumulacija aa-tRNA^{Val} odgovara Val-tRNA^{Val}. Dakle, zaključujemo kako nema akumulacije Thr-tRNA^{Val}, što odgovara pretpostavci o *in cis* mehanizmu popravka pogreške.

Osim što IleRS pokazuje različit mehanizam popravka pogreške nakon prijenosa, prethodno je spomenuto da se razlikuje od srodnih LeuRS i ValRS prema popravku pogreške prije prijenosa. Naime, čak se 30 % ukupnog popravka pogreške kod IleRS pripisuje tRNA-ovisnom popravku pogreške prije prijenosa, dok taj popravak pogreške nije zabilježen kod LeuRS i ValRS. Zanimljivo je da baš IleRS ima zastupljeniji *in trans* popravak pogreške nakon prijenosa među sintetazama razreda Ia. *In trans* popravak pogreške predstavlja najveći rizik za konačnu pogrešku jer jednom kad misacilirana aa-tRNA disocira s enzima, može se vezati na EF-Tu prije ponovnog vezanja na aaRS i završiti u translaciji. Zbog toga možda nije čudno što je popravak pogreške prije prijenosa razvijeniji kod IleRS jer je poželjno da spriječi pogrešku prije prijenosa na tRNA, dok kod LeuRS i ValRS koji popravak pogreške nakon prijenosa obavljaju pretežito *in cis* putem to nije toliko nužno jer je mala šansa da će pogrešno aminoacilirana tRNA disocirati s enzima.

6. ZAKLJUČCI

- Dodatak EF-Tu značajno utječe na potrošnju ATP-a u slučaju IleRS, dok kod LeuRS i ValRS nema utjecaja. Iz toga pretpostavljamo da se popravak pogreške nakon prijenosa odvija pretežito mehanizmom *in trans* kod IleRS, a kod LeuRS i ValRS mehanizmom *in cis*.
- Eksperimenti kojima smo pokušali potvrditi prethodni zaključak (provjera akumulacije aa-tRNA bez i s EF-Tu) bili su manje jednoznačni u slučaju LeuRS i ValRS zbog kontaminacije aminokiseline ili enzima. U slučaju IleRS akumulacijom Val-tRNA^{Ile} uz prisutnost EF-Tu potvrđen je popravak *in trans*, dok u slučaju LeuRS i ValRS zbog kontaminacija ne može biti potpuno isključena mogućnost popravka pogreške *in trans*.
- ValRS je 25 % kontaminiran s pripadnom aminokiselinom valinom te bez dodatka aminokiseline pokazuje veću akumulaciju aa-tRNA^{Val} nego s dodatkom treonina. Moguće je da je akumulirana aa-tRNA^{Val} uz dodatak treonina zapravo Val-tRNA^{Val} zbog kontaminacije enzima što ide u prilog *in cis* mehanizmu popravka pogreške kod ValRS.
- Kod LeuRS prisutno je povećanje akumulacije aa-tRNA^{Leu} uz dodatak EF-Tu pri početku reakcije. Eksperimenti provedeni za provjeru ovog rezultata nisu posve jednoznačni i sugeriraju kontaminaciju norvalina pripadnim leucinom, ali i mogući udio *in trans* mehanizma popravka pogreške kod LeuRS.
- IleRS je jedinstven među sintetazama razreda Ia prema značajnom udjelu *in trans* mehanizma popravka, ali i prema velikom udjelu tRNA-ovisnog popravka pogreške prije prijenosa.

7. ZAHVALE

Od srca se zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Ili Gruić Sovulj na ukazanom povjerenju, pruženoj prilici da budem dio aktualnog istraživanja i na pomoći oko izrade ovog rada. Puno hvala na usmjeravanju, susretljivosti, prenesenom znanju te stručnim savjetima i prijedlozima pomoću kojih je ovaj rad iznimno poboljšan.

Veliko hvala želim uputiti i Igoru Živkoviću, mag. chem. koji mi je pomogao u svakom koraku izrade ovog rada. Hvala na podršci i na strpljenju i hvala na ogromnoj količini uloženog vremena u rad sa mnom kroz koji sam usvojila brojna nova znanja i vještine. Hvala također na divnoj atmosferi uz koju su čak i sve prepreke i problemi bili izdržljivi.

Hvala i svima na Zavodu za biokemiju na ugodnoj radnoj atmosferi.

8. POPIS LITERATURE

- Allocati N, Masulli M, Alexeyev MF, Ilio C Di (2013). Escherichia coli in Europe: An overview. *Int J Environ Res Public Health* **10**: 6235–6254.
- Apostol I, Levine J, Lippincott J, Leach J, Hess E, Glascock CB, i sur. (1997). Incorporation of norvaline at leucine positions in recombinant human hemoglobin expressed in Escherichia coli. *J Biol Chem* **272**: 28980–28988.
- Aravind L, Anantharaman V, Koonin E V. (2002). Monophyly of Class I aminoacyl tRNA synthetase, USPA, ETFP, photolyase, and PP-ATPase nucleotide-binding domains: Implications for protein evolution in the RNA world. *Proteins Struct Funct Genet* **48**: 1–14.
- Becker HD, Kern D (1998). Thermus thermophilus: A link in evolution of the tRNA-dependent amino acid amidation pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 12832–12837.
- Bilus M, Semanjski M, Mocibob M, Zivkovic I, Cvetesic N, Tawfik DS, i sur. (2019). On the Mechanism and Origin of Isoleucyl-tRNA Synthetase Editing against Norvaline. *J Mol Biol* **431**: 1284–1297.
- Blount ZD (2015). The unexhausted potential of E. coli. *Elife* **4**: .
- Boniecki MT, Vu MT, Betha AK, Martinis SA (2008). CP1-dependent partitioning of pretransfer and posttransfer editing in leucyl-tRNA synthetase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 19223–19228.
- Cathopoulos TJT, Chuawong P, Hendrickson TL (2008). Conserved discrimination against misacylated tRNAs by two mesophilic elongation factor Tu orthologs. *Biochemistry* **47**: 7610–7616.
- Cavarelli J, Eriani G, Rees B, Ruff M, Boeglin M, Mitschler A, i sur. (1994). The active site of yeast aspartyl-tRNA synthetase: Structural and functional aspects of the aminoacylation reaction. *EMBO J* **13**: 327–337.

- Chen JF, Guo NN, Li T, Wang ED, Wang YL (2000). CP1 domain in Escherichia coli leucyl-tRNA synthetase is crucial for its editing function. *Biochemistry* **39**: 6726–6731.
- Crick FHC, Barnett L, Brenner S, Watts-Tobin RJ (1961). General nature of the genetic code for proteins. *Nature* **192**: 1227–1232.
- Cvetešić N (2010). Kloniranje, prekomjerna ekspresija te pročišćavanje molekula tRNA^{Ile} i tRNA^{Val} iz bakterije Escherichia coli.
- Cvetesic N, Akmačić I, Gruić-Sovulj I (2013). Lack of discrimination against non-proteinogenic amino acid norvaline by elongation factor Tu from Escherichia coli. *Croat Chem Acta* **86**: 73–82.
- Cvetesic N, Bilus M, Gruic-Sovulj I (2015). The tRNA A76 hydroxyl groups control partitioning of the tRNA-dependent pre- and post-transfer editing pathways in class I tRNA synthetase. *J Biol Chem* **290**: 13981–13991.
- Cvetesic N, Palencia A, Halasz I, Cusack S, Gruic-Sovulj I (2014). The physiological target for LeuRS translational quality control is norvaline. *EMBO J* **33**: 1639–1653.
- Cvetesic N, Perona JJ, Gruic-Sovulj I (2012). Kinetic partitioning between synthetic and editing pathways in class I aminoacyl-tRNA synthetases occurs at both pre-transfer and post-transfer hydrolytic steps. *J Biol Chem* **287**: 25381–25394.
- Dulic M, Cvetesic N, Perona JJ, Gruic-Sovulj I (2010). Partitioning of tRNA-dependent editing between pre- and post-transfer pathways in class I aminoacyl-tRNA synthetases. *J Biol Chem* **285**: 23799–23809.
- Dulic M, Cvetesic N, Zivkovic I, Palencia A, Cusack S, Bertosa B, i sur. (2017). Kinetic Origin of Substrate Specificity in Post-Transfer Editing by Leucyl-tRNA Synthetase. *J Mol Biol* **430**: 1–16.
- Dulic M, Perona JJ, Gruic-Sovulj I (2014). Determinants for tRNA-dependent pretransfer editing in the synthetic site of isoleucyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* **53**: 6189–6198.

- Dwivedi K (2011). M.Sc. Dissertation Report “Expression of recombinant insecticidal protein (code: NBRI 12) as a fusion protein in E. coli, its purification, refolding and evaluation of its biological activity.” .
- Englesberg E, Irr J, Power J, Lee N (1965). Positive Control of Enzyme Synthesis by Gene C in the L-Arabinose System. *J Bacteriol* .
- Fersht AR (1977). Editing Mechanisms in Protein Synthesis. Rejection of Valine by the Isoleucyl-tRNA Synthetase. *Biochemistry* **16**: 1025–1030.
- Fersht AR (1998). Sieves in sequence. *Science* **280**: 541.
- Fersht AR, Dingwall C (1979a). Establishing the Misacylation/Deacylation of the tRNA Pathway for the Editing Mechanism of Prokaryotic and Eukaryotic Valyl-tRNA Synthetases. *Biochemistry* **18**: 1238–1245.
- Fersht AR, Dingwall C (1979b). Evidence for the double-sieve editing mechanism in protein synthesis. Steric exclusion of isoleucine by valyl-tRNA synthetases. *Biochemistry* **18**: 2627–2631.
- Fukai S, Nureki O, Sekine S, Shimada A, Tao J, Vassilyev DG, i sur. (2000). Structural basis for double-sieve discrimination of L-valine from L-isoleucine and L-threonine by the complex of tRNA(Val) and valyl-tRNA synthetase. *Cell* **103**: 793–803.
- Fukai S, Nureki O, Sekine SI, Shimada A, Vassilyev DG, Yokoyama S (2003). Mechanism of molecular interactions for tRNA^{Val} recognition by valyl-tRNA synthetase. *Rna* **9**: 100–111.
- Fukunaga R, Fukai S, Ishitani R, Nureki O, Yokoyama S (2004). Crystal Structures of the CP1 Domain from *Thermus thermophilus* Isoleucyl-tRNA Synthetase and Its Complex with L-Valine. *J Biol Chem* **279**: 8396–8402.
- Fukunaga R, Yokoyama S (2006). Structural basis for substrate recognition by the editing domain of isoleucyl-tRNA synthetase. *J Mol Biol* **359**: 901–912.

- Furano A V. (1975). Content of elongation factor Tu in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**: 4780–4784.
- Giege R, Sissler M, Florentz C (1998). Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity. *Nucleic Acids Res* **26**: 5017–5035.
- Harvey KL, Jarocki VM, Charles IG, Djordjevic SP (2019). The diverse functional roles of elongation factor tu (Ef-tu) in microbial pathogenesis. *Front Microbiol* **10**: 2351.
- Horowitz J, Chu WC, Derrick WB, Liu JCH, Liu M, Yue D (1999). Synthetase recognition determinants of E. coli valine transfer RNA. *Biochemistry* **38**: 7737–7746.
- Ibba M, Morgan S, Curnow AW, Pridmore DR, Vothknecht UC, Gardner W, i sur. (1997). A euryarchaeal Lysyl-tRNA synthetase: Resemblance to class I synthetases. *Science* **278**: 1119–1122.
- Ibba M, Soll D (2000). Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu Rev Biochem* **69**: 617–650.
- Jacob F, Monod J (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* **3**: 318–356.
- Jakubowski H, R.fersht A (1981). Alternative pathways for editing non-cognate amino acids by aminoacyl-tRNA synthetases. *Nucleic Acids Res* **9**: 3105–3117.
- Kjeldgaard M, Nissen P, Thirup S, Nyborg J (1993). The crystal structure of elongation factor EF-Tu from *Thermus aquaticus* in the GTP conformation. *Structure* **1**: 35–50.
- Lehman IR, Bessman MJ, Simms ES, Kornberg A (1958). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. I. Preparation of substrates and partial purification of an enzyme from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **233**: 163–170.
- Lincecum TL, Tukalo M, Yaremchuk A, Mursinna RS, Williams AM, Sproat BS, i sur. (2003). Structural and mechanistic basis of pre- and posttransfer editing by leucyl-tRNA synthetase. *Mol Cell* **11**: 951–963.

- Ling J, So BR, Yadavalli SS, Roy H, Shoji S, Fredrick K, i sur. (2009). Resampling and Editing of Mischarged tRNA Prior to Translation Elongation. *Mol Cell* **33**: 654–660.
- Ling J, Yadavalli SS, Ibba M (2007). Phenylalanyl-tRNA synthetase editing defects result in efficient mistranslation of phenylalanine codons as tyrosine. *Rna* **13**: 1881–1886.
- Lippmann C, Lindschau C, Vijgenboom E, Schroder W, Bosch L, Erdmann VA (1993). Prokaryotic elongation factor Tu is phosphorylated in vivo. *J Biol Chem* **268**: 601–607.
- Lofffield RB, Vanderjagt D (1972). The frequency of errors in protein biosynthesis. *Biochem J* **128**: 1353–1356.
- Lue SW, Kelley SO (2005). An aminoacyl-tRNA synthetase with a defunct editing site. *Biochemistry* **44**: 3010–3016.
- Lue SW, Kelley SO (2007). A single residue in leucyl-tRNA synthetase affecting amino acid specificity and tRNA aminoacylation. *Biochemistry* **46**: 4466–4472.
- Martinis SA, Fox GE (1997). Non-standard amino acid recognition by Escherichia coli leucyl-tRNA synthetase. *Nucleic Acids Symp Ser* **36**: 125–128.
- Muramatsu T, Nishikawa K, Nemoto F, Kuchino Y, Nishimura S, Miyazawa T, i sur. (1988a). Codon and amino-acid specificities of a transfer RNA are both converted by a single post-transcriptional modification. *Nature* **36**: 179–180.
- Muramatsu T, Yokoyama S, Horie N, Matsuda A, Ueda T, Yamaizumi Z, i sur. (1988b). A novel lysine-substituted nucleoside in the first position of the anticodon of minor isoleucine tRNA from Escherichia coli. *J Biol Chem* **263**: 9261–9267.
- Nelson DL, Cox MM (2013). *Lehninger Principles of Biochemistry*. W.H. Freeman.
- Noort JM Van, Kraal B, Sinjorgo KMC, Persoon NLM, Johanns ESD, Bosch L (1986). Methylation in vivo of elongation factor EF-Tu at lysine-56 decreases the rate of tRNA-dependent GTP hydrolysis. *Eur J Biochem* **160**: 557–561.

- Nordin BE, Schimmel P (2005). Isoleucyl-tRNA synthetases. *Amin Synth* 24–35.
- Nureki O, Kohno T, Sakamoto K, Miyazawa T, Yokoyama S (1993). Chemical modification and mutagenesis studies on zinc binding of aminoacyl-tRNA synthetases. *J Biol Chem* **268**: 15368–15373.
- Nureki O, Vassylyev DG, Tateno M, Shimada A, Nakama T, Fukai S, i sur. (1998). Enzyme structure with two catalytic sites for double-sieve selection of substrate. *Science* **280**: 578–582.
- Palencia A, Crépin T, Vu MT, Lincecum TL, Martinis SA, Cusack S (2012). Structural dynamics of the aminoacylation and proofreading functional cycle of bacterial leucyl-tRNA synthetase. *Nat Struct Mol Biol* **19**: 677–684.
- Park JO, Rubin SA, Xu Y-FF, Amador-Noguez D, Fan J, Shlomi T, i sur. (2016). Metabolite concentrations, fluxes and free energies imply efficient enzyme usage. *Nat Chem Biol* **12**: 482–489.
- Perona JJ, Gruic-Sovulj I (2014). Synthetic and editing mechanisms of aminoacyl-tRNA synthetases. *Top Curr Chem* **344**: 1–41.
- Perona JJ, Hadd A (2012). Structural diversity and protein engineering of the aminoacyl-tRNA synthetases. *Biochemistry* **51**: 8705–29.
- Rudorf S, Lipowsky R (2015). Protein synthesis in E. coli: Dependence of codon-specific elongation on tRNA concentration and codon usage. *PLoS One* **10**: e0134994.
- Sankaranarayanan R, Dock-Bregeon AC, Romby P, Caillet J, Springer M, Rees B, i sur. (1999). The structure of threonyl-tRNA synthetase-tRNA^{Thr} complex enlightens its repressor activity and reveals an essential zinc ion in the active site. *Cell* **97**: 371–381.
- Schuwirth BS, Borovinskaya MA, Hau CW, Zhang W, Vila-Sanjurjo A, Holton JM, i sur. (2005). Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science* **310**: 827–834.
- Silvian LF, Wang J, Steitz TA (1999). Insights into editing from an Ile-tRNA synthetase

structure with tRNA(Ile) and mupirocin. *Science* **285**: 1074–1077.

Snyder L, Peters JE, Henkin TM, Champness W (2013). *Molecular Genetics of Bacteria*. ASM Press.

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

Stevens A (1960). Incorporation of the adenine ribonucleotide into RNA by cell fractions from *E. coli* B. *Biochem Biophys Res Commun* **3**: 92–96.

Tang Y, Tirrell DA (2002). Attenuation of the editing activity of the *Escherichia coli* Leucyl-tRNA synthetase allows incorporation of novel amino acids into proteins in vivo. *Biochemistry* **41**: 10635–10645.

Voet D, Voet JG (2010). *Biochemistry*. Wiley.

Vu MT, Martinis SA (2007). A unique insert of leucyl-tRNA synthetase is required for aminoacylation and not amino acid editing. *Biochemistry* **46**: 5170–5176.

Živković I (2016). Mehanizam diskriminacije leucina u mjestu za popravak pogreške leucil-tRNA-sintetaze.

Zivkovic I, Moschner J, Kokschi B, Gruic-Sovulj I (2020). Mechanism of discrimination of isoleucyl-tRNA synthetase against nonproteinogenic α -aminobutyrate and its fluorinated analogues. *FEBS J* **287**: 800–813.

BL21(DE3) | Expression strains | NZYTech. <https://www.nzytech.com/products-services/molecular-biology/competent-cells-media/competent-cells/expression-strains/mb006/> (pristup: svibanj 2021.)

9. SAŽETAK

Kate Ivković

Izoleucil-tRNA-sintetaza popravlja vlastitu pogrešku tijekom biosinteze proteina drugačije od evolucijski srodnih aminoacil-tRNA-sintetaza razreda Ia

Jedna od glavnih karika u biosintezi proteina su aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) – enzimi koji kataliziraju povezivanje aminokiseline i tRNA. Reakcija aminoaciliranja odvija se u dva koraka, aktivacija aminokiseline i njezin prijenos na tRNA. Kako bi genetička informacija bila vjerno prenesena, važno je da aaRS prepoznaju isključivo pripadni par aminokiseline i tRNA. Potonje su velike molekule pa njihovo prepoznavanje nije problem, ali zbog velike strukturne i kemijske sličnosti nekih aminokiselina, aaRS katkad pogrešno prepoznaju nepripadne aminokiseline kao da su pripadne. To može biti toksično za stanicu pa su takve aaRS razvile mehanizme popravka vlastite pogreške. Glavni mehanizam je popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline na tRNA (hidroliza pogrešno aminoacilirane tRNA) koji se odvija u zasebnoj domeni enzima. Razlikujemo dva tipa popravka pogreške nakon prijenosa, popravak *in cis* i *in trans*. U slučaju popravka *in cis*, 3' kraj pogrešno aminoacilirane tRNA (aa-tRNA) premješta se u mjesto za popravak pogreške bez disocijacije aa-tRNA s enzima. U slučaju popravka *in trans*, aa-tRNA disocira s enzima te se ponovno veže u mjesto za popravak. Alternativno, slobodna aa-tRNA može biti vezana od strane elongacijskog faktora Tu (EF-Tu) koji je odvodi prema ribosomu kako bi se uključila u translaciju. Predmet istraživanja ovog rada su izoleucil-, leucil- i valil-tRNA-sintetaza (IleRS, LeuRS i ValRS) – evolucijski vrlo srodne aaRS koje su specifične po tome da pogrešno prepoznaju nekoliko različitih aminokiselina te posjeduju popravak pogreške nakon prijenosa. Cilj rada bio je odgovoriti na pitanje primjenjuju li IleRS, LeuRS i ValRS *in cis* ili *in trans* popravak pogreške. U tu svrhu korišten je kinetički test paralelnog praćenja reakcije aminoaciliranja i utroška ATP-a sa i bez dodanog EF-Tu. ATP se stehiometrijski troši prilikom reakcije aminoaciliranja, a u slučaju popravka pogreške bilježi se nestehiometrijski visok udio utrošenog ATP-a. Dobiveni rezultati sugeriraju da IleRS popravak pogreške obavlja pretežito *in trans*, a LeuRS i ValRS *in cis* mehanizmom. Ovi rezultati su važni jer potvrđuju da se, unatoč bliskoj evolucijskoj srodnosti, popravak pogreške drugačije odvija kod IleRS, u odnosu na LeuRS i ValRS te postavljaju temelj za daljnja istraživanja o razlikama među te tri aaRS.

Ključne riječi: izoleucil-tRNA-sintetaza, leucil-tRNA-sintetaza, valil-tRNA-sintetaza, popravak pogreške nakon prijenosa

10. SUMMARY

Kate Ivković

Isoleucyl-tRNA synthetase corrects its own error during protein biosynthesis in a different manner than the evolutionary related class Ia aminoacyl-tRNA synthetases

Among the key contributors to protein biosynthesis are aminoacyl-tRNA synthetases (aaRS) - enzymes that catalyse coupling of amino acids and tRNAs. The aminoacylation reaction consists of two steps: amino acid activation and the aminoacyl transfer to tRNA. To enable faithful transmission of genetic information, it is important that aaRSs couple only cognate amino acids and tRNAs. The latter are large molecules whose recognition does not pose a problem. In contrast, due to high structural and chemical similarity of several amino acids, aaRSs sometimes mistakenly recognize non-cognate amino acids. Since the aminoacylation error can be toxic for the cell, aaRS with inherent problems in amino acid recognition have evolved editing mechanisms. The main mechanism is post-transfer editing which comprises hydrolysis of misaminoacyl-tRNAs and takes place in a specialized editing domain. Post-transfer editing has two pathways, *in cis* and *in trans* editing. In the case of *in cis* editing, the 3' end of the aminoacyl-tRNA (aa-tRNA) is transferred to the editing domain without aa-tRNA dissociation from the enzyme. In the case of *in trans* editing, aa-tRNA firstly dissociates from the enzyme and then rebinds to the editing domain. Alternatively, free aa-tRNA can be bound by an elongation factor Tu (EF-Tu) to be escorted to the ribosome. Here we studied isoleucyl, leucyl and valyl-tRNA synthetases (IleRS, LeuRS and ValRS) – three evolutionary related aaRSs that may recognize several noncognate amino acids and all exhibit post-transfer editing. We sought to answer whether IleRS, LeuRS and ValRS employ *in cis* or *in trans* editing. To tackle this question, we used a kinetic assay for monitoring aminoacylation reaction and ATP consumption in the presence and absence of EF-Tu. ATP is consumed during the aminoacylation reaction and if editing is present, a higher, nonstoichiometric ratio of consumed ATP to the produced aa-tRNA is recorded. The obtained results suggest IleRS predominantly performs *in trans* post-transfer editing while LeuRS and ValRS generally employ *in cis* editing. The results are significant because they confirm that despite the close evolutionary link, error correction follows a different pathway in IleRS compared to LeuRS and ValRS. Moreover, presented data lay the groundwork for further research on the differences between these three aaRS.

Key words: isoleucyl-tRNA synthetase, leucyl-tRNA synthetase, valyl-tRNA synthetase, post-transfer editing