



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Alojzije Brkić

**MEHANIZMI RAZLIČITE OSJETLJIVOSTI NA
ANTIBIOTIK MUPIROCIN KOD DVA TIPA
BAKTERIJSKIH IZOLEUCIL-tRNA-SINTETAZA**

DOKTORSKI RAD

Mentorica: prof. dr. sc. Ita Gruić-Sovulj

Zagreb, 2025.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Alojzije Brkić

**MECHANISMS OF DIFFERENT MUPIROCIN
SENSITIVITY OF TWO TYPES OF BACTERIAL
ISOLEUCYL-tRNA SYNTHETASES**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor: Ita Gruić-Sovulj, Ph.D.

Zagreb, 2025.

Hvala

Mentorici, prof. dr. sc. Iti Gruić-Sovulj

Hvala na povjerenju, podršci i strpljenju, ali i što ste mi pokazali da se i u Hrvatskoj, zemlji s više prepreka nego rješenja, može raditi kvalitetna znanost.

Suradnicima iz grupa Gruić i Ban

Sve ove godine surađivali smo, dijelili uspjehe i neuspjehe. Iako smo krenuli različitim putevima, naša prijateljstva ostaju! Hvala za sve lijepe trenutke koji su laboratorij učinili ugodnim mjestom za rad.

Nastavnicima i profesorima koji su pratili moj obrazovni put

Iako ste svi bili različiti, od svakoga sam ponešto naučio.

Sari

Hvala ti što si me podržavala, motivirala i voljela u svim mojim izdanjima. Ovaj doktorat nije bio samo test moje strpljivosti i upornosti, nego i tvoje. Hvala ti što si ostala uz mene cijelo ovo vrijeme, čak i kad sam ti davao malo razloga za to.

Obitelji

U teškim trenucima, kada sam bio blizu odustajanja, vaša ljubav i žrtva poticale su me da nastavim. Hvala što ste me izveli na pravi put, bili uz mene i naučili me ljudskim vrijednostima. Hvala za požrtvornost, odgoj, ljubav i podršku kroz sve ove godine – vi ste dokaz da ljubav nema granica.



SADRŽAJ

SAŽETAK.....	x
ABSTRACT	xii
§ 1. UVOD	1
1.1. Ciljevi, svrha i hipoteze rada	5
§ 2. LITERATURNI PREGLED	7
2.1. Prijenos genetičke informacije i sinteza proteina.....	7s
2.1.1. Sinteza proteina kao meta antibiotika i antibiotska rezistencija	13
2.2. Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS).....	15
2.2.1. Opća svojstva i uloga aaRS u biosintezi proteina	15
2.2.2. Supstrati aaRS	17
2.2.3. Supstratna specifičnost aaRS.....	20
2.2.4. aaRS kao mete antibiotika	21
2.3. Isoleucil-tRNA-sintetaza (IleRS)	25
2.3.1. Opća svojstva, klasifikacija i rasprostranjenost bakterijskih IleRS	25
2.3.2. Supstratna specifičnost IleRS	27
2.3.3. Interakcije reakcijskog međuprodukta	29
2.3.4. Mupirocin kao kompetitivni inhibitor IleRS	30
§ 3. MATERIJALI I METODE	34
3.1. Materijali	34
3.1.1. Standardne krute kemikalije	34
3.1.2. Komercijalni kompleti za kristalizaciju	35
3.1.3. Makromolekulski precipitanti.....	35
3.1.4. Kromatografske kolone, smole i pločice za tankoslojnu kromatografiju.....	35
3.1.5. Ostali materijali	36
3.1.6. Boje.....	36
3.1.7. Enzimi i komercijalni reakcijski puferi.....	36
3.1.8. Komercijalni kompleti za pročišćavanje nukleinskih kiselina	36
3.1.9. Radioaktivne kemikalije.....	36
3.1.10. Hranjive podloge i mediji za uzgoj bakterijskih kultura.....	37
3.1.11. Klonirajući i ekspresijski sojevi bakterije <i>Escherichia coli</i>	38
3.1.12. Plazmidi.....	38
3.1.13. Antibiotici	40
3.1.14. Aminokiseline, nukleotidi, sintetski oligonukleotidi	40
3.1.15. Analizi reakcijskog međuprodukta IleRS.....	40
3.2. Metode.....	41
3.2.1. Metode evolucijske biologije	41
3.2.2. Rad s nepatogenim genetski modificiranim organizmima (np-GMO).....	41
3.2.2.1. Uvjeti uzgoja bakterijskih kultura.....	42
3.2.2.2. Dugoročna pohrana bakterijskih kultura	42
3.2.2.3. Priprema kompetentnih stanica bakterije <i>E. coli</i>	42
3.2.2.4. Transformacija elektrokompetentnih stanica	43
3.2.2.5. Transformacija kemijski kompetentnih stanica.....	43
3.2.2.6. Provjera kompetencije kemijski kompetentnih i elektrokompetentnih stanica.....	44
3.2.3. Metode rada s DNA.....	44
3.2.3.1. Izolacija plazmidne DNA upotrebom komercijalnih kompleta	44
3.2.3.2. Agarozna gel-elektroforeza.....	44
3.2.3.3. Izolacija genomske DNA iz taloga bakterijskih stanica.....	45

3.2.3.4.	<i>Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije nukleinskih kiselina</i>	45
3.2.3.5.	<i>Lančana reakcija polimerazom (PCR)</i>	45
3.2.3.6.	<i>Razgradnja DNA restrikcijskim endonukleazama</i>	48
3.2.3.7.	<i>Ligacija DNA fragmenata T4-DNA ligazom</i>	49
3.2.3.8.	<i>Ciljana mutageneza</i>	49
3.2.3.9.	<i>Kazetna mutageneza</i>	51
3.2.3.10.	<i>Sekvenciranje DNA</i>	52
3.2.4.	<i>Metode rada s proteinima</i>	53
3.2.4.1.	<i>Preparativna pojačana ekspresija proteina</i>	53
3.2.4.2.	<i>Liza bakterijskih stanica</i>	55
3.2.4.3.	<i>Flokulacija proteinskog ekstrakta</i>	55
3.2.4.4.	<i>Pročišćavanje proteina metodom afinitetne kromatografije na smoli s imobiliziranim metalnim ionima (IMAC)</i>	55
3.2.4.5.	<i>Pročišćavanje proteina metodom ionske izmjene</i>	57
3.2.4.6.	<i>Provjera agregacije proteina metodom gel-filtracijske kromatografije</i>	58
3.2.4.7.	<i>Izmjena pufera i ugušćivanje proteina ultrafiltriranjem</i>	58
3.2.4.8.	<i>Smrzavanje otopine proteina za kristalizaciju</i>	59
3.2.4.9.	<i>Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije proteina</i>	59
3.2.4.10.	<i>Denaturirajuća elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijeva dodecil-sulfata (SDS-PAGE)</i>	60
3.2.5.	<i>Kinetičke metode</i>	61
3.2.5.1.	<i>Aktivacija aminokiseline mjerena metodom izmjene pirofosfata</i>	61
3.2.5.2.	<i>Inhibicija mupirocinom u reakciji aktivacije praćena metodom izmjene pirofosfata</i>	63
3.2.6.	<i>Metode strukturne biologije</i>	65
3.2.6.1.	<i>Pronalazak inicijalnih kristalizacijskih uvjeta za odabrane enzime</i>	65
3.2.6.2.	<i>Optimizacija rasta kristala</i>	66
3.2.6.3.	<i>Sijanje kristala</i>	67
3.2.6.4.	<i>Umrežavanje kristala</i>	67
3.2.6.5.	<i>Krioprotekcija i smrzavanje kristala</i>	67
3.2.6.6.	<i>Difrakcijski eksperimenti na sinkrotronskom izvoru zračenja</i>	68
3.2.6.7.	<i>Računalne metode za rješavanje kristalne strukture</i>	69
§ 4.	REZULTATI i rasprava	70
4.1.	Proizvodnja i pročišćavanje biološkog materijala za kinetičke i strukturne studije	70
4.1.1.	<i>Proizvodnja i pročišćavanje divljih tipova enzima</i>	70
4.1.2.	<i>Proizvodnja i pročišćavanje izmijenjenih varijanti proteina</i>	76
4.2.	Nekanonski oblik HXGH motiva, rasprostranjen među bakterijskim IleRS2, obdaruje ih mupirocinskom hiper-rezistencijom	80
4.2.1.	<i>Filogenetska analiza bakterijskih IleRS</i>	80
4.2.2.	<i>Kinetička karakterizacija odabranih IleRS i njihovih varijanti s promijenjenim slijedom strukturnog motiva</i>	83
4.3.	Specifična konformacija vrha zavojnice α_1 omogućava akomodaciju nekanonskog slijeda strukturnog motiva u IleRS2	86
4.3.1.	<i>Kristalizacija kompleksa PmIleRS1 i PmIleRS2 s 5'-O-Ile-AMS</i>	86
4.3.2.	<i>Tercijarna struktura PmIleRS1 i PmIleRS2 u kompleksu s 5-O'-Ile-AMS</i>	92
4.3.3.	<i>Prepoznavanje i vezanje analoga reakcijskog međuprodukta</i>	94
4.3.4.	<i>Specifičnosti u vezanju analoga reakcijskog međuprodukta kod dva tipa PmIleRS</i>	97
4.3.5.	<i>Fleksibilnost vrha α_1 zavojnice kao univerzalno svojstvo IleRS2?</i>	100
4.4.	Mupirocinska rezistencija IleRS	104
4.4.1.	<i>Kristalizacija PmIleRS enzima u kompleksu s mupirocinom</i>	104
4.4.2.	<i>Tercijarna struktura PmIleRS1 i PmIleRS2 u kompleksu s mupirocinom</i>	108
4.4.3.	<i>Indeksiranje atoma u molekuli mupirocina</i>	108
4.4.4.	<i>Prepoznavanje i vezanje mupirocina</i>	109
4.4.5.	<i>Dinamičnost kod prepoznavanja i vezanja mupirocina</i>	112
4.4.6.	<i>Predloženi mehanizam mupirocinske hiper-rezistencije IleRS2 enzima</i>	118
4.5.	Redizajn PmIleRS enzima metodom racionalne mutageneze	120

4.5.1.	<i>Racional dizajna mutanata</i>	120
4.5.3.	<i>Strukturna karakterizacija odabranih mutanata PmIleRS2</i>	125
4.6.	Kristalizacija drugih IleRS enzima i njihovih mutiranih varijanti	131
4.6.1.	<i>Kristalizacija IleRS2 iz bakterije Streptomyces griseus (wt-GIHH-SgIleRS2)</i>	131
4.6.2.	<i>Kristalizacija IleRS2 iz bakterije Deinococcus radiodurans (wt-ALHH-DrIleRS2)</i>	133
§ 5.	ZAKLJUČAK	136
§ 6.	Popis oznakâ, kraticâ i simbolâ	138
6.1.	Popis kratica korištenih u radu	138
6.2.	Popis kanonskih proteinogenih aminokiselina	141
§ 7.	LITERATURNI IZVORI	142
§ 8.	ŽIVOTOPIS	xiii



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet

Doktorska disertacija

Kemijski odsjek

SAŽETAK

MEHANIZMI RAZLIČITE OSJETLJIVOSTI NA ANTIBIOTIK MUPIROCIN KOD DVA TIPA BAKTERIJSKIH IZOLEUCIL-tRNA-SINTETAZA

Alojzije Brkić

Kemijski odsjek, Horvatovac 102A, 10000 Zagreb, Republika Hrvatska

Antibiotici, selektivni inhibitori prokariotske sinteze proteina, gube učinkovitost zbog antibiotske rezistencije, koja postaje sve veći javnozdravstveni problem. Prirodni antibiotik mupirocin kompetitivno inhibira izoleucil-tRNA-sintetaze (IleRS) pojedinih bakterija, ometajući nastanak Ile-tRNA^{Ile} tijekom sinteze proteina. U bakterijama postoje dva tipa ovog enzima: mupirocin-osjetljive IleRS1 i mupirocin-rezistentne IleRS2. U disertaciji je pokazano da prirodna varijacija visoko očuvanog, katalitički važnog motiva IleRS (HXGH motiv) povećava mupirocinsku rezistenciju IleRS2 za tri reda veličine, uz zanemariv utjecaj na katalitičku učinkovitost enzima. Nadalje, pokazano je da je promijenjeni motiv vijabilan u IleRS2, ali ne i u IleRS1 enzimima. Strukturna analiza odabranih IleRS pokazala je da IleRS2, za razliku od IleRS1, mogu akomodirati promijenjeni motiv uz minimalne promjene u vezanju reakcijskog međuprodukta. Disertacija doprinosi razumijevanju općeg mehanizma antibiotske rezistencije kod IleRS, pružajući uvid u novi mehanizam razvoja antibiotske rezistencije putem permisivnih varijacija visoko očuvanih, katalitički važnih aminokiselina.

(153 + xv stranica, 59 slika, 29 tablica, 247 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: antibiotska rezistencija / HXGH-motiv / izoleucil-tRNA-sintetaza / mupirocin

Mentorica: prof. dr. sc. Ita Gruić-Sovulj, redovita profesorica

Rad prihvaćen: 2. srpnja 2025.

Ocjenitelji:

1. izv. prof. dr. sc. Ivica Đilović, izv. prof.
2. dr. sc. Mario Cindrić, zn. savj.
3. dr. sc. Zrinka Kovarik, zn. savj. i nasl. izv. prof.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

MECHANISMS OF DIFFERENT MUPIROCIN SENSITIVITY OF TWO TYPES OF BACTERIAL ISOLEUCYL-tRNA SYNTHETASES

Alojzije Brkic

Chemistry department, Horvatovac 102A, 10000 Zagreb, Republika Hrvatska

Antibiotics, selective inhibitors of prokaryotic protein synthesis, are losing their effectiveness due to antibiotic resistance, which is becoming a growing public health concern. The natural antibiotic mupirocin competitively inhibits isoleucyl-tRNA synthetases (IleRS) in certain bacterial species, interfering with the formation of Ile-tRNA^{Ile} during protein synthesis. Bacteria possess two types of these enzymes: mupirocin-sensitive IleRS1 and mupirocin-resistant IleRS2. This dissertation demonstrates that mutations in the highly conserved, class-defining HXGH motif of IleRS can lead to an increase in mupirocin resistance by three orders of magnitude in IleRS2 enzymes, with a negligible effect on the enzyme's catalytic cycle. Furthermore, it was shown that the altered motif is tolerated in all IleRS2 enzymes, but not in IleRS1. Structural analysis of selected IleRS enzymes revealed that, unlike IleRS1, IleRS2 accommodate the altered motif with minimal changes in binding of the reaction intermediate. The dissertation contributes to the understanding of the general mechanisms underlying IleRS-mediated antibiotic resistance and offers new insight into how antibiotic hyper-resistance can arise through permissive alterations of highly conserved, catalytically important residues.

(153 + xv pages, 59 figures, 29 tables, 247 references, original in croatian)

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

Keywords: antibiotic resistance / HXGH-motif / isoleucyl-tRNA synthetases / mupirocin

Supervisor: Dr. Ita Gruić Sovulj, Full Professor

Thesis accepted: 2nd July 2025.

Reviewers:

1. Dr. Ivica Đilović, Assoc. Prof.
2. Dr. Mario Cindrić, Sci. Advisor
3. Dr. Zrinka Kovarik, Sci. Advisor and Tit. Assoc. Prof.

§ 1. UVOD

Antibiotici su prirodni ili sintetički spojevi s antimikrobnim djelovanjem. Predstavljaju zaglavni kamen moderne mikrobiologije, transplantacijske medicine i kirurgije, budući da su njihovom upotrebom značajno smanjene komplikacije povezane s bakterijskim infekcijama. Djeluju kroz selektivnu inhibiciju važnih prokariotskih staničnih procesa patogena, bez ili uz smanjene negativne utjecaje na analogne stanične procese eukariotskog domaćina. Svoju učinkovitost zahvaljuju strukturnim i funkcionalnim razlikama staničnih procesa prokariota i eukariota. Zbog centralne važnosti u staničnom metabolizmu, komponente stanične mašinerije za sintezu proteina te peptidoglikanske membrane prokariota su najčešće mjesto vezanja antibiotika u komercijalnoj upotrebi¹⁻⁴.

Prokarioti na prolongirano izlaganje sub-letalnim dozama antibiotika odgovaraju razvojem rezistencije. Najčešći mehanizmi stjecanja rezistencije su mutacije mjesta vezanja antibiotika, interferencija unosu antibiotika u stanicu ili njegova enzimatska razgradnja^{1,5-7}. Razina rezistencije koju patogeni razvijaju može biti niska i visoka, na pojedinačne antibiotike ili cijele klase antibiotika. Niska razina rezistencije generalno nije problematična, budući da se može zaobići primjenom drugih antibiotika na koje patogen nije rezistentan. S druge strane, visoka rezistentnost na više klasa antibiotika, poznata kao multirezistencija, jedan je od najbrže rastućih javnozdravstvenih problema stoljeća, budući da su takve bakterijske infekcije neliječive i u većini slučajeva letalne. Smatra se da je prekomjerna upotreba antibiotika u medicini i industriji, najznačajnije pridonijela razvoju multirezistencije^{6,8}. Razvoj novih antibiotika, s potencijalnom učinkovitošću prema novim farmakološkim metama, stoga je od velikog značaja. Nažalost, razvoj novih antibiotika je spor i dugotrajan proces, a konačni proizvod ima usko područje primjene, zbog čega je ekonomski neisplativ. Istraživanje novih antibiotika stoga je u zadnjim desetljećima pokazalo tendenciju prelaska u domenu akademskih istraživanja⁸.

Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) su tijekom godina postale validirane farmakološke mete za razvoj antibiotika nove generacije. Ovi evolucijski očuvani enzimi, prisutni su na svim skalama života, a po specifičnostima u strukturi i mehanizmu mogu se podijeliti u dva razreda (I i II). Kataliziraju vezanje aminokiseline na molekule tRNA u procesu aminoaciliranja. Aminoacilirane tRNA supstrati su ribosomske sinteze proteina tijekom koje se aminokiselina u

kodon-ovisnoj maniri na ribosomu ugrađuje u rastući polipeptini lanac. Reakcija aminoaciliranja odvija se u dva koraka (aktivacija i prijenos) u sintetičkom aktivnom mjestu enzima. Tijekom aktivacije, reakcijom aminokiseline i molekule adenozin-5'-trifosfata (ATP) nastaje miješani anhidrid, aminoacil-adenilat (aa-AMP). Ovaj aktivirani prekursor djeluje kao donor s kojeg se aminokiselina u reakciji prijenosa transesterificira na 2'- ili 3'-hidroksilnu skupinu terminalnog nukleotida molekule tRNA^{9,10}.

Razred I čine uglavnom monomerni enzimi koje karakterizira katalitička domena iz HUP superporodice s Rossmannovom topologijom koja je građena od pet paralelnih β ploča premoštenih α zavojnicama. U Rossmannovom naboru, aminokiselinski sljedovi histidil-X¹-glicil-histidin (HXGH) i lizil-metionil-seril-lizil-serin (KMSKS) katalitički su važni strukturni motivi koji sudjeluju u prepoznavanju supstrata i stabilizaciji prijelaznog stanja^{10,11}. Iako je postojanje prirodnih varijacija ovih sljedova poznato u literaturi, istima nije pridavan značaj. Primjer je izoleucil-tRNA-sintetaza (IleRS) iz bakterije *Streptomyces griseus* (SgIleRS2), koja umjesto kanonskog slijeda histidil-X-glicil-histidin (HXGH) ima prirodni nekanonski slijed glicil-X-histidil-histidin (GXHH). Kinetička mjerenja pokazala su zanemarivu razliku kinetičkih parametara aktivacije, prijenosa ili ukupnog aminoaciliranja ovog enzima u odnosu na stereotipne pripadnike sintetaza s uobičajenim slijedom HXGH¹².

Aktivna mjesta većinom homodimernih aaRS razreda II građena su od superstrukture sastavljene od sedam antiparalelnih β ploča premoštenih α zavojnicama. Kod razreda II se ističu tri karakteristična motiva (1,2,3) važna za dimerizaciju (1), vezanje supstrata (2) te stabilizaciju prijelaznog stanja (3). Po svojoj funkciji, motiv 3 kod razreda II, funkcijski je istovjetan HXGH motivu razreda I aaRS⁹⁻¹¹.

Izoleucil-tRNA-sintetaza (IleRS) je monomerni višedomenski, enzim razreda I, veličine ~120 kDa. Po arhitekturi aktivnog mjesta i očuvanim strukturnim motivima stereotipni je primjer enzima svojeg razreda. Aktivno mjesto ustrojeno je iz dva dijela. Prvi dio čine segment β_1 - α_1 - β_2 - α_2 - β_3 s HXGH motivom na vrhu α_1 zavojnice, dok drugi čini segment α_3 - β_4 - α_4 - β_5 s KMSKS omčom neposredno iza β_5 ploče¹³. Dva dijela aktivnog mjesta premoštena su varijabilnim insercijama CP1 i CP2. Insercija CP1 kod pojedinih pripadnika podrazreda I_a posjeduje dodatnu hidrolitičku aktivnost za popravak pogreške aminoaciliranja, nakon

¹ Predstavlja varijabilnu poziciju koja je u pravilu okupirana aminokiselinom s hidrofobnim bočnim ogrankom.

prijenosa aminokiseline na tRNA. IleRS su strukturno i funkcionalno heterogeni enzimi. Tako se bakterijske IleRS segregiraju u dva tipa – IleRS1 i IleRS2. Podjela je provedena na temelju evolucijskih, strukturnih i funkcionalnih kriterija¹²⁻¹⁵. U odnosu na IleRS1 enzime, IleRS2 enzimi su veći, prvenstveno zbog strukturno složenije C-terminalne antikodon-vezujuće domene koja nema cink-vezujući motiv tipičan za IleRS1¹⁶. Osim strukturnih razlika, IleRS2 enzimi su rezistentniji na inhibiciju prirodnim antibiotikom mupirocinom, što ih čini fiziološki sličnima eukariotskim IleRS^{12,15}. IleRS1 su u pravilu snažno inhibirane mupirocinom u nanomolarnom ($K_i \sim \text{nmol dm}^{-3}$), za razliku od IleRS2 koje su inhibirane tek u mikromolarnom koncentracijskom području ($K_i \sim \mu\text{mol dm}^{-3}$)^{17,18}. Upravo su zbog svoje različite osjetljivosti prema mupirocinu, bakterijski IleRS enzimi interesantne farmakološke mete.

Mupirocin je prirodni antibiotik koji sintetizira bakterija *Pseudomonas fluorescens*. Strukturno je riječ o esteru monične i 9-hidroksinonanoične kiseline.¹⁹ Pod komercijalnim nazivom *Bactorban* odobren je za liječenje humanih topikalnih infekcija uzrokovanim Gram-negativnim bakterijama²⁰. U Republici Hrvatskoj HALMED je izdao odobrenje za tri topikalna pripravka s mupirocinom komercijalnih naziva *Betrion*²¹, *Mirobact*²² i *Mupiron*²³. Djelotvornost mupirocina prema Gram-pozitivnim patogenima je niska, budući da kompaktni peptidoglikanski sloj ovih bakterija onemogućava njegov učinkovit unos u stanicu¹⁷. S druge strane, kod Gram-negativnih bakterija mupirocin pokazuje značajnu primarnu učinkovitost. Nažalost, zbog niske stabilnosti mupirocina i mutacija farmakološke mete, Gram-negativni patogeni niske razine rezistencije na mupirocin stječu relativno brzo²⁴. Svoju antibiotsku aktivnost mupirocin ostvaruje kroz kompetitivnu inhibiciju IleRS, pri čemu se u aktivno mjesto enzima veže oponašajući reakcijski međuprodukt, izoleucil-adenilat (Ile-AMP). Monična kiselina mupirocina strukturno oponaša aminokiselinu (izoleucin) i heterociklični sustav riboze molekule ATP¹³. 9-hidroksinonanoična kiselina mupirocina koja nema strukturnu sličnost sa supstratima ili međuproduktom, presudna je za pravilno pozicioniranje mupirocina, budući da sama monična kiselina nema antibiotsko djelovanje²⁵. Iako je razlika u osjetljivosti na mupirocin između dvaju tipova IleRS već istraživana, strukturna osnova njihove različite rezistencije na mupirocin još uvijek nije u potpunosti razjašnjena. Istraživanja je usporavao nedostatak informativnih kristalnih struktura IleRS1 i IleRS2 u kompleksu sa supstratima, reakcijskim međuproduktom te mupirocinom. U trenutku provedbe istraživanja unutar ove doktorske disertacije bile su dostupne samo tri: struktura IleRS1 iz bakterije *Staphylococcus aureus* (SalleRS1) u kompleksu s mupirocinom i *SatRNA*^{Ile} (1QU2²⁶, 1QU3²⁷, 1FFY²⁸) te

strukture IleRS2 iz bakterije *Thermus thermophilus* (TtIleRS2) u kompleksu s izoleucil-N-sulfamoil adenozinom (1JZQ²⁹) i mupirocinom (1JZS³⁰). Tek nedavno su dodatno publicirane struktura eukariotske IleRS2 iz gljivice *Candida albicans* (CalleRS2) u kompleksu s izoleucil-adenilatom (6LDK³¹) te kristalne strukture IleRS1 iz bakterije *Helicobacter pylori* (HpIleRS1) u *apo* formi (8WNF³²) te u kompleksima s izoleucil-adenilatom (8WNI³³), valil-adenilatom (8WO2³⁴), izoleucinom (8WNG³⁵), valinom (8WNI³⁶) te mupirocinom (8WO3³⁷). Najnovije deponirane kristalne strukture uključuju i strukturu IleRS2 kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (ScIleRS2) u kompleksu s izoleucinom i tRNA^{Ile}_{GAU} iz bakterije *Escherichia coli* (EctRNA^{Ile}_{GAU}) (8WND³⁸), odnosno izoleucinom i tRNA^{Ile}_{CAU} iz bakterije *Escherichia coli* (tRNA^{Ile}_{CAU}) (8Z1P³⁹).

Deponirane kristalne strukture nisu izravno usporedive jer se odnose na enzime evolucijski udaljenih organizama. Do sada nisu riješene kristalne strukture dvaju tipova IleRS u kompleksu s mupirocinom iz istog organizma – primjerice iz bakterija određenih rodova *Priestia* te *Pseudomonas* koje prirodno eksprimiraju oba enzima⁴⁰⁻⁴².

Osim poteškoća u strukturnoj analizi IleRS, u filogenetskim i strukturnim istraživanjima do sada je zanemarena skupina IleRS2 s prirodnim varijacijama u aminokiselinskom slijedu očuvanog motiva HXGH. Kinetička istraživanja na prethodno spomenutoj SgIleRS2 pokazala su da je nekanonski slijed potencijalno povezan s hiper-rezistencijom prema mupirocinu. Naime, konstanta inhibicije wt-GIHH-SgIleRS2 prema mupirocinu iznosi 10 mmol dm⁻³ te je višestruko veća od konstante inhibicije IleRS2 enzima s kanonskim slijedom strukturnog motiva¹².

1.1. Ciljevi, svrha i hipoteze rada

Iako je literaturno poznato da je mupirocin značajno bolji kompetitivni inhibitor IleRS1 u odnosu na IleRS2 enzime, točan mehanizam razlike nije potpuno razjašnjen. Nije razjašnjena ni mehanistička podloga za hiper-rezistenciju IleRS2 koje imaju nekanonski slijed strukturnog motiva (GXHH). Korelacija nekanonskog slijeda strukturnog motiva s rezistencijom na mupirocin nije potvrđena, a ukoliko postoji, nije jasno je li univerzalna za sve IleRS2 enzime. U konačnici, do sada nije istraženo koliko je u populaciji IleRS2 enzima zastupljen nekanonski oblik strukturnog motiva, niti je utvrđeno postoji li ista prirodna mutacija i kod IleRS1 enzima. Shodno tome, ova doktorska disertacija usredotočit će se na sljedeće:

1. Provođenje evolucijske analize bakterijskih IleRS enzima, kako bi se utvrdila zastupljenost i propagacija nekanonskog slijeda strukturnog motiva (GXHH) među bakterijskim IleRS1 i IleRS2.
2. Kinetičku karakterizaciju IleRS2 enzima s prirodnim nekanonskim slijedom strukturnog motiva (GXHH-IleRS2), s naglaskom na određivanje konstante inhibicije prema mupirocinu u odnosu na oba supstrata.
3. Uvođenje nekanonskog slijeda strukturnog motiva (GXHH) u enzime s prirodnim kanonskim slijedom (HXGH-IleRS). Paralelno, reverzija nekanonskog slijeda strukturnog motiva (GXHH) u kanonski (HXGH) kod enzima s prirodnim nekanonskim slijedom (GXHH-IleRS). Po dobivanju navedenih varijanti, planirana je njihova kinetička karakterizacija.
4. Strukturna analiza odabranih IleRS s prirodnim kanonskim (HXGH) ili nekanonskim (GXHH) slijedom strukturnog motiva te njihovih mutanata s izmijenjenim slijedom (kanonski u nekanonski i *vice versa*).

Za ostvarivanje specifičnog cilja 1, planirano je pretraživanje javno dostupnih repozitorija aminokiselinskih sljedova IleRS te upotreba javno dostupnih bioinformatičkih resursa i algoritama za njihovo sravnjivanje, analizu i vizualizaciju. Kinetička analiza koja je navedena u specifičnim ciljevima 2 i 3, oslanjat će se na metode enzimske kinetike ustaljenog stanja s radioaktivno obilježenim supstratima. Navedene reakcije obuhvaćaju mjerenje aktivacije aminokiseline i inhibiciju mupirocinom. Za ostvarivanje specifičnog cilja 3 koristit će se standardne metode molekularne biologije (ciljana mutageneza, pojačana ekspresija i pročišćavanje proteina). Konačno, za ostvarivanje specifičnog cilja 4 koristit će se metode

makromolekulske kristalografije i rendgenske difrakcije na monokristalima IleRS u kompleksu sa supstratima, nehidrolizabilnim analogom reakcijskog međuprodukta ili mupirocinom.

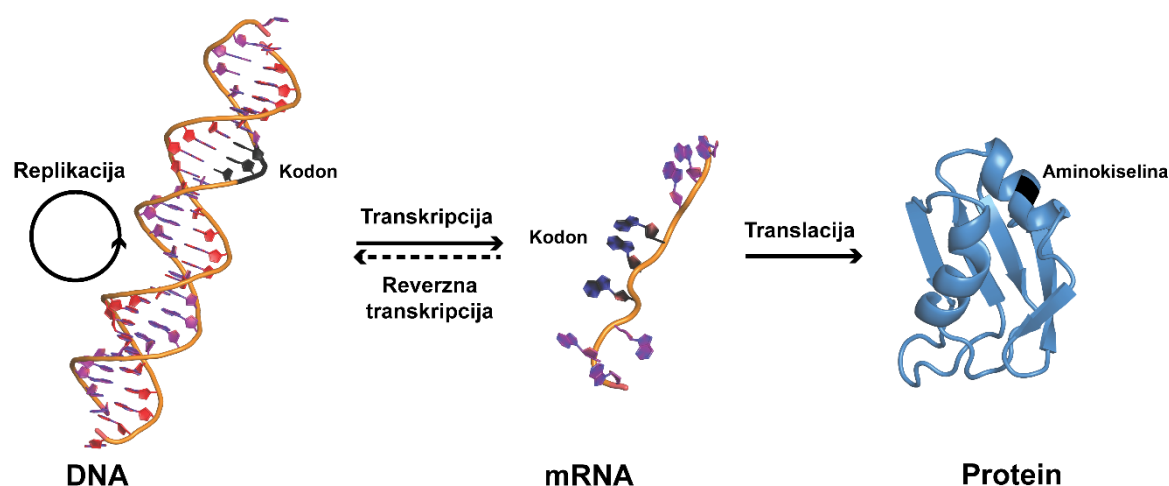
Polazeći od specifičnih ciljeva istraživanja, definirane su sljedeće hipoteze:

1. IleRS2 mogu akomodirati kanonski (HXGH) i nekanonski (GXHH) oblik strukturnog motiva.
2. IleRS1 ne zadržavaju katalitičku aktivnost nakon zamjene kanonskog HXGH slijeda nekanonskim GXHH slijedom.
3. Nekanonski (GXHH) slijed strukturnog motiva prisutan kod nekih IleRS2 uzrok je višestruko veće mupirocinske rezistencije tih enzima u odnosu na IleRS2 enzime s kanonskim (HXGH) slijedom.
4. Mutacija nekanonskog (GXHH) slijeda mupirocin-rezistentnih IleRS2 u kanonski (HXGH) slijed strukturnog motiva, dovest će do povećanja osjetljivosti promijenjenih varijanti na mupirocin (gubitka mupirocinske rezistencije) uz zanemariv gubitak enzimske aktivnosti.
5. Uvođenje nekanonskog (GXHH) slijeda u IleRS2 s kanonskim (HXGH) slijedom povećat će njihovu rezistenciju na mupirocin, ali i značajno smanjiti katalitičku učinkovitost.
6. Kod IleRS1 i IleRS2 enzima s kanonskim slijedom strukturnog motiva (HXGH), osim različitih interakcija, afinitet prema mupirocinu definira i različita konformacijska dinamika dvaju aktivnih mjesta.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Prijenos genetičke informacije i sinteza proteina

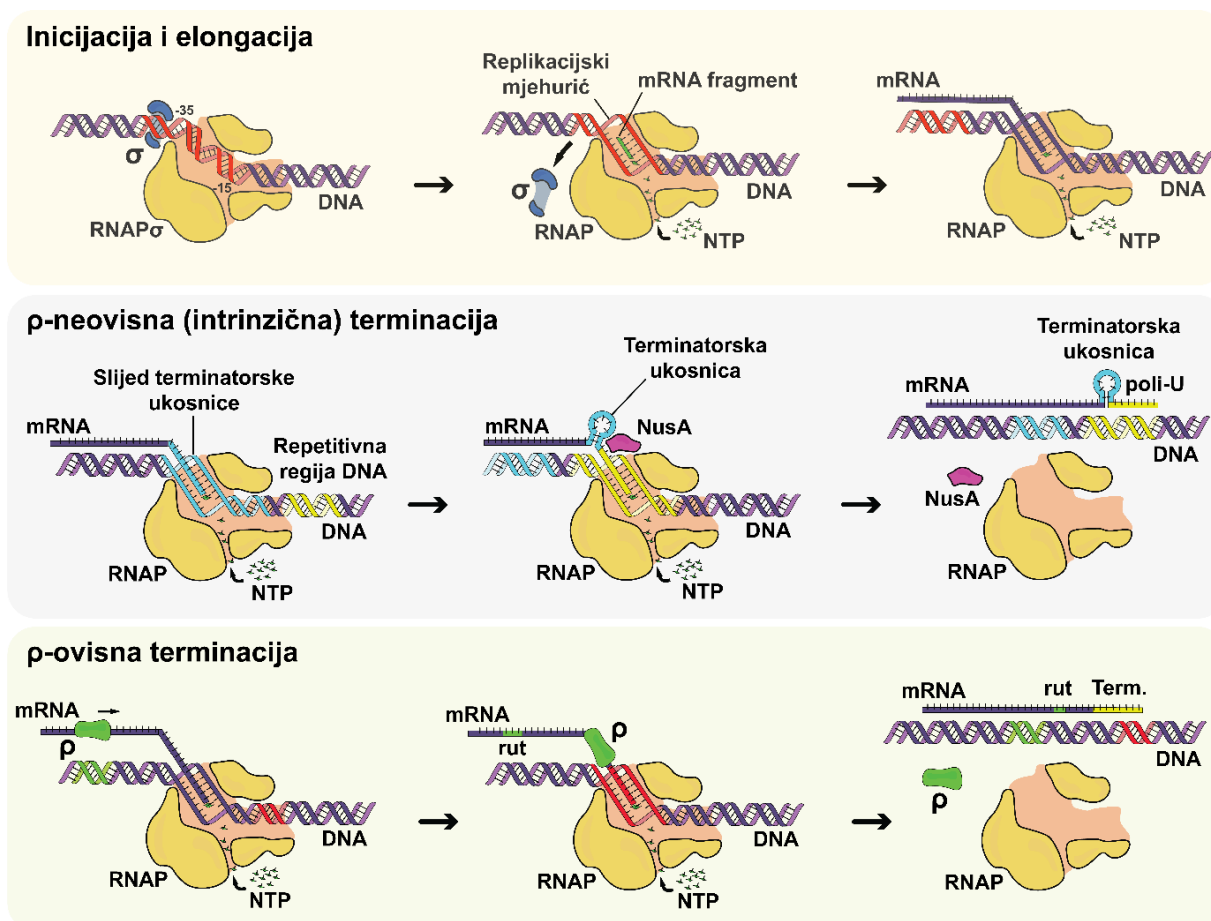
Proteini su uz nukleinske kiseline, ugljikohidrate i lipide, temeljni gradivni i operativni elementi stanice u svim domenama života. Informacija za njihovu sintezu pohranjena je u univerzalnim, nepreklapajućim i degeneriranim slijedovima deoksiribonukleinske kiseline (DNA). Održavanje genetičke informacije i njezina jednosmjerna propagacija od nukleotidnog slijeda DNA do proteinskog slijeda općeprihvaćeni je koncept u biologiji poznat kao centralna dogma života, a uključuje stanične procese replikacije, transkripcije i translacije⁴³ (Slika 1).



Slika 1. Shematski prikaz centralne dogme života. Genetička informacija pohranjena u nukleotidnom slijedu DNA se replicira u procesu replikacije, a posredstvom mRNA se u procesu transkripcije i translacije prevodi u aminokiselinski slijed proteina.

Tijekom transkripcije RNA polimeraza (RNAP) prepisuje genetičku informaciju iz DNA u glasničku RNA (mRNA) kroz tri faze: inicijaciju, elongaciju i terminaciju (Slika 2). Inicijacija započinje vezanjem σ -faktora na katalitičku srž RNAP ($\alpha_2\beta\beta'\omega$), čime nastaje funkcionalni holoenzim. σ -faktor prepoznaje elemente na pozicijama –35 i –10 u Pribnow-Schallerovom slijedu promotora, omogućujući ispravno pozicioniranje enzima i otvaranje DNA lanca na poziciji –12. Nastali transkripcijski mjehurić omogućuje sintezu kratkog DNA:RNA hibrida (10–20 nukleotida), nakon čega σ -faktor disocira i započinje elongacija^{44,45}. Elongacija se odvija reakcijom nukleofilne supstitucije, pri čemu se mRNA lanac produljuje brzinom od ~1–6 kb / min uz visoku točnost (10^{-6} – 10^{-5}) osiguranu mehanizmima popravka pogreške⁴⁶⁻⁴⁹.

RNAP aktivno modulira procesivnost usklađujući brzinu transkripcije s brzinom ribosomske sinteze proteina^{50,51}. Iako smanjenje brzine povećava točnost, stanica održava visoku procesivnost jer su zaustavljeni transkripcijski mjehurići citotoksični^{52,53}. Terminacijom se zaustavlja sinteza mRNA te ista može biti intrinzična (ρ -neovisna) ili ρ -ovisna. Intrinzična terminacija nastaje formiranjem terminatorske ukosnice u mRNA, što destabilizira RNA:DNA hibrid i dovodi do disocijacije uz pomoć disocijacijskog faktora NusA⁵⁴. Kod ρ -ovisne terminacije, protein ρ se veže na *rut*-mjesto mRNA (engl. *rho utilization site*) i uz utrošak adenozin-5'-trifosfata (ATP) se pomiče duž lanca. Kada RNAP uspori zbog transkripcije slijeda ρ -ovisnog terminatora, protein ρ ju sustiže potičući disocijaciju transkripcijskog kompleksa⁵⁵. Nakon terminacije mRNA služi kao kalup za sintezu proteina na ribosomu.



Slika 2. Shematski prikaz prokariotske transkripcije: (a) **Inicijacija i elongacija:** RNA polimeraza (RNAP), uz σ -faktor, prepoznaje Pribnowljev kutiju (-35 i -10 regiju promotora) otvarajući transkripcijski mjehurić. RNAP zatim katalizira procesivnu sintezu mRNA, koja traje do terminacije. (b) **ρ -neovisna terminacija:** RNAP transkribira terminatorsku ukosnicu, koja destabilizira DNA:RNA hibrid, što dovodi do disocijacije transkripcijske mašinerije. Disocijaciju dodatno potpomaže disocijacijski faktor NusA. (c) **ρ -ovisna terminacija:** ρ -protein se veže na *rut*-slijed u mRNA te slijedi RNAP krećući se po mRNA uz utrošak molekula ATP. Kada RNAP uspori zbog transkripcije slijeda ρ -terminatora, ρ -protein ju sustiže i prekida transkripciju.

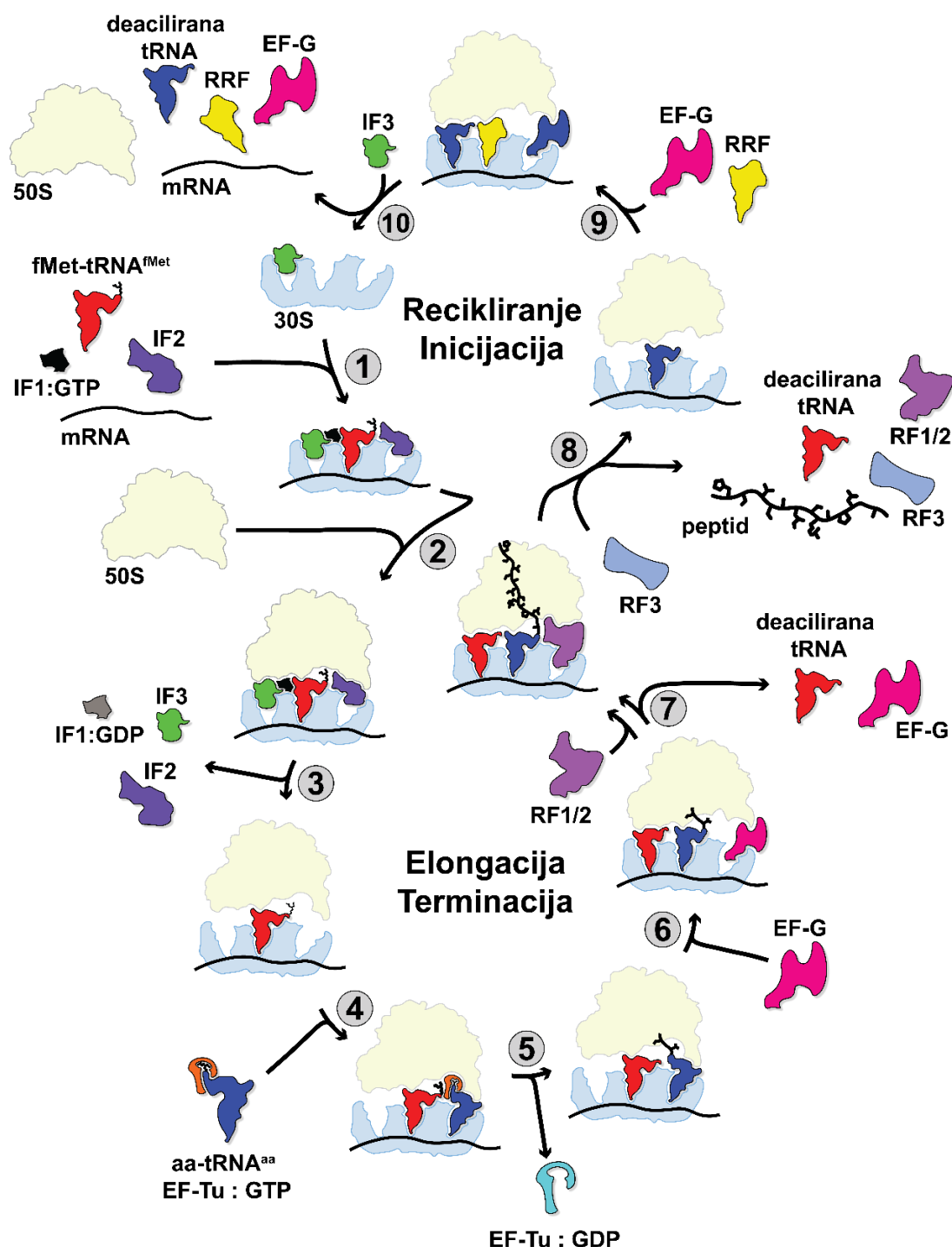
Uz izuzetak sinteze na citosolnim peptidnim sintetazama, prokariotska sinteza proteina je ribosomska⁵⁶. Prokariotski ribosomi su ribonukleoproteinski kompleksi molekulske mase oko 2,6 MDa, sastavljeni od dvije podjedinice – velike sa sedimentacijskim koeficijentom 50S i male sa sedimentacijskim koeficijentom 30S. U strukturi ribosoma, ribosomska RNA (rRNA) doprinosi s dvije trećine mase, dok preostaloj trećini doprinose asocirani ribosomski proteini⁵⁷. Proteini su raspoređeni po površini ribosoma, ali nisu prisutni u regijama koje su od funkcionalnog značaja: peptidil-transferaznom centru (PTC, engl. *Peptidyl-Transferase Center*) i dimerizacijskom sučelju dvaju podjedinica^{58,59}. Iako su prvi puta uočeni sredinom pedesetih godina kao sferični citosolni partikuli, cjelovita struktura i mehanizam reakcije koju kataliziraju ribosomi, razjašnjeni su tek na prijelomu tisućljeća. Ista istraživanja su pokazala da je ribosom ribozim, odnosno katalitički aktivna RNA⁵⁷⁻⁶⁰.

Poput transkripcije, translacija se odvija kroz tri koraka: inicijaciju, elongaciju i terminaciju (Slika 3). Inicijacija translacije započinje vezanjem mRNA transkripta, inicijacijskih faktora IF1, IF2 i IF3 (engl. *Initiation Factor*) te fMet-tRNA^{fMet} na malu podjedinicu ribosoma, pri čemu nastaje labilni predinicijacijski kompleks (PIC, engl. *Pre-Initiation Complex*). Tijekom inicijacije, IF3 sprječava preuranjenu asocijaciju velike 50S podjedinice ribosoma, dok IF2 potiče ispravno sparivanje startnog kodona mRNA s antikodonom fMet-tRNA^{fMet}. PIC prepoznaje ribosom vezujuće mjesto (RBS, engl. *Ribosome Binding Site*) na netranslatiranoj regiji 5'-kraja mRNA (UTR, engl. *Untranslated Region*). Specifično prepoznavanje RBS osigurano je prepoznavanjem Shine-Delangarno slijeda UTR regije mRNA i *anti*-Shine-Delangarno slijeda 16S rRNA male podjedinice ribosoma kod većine prokariota⁶¹. Za mRNA koje nemaju 5'-UTR regiju, prepoznavanje startnog kodona je direktno i potpomognuto s IF2 i IF3⁶². Nakon prepoznavanja RBS, PIC veže veliku ribosomsku podjedinicu 50S pri čemu nastaje funkcionalan 70S ribosom. Tijekom asocijacije velike podjedinice GTP-azna aktivnost IF2 potiče ispravno sparivanje antikodona fMet-tRNA^{fMet} sa startnim kodonom mRNA, čime se definira otvoreni okvir čitanja. Slijedi disocijacija elongacijskih faktora i konformacijski rearanžman podjedinica nužan za pravilno sastavljanje ribosoma^{63,64}. Nakon inicijacije, na sučelju velike i male podjedinice formirana su A- E- i P- vezna mjesta pri čemu je fMet-tRNA^{fMet} vezana u P-mjesto ribosoma.

Elongacijska faza započinje nakon što je sastavljen funkcionalan 70S ribosom. Proces je postupan, a čine ga repetitivni ciklusi dekodiranja, transpeptidacije i translokacije. Elongaciju koordiniraju elongacijski faktori EF-Tu, EF-G, EF-P (engl. *Elongation Factor*) te SelB.

Tijekom dekodiranja, kodon mRNA se sparuje s ispravnim antikodonom aminoacilirane tRNA u A-veznom mjestu ribosoma. Aminoacilirana tRNA se do ribosoma doprema u obliku ternarnog kompleksa s EF-Tu i molekulom gvanozin-5'-trifosfata (GTP). Za dekodiranje 21. proteinogene aminokiseline selenocistein, koristi se specijalizirani elongacijski faktor SelB⁶⁵. Prepoznavanje ispravnog ternarnog kompleksa u A-mjestu ribosoma dovodi do hidrolize molekule GTP zbog čega EF-Tu disocira s aminoacilirane tRNA⁶⁶. Hidroliza molekule GTP i prateće konformacijske promjene EF-Tu deformiraju 3'-kraj aminoacilirane tRNA prema P-mjestu ribosoma. Uz inicijalnu selekciju ternarnog kompleksa, konformacijska promjena 3'-kraja tRNA sugerirana je kao važan mehanizam diskriminacije protiv nepripadne tRNA. Naime, ukoliko je u A-mjesto ribosoma vezana nepripadna aminoacilirana tRNA, konformacijska promjena je spora, što favorizira disocijaciju vezane tRNA⁶⁷. Po završetku inicijacije i dekodiranja, na ribosomu su u A- i P-mjestu vezane molekule aminoacilirane, odnosno peptidilirane tRNA. Ribosom je spreman za transpeptidaciju tijekom koje se peptid s tRNA u P-mjestu ribosoma prenosi na aminoaciliranu tRNA u A-mjestu ribosoma, čime se produžuje za jednu aminokiselinu. Reakcija transpeptidacije je bimolekulska nukleofilna supstitucija tijekom koje amino-skupina aminokiseline aminoacilirane tRNA iz A-mjesta ribosoma nukleofilno napada karbonilnu skupinu esterske veze peptidil-tRNA u P-mjestu ribosoma. Sintetsko mjesto ribosoma ustrojeno je na sučelju dvije podjedinice i građeno isključivo od rRNA, što ribosom čini najvećim i do sada jedinim poznatim procesivnim ribozimom⁵⁹. Za razliku od drugih bioloških sustava, katalitički efekt ribosoma proizlazi gotovo isključivo od entropijskog efekta uzrokovano rearanžmanom molekula vode u peptidil-transferaznom centru tijekom reakcije⁶⁸. Prijenos protona koji je integralan dio ove reakcije, trenutno je objašnjen dvama mehanizmima supstratom potpomognute kinetike^{68,69}. Transpeptidacija je generalno neovisna o primarnoj strukturi peptida, osim u slučaju sinteze poliprolinskih sljedova kod kojih je potrebna aktivnost elongacijskog faktora EF-P, kako bi se potakao konformacijski rearanžman sterički zakočenog poliprolinskog peptida i spriječilo zastajkivanje ribosoma⁷⁰. Završetkom transpeptidacije u P-mjestu zaostaje deacilirana tRNA, dok je peptidilirana tRNA sada u A-mjestu ribosoma. Kako bi se ribosom pripremio za sljedeći ciklus elongacije, mora doći do translokacije tijekom koje se ribosom pomiče za jedan kodon po mRNA. Translokacija je izuzetno složen proces tijekom kojeg ribosom prolazi kroz barem osam različitih konformacijskih stanja spregnutih s hidrolizom molekule GTP vezanoj na elongacijskom faktoru EF-G⁷¹. Rezultat ovog procesa je da se prethodno elongirana peptidil-

tRNA iz A-mjesta pomiče u P-mjesto ribosoma, dok se tRNA deacilirana u prethodnom koraku transpeptidacije pomiče iz P-mjesta u E-mjesto. A-mjesto ostaje prazno za sljedeći ciklus dekodiranja i transpeptidacije. Elongacija se procesivno nastavlja dok ribosom ne pročita neki od kanonskih terminacijskih kodona. Dekodiranjem terminacijskih kodona, ribosomska sinteza proteina ulazi u terminacijsku fazu tijekom koje terminacijski faktori RF1 i RF2 (engl. **Release Factor**) stimuliraju hidrolizu peptida s peptidil-tRNA i njegovo oslobađanje u citosol⁷². Konačno, RF3 stimulira disocijaciju faktora RF1 i RF2 s ribosoma⁷³. Nakon terminacije, ribosom i dalje sadrži vezanu mRNA kao i deaciliranu tRNA u P-veznom mjestu preostalu nakon hidrolize polipeptidnog lanca u koraku terminacije. Na takav ribosom mogu asocirati EF-G te ribosomski faktor recikliranja RRF (engl. **Ribosome Release Factor**) koji sinergistički potiču otpuštanje mRNA te disocijaciju ribosomskih podjedinica⁷⁴. Na taj način ribosom u potpunosti disocira što njegove komponente čini dostupnim za novi ciklus translacije s novom molekulom mRNA.



Slika 3. Pojednostavljeni shematski prikaz prokariotske ribosomske sinteze proteina. Sinteza započinje sklapanjem predinicijacijskog kompleksa (PIC), pri čemu se velika podjedinica ribosoma veže na malu podjedinicu zajedno s inicijacijskim faktorima, fMet-tRNA^{fMet} i mRNA (Koraci 1 i 2). Hidrolizom molekule GTP vezane na IF1, predinicijacijski kompleks prelazi u inicijacijski kompleks (IC) (Korak 3). Zatim slijede ponavljajući ciklusi vezanja aminoaciliranih tRNA (Koraci 4 i 5) te transpeptidacije (Korak 6), tijekom koje se rastući polipeptid s tRNA u P-mjestu prenosi na tRNA u A-mjestu ribosoma. U prisutnosti EF-G i GTP-a dolazi do translokacije tRNA, pri čemu se ribosom pomiče duž mRNK (Korak 6). Ciklus se ponavlja sve dok ribosom ne pročita kanonski stop kodon, što dovodi do disocijacije EF-G i vezanja terminacijskih faktora RF1 i RF2 (Korak 7). RF3 zatim potiče oslobađanje sintetiziranog peptida (Korak 8). Na kraju, ribosomske podjedinice disociraju, dok se mRNA i tRNA oslobađaju uz pomoć EF-G, RRF i IF3 (Koraci 9 i 10).

2.1.1. Sinteza proteina kao meta antibiotika i antibiotska rezistencija

Točnost sinteze proteina ovisi o pogreškama nakupljenima tijekom replikacije, transkripcije i translacije⁷⁵. Pogreške u dekodiranju, prerana inicijacija, zakašnjela terminacija elongacije, pomaci okvira čitanja te klimavi parovi baza u trećoj poziciji kodona značajno doprinose mistranslaciji – pogreškama u primarnoj strukturi proteina⁷⁶⁻⁷⁸. Stanica aktivno održava umjerenu razinu mistranslacije (10^{-4} – 10^{-3} u proteomu bakterije *Escherichia coli*), balansirajući pozitivne epigenetske učinke stohastičkih mutacija s rizikom gubitka vijabilnosti ili stanične smrti.⁷⁹ Umjerena mistranslacija može potaknuti adaptaciju i preživljavanje u stresnim uvjetima te proširiti proteom putem stohastičkih mutacija⁸⁰⁻⁸⁴. S druge strane, sustavna mistranslacija ili zaustavljanje translacije uzrokuju gubitak stanične prilagodljivosti i vitalnosti, agregaciju proteoma i, posljedično, staničnu smrt⁸⁵. Zbog toga se citotoksični učinci mistranslacije i inhibicije translacije često koriste kao mehanizmi za dizajn antibiotika, pri čemu ribosom-vezujući antibiotici čine najveću klasu komercijaliziranih lijekova u primjeni.

Ribosom-vezujući antibiotici mogu djelovati na pravilno sklapanje ribosomskog kompleksa (aminoglikozidi i tetraciklini), konformacijsku dinamiku podjedinica ribosoma (spektinomycin), vezanje supstrata ili kofaktora (tetraciklini) ili funkciju peptidil-transferaznog centra (makrolidi), utječući na točnost ili mogućnost odvijanja translacije^{2,3,86,87}. Osim izravne interferencije ribosoma, sintetska reakcija može se također zaustaviti prekidom dotoka aminoaciliranih tRNA kao supstrata. Inhibicija aminoaciliranja na aaRS stoga je također važna farmakološka meta za dizajn antibiotika i bit će detaljno obrađena u sljedećim poglavljima. Naravno, sinteza proteina na ribosomu ili njegovih supstrata na aaRS nisu jedine farmakološke mete za učinkovite antibiotike. Sinteza stanične stijenke, replikacija i transkripcija, metabolički putevi mikolične i folne kiseline te sinteza adenozin-5'-trifosfata na bakterijskoj ATP-sintazi također su validirane mete antibiotika^{4,88-91}.

Horizontalni prijenos gena identificiran je kao ključan za širenje antibiotske rezistencije posebno u kliničkim okruženjima gdje su patogeni konstantno izloženi subletalnim dozama^{5,6,8}. Enzimska modifikacija antibiotske mete, efluks antibiotika iz stanice ili enzimska razgradnja antibiotika samo su neki od mehanizama kojima patogeni mogu steći rezistenciju^{1-3,92,93}. Istovremeno, neopravdana upotreba antibiotika za liječenje stanja koja nisu povezana s život-ugrožavajućim infekcijama te neselektivna upotreba u stočarskoj, veterinarskoj i prehrambenoj industriji značajno su ubrzale razvoj rezistencije^{6,8}. Nekoliko patogenih vrsta, poznatih pod akronimom ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*,

Acinetobacter baumannii, *Pseudomonas aeruginosa* te *Enterobacter sp.*) uvršteno je na listu Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, engl. *World Health Organisation*) visoko-rizičnih patogena, budući da pokazuju rezistenciju širokog spektra prema većini postojećih antibiotika u kliničkoj upotrebi. Razvoj bakterijske multirezistencije predstavlja najbrže rastući i najozbiljniji javnozdravstveni problem stoljeća^{6,8}. Jedini način rješavanja ovog problema, prije nego izmakne kontroli, je razvoj novih antibiotika s različitim mehanizmom djelovanja od postojećih na koje je rezistencija stečena.

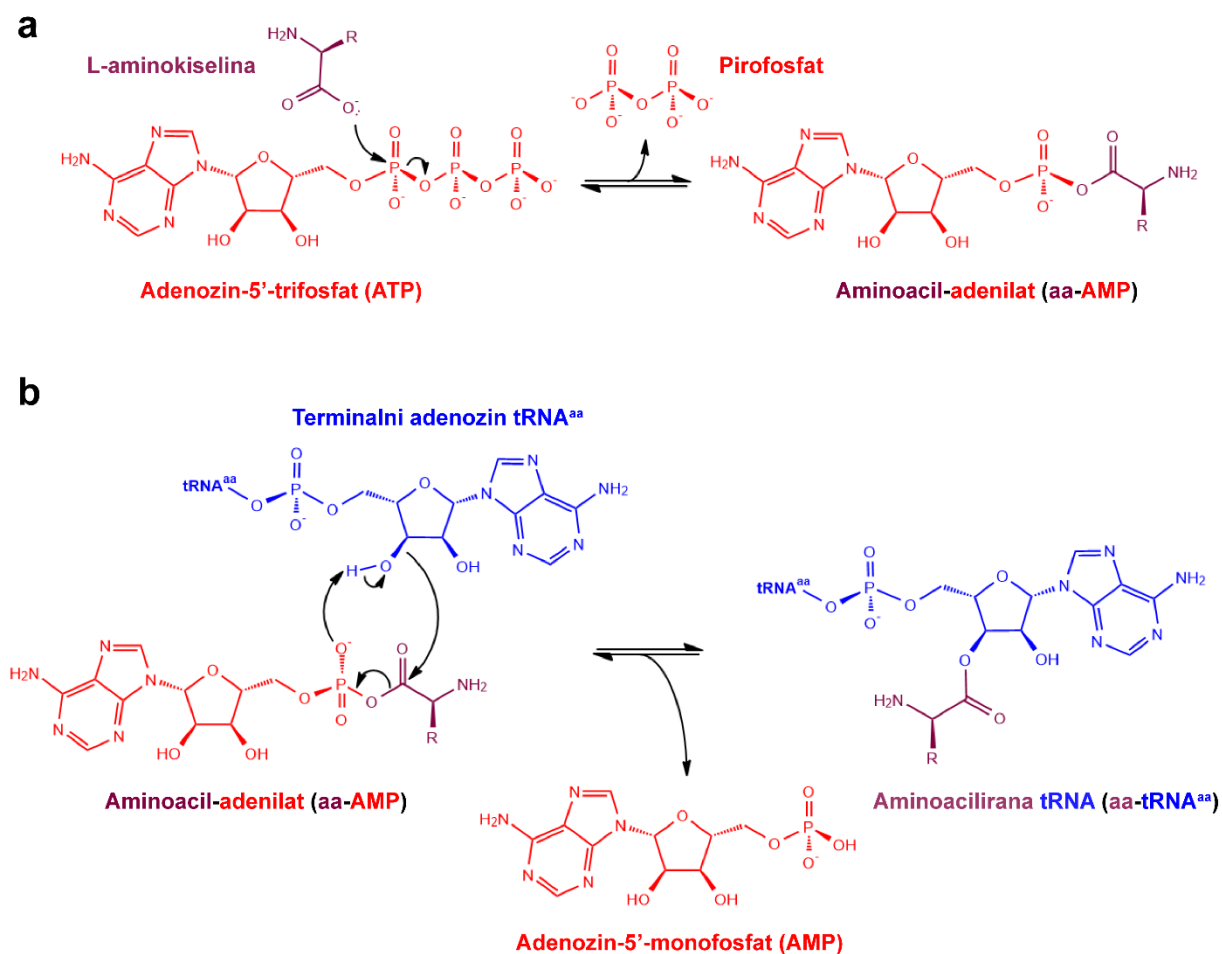
2.2. Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS)

2.2.1. Opća svojstva i uloga aaRS u biosintezi proteina

Aminoacil-tRNA sintetaze (aaRS) univerzalno su prisutni i evolucijski očuvani enzimi s ključnom ulogom u sintezi proteina. Vežući pripadne aminokiseline na odgovarajuće tRNA, aaRS dekodiraju genetski kod, osiguravajući ribosomu supstrate – aminoacilirane tRNA⁹⁻¹¹. Sposobnost dekodiranja genetičkog koda ekskluzivno je svojstvo aaRS, što ih čini nezamjenjivima u procesu prevođenja genoma u proteom^{11,94}. Funkcionalnost aaRS stoga je esencijalna za stanicu, a njezin gubitak dovodi do stanične disfunkcije ili letalnosti⁹⁵. Do sada su identificirane 22 različite aaRS – dvadeset kanonskih i dvije nekanonske za proteinogene aminokiseline. Dvije nekanonske aaRS, pirolizil-tRNA-sintetaza (PylRS) i fosfoseril-tRNA-sintetaza (SepRS), identificirane su u ograničenom broju arheja i bakterija^{96,97}.

Aminoacil-tRNA-sintetaze kataliziraju aminoaciliranje – esterificiranje aminokiseline na 2'- ili 3'- hidroksilnu skupinu terminalnog nukleotida akceptorske petlje tRNA. Reakcija se odvija u dva koraka (aktivacija i prijenos) u istom aktivnom mjestu uz utrošak jedne molekule ATP. U koraku aktivacije, nukleofilnim napadom α -karboksilatnog kisika aminokiseline na α -fosfatnu skupinu ATP-a nastaje miješani anhidrid, aminoacil-adenilat (aa-AMP). Ireverzibilnosti aktivacije pridonose disocijacija nastalog pirofosfata i njegova hidroliza u ortofosfat u citosolu⁹⁸. Međuprodukt ostaje vezan u aktivnom mjestu enzima i služi kao aktivirani donor aminokiseline za reakciju prijenosa. Tijekom prijenosa, nukleofilnim napadom 2'- ili 3'-hidroksilne skupine terminalnog adenzina 5'-kraja tRNA na karbonilnu skupinu aminoacil-adenilata, dolazi do transesterifikacije aminokiseline na tRNA pri čemu se u otopinu oslobađa adenzin-5'-monofosfat (AMP)⁹⁻¹¹. Reakcija aminoaciliranja shematski je prikazana na slici 4.

Iako sve aaRS kataliziraju reakciju aminoaciliranja dvostupanjskim mehanizmom aktivacije i prijenosa, strukturne i mehanističke razlike dovele su do njihove podjele u dva razreda: I i II, s daljnjom podjelom u više podrazreda^{9,11,99,100}. Dok je literaturno postignut konsensus prema kojem se razred II dijeli na tri podrazreda (II_a - II_c), podjela razreda I predmet je diskusija. U tablici 1 prikazana je podjela prema L. Ribas DePouplana *et al.*, koja razred I dijeli u tri podrazreda (I_a - I_c)¹⁰⁰.



Slika 4. Shematski prikaz katalitičkog ciklusa aminoacil-tRNA-sintetaza: (a) U prvom koraku aminoaciliranja – aktivaciji – nastaje miješani anhidrid, aminoacil-adenilat, koji djeluje kao aktivirani donor aminokiseline. (b) U drugom koraku – prijenosu aminokiseline – dolazi do transesterifikacije aminokiseline na 2'- ili 3'-hidroksilnu skupinu terminalnog adenzina tRNA. U prikazanom primjeru riječ je o prijenosu na 3'-hidroksilnu skupinu, što je karakteristično za enzime razreda II.

Razred I obuhvaća pretežito monomerne enzime čije se aktivno mjesto nalazi unutar HUP domene Rossmannove topologije¹⁰¹. Rossmannov nabor sastoji se od pet paralelnih β ploča (β_1 – β_5) premoštenih α zavojnicama (α_1 – α_4) te je simetrično podijeljen insercijom CP1. Definirajuća obilježja aktivnih mjesta aaRS razreda I su univerzalno očuvani, katalitički važni motivi: histidil-X-glicil-histidin (HXGH) – smješten na vrhu α_1 zavojnice – i lizil-metionil-seril-lizil-serin (KMSKS) – smješten neposredno nakon β_5 ploče^{13,99,102,103}. Enzimi ovog razreda vežu ATP u ravnoj konfiguraciji (s γ -fosfatom u ravnini adeninske baze), prepoznaju tRNA sa strane malog utora te prenose aminokiselinu na 2'-hidroksilnu skupinu terminalnog adenzina akceptorske petlje tRNA. Limitirajući korak reakcije aminoaciliranja je disocijacija produkta^{100,103}.

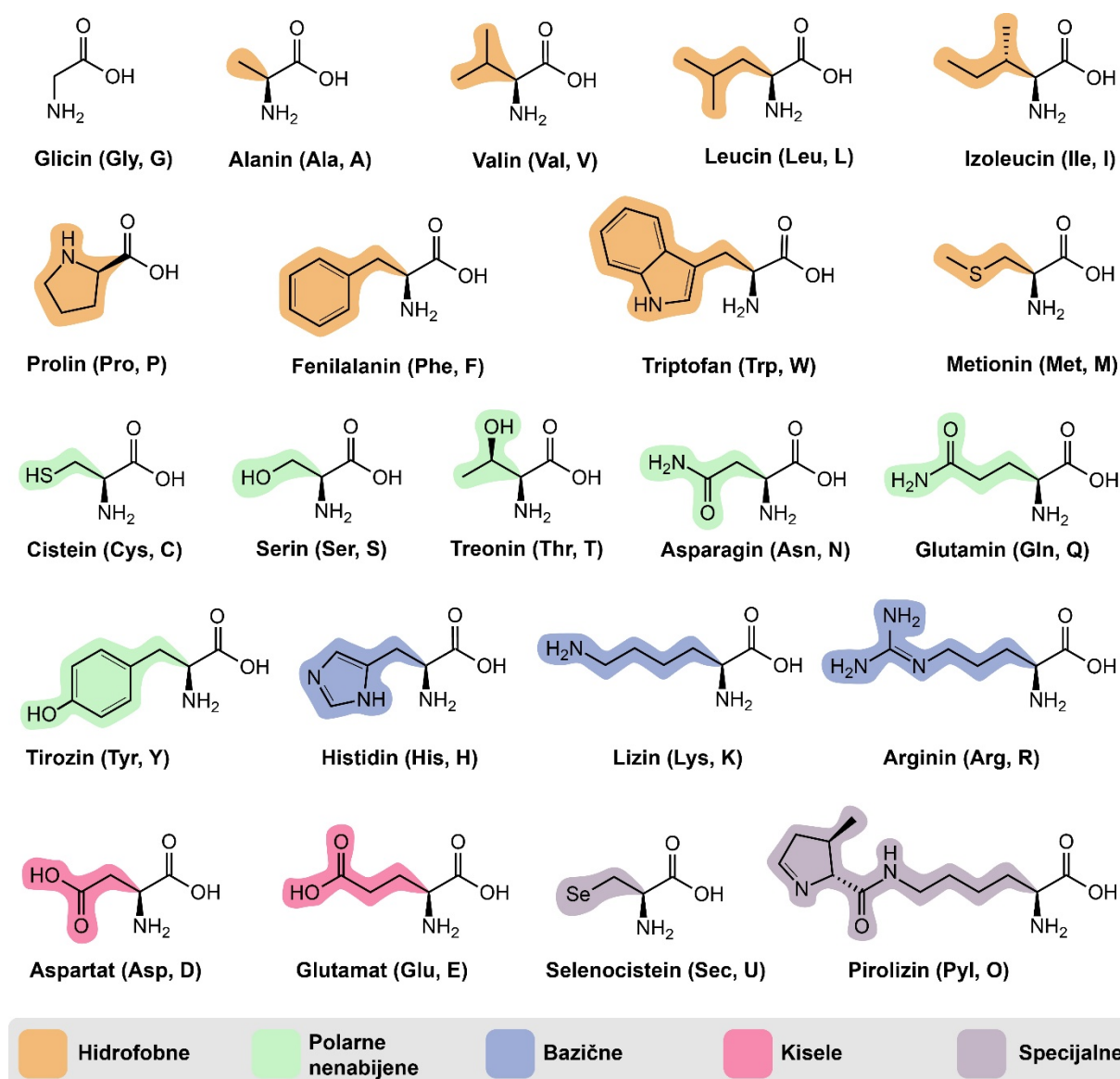
Razred II, za razliku od razreda I, čine pretežito homodimerni i heterotetramerni enzimi (npr. GlyRS, PheRS). Njihovo aktivno mjesto građeno je od sedam antiparalelnih β ploča (β_1 – β_7) premoštenih četirima α zavojnicama (α_1 – α_4) s trima strukturnim motivima (1–3) važnima za prepoznavanje supstrata i katalizu^{9,10}. Suprotno razredu I, limitirajući korak aminoaciliranja u ovom razredu jest aktivacija aminokiseline. Osim toga, enzimi razreda II vežu ATP u sviježoj konfiguraciji (s γ -fosfatom iznad adeninske baze), prepoznaju tRNA sa strane velikog utora, te aminokiselinu prenose na 3'-hidroksilnu skupinu terminalnog adenzina tRNA¹⁰⁰.

Tablica 1. Podjela dvaju razreda kanonskih aminoacil-tRNA-sintetaza (aaRS) prema njihovim podrazredima, katalitičkim svojstvima i kvaternom ustroju. Prikazana je podjela razreda I na tri podrazreda (I_a–I_c) prema L. Ribas DePouplana *et al.*¹⁰⁰

Razred I aaRS			Razred II aaRS		
aaRS	Podrazred	Ustroj	aaRS	Podrazred	Ustroj
IleRS	I _a	α	ThrRS	II _a	α_2
LeuRS		α	GlyRS		α_2
ValRS		α	HisRS		α_2
CysRS		α, α_2	SerRS		α_2
MetRS		α_2	ProRS		α_2
ArgRS		α_2	AsnRS	II _b	α_2
GluRS	I _b	α	AspRS		α_2
GlnRS		α	LysRS-II		α_2
LysRS-I		α	PheRS	II _c	$\alpha, (\alpha\beta)_2$
TrpRS	I _c	α_2	AlaRS		α, α_2
TyrRS		α_2	GlyRS		$(\alpha\beta)_2$

2.2.2. Supstrati aaRS

Supstrati aminoacil-tRNA-sintetaza su aminokiseline i molekule tRNA. Aminokiseline su α -supstituirane α -aminokarboksilne kiseline. Ugljikov α -atom, osim kod aminokiseline glicin, dodatno je supstituiran funkcionalnim skupinama koje određuju njihova kemijska i fizikalna svojstva (Slika 5). Ovisno o tome sudjeluju li u sintezi proteina, aminokiseline se dijele na proteinogene i neproteinogene, pri čemu oba tipa mogu biti supstrati aaRS. Zbog kvaterne supstituiranosti α -ugljikovog atoma, sve aminokiseline osim glicina su kiralne molekule, prisutne kao racemična smjesa D- i L-enantiomera. Aminoacil-tRNA-sintetaze učinkovito diskriminiraju D-aminokiseline već u fazi vezanja, iako je u rijetkim slučajevima (poput AlaRS i TyrRS) opaženo aminoaciliranje s D-aminokiselinama. U tim slučajevima, različiti endo- i egzogeni hidrolitički mehanizmi sprječavaju ugradnju D-aminokiselina u proteine tijekom translacije¹⁰⁴.

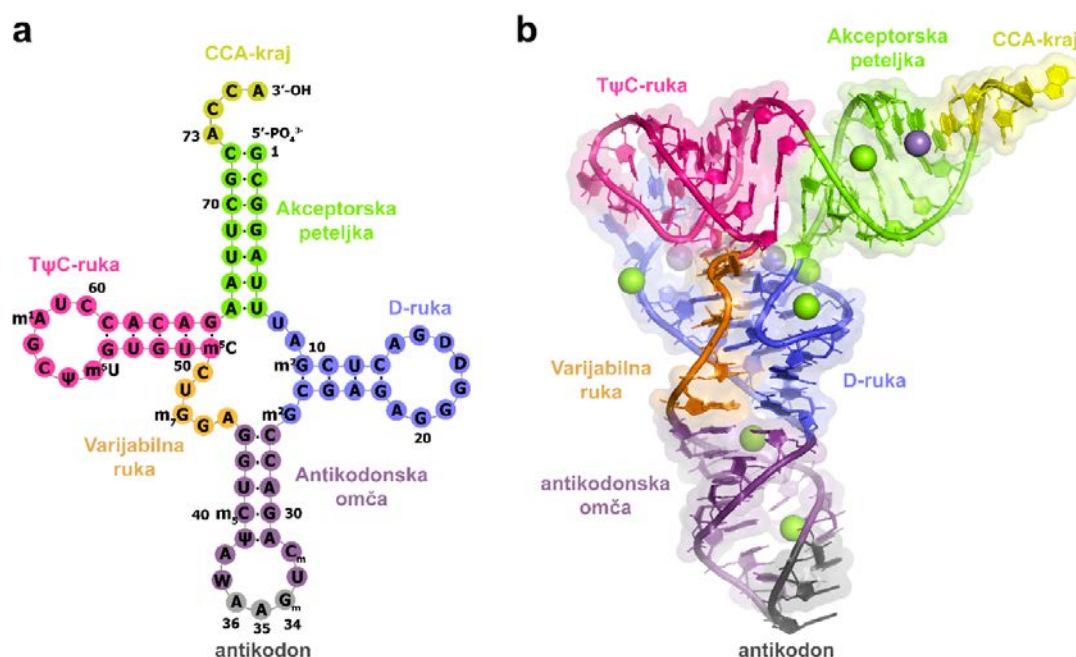


Slika 5. Struktura 20 kanonskih i 2 nekanonske proteinogene aminokiseline. Bojom su osjenčani bočni ogranci koji definiraju fizikalna i kemijska svojstva aminokiseline.

Molekule prijenosne RNA (tRNA) su jednolančani ribonukleinski lanci veličine ~76 ribonukleotida. Na njihovom 3'-kraju nalazi se očuvani CCA-trinukleotid, na koji se tijekom aminoaciliranja kovalentno veže aminokiselina¹⁰⁵. Francis Crick je hipotezu o postojanju tRNA kao adaptera iznio 1950.-ih, što su 1958. potvrdili eksperimenti Zamecnika i suradnika, demonstrirajući prijenos radioaktivno obilježenih aminokiselina na male citosolne RNA molekule^{106,107}. Prvi nukleotidni slijed tRNA odredio je Robert Holley 1965., za što je 1968. dobio Nobelovu nagradu^{108,109}. Kristalna struktura kvašćeve fenilalaninske tRNA riješena je 1974., pružajući uvid u njen trodimenzionalni ustroj¹¹⁰.

Sekundarna struktura tRNA podsjeća na trolisnu djetelinu (Slika 6 a), s četiri karakteristične petlje: antikodonskom, varijabilnom, D- i T Ψ C-petljom. Antikodonska petlja sadrži univerzalno prisutni antikodon, dok su T Ψ C- i D-petlja definirane prisustvom modificiranih ribonukleotida, poput pseudouridina (ψ) i dihidrouridina (D). Prosječna tRNA sadrži do 15 modificiranih ribonukleotida, a do danas je identificirano preko 90 prirodnih modifikacija. One stabiliziraju strukturu, utječu na pravilno smatanje i prepoznavanje tRNA tijekom aminoaciliranja i translacije te smanjuju vjerojatnost pomaka okvira čitanja^{105,111,112}.

Tercijarna struktura tRNA poprima oblik grčkog slova gama („Γ“) i stabilizirana je kompleksnim interakcijama, uključujući kontakte između D- i TψC-petlje (Slika 6 b). Evolucijski pritisak na molekule tRNA da istovremeno interagiraju s aaRS i ribosomima doveo je do zanimljivog strukturnog rješenja: ključni funkcionalni elementi molekule, antikodon i CCA-kraj, udaljeni su ~75 Å. Osim toga, zbog degeneriranosti genetskog koda, više različitih tRNA može prenositi istu aminokiselinu – takve se tRNA nazivaju izoakceptorima.



Slika 6. Opća struktura molekule tRNA, prikazana na primjeru kvašćeve tRNA^{Phe}: (a) Molekula tRNA sastavljena je od nekoliko domena koje čine karakteristične peteljke i omče s nesparenim nukleotidima: akceptorska peteljka (zeleno) s očuvanim CCA-krajem (žuto), D-petlja (svijetloplava), antikodonska petlja (ljubičasta) s antikodonom (sivo), varijabilna petlja (narančasta) i TψC-petlja (magenta). Sekundarna struktura molekule poprima oblik trolisne djeteline. (b) Tercijarna struktura kvašćeve tRNA^{Phe} (1EHZ). Boje označavaju pojedine domene tRNA u skladu s bojama sekundarne strukture. Molekula tRNA^{Phe} sadrži 11 modificiranih nukleotida: 1-metiladenozin (m¹A), 2'-O-metilcitidin (C_m), 2'-O-metilgvanozin (G_m), 2-metilgvanozin (m₂G), 5,6-dihidrouridin (D), 5-metilcitidin (m⁵C), 7-metilgvanozin (m⁷G), 5-metiluridin (T), N2-dimetilgvanozin (m²G), pseudouridin (ψ) i vibutozin (W).

2.2.3. *Supstratna specifičnost aaRS*

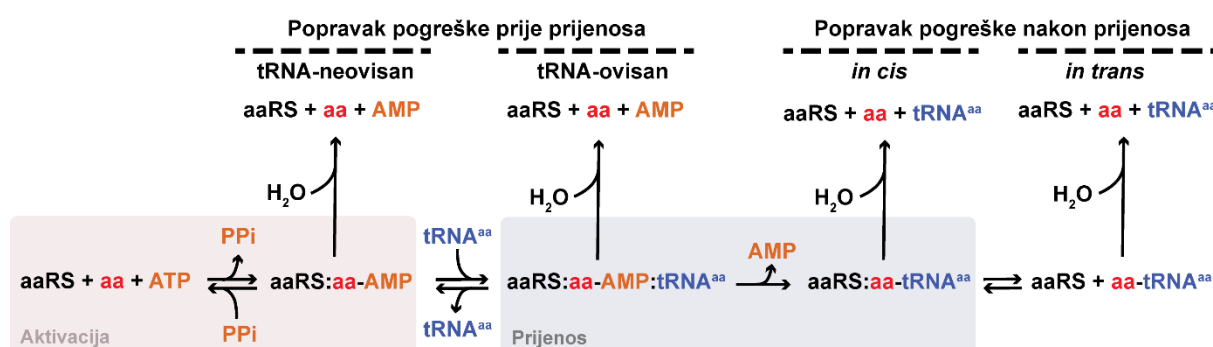
Zbog fizikalne i kemijske sličnosti pripadnih i nepripadnih supstrata, postizanje supstratne specifičnosti na aaRS nije trivijalno. Iako su tRNA makromolekulski supstrati, njihova topološka i sekvencijska sličnost otežava njihovo specifično prepoznavanje. Selekcija pripadne tRNA temelji se na direktnom iščitavanju, koje uključuje interakcije aaRS s bazama tRNA te indirektnom prepoznavanju, koje prepoznaje konformaciju molekule kroz interakcije s fosfodieterskom okosnicom^{113,114}. Elementi identiteta tRNA mogu biti pojedinačne baze, modifikacije ribonukleotida ili određene regije molekule, pri čemu su najčešći nukleotidi antikodona i baza N73 akceptorske peteljke^{115,116}. Sintetaze koje prepoznaju više izoakceptora, poput SerRS, umjesto antikodona za specifično prepoznavanje koriste druge elemente identiteta, primjerice varijabilnu petlju tRNA¹¹⁷.

Prepoznavanje aminokiselina još je zahtjevnije zbog njihove male veličine i strukturne sličnosti. Aminoacil-tRNA-sintetaze razlikuju aminokiseline prema veličini, naboju, koordinaciji s metalnim ionima ili kinetičkom diskriminacijom nepripadnih supstrata^{118,119}. Na primjer, HisRS i ProRS koriste inducirano pristajanje, gdje samo vezanje pripadnog supstrata uzrokuje konformacijske promjene neophodne za katalizu¹²⁰. Bakterijska GlyRS diskriminira aminokiseline po veličini, dok eukariotska GlyRS to čini prema naboju¹¹⁸. CysRS iz *E. coli* specifično prepoznaje cistein koristeći tetraedarski koordinirani ion cinka, koji preferira tiolnu skupinu cisteina u odnosu na hidroksilnu skupinu serina^{121,122}.

Posebnu skupinu čine sintetaze razreda I_a (IleRS, ValRS, LeuRS) koje potpunu supstratnu specifičnost ne mogu postići tijekom aminoacilacije. IleRS, primjerice, diskriminira norvalin (Nva) u omjeru 150:1 u korist izoleucina, što nije dovoljno za translacijsku točnost^{79,123-125}. Stoga ti enzimi koriste dvostruko sito: sintetsko aktivno mjesto diskriminira veće aminokiseline, dok se manje uklanjaju hidrolitičkim mehanizmima popravka¹⁰².

Mehanizmi popravka pogreške dijele se na popravak pogreške prije prijenosa i nakon prijenosa, ovisno o tome je li nepripadna aminokiselina već prenesena na tRNA⁹⁻¹¹ (Slika 7). Kod popravka prije prijenosa, nepripadni reakcijski međuprodukt (aa-AMP) hidrolizira se u sintetskom mjestu enzima prije nego što se nepripadna aminokiselina prenese na tRNA. Ovaj proces može biti tRNA-ovisan ili tRNA-neovisan¹¹. Alternativno, nepripadni aa-AMP može disocirati u citosol, gdje se hidrolizira¹²⁶. Ako sintetaza ne osigura točnost aktivacije supstratnom specifičnošću i mehanizmima popravka pogreške prije prijenosa, pogrešku ispravlja popravkom nakon prijenosa. Kod popravka pogreške nakon prijenosa, misacilirana

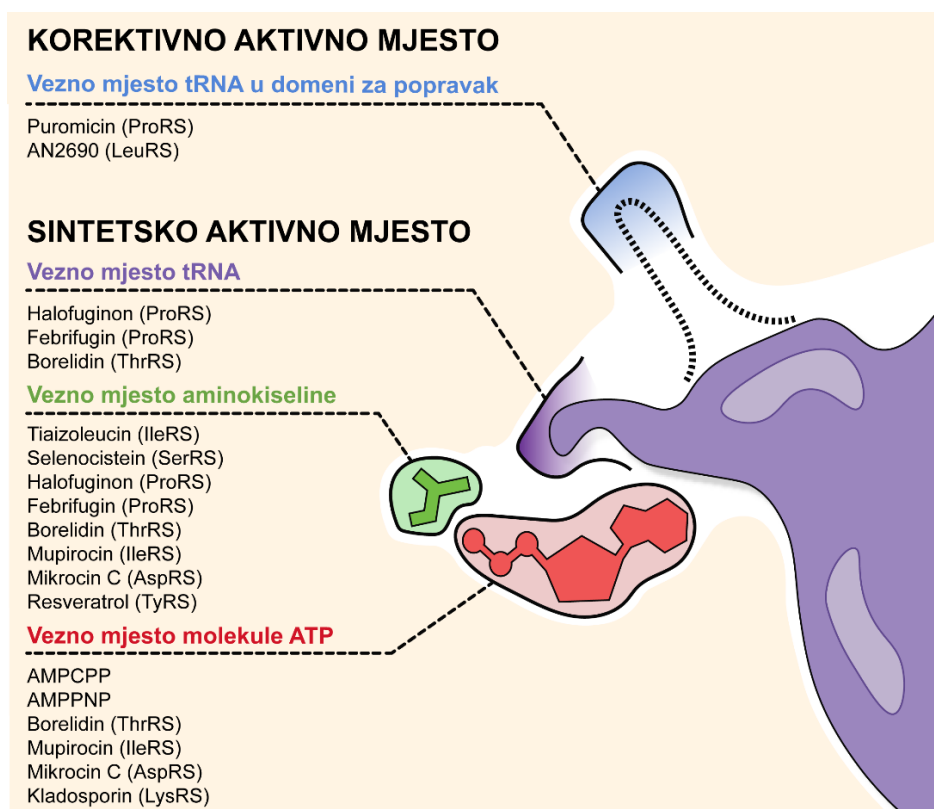
tRNA hidrolizira se u domenama za popravak pogreške koje mogu biti dio enzima ili samostojeći citosolni proteini. Ovisno o tome, ostaje li tRNA tijekom hidrolize vezana na aaRS, razlikuju se popravak *in cis* (bez disocijacije) i *in trans* (uz disocijaciju)¹¹. Razred I sintetaza uglavnom koristi popravak *in cis*, pri čemu se hidroliza događa nakon translokacije misacilirane akceptorske peteljke tRNA iz sintetskog u hidrolitičko aktivno mjesto. Ovu hipotezu podupire spora disocijacija tRNA, koja određuje brzinu aminoaciliranja tRNA^{9,11}. Razred II češće koristi popravak *in trans* jer misacilirana tRNA brzo disocira te se djelovanjem zasebnih hidrolitičkih enzima hidrolizira u citosolu. Ipak, pojedini enzimi razreda II, poput PheRS i ProRS imaju hidrolitičke domene kao dio enzima^{9,11,126-128}.



Slika 7. Shematski prikaz mehanizamama popravka pogreške aminoacil-tRNA-sintetaza. AaRS aminoacilacijsku pogrešku mogu popraviti prije prijenosa nepripadne aminokiseline na tRNA hidrolizom nepripadnog aminoacil-adenilata (popravak pogreške prije prijenosa) te hidrolizom misacilirane tRNA nakon što je nepripadna aminokiselina prenesena na tRNA (popravak pogreške nakon prijenosa).

2.2.4. aaRS kao mete antibiotika

Zahvaljujući središnjoj ulozi u sintezi proteina, ali i evolucijskoj divergentnosti prokariotskih i eukariotskih enzima, aminoacil-tRNA-sintetaze predstavljaju dobre mete za razvoj specifičnih inhibitora s antibiotskim djelovanjem^{101,129}. Sve aaRS posjeduju tri vezna mjesta za supstrate (ATP- i tRNA-vezno mjesto, te mjesto vezanja aminokiseline), a enzimi koji vrše popravak pogreške nakon prijenosa i četvrto vezno mjesto, što otvara više smjerova razvoja potencijalnih specifičnih inhibitora (Slika 8). Potencijalni inhibitor može se vezati u jedno vezno mjesto (jednomodalni inhibitori) ili više njih istovremeno (multimodalni inhibitori).



Slika 8. Shematski prikaz veznih mjesta za potencijalne inhibitore aminoacil-tRNA sintetaza. Vezna mjesta za supstrate sintetske reakcije, kao i za reakciju popravka pogreške nakon prijenosa, predstavljaju potencijalne mete za razvoj selektivnih aaRS inhibitora s antibiotskim djelovanjem. Na slici su najpoznatiji aaRS inhibitori klasificirani prema svojim veznim mjestima. U slučajevima kada je inhibitor multimodalan, njegov je naziv naveden uz svako od veznih mjesta na koja se veže.

Najjednostavniji jednomodalni inhibitori aaRS su nehidrolizabilni analozi adenozin-5'-trifosfata (α,β -metilenadenozin-5'-trifosfati (AMPCPP); β,γ -imidoadenozin-5'-trifosfati (AMP-PNP)) te nefunkcionalni analozi aminokiselina (aminoalkoholi i hidroksamati aminokiselina). Iako snažno inhibiraju aaRS, ovakvi analozi nemaju kliničku primjenu kao antibiotici, budući da neselektivno inhibiraju sve stanične procese u kojima sudjeluju adenozin-5'-trifosfat i aminokiseline. Kladosporin i resveratrol rijetki su specifični jednomodalni inhibitori aaRS. Kladosporin se veže u ATP-vezujuće mjesto LysRS, dok se resveratrol veže u vezno mjesto aminokiselina na TyrRS¹³⁰⁻¹³². Za razliku od direktnih analoga supstrata, djelovanje kladosporina i resveratrola temelji se na funkcijskoj, a ne strukturnoj mimikriji adenozin-5'-trifosfata i aminokiselina, zbog čega osim inhibicije specifične aaRS ne utječu na druge stanične procese^{130,132}.

Sintetsko mjesto aaRS nije jedino vezno mjesto vezanja jednomodalnih inhibitora. AN2690 i puromicin selektivni su inhibitori domena za popravak pogreške LeuRS i PheRS. Puromicin sterički sprječava vezanje akceptorske peteljke tRNA u domenu za popravak

pogreške PheRS, dok se AN2690 kod LeuRS kovalentno veže na terminalni adenozin akceptorske peteljke tRNA^{Leu}. Nastali nefunkcionalni adukt zaustavlja katalitički ciklus LeuRS, jer nije supstrat aminoacilacije i sporo disocira s enzima^{133,134}.

Od multimodalnih inhibitora aaRS, najčešći su dvomodalni. Najveću skupinu ovih inhibitora čine nehidrolizabilni analozi aminoacil-adenilata, koji pokazuju afinitet vezanja u aktivna mjesta za aminokiselinu i adenozin-5'-trifosfat. Iako su potentni i specifični inhibitori aaRS, pokazuju nisku selektivnost prema aaRS iz različitih domena života, zbog čega nisu pogodni za kliničku primjenu^{30,135,136}. Osim toga, zbog svog naboja i polarne prirode teško prolaze kroz staničnu membranu. Njihova svojstva mogu se poboljšati modifikacijama ciljanih funkcionalnih skupina. Primjerice, skupina tiazolnih derivata leucil-N-sulfamoil adenozina (Leu-AMS), kod kojih je adeninska baza zamijenjena supstituiranim tiazolima, pokazuje značajno veću specifičnost prema prokariotskim nego eukariotskim LeuRS¹³⁷. Trojanski inhibitor mikrocin C peptidni je derivat nehidrolizabilnog analoga aspartil-adenilata, u kojem je N-terminalna skupina aspartata modificirana je kratkim peptidom N-formilmetionil-arginil-treonil-glicil-asparaginil-alaninil-aspartatom (f-MRTGNAD), koji omogućuje unos u stanicu putem transmembranskog prenositelja YejABEF. Nakon unosa, peptidna deformilaza i peptidaze uklanjaju N-terminalni peptid, čime se oslobađa nehidrolizabilni analog aspartil-adenilata – snažni inhibitor AspRS¹³⁸. Drugi primjer ove klase inhibitora je mupirocin. Iako dijeli vrlo malo strukturnih sličnosti s izoleucil-adenilatom, snažno i kompetitivno inhibira bakterijske IleRS. Monična kiselina mupirocina funkcionalno oponaša izoleucil-adenilat, omogućujući mupirocinu vezanje u aktivno mjesto enzima¹³. Mehanizam djelovanja mupirocina bit će detaljnije opisan u sljedećim poglavljima.

Od multimodalnih inhibitora koji se vežu u vezna mjesta za aminokiselinu i tRNA, ističu se febrifugin i njegov derivat halofuginon. Ovi alkaloidi, specifični kompetitivni inhibitori prolil-tRNA sintetaze (ProRS), svojim piperidinskim i 4-kvinazolinonskim skupinama vežu se u aktivna mjesta za aminokiselinu i tRNA^{Pro} u sintetskom aktivnom mjestu enzima. Na taj način funkcionalno oponašaju aminoaciliranu tRNA^{135,139}. Prirodni poliketidni antibiotik borelidin pokazuje antibakterijsku, antifungalnu, antimalarijsku, antiangiogenu (antikancerogenu) i antivirusnu aktivnost putem selektivne inhibicije treonil-tRNA sintetaze (ThrRS). Borelidin je jedini dosad poznati inhibitor aaRS s četveromodalnim mehanizmom djelovanja. Prilikom vezanja na ThrRS, istovremeno zauzima aktivna mjesta za treonin, ATP, tRNA^{Thr} te dodatno ortogonalno mjesto enzima, što ga čini izuzetno specifičnim inhibitorom ThrRS¹⁴⁰⁻¹⁴⁵.

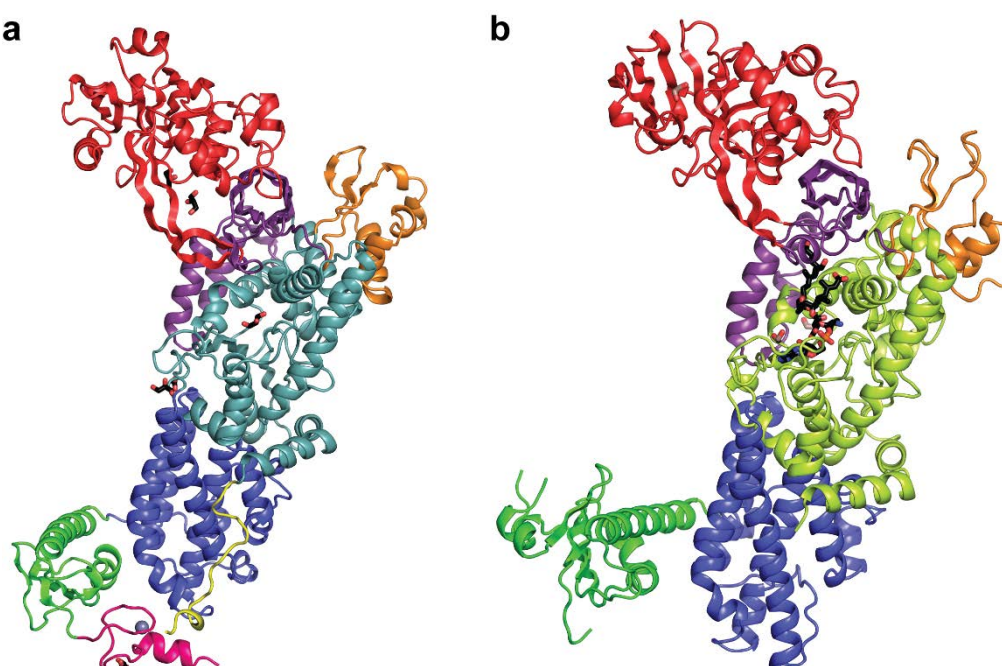
Zbog njihove ograničene kliničke primjene, aaRS inhibitori zasad uzrokuju nisku razinu zabilježene antibiotske rezistencije. Ipak, ni ovi antibiotici nisu iznimka – organizmi koji ih prirodno proizvode otkrivaju moguće mehanizme razvoja rezistencije unutar šire bakterijske populacije. Mupirocin i mikrocina C, prethodno spomenuti, istaknuti su primjeri. Bakterija *Pseudomonas fluorescens*, koja sintetizira mupirocin, posjeduje dvije kopije izoleucil-tRNA sintetaze, od kojih jedan homolog pokazuje visoku otpornost na mupirocin i omogućava preživljavanje pri koncentracijama letalnim za kompetitivne sojeve. Mupirocin-rezistentna sintetaza dio je mupirocinskog operona na konjugativnom plazmidu koji se može neometano prenositi u bakterijskoj populaciji⁴². Cirkulacija plazmida koji nose gene za antibiotsku rezistenciju čest je mehanizam putem kojeg patogeni istu stječu u okolišu⁵. Visoka mupirocinska rezistencija nedavno je po prvi put uočena kod bakterije *Pseudomonas argenteus* vjerojatno kao posljedica horizontalnog prijenosa gena iz *S. aureus*¹⁴⁶. Sojevi bakterije *Escherichia coli* koji sintetiziraju prethodno spomenuti mikrocina C predstavljaju još jedan primjer razvoja rezistencije na aaRS inhibitore. *E. coli* neutralizira vlastiti mikrocina C na barem dva načina. Prvi mehanizam uključuje djelovanje acetil-CoA-ovisne acetiltransferaze, koja acetilira primarnu amino skupinu aspartil-adenilata. Drugi mehanizam uključuje hidrolizu aspartata iz mikrocina C, posredstvom serinske proteaze MccF. U oba slučaja – bilo acetiliranjem molekule ili njezinom razgradnjom – mikrocina C potpuno gubi svoja inhibitorna i antibiotska svojstva¹³⁸.

Navedeni primjeri pokazuju da, iako mogu biti iznimno potentni antibiotici, aaRS-specifični inhibitori nisu „srebrni metak“ za rastući problem antibiotske rezistencije. U konačnici, i oni se, poput ostalih antibiotika, suočavaju s istim izazovom – izuzetnom sposobnošću mikroorganizama da evoluiraju i prežive.

2.3. Izoleucil-tRNA-sintetaza (IleRS)

2.3.1. Opća svojstva, klasifikacija i rasprostranjenost bakterijskih IleRS

Izoleucil-tRNA-sintetaza (IleRS) kanonska je aaRS koja katalizira vezanje proteinogenog izoleucina na izoleucinske izoakceptorske tRNA. Podaci o ustrojstvu i funkciji IleRS enzima dobiveni su analizom više kristalnih struktura: IleRS1 iz bakterije *Staphylococcus aureus* (SaIleRS1) u kompleksu s mupirocinom i *SatRNA*^{Ile} (1QU2²⁶, 1QU3²⁷, 1FFY²⁸), strukture IleRS2 iz bakterije *Thermus thermophilus* (TtIleRS2) u kompleksu s izoleucil-N-sulfamoil adenozinom (1JZQ²⁹) i mupirocinom (1JZS³⁰), strukture IleRS2 iz gljivice *Candida albicans* (CaIleRS2) u kompleksu s izoleucil-adenilatom (6LDK³¹), struktura IleRS2 iz kvasca *S. cerevisiae* u kompleksu s reveromicinom (7D5C¹⁴⁷), izoleucinom i *EctRNA*^{Ile}_{GAU} (8WND³⁸), odnosno izoleucinom i *EctRNA*^{Ile}_{CAU} (8Z1P³⁹) te kristalne strukture IleRS1 iz bakterije *Helicobacter pylori* (HpIleRS1) u *apo* formi (8WNF³²), kao i u kompleksima s izoleucil-adenilatom (8WNI³⁶), valil-adenilatom (8WNI³⁶), izoleucinom (8WNG³⁵), valinom (8WNI³⁶) te mupirocinom (8WO3³⁷). Reprezentativne strukture dvaju tipova bakterijskih IleRS prikazane su na slici 9.



Slika 9. Primjeri kristalnih struktura bakterijskih izoleucil-tRNA-sintetaza: (a) IleRS1 iz bakterije *H. pylori* (HpIleRS1) u *apo* formi određena pri rezoluciji 1,9 Å (8WNF). **(b)** IleRS2 iz kvasca *S. cerevisiae* (ScIleRS2) u kompleksu s reveromicinom riješena pri rezoluciji 1,895 Å (7D5C). U strukturi je djelomično razlučena SD2 poddomena C-terminalne antikodon-vezujuće domene. Bojama su označene domene enzima: HUP domena sa sintetskim aktivnim mjestom (cijan – IleRS1, svijetlo zeleno – IleRS2), CP1 insercija s domenom za popravak pogreške nakon prijenosa (crveno), CP2 insercija (ljubičasto), CP3 insercija (narančasto). Poddomene C-terminalne antikodon-vezujuće domene prikazane su: tamnoplavo (SD1), zeleno (SD2) i magenta (SD3).

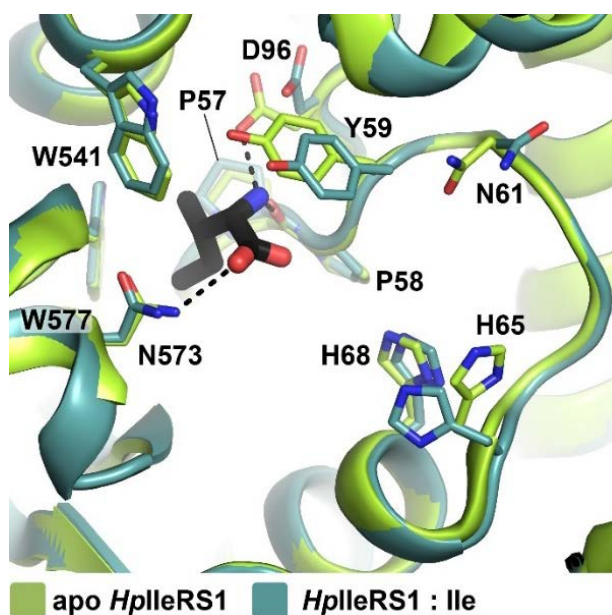
Tipična IleRS je modularni enzim s ~1000 aminokiselina, molekulske mase ~100 kDa i dimenzija $\sim 100 \times 80 \times 45 \text{ \AA}$ ^[27-37]. Pripada podrazredu I_a aminoacil-tRNA-sintetaza, s kojima dijeli karakteristične strukturne i funkcionalne značajke. Sintetsko aktivno mjesto enzima smješteno je neposredno nakon N-terminalnog peptida, unutar HUP domene s topologijom Rossmannovog nabora¹⁰¹. U strukturi aktivnog mjesta ističu se dva visoko očuvana motivska slijeda: histidil-X-glicil-histidin (HXGH) i lizil-metionil-seril-lizil-serin (KMSKS), koji sudjeluju u prepoznavanju i vezanju supstrata te stabilizaciji prijelaznog stanja^{13,148,149}. Rossmannov nabor simetrično je podijeljen na dva dijela trima insercijama, poznatim i kao vezni peptidi (CP, engl. *Connective Peptide*). Kod nekih IleRS enzima, CP1 insercija sadrži hidrolitičko mjesto odgovorno za popravak pogreške nakon prijenosa. Preostale dvije CP insercije imaju primarno strukturnu ulogu i razlikuju se među IleRS enzimima različitih organizama.

IleRS se dijele u dvije skupine: enzime bakterijskog tipa (IleRS1) i eukariotskog tipa (IleRS2). Pojam „eukariotski“ nije ekskluzivan za eukariote, nego se koristi i za opisivanje bakterijskih enzima koji dijele obilježja eukariotskih ortologa. Osim na filogenetskim razlikama, podjela se temelji i na suptilnim razlikama u aktivnim mjestima enzima, građi C-terminalne antikodon-vezujuće domene te osjetljivosti na mupirocin – prirodnom inhibitoru IleRS^{12,14,15,17,150}. C-terminalna antikodon-vezujuća domena dvaju tipova IleRS razlikuje se po veličini i prisutnosti cink-vezujućeg motiva. Manja, modularna C-terminalna domena IleRS1, za razliku od IleRS2, sadrži tetrakoordinirani cinkov ion koji stabilizira konformaciju bočnih ogranka uključenih u iščitavanje antikodona te je presudan za prijenos aminokiseline na tRNA¹⁶. Suprotno tomu, struktura modularne C-terminalne domene enzima IleRS2 razjašnjena je tek nedavno strukturama ScIleRS2 u kompleksima s *EctRNA*^{Ile}_{GAU} (8WND³⁸), odnosno *EctRNA*^{Ile}_{CAU} (8Z1P³⁹). Prethodno riješene strukture IleRS2 enzima nisu bile informativne, budući da su kristalizirani krnji IleRS2 enzimi^{13,30,31,148}. Dva tipa IleRS također pokazuju drastičnu razliku u osjetljivosti prema inhibiciji prirodnim antibiotikom mupirocinom pri čemu su IleRS1 enzimi i do šest redova veličine osjetljiviji od IleRS2^{12,40-42,150}. Naposljetku, nedavna istraživanja ukazuju na suptilne razlike u očuvanim sljedovima/aminokiselinama unutar aktivnog mjesta enzima. Među njima se izdvaja aminokiselina Tyr59, koja je u slučaju IleRS1 iz *E. coli* važna determinanta tRNA-ovisnog popravka pogreške prije prijenosa¹⁵¹. Ova je aminokiselina u IleRS2 enzimima supstituirana treoninom ili fenilalaninom, pri čemu neki od tih enzima uopće ne posjeduju tRNA-ovisan popravak pogreške prije prijenosa^{12,40,41}.

Većina bakterija posjeduje jednu genomsku kopiju IleRS, a domaćinsku funkciju (engl. *housekeeping*) mogu obavljati i IleRS1 i IleRS2. Brzorastući mikroorganizmi u pravilu koriste IleRS1 kao glavnu sintetazu, dok je kod sporije dijelećih bakterija učestalija IleRS2. Bakterija *Pseudomonas fluorescens* te pojedini predstavnici rodova *Bacillus* i *Oceanibacillus* rijetki su primjeri organizama čiji genomi sadrže kodirajuće sljedove za oba tipa IleRS. U takvim organizmima oba tipa IleRS ipak nisu istodobno koeksprimirana. U uvjetima stabilnog rasta oslanjaju se na domaćinsku, katalitički učinkovitiju IleRS1, dok se ekspresija IleRS2 inducira tek u prisutnosti mupirocina, čime se povećava adaptivni potencijal stanice⁴⁰.

2.3.2. Supstratna specifičnost IleRS

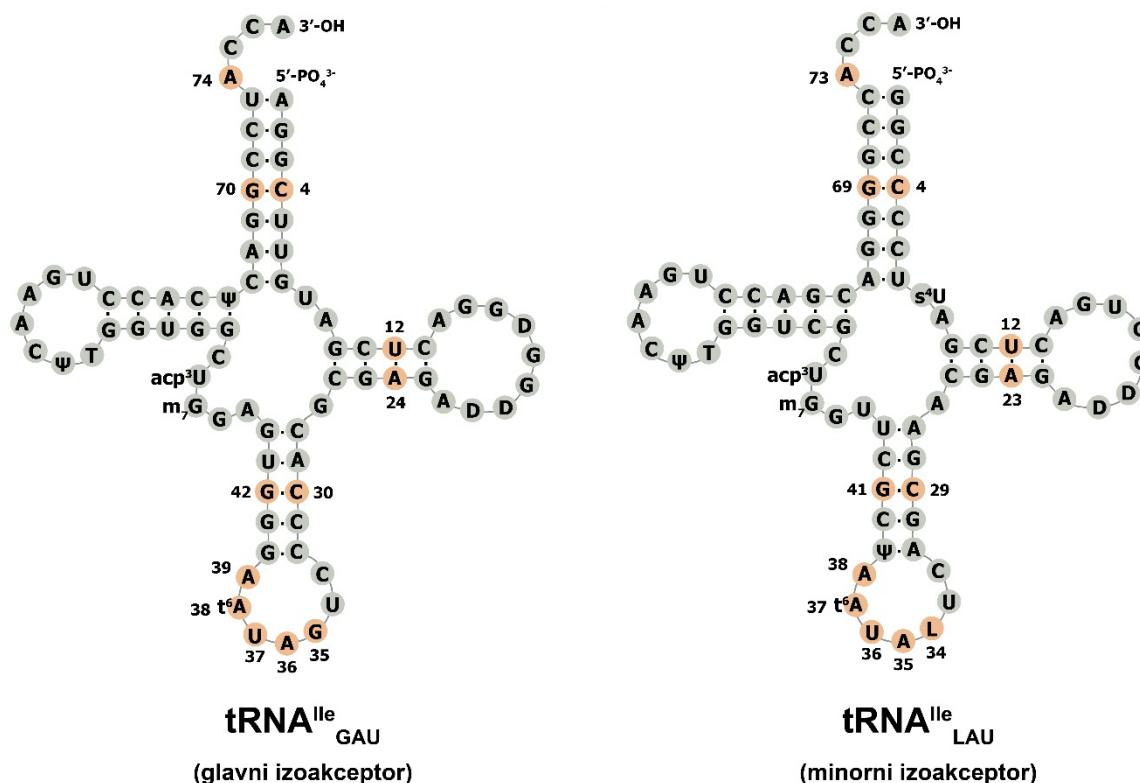
Specifičnost IleRS prema izoleucinu rezultat je kombinacije supstratne specifičnosti i mehanizama popravka pogreške. Aktivno mjesto IleRS1, primjerice u *HpIleRS1*, čine očuvane aminokiseline Gly56, Pro57, Tyr59, Asp96, Trp541, Gln573 i Trp577 koje sterički i elektrostatski određuju vezno mjesto za izoleucin^{32,35,152}. Tyr59 djeluje kao poklopac aktivnog mjesta te je ključan za tRNA-ovisan popravak prije prijenosa u *EcIleRS1*¹⁵¹. Usporedba struktura *HpIleRS1* u *apo* obliku (8WNF³²) i u kompleksu s izoleucinom (8WNG³⁵) pokazuje minimalne konformacijske promjene pri vezanju supstrata (Slika 10). Kod IleRS2, vezanje izoleucina je slično. U *TtIleRS2* (1JZQ²⁹), vezno mjesto oblikuju Gly45, Pro46, Trp518 i Trp588, dok se amino- i karboksilna skupina aminokiseline stabiliziraju interakcijama s Asp85 i Gln554. Za razliku od IleRS1, u ovom se slučaju na poziciji Tyr59 nalazi očuvani Thr49^{13,29}.



Slika 10. Sterički rearanžman aktivnog mjesta *HpIleRS1* prilikom vezanja aminokiseline. Vezanjem aminokiseline aktivno se mjesto enzima kompaktizira pomacima očuvanih ostataka: Asp96, Tyr59 i Trp541.

IleRS razlikuje izoleucin od leucina, koji ima drugačije razgranat bočni ogranak, ali ne uspijeva u potpunosti diskriminirati valin s manjim bočnim ogrankom. U *EcIleRS1*, Gly45 omogućuje djelomično razlikovanje valina od izoleucina s preferencijom 180:1 prema izoleucinu¹⁵³. Mutacija Gly45Ala dovodi do potpunog gubitka specifičnosti te do jednakovrijedne aktivacije izoleucina i valina. Radi osiguravanja točnosti aminoaciliranja, *EcIleRS* koristi mehanizam popravka pogreške nakon prijenosa, pri čemu hidrolitička domena CP1 uklanja pogrešno aciliranu Val-tRNA^{Ile} (~70 % ukupne diskriminacije)^{125,151}. Utvrđeno je da se popravak pogreške nakon prijenosa primarno odvija *in cis*, translokacijom akceptorske petlje tRNA između sintetskog i korektivnog mjesta, ali kinetička istraživanja upućuju da i *in trans* mehanizam – pri kojem misacilirana tRNA disocira s enzima – također pridonosi ukupnom popravku¹⁵⁴. Neki IleRS enzimi imaju sposobnost za popravak pogreške prije prijenosa. Tako *EcIleRS1* provodi tRNA-ovisan (~30 %), ali i tRNA-neovisan (~3 %) popravak pogreške¹². Međutim, taj mehanizam nije univerzalan - IleRS2 (*SgIleRS2*), kao i neki IleRS1 enzimi (*PmIleRS1* i *PmIleRS2*), ne provode tRNA-ovisan popravak prije prijenosa. Pretpostavljalo se da je gubitak popravka pogreške prije prijenosa povezan s evolucijom rezistencije na mupirocin, no ta je hipoteza eksperimentalno opovrgnuta^{12,40,41}.

Bakterija *E. coli* razlikuje dvije izoakceptorske tRNA^{Ile} specifične za izoleucin: glavni izoakceptor tRNA^{Ile}_{CAU} i minorni tRNA^{Ile}_{LAU} (Slika 11). Glavni izoakceptor na ribosomu dekodira izoleucinske kodone AUU i AUC putem kolebljivog sparivanja baza, dok minorni izoakceptor dekodira samo kodon AUA. Prva baza antikodona, citidin, kod minorne tRNA^{Ile}_{LAU} uvijek je posttranskripcijski modificirana lizinom na položaju C2' i naziva se lizidin (L). Prisustvo lizidina omogućuje specifično prepoznavanje izoleucinskog kodona AUA i diskriminaciju metioninskog kodona AUG, koji bi se zbog kolebljivog sparivanja baza mogao na ribosomu pročitati kao izoleucinski¹⁵⁵. Elementi identiteta molekule tRNA^{Ile} uključuju baze antikodona, antikodonu susjedne nukleotide A37 i A38, diskriminatorsku bazu A71, kao i parove C4:G69, U12:A23, C29:G41. Baza A37 uvijek je posttranskripcijski modificirana N6-treonil-karbamoil-adenozinom (t⁶A37) koji je važan element identiteta tRNA^{Ile}. U odsutnosti ove modifikacije tRNA^{Ile} se slabije aminoacilira, pri čemu je učinak primarno katalitički, što se očituje smanjenjem k_{cat} vrijednosti¹⁵⁶. Modificirani t⁶A37 također stabilizira otvorenu strukturu antikodonske omče tRNA^{Ile}, čime sprječava nespecifično sparivanje kodona i antikodona na ribosomu te potencijalne pomake okvira čitanja¹¹².

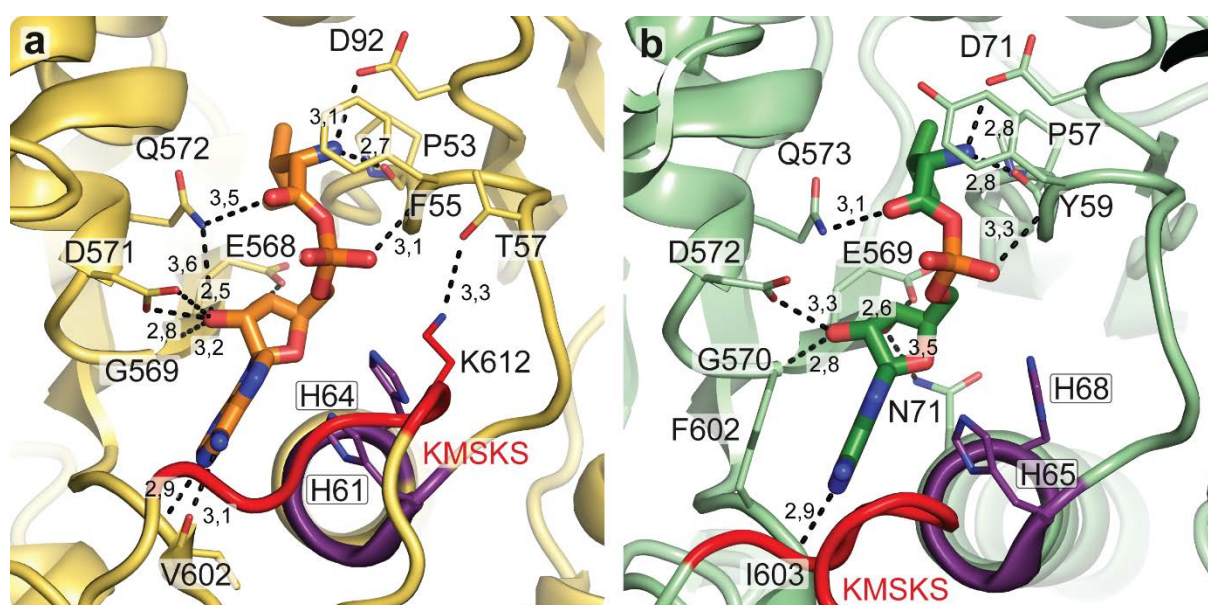


Slika 11. Sekundarne strukture glavnog i minornog izoakceptora tRNA^{Ile} iz bakterije *E. coli*. Pozitivni elementi identiteta označeni su u boji. Modifikacije nukleotida prikazane su na sljedeći način: 4-tiouridin (s^4U), 2'-O-metilguanozin (G_m), dihidrouridin (D), N^6 -treonilkarbamoidadenozin (t^6A), pseudouridin (ψ), N7-metilguanozin (m^7G), 3-(3-amino-3-karboksipropil)uridin (acp^3U) i 5-metiluridin (T).

2.3.3. Interakcije reakcijskog međuprodukta

Nakon aktivacije aminokiseline, a prije njezina prijenosa na tRNA, u aktivnom mjestu IleRS enzima je kao međuprodukt vezan miješani anhidrid, izoleucil-adenilat (Ile-AMP). Strukture *HpIleRS1* (8WNJ³³) i *CaIleRS2* (6LDK³¹) u kompleksu s Ile-AMP ukazuju na suptilne razlike u načinu vezanja reakcijskog međuprodukta kod dva tipa IleRS. Interakcije koje stabiliziraju fosfatnu skupinu međuprodukta te amino- i karboksilnu skupinu izoleucina iste su kod oba tipa IleRS, dok su adeninska baza i ribeza međuprodukta stabilizirane na različite načine (Slike 12 a i b). Hidroksilna skupina O3' u *HpIleRS1* stabilizirana je, za razliku od *CaIleRS2*, vodikovom vezom s Asn71 nizvodno od HXGH motiva. Ova je pozicija univerzalno očuvana kod IleRS1 enzima i vjerojatno osim u stabilizaciji međuprodukta sudjeluje i u stabilizaciji molekule ATP, što sugeriraju niže vrijednosti $K_M(ATP)$ kod IleRS1 enzima u usporedbi s IleRS2 enzimima^{12,40,136}. Osim razlika u stabilizaciji riboze, kod *HpIleRS1* adeninsku bazu stabiliziraju π - π interakcije s Phe602 te vodikova veza između N1 adeninske baze i Ile603 iz KMSKS omče. KMSKS omča *HpIleRS1* ostaje otvorena, bez specifične

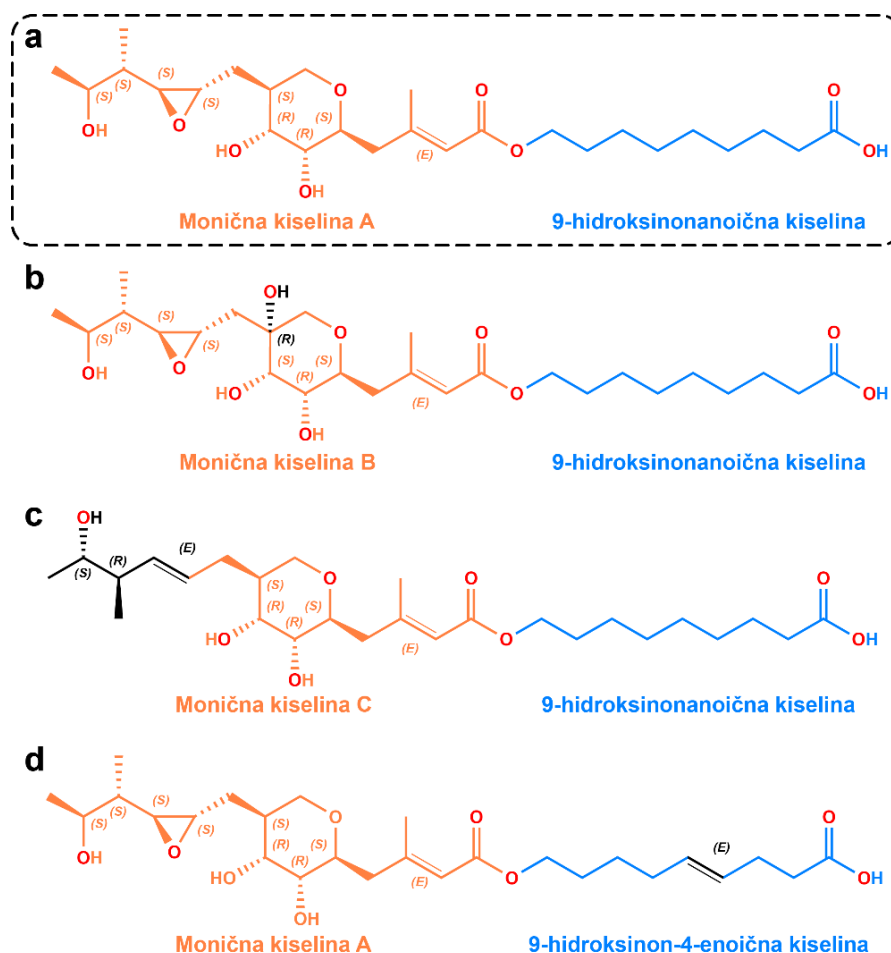
stabilizacije njezinih aminokiselina. Kod *CalIeRS2*, izostaje stabilizacija adeninske baze slaganjem, budući da Ile601 nema aromatični bočni ogranak potreban za π -interakcije s bazom. Adeninska baza se, umjesto slaganjem, stabilizira vodikovim vezama N1 i N6 s peptidnom okosnicom Val602. Nadalje, kod *CalIeRS2* opaža se značajnija kompaktizacija aktivnog mjesta zbog zatvaranja KMSKS omče, budući da Lys612 KMSKS motiva ostvaruje jaku vodikovu vezu s Thr57 iz α_1 - β_1 omče aktivnog mjesta. Ni kod jednog od ova dva enzima se ne opaža nastanak specifičnih interakcija bočnih ograna HXGH motiva s reakcijskim međuproduktom, iako je fosfatna skupina međuprodukta u *HpIleRS1* pozicionirana značajno bliže prvom histidinu motiva nego u *CalIeRS2*.



Slika 12. Interakcije reakcijskog međuprodukta u aktivnim mjestima tipičnih IleRS1 i IleRS2 enzima: (a) Interakcije međuprodukta u aktivnom mjestu *CalIeRS2*, (b) Interakcije međuprodukta u aktivnom mjestu *HpIleRS1*. Stabilizacija međuprodukta kod oba tipa IleRS je slična, uz manje razlike u stabilizaciji adeninske baze i riboze. Zbog zatvaranja KMSKS omče, aktivno mjesto *CalIeRS2* (a potencijalno i drugih IleRS2 enzima) s vezanim međuproduktom značajno je kompaktnije nego aktivno mjesto *HpIleRS1*.

2.3.4. Mupirocin kao kompetitivni inhibitor IleRS

Mupirocin je prirodni antibiotik i primarni metabolit bakterije *Pseudomonas fluorescens* soja NCIMB 10586. Složen biosintetski put mupirocina uključuje modularne poliketidne sintaze i rezultira smjesom estera 9-hidroksinonanoične kiseline s trima strukturno različitim pseudomoničnim kiselinama: A, B i C (Slika 13). U odnosu na pseudomoničnu kiselinu A, kiselina B sadrži dodatnu hidroksilnu skupinu na C8, dok kiselina C umjesto epoksidnog prstena između C10 i C11 ima dvostruku vezu¹⁹. Mupirocini su homologni tiomarinolima, prirodnim poliketidima izoliranim iz morskih sojeva roda *Pseudoalteromonas* sp.¹⁵⁷.



Slika 13. Strukture mupirocina (pseudomoničnih kiselina): (a) mupirocin A, (b) mupirocin B, (c) mupirocin C, (d) mupirocin D. Četiri mupirocina po kemijskoj su strukturi esteri moničnih kiselina (A, B i C) s 9-hidroksinonanoičnom (mupirocini A, B i D) ili 9-hidroksinon-4-enoičnom kiselinom (mupirocin D). Mupirocin A je u komercijalnoj upotrebi kao topikalni antibiotik širokog spektra za liječenje infekcija uzrokovanih Gram-pozitivnim bakterijama.

U kliničkoj upotrebi je samo ester pseudomonične kiseline A, koji se primjenjuje za liječenje širokog spektra topikalnih infekcija uzrokovanih aerobnim Gram-pozitivnim sojevima iz rodova *Staphylococcus* i *Streptococcus*, uključujući meticilin-rezistentne podsojeve^{17,18}. Baktericidna aktivnost prema Gram-negativnim sojevima rodova *Streptococcus* i *Enterococcus*, kao i pripadnicima normalne kožne mikroflore (*Micrococcus*, *Propionibacterium*), zanemariva je. Iako je u *in vitro* uvjetima zabilježena visoka antifungalna aktivnost, uključujući djelovanje prema rodu *Candida*, mupirocin još uvijek nije validiran kao antifungalni lijek¹⁵⁸. Klinička aktivnost mupirocina temelji se na kompetitivnoj inhibiciji bakterijskih IleRS. Mupirocin se veže u aktivno mjesto enzima, funkcionalno oponašajući reakcijski međuprodukt, izoleucil-adenilat, čime inhibira korak aktivacije aminokiseline³⁰. Epoksidni dio pseudomonične kiseline oponaša aminokiselinu, ostvarujući hidrofozne

interakcije u veznom mjestu izoleucina. Šesteročlani heterociklički prsten mupirocina oponaša ribozu izoleucil-adenilata te je stabiliziran snažnim vodikovim vezama s očuvanim, katalitički važnim bočnim ograncima aktivnog mjesta. Konačno, 9-hidroksinonanoična kiselina mupirocina strukturno nije analogna nijednom od supstrata, već se veže na KMSKS omču. Iako mupirocin pokazuje specifičnost prema oba tipa IleRS (bakterijskom i eukariotskom), bakterijske IleRS su znatno osjetljivije na njegovu inhibiciju. Primjerice, IleRS1 iz bakterija *P. megaterium* i *E. coli* MC4100 imaju konstante inhibicije prema mupirocinu od $K_I = 2,9 \text{ nmol dm}^{-3}$ i $K_I = 2,3 \text{ nmol dm}^{-3}$, dok IleRS2 iz *P. megaterium* i *P. fluorescens* NCIB 10586 pokazuju znatno nižu osjetljivost, s vrijednostima $K_I = 1,8 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ i $K_I = 2,5 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ – četiri reda veličine višima od onih za IleRS1.^{40,41,150} Rijetke IleRS2, kao IleRS2 iz bakterije *S. griseus*, mogu postići rezistenciju u milimolarnom području. Točan mehanizam ove iznimne rezistencije nije razjašnjen, ali je uočeno da *SgIleRS2* nema očuvan slijed katalitički važnog HXGH motiva¹². S druge strane, unatoč riješenim kristalnim strukturama *SalIleRS1* i *TtIleRS2* u kompleksu s mupirocinom, točan mehanizam prirodne razlike u osjetljivosti dva tipa IleRS još uvijek nije u potpunosti razjašnjen. Pretpostavlja se da razlika u rezistenciji dvaju tipova IleRS proizlazi iz različite afiniteta vezanja mupirocina ili iz razlika u konformacijskoj dinamici njihovih aktivnih mjesta. Mupirocin je jače stabiliziran u aktivnom mjestu IleRS1, gdje, za razliku od IleRS2, peptidna okosnica Pro46 sudjeluje u stabilizaciji hidroksilne skupine na atomu C13 mupirocina. Nadalje, 2'-hidroksilna skupina tetrahidropiranilnog prstena pseudomonične kiseline mupirocina kod IleRS1 dodatno je stabilizirana interakcijom s bočnim ogrankom asparagina iz očuvanog asparagil-lizin slijeda (NK-slijeda), smještenog nizvodno od HXGH motiva.^{13,26,28,37,152,159} Na razini konformacijske dinamike IleRS enzima, smatra se da razlika u osjetljivosti na mupirocin proizlazi iz različitog stupnja zatvorenosti dvaju aktivnih mjesta, ponajprije zbog razlika u konformaciji KMSKS omče¹⁴⁸. Tako je, primjerice, u *CaIleRS2*³¹, KMSKS omča orijentirana prema HXGH motivu te stabilizirana vodikovom vezom između Lys612 i Thr57, dok je u strukturi *TtIleRS2*²⁹ analogni Lys594 orijentiran prema otopini i ne sudjeluje u stabilizaciji konformacije KMSKS omče. Različita konformacija KMSKS omče uzrokuje razliku u prostornom položaju 9-hidroksinonanoične kiseline mupirocina u kristalnim strukturama dvaju tipova IleRS. U strukturi *SalIleRS1* u kompleksu sa *SatRNA*^{11e} i mupirocinom, 9-hidroksinonanoična kiselina orijentirana je prema KMSKS omči, pri čemu se njezina slobodna karboksilna skupina nalazi u blizini prvog lizina KMSKS motiva¹⁴⁸. Takvo vezanje 9-hidroksinonanoične kiseline ključno je za antibiotski učinak

mupirocina na IleRS1. Naime, hidrolizom mupirocina dolazi do potpunog gubitka inhibicijskog djelovanja, budući da ni 9-hidroksinonanoična ni pseudomonična kiselina ne djeluju kao inhibitori IleRS²⁵. Pretpostavlja se da je 9-hidroksinonanoična kiselina mupirocina stabilizirana interakcijama s KMSKS omčom u IleRS1 enzimima, budući da vezanje mupirocina smanjuje tripsinsku probavu *EcIleRS* na poziciji Lys605–Ser606 unutar KMSKS omče¹⁵⁰. Ipak, specifične interakcije mupirocina s KMSKS omčom nisu neupitno potvrđene u primjeru *SalIleRS1* u kompleksu s mupirocinom i tRNA^{26–28}. Moguće je da se interakcije ostvaruju tranzijentno ili da tRNA, s kojom je *SalIleRS1* kokristalizirana, utječe na vezanje mupirocina. Kod IleRS2 enzima, 9-hidroksinonanoična kiselina mupirocina "ukliještena" je u hidrofobnom kanalu kojeg čine polipeptidne okosnice HXGH i KMSKS motiva. Posljedično, stabilizacija je ograničena na nespecifične hidrofobne interakcije^{13,30}.

Budući da mupirocin ima različit mehanizam djelovanja u odnosu na druge antibiotike, pretpostavljalo se da je imun na razvoj rezistencije⁷. Međutim, već u prvim nekoliko godina kliničke upotrebe izolirani su sojevi s umjerenom ($8 \text{ ml L}^{-1} < [\text{MIC}] < 256 \text{ ml L}^{-1}$) do visokom ($[\text{MIC}] > 512 \text{ ml L}^{-1}$) rezistencijom prema mupirocinu²⁴. Visoku rezistenciju prema mupirocinu patogeni stječu prijenosom konjugativnog plazmida s lokusom *mupA*, koji kodira mupirocin-rezistentnu IleRS2¹⁶⁰. U rijetkim slučajevima, kao kod nekih pripadnika roda *Priestia* i *Oceanibacillus*, gen za mupirocin-rezistentnu IleRS2 može biti i dio genoma^{40,41}. Hidroliza mupirocina također može biti mehanizam stjecanja visoke rezistencije, budući da hidrolizom mupirocin gubi svoja inhibicijska svojstva. Ipak, dokazi o enzimskoj hidrolizi mupirocina kao mehanizmu stjecanja visoke rezistencije, još nisu pronađeni^{7,17,24,25}. Mikroorganizmi stječu nisku razinu rezistencije prema mupirocinu točkastim mutacijama u aktivnom mjestu enzima. Dobar primjer su IleRS1 enzimi iz sojeva *E. coli* MC4100 i PS102, koji se u primarnom slijedu razlikuju samo po jednoj aminokiselini – onoj na poziciji 594. Fenotip Phe594 soja MC4100, u usporedbi s fenotipom Leu594 soja PS102, rezultira otprilike deset puta većom rezistencijom soja MC4100 prema mupirocinu, što se pripisuje dodatnoj stabilizaciji konjugiranog sustava pseudomonične aomatičnim sustavom bočnog ogranka Phe594¹⁵⁰. Niska razina rezistencije ne predstavlja prepreku kliničkoj upotrebi mupirocina, budući da je topikalni pripravak formuliran s približno 20 g L^{-1} mupirocina (2 % (w/v)), što višestruko premašuje minimalnu inhibitornu koncentraciju (MIC) potrebnu za većinu patogena^{20,161}. Niskorezistentni fenotipi, nastali točkastim mutacijama u IleRS, također općesnito nisu problematični za liječenje jer se, za razliku od visokorezistentnih fenotipa, ne zadržavaju niti prenose u bakterijskoj populaciji.

§ 3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Standardne krute kemikalije

2-merkaptetanol (CAS: 60-24-2, Kat: M6250, *Sigma-Aldrich*), **agaroza** (CAS: 9012-36-6, Kat: A9539, *Sigma-Aldrich*), **akrilamid** (CAS: 79-06-1, Kat: A8887, *Sigma-Aldrich*), **amonijev klorid** (CAS: 12125-02-9, Kat: 0137407, *Kemika*), **amonijev persulfat** (CAS: 7727-54-0, Kat: 13376, *Serva*), **amonijev sulfat** (CAS: 7783-20-2, Kat: 0139707, *Kemika*), **bakto-tripton** (Kat: 16279751, *Difco*), **cinkov klorid** (CAS: 7646-85-7, Kat: 208086, *Sigma-Aldrich*), **digest kazeina** (Kat: 211610, *Gibco*), **ditiotreitol (DTT)** (CAS: 3483-12-3, Kat: D0632, *Sigma-Aldrich*), **dimetil-sulfoksid (DMSO)** (CAS: 67-68-5, Kat: D5879, *Sigma-Aldrich*), **etanol** (CAS: 64-17-5, Kat: 0528155, *Kemika*), **etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA)** (CAS: 60-00-4, Kat: E9884, *Sigma-Aldrich*), **fenilmetilsulfonilfluorid (PMSF)** (CAS: 329-98-6, Kat: P7626, *Sigma-Aldrich*), **fenol** (CAS: 108-95-2, Kat: P1037, *Sigma-Aldrich*), **glicerol** (CAS: 56-81-5, Kat: 0711901, *Kemika*), **glukoza** (CAS: 50-99-7, Kat: 0705007, *Kemika*), **imidazol** (CAS: 288-32-4, Kat: I5513, *Sigma-Aldrich*), **izopropil-β-D-tiogalaktozid (IPTG)** (CAS: 367-93-1, Kat: I6758, *Sigma-Aldrich*), **izopropanol** (CAS: 67-63-0, Kat: 1622601, *Kemika*), **kalcijev klorid** (CAS: 10043-52-4, Kat: 1161307, *Kemika*), **kalijev dihidrogenfosfat** (CAS: 7758-11-4, Kat: P8281, *Sigma-Aldrich*), **kalijev klorid** (CAS: 7447-40-7, Kat: 1120907, *Kemika*), **kloroform** (CAS: 67-66-3, Kat: 1130308, *Kemika*), **klorovodična kiselina** (CAS: 7647-01-0, Kat: 1824301, *Kemika*), **kvaščev ekstrakt** (Kat: 210929, *Difco*), **magnezijev klorid heksahidrat** (CAS: 7791-18-6, Kat: 1301707, *Kemika*), **magnezijev sulfat heptahidrat** (CAS: 10034-99-8, Kat: 1303406, *Kemika*), **N-(2-hidroksietil)piperazin-N'-2-etansulfonska kiselina (HEPES)** (CAS: 7365-45-9, Kat: H3375, *Sigma-Aldrich*), **N,N'-metilenbisakrilamid** (CAS: 110-26-9, Kat: 146702, *Sigma-Aldrich*), **N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (TEMED)** (CAS: 110-18-9, Kat: 35925, *Serva*), **natrijev acetat bezvodni** (CAS: 127-09-3, Kat: 1441908, *Kemika*), **natrijev dodecil sulfat (SDS)** (CAS: 151-21-3, Kat: L3771, *Sigma-Aldrich*), **natrijev hidroksid** (CAS: 1310-73-2, Kat: 1.06492.1000, *Merck*), **natrijev klorid** (CAS: 7647-14-5, Kat: 1417506, *Kemika*), **natrijev pirofosfat** (CAS: 7722-88-5, Kat: P8010, *Sigma-Aldrich*), **niklov (II) sulfat** (CAS: 7786-81-

4, Kat: 656895, *Sigma-Aldrich*), **octena kiselina** (CAS: 64-19-7, Kat: 1500301, *Kemika*), **piperazin-N,N'-bis(2-etansulfonska) kiselina (PIPES)** (CAS: 5625-37-6, Kat: 80635, *Sigma-Aldrich*), **tris(hidroksimetil)aminometan (Tris)** (CAS: 77-86-1, Kat: T1503, *Sigma-Aldrich*)

3.1.2. Komercijalni kompleti za kristalizaciju

Index HT (Kat: HR2-134, LOT: 2134104-55, *Hampton Research*), **JCSG+** (Kat: MD1-37, *Molecular Dimensions*), **Natrix HT** (Kat: HR2-131, LOT: 213134-55-16, *Hampton Research*), **PEG/Ion HT** (Kat: HR2-139, LOT: 213958-57-22, *Hampton Research*), **SaltRX HT** (Kat: HR2-136, LOT: 213664-19-19, *Hampton Research*)

3.1.3. Makromolekulski precipitanti

2-metil-2,4-pentandiol (MPD) (CAS: 107-41-5, Kat: 8.20819, *Sigma-Aldrich*), **dinatrijeva sol poliakrilne kiseline $M_r \sim 5100$** (CAS: 9003-04-7, Kat: 447013, *Sigma-Aldrich*), **dinatrijeva sol poliakrilne kiseline $M_r \sim 8000$** (CAS: 9003-04-7, Kat: 416029, *Sigma-Aldrich*), **etilen-glikol (EG)** (CAS: 107-21-1, Kat: 102466, *Sigma-Aldrich*), **pentaeritritol-propoksilat (5/4 PO/OH)** (CAS: 9051-49-4, Kat: 418749, *Sigma-Aldrich*), **polietilen glikol 400 (PEG400)** (CAS: 25322-68-3, Kat: 202398, *Sigma-Aldrich*), **polietilen glikol $M_r \sim 1000$ (PEG1K)** (CAS: 25322-68-3, Kat: 81188, *Sigma-Aldrich*), **polietilen glikol $M_r \sim 3350$ (PEG3.35K)** (CAS: 25322-68-3, Kat: P4338, *Sigma-Aldrich*), **polietilen glikol $M_r \sim 8000$ (PEG8K)** (CAS: 25322-68-3, Kat: 89510, *Sigma-Aldrich*), **polietilen glikol $M_r \sim 10000$ (PEG10K)** (CAS: 25322-68-3, Kat: 92897, *Sigma-Aldrich*), **polietilen glikol $M_r \sim 20000$ (PEG20K)** (CAS: 25322-68-3, Kat: 95172, *Sigma-Aldrich*), **polipropilen glikol $M_r \sim 400$** (CAS: 25322-69-4, Kat: 81350, *Sigma-Aldrich*)

3.1.4. Kromatografske kolone, smole i pločice za tankoslojnu kromatografiju

Kolona za afinitetnu kromatografiju **HisTrap HP 5 ml** (Kat: 17-5247-01, *Cytiva*), kolona s jakim anionskim izmjenjivačem **MonoQ** (Kat: 17-0556-01, *Pharmacia*), kolona za gel filtraciju **Superdex™ 200 10/300GL** (Kat: 17-5175-01, *GE Healthcare*), pločice za tankoslojnu kromatografiju **Polygram CEI300 PEI/UV₂₅₄** (Kat: 801063, 20 x 20 cm; 0,1 mm sloj celuloza MN300 polietilenimina, *Macherey-Nagel*), smola za afinitetnu kromatografiju **Protino Ni-NTA agarose** (Kat: 745400, *Macherey-Nagel*)

3.1.5. Ostali materijali

Centrifugalni filteri Amicon Ultra-15 MWCO = 50 kDa (Kat: UFC9050, *Merck-Millipore*), **kromatografski papir Whatman 3MM Chr** (Kat: WHA3001861, *Whatman*), **mikrotitarske pločice U-oblika volumena 280 µl** (Kat: 390963, *Kisker-Biotech*), **sterilni filteri za špricu promjera pore 0,22 µm** (Kat: 9911-1302, *Whatman*), **zaslon s pohranjenim fosforom** (Kat: BAS-IP MS 3543E, *GE Healthcare*)

3.1.6. Boje

Bromfenol plavo (CAS: 115-39-9, Kat: B0126, *Sigma-Aldrich*), **Coomassie Brilliant blue R-250** (CAS: 6104-58-1, Kat: 1154440025, *Sigma-Aldrich*), **ksilencijalno-FF** (CAS: 2650-17-1, Kat: X4126, *Sigma-Aldrich*), pufer za agaroznu elektroforezu **Gel Loading Dye, Purple (6X)**, **no SDS** (Kat: B7025S, *NEB*), **GelRed®** (CAS: 163795-75-3, Kat: 37-41001, *Biotium*)

3.1.7. Enzimi i komercijalni reakcijski puferi

BamHI (Kat: R0136S, *NEB*), **DpnI** (Kat: R0176S, *NEB*), **HindIII** (R0104S, *NEB*), **lizozim iz bjelanjka jajeta** (Kat: 10837059001, *Roche*), **NdeI** (Kat: R0111S, *NEB*), **NheI-HF** (Kat: R3131S, *NEB*), **Phusion® DNA polimeraza** (Kat: F530S, *Thermo Fisher Scientific*), **rekombinantna alkalna fosfataza iz škampa (rSAP)** (engl. *Recombinant Shrimp Alkaline Phosphatase*) (Kat: N0371S, *NEB*), **reakcijski pufer rCutSmart** (Kat: B6004S, *NEB*), **reakcijski pufer NEBuffer r3.1** (Kat: B6003S, *NEB*), **RNazaA** (Kat: 55674, *Merck-Millipore*), **SalI** (R0138S, *NEB*), **serumski albumin goveda (BSA)** (engl. *Bovine Serum Albumin*) (Kat: B9000S, *NEB*), **T4-DNA ligaza** (Kat: 2011B, *TaKaRa*), **T4-polinukleotid kinaza** (Kat: EK0032, *Thermo Fisher Scientific*), **Taq-DNA polimeraza** (Kat: EP0401, *Thermo Fisher Scientific*), **termostabilna anorganska pirofosfataza (TIPP)** (engl. *Thermostable Inorganic Pyrophosphatase*) (Kat: N0296S, *NEB*), **XhoI** (Kat: R0146S, *NEB*)

3.1.8. Komercijalni kompleti za pročišćavanje nukleinskih kiselina

Komplet za izolaciju plazmidne DNA **Qiaprep Spin Mini Prep Kit** (Kat: 27106X4, *Qiagen*) i komplet za pročišćavanje reakcijske smjese lančane reakcije polimerazom **QiaQuick PCR Purification Kit** (Kat: 28104, *Qiagen*)

3.1.9. Radioaktivne kemikalije

[³²P]-natrijev pirofosfat, 10 mCi (370 MBq) (Kat: NEX019010MC, *PerkinElmer*)

3.1.10. Hranjive podloge i mediji za uzgoj bakterijskih kultura

Za uzgoj bakterijskih kultura u tekućim i na krutim hranjivim podlogama korišteni su sljedeći hranjivi mediji:

- **Hranjivi medij *Luria-Bertani* (LB):** 5 g dm⁻³ ekstrakt kvasca, 10 g dm⁻³ natrijev klorid, 10 g dm⁻³ bakto-tripton
- **Hranjivi medij *Luria-Bertani* s magnezijevim kloridom (LB/Mg):** Za potrebe pojačane ekspresije proteina, standardni LB medij suplementiran je s 1 mmol dm⁻³ magnezijeva klorida, što je pridonijelo gustoći stanica tijekom rasta.
- **Hranjivi medij *Cornybacterium* (DSM medij 53):** 10 g dm⁻³ digest kazeina, 5 g dm⁻³ ekstrakt kvasca, 5 g dm⁻³ glukoza, 5 g dm⁻³ natrijev klorid. Nakon priprave, a prije steriliziranja medija, pH-indikatorom je provjereno da je pH vrijednost u rasponu između 7,2 i 7,4 te je medij po potrebi titriran s kiselinom ili lužinom. Ovaj medij je korišten za uzgoj bakterije *Deinococcus radiodurans* R1 (DSM: 20539) pri temperaturi 30 °C.
- **Hranjivi medij SOB (engl. Super Optimal Broth):** 20 g dm⁻³ bakto-tripton, 5 g dm⁻³ ekstrakt kvasca, 0,584 g dm⁻³ NaCl, 0,186 g dm⁻³ KCl. Nakon sterilizacije autoklaviranjem, medij je u sterilnim uvjetima dodatno suplementiran s 10 mmol MgCl₂ i 10 mmol dm⁻³ MgSO₄. SOB medij je korišten za oporavak stanica nakon transformacije stanica elektroporiranjem (Poglavlje 3.2.2.4) ili kemijskom transformacijom (Poglavlje 3.2.2.5), odnosno za pripravu kompetentnih stanica bakterije *E. coli* (Poglavlje 3.2.2.3).

Tekući mediji su nakon priprave sterilizirani autoklaviranjem pri temperaturi 121 °C u trajanju 20 minuta. Ohlađeni mediji su po potrebi u sterilnim uvjetima suplementirani sterilnim antibioticima: ampicilinom (100 µg ml⁻¹), kanamicinom (30 µg ml⁻¹) ili kloramfenikolom (34 µg ml⁻¹). Kruti hranjivi mediji na pločama pripremljeni su na jednak način kao i tekući mediji, osim što je tijekom pripreme dodan agar (15 g dm⁻³). Nakon sterilizacije, medij s agarom djelomično je ohlađen na temperaturu ~50 °C i po potrebi suplementiran antibioticima te je u sterilnim uvjetima izlijevan u jednokratne sterilne Petrijeve zdjelice. Petrijeve zdjelice su ostavljene nepomične do potpune polimerizacije agara, nakon čega su umotane u foliju te pohranjene u hladnjaku na temperaturi 4 °C do mjesec dana.

3.1.11. Klonirajući i ekspresijski sojevi bakterije *Escherichia coli*

BL21(DE3) [$F^- ompT hsdS_B (r_B^- m_B^-) gal dcm$ (DE3)] (Kat: 69450, Novagen): Standardni ekspresijski soj bakterije *Escherichia coli* ($\geq 10^7$ CFU / μ g pUC18) koji omogućuje pojačanu ekspresiju kodirajućih sljedova kloniranih u vektore pET-serije (T7-promotor) uporabom izopropil- β -D-tiogalaktopiranozida (IPTG) kao induktora (*lacI^q*). Soj sadrži DE3, λ -profag koji nosi kodirajući slijed za gen za T7-RNA-polimerazu pod kontrolom inducibilnog promotora *lacUV5*. Smanjena razgradnja pojačano eksprimiranih proteina osigurana je delecijom gena za proteaze vanjske membrane: *lon* i *ompT*.

Rossetta™ 2 (DE3) [$F^- ompT hsdS_B (r_B^- m_B^-) gal dcm$ (DE3) pRARE2 (Cam^R)] (Kat: 71397, Novagen): Ekspresijski soj bakterije *Escherichia coli* ($\geq 10^7$ CFU / μ g pUC18) koji omogućava prekomjernu ekspresiju kodon-neoptimiranih kodirajućih sljedova u vektorima pET-serije (T7-promotor). Uvjeti indukcije i ekspresije identični su onima primijenjenima za soj BL21(DE3). Poput BL21(DE3), soj je deficijentan za proteaze vanjske membrane *lon* i *ompT*. Soj sadrži visokokopijski plazmid pRARE2 (Cam^R) koji kodira za *argU*, *argW*, *ileX*, *glyT*, *leuW*, *proL*, *metT*, *thrT*, *tyrU* i *thrU*, tako suplementirajući tRNA za rijetke kodone: AGG, AGA, AUA, CUA, CCC i GGA.

XL10-Gold [Tet^R $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac$ Hte [F' *proAB lacI^q Z* $\Delta M15$ Tn10 (Tet^R) Amy Cam^R] (Kat: 200317, Agilent): Visokoučinkoviti klonirajući soj bakterije *Escherichia coli* ($\geq 10^9$ CFU / μ g pUC18) namijenjen za kloniranje velikih plazmida i ligacijskih smjesa uz visoku učinkovitost transformacije (Hte). Soj je deficijentan za sve poznate restriksijske sustave (Tet^R $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$) te za endonukleazu *endA*, čime se povećava stabilnost transformirane plazmidne DNA. Genotip F' *proAB lacI^q Z* $\Delta M15$ omogućuje plavo-bijelu selekciju transformanata.

3.1.12. Plazmidi

pET28b(+) (Kat: 69865-3, EMD Bioscience): niskokopijski ekspresijski vektor iz serije pET s ishodištem replikacije ColE1 iz plazmida pBR322. Omogućuje ekspresiju proteina s N- ili C-terminalnim heksahistidinskim privjeskom pod kontrolom T7-promotora. Plazmid nosi gen za aminoglikozid-fosfotransferazu (Kan^R) te omogućava selekciju s kanamicinom. U okviru disertacije korišten je za prekomjernu ekspresiju proteina s N-terminalnim heksahistidinskim privjeskom.

pET28b(+)-PmIleRS1 i **pET28b(+)-PmIleRS2**: derivati niskokopijskog plazmida pET28b(+) s umetnutim kodirajućim slijedovima za divlje tipove IleRS1 i IleRS2 iz bakterije *P.*

megaterium (*PmIleRS1*, wt-HMGH-*PmIleRS1*; odnosno *PmIleRS2*, wt-HVGH-*PmIleRS2*) kloniranim između restrikcijskih mjesta *NheI* i *XhoI* (za *PmIleRS1*), odnosno *NdeI* i *XhoI* (za *PmIleRS2*). Plazmidi omogućuju ekspresiju proteinâ s N-terminalnim heksahistidinskim privjeskom. Korišteni su za pojačanu ekspresiju divljih tipova enzima i kao kalupi za mutagenezu. Plazmide je ustupio dr. sc. Vladimir Zanki.

pET28b(+)-H64G-G66H-*PmIleRS1*: derivat niskokopijskog plazmida pET28b(+) s kodirajućim slijedom dvostrukog mutanta H64G i G66H *IleRS1* iz bakterije *P. megaterium* (mut-H64G-G66H-*PmIleRS1*) kloniranim između restrikcijskih mjesta *NheI* i *XhoI*. Plazmid omogućuje pojačanu ekspresiju mutanta s N-terminalnim heksahistidinskim privjeskom, za što je korišten u okviru ove disertacije. Plazmid je ustupio dr. sc. Vladimir Zanki.

pTwist^{Amp} HC (Kat: N/A, *Twist Bioscience*): visokokopijski klonirajući vektor s ishodištem replikacije pMB1 i ampicilinom kao selekcijskim markerom. Plazmid je razvila tvrtka *Twist Bioscience*, San Francisco, a služi kao nosač nukleotidnih sljedova koje dobavljač sintetizira. U okviru ove disertacije korišteni su plazmidni vektori s mutagenim *NdeI-XhoI* kazetama H61G (pTwist^{Amp} HC_*DrF1*) te A59H-L60V-H61G (pTwist^{Amp} HC_*DrF2*) izoleucil-tRNA-sintetaze tipa 2 iz bakterije *Deinococcus radiodurans* R1 (*DrIleRS2*) ugrađenim između sljedova za početnice Twist_F i Twist_R (Poglavlje 3.2.3.9).

pUC18(+) (Kat: 50004, *AddGene*): visokokopijski klonirajući plazmid iz serije pUC vektora s ishodištem replikacije *ori*. Plazmid nosi gen za β -laktamazu (Amp^R) te omogućava probir na antibiotskim pločama s ampicilinom, karbecilinom i sličnim antibioticima iz porodice β -laktama. Mjesto za višestruko kloniranje nalazi se unutar gena za α -podjedinicu β -laktamaze pod kontrolom *lac*-promotora, što omogućava plavo-bijelu selekciju sojeva s *lacZ* Δ M15 fenotipom na hranjivim podlogama s 5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozidom (XGAL). U sklopu ove disertacije korišten je za kontrolu kemijske- ili elektrokompetentnosti bakterijskih stanica.

TEx18A07 (Kat: THR007207, *Riken BRC*): komercijalni plazmidni vektor pET21a(+) u koji je između restrikcijskih mjesta *NdeI* i *BlpI* kloniran kodirajući slijed izoleucil-tRNA-sintetaze tipa 2 iz bakterije *Thermus thermophilus* HB8 (*TtIleRS2*). Plazmid je kupljen iz međunarodne zbirke plazmida koju održava *Riken BRC* kroz nacionalni projekt osiguran sredstvima zaklada NEXT/AMED, Japan. U sklopu disertacije, kodirajući slijed za *TtIleRS2* iz ovog plazmida prekloniran je u vektor pET28b(+).

3.1.13. Antibiotici

Ampicilin (CAS: 69-53-4, Kat: A9393, *Sigma-Aldrich*), **kanamicin sulfat** (CAS: 70560-51-9, Kat: 60615, *Sigma-Aldrich*), **kloramfenikol** (CAS: 56-75-7, Kat: C0378, *Sigma-Aldrich*), **mupirocin litijeva sol** (CAS: 73346-79-9, Kat: 07188, *Sigma-Aldrich*), **mupirocin** (CAS: 12650-69-0, Kat: APA4718.0025, *Applichem Panreac*)

3.1.14. Aminokiseline, nukleotidi, sintetski oligonukleotidi

Adenozin-5'-trifosfat (ATP) (CAS: 34369-07-8, Kat: A2383, *Sigma-Aldrich*), **izoleucin** (CAS: 73-32-5, Kat: 58879, *Sigma-Aldrich*), **sintetski oligonukleotidi** pročišćeni odsoljenjem (<35 nt) ili na MOPC patroni (>35 nt) naručeni su od dobavljača *Macrogen Inc.* ili *Microsynth AG*

3.1.15. Analози reakcijskog međuprodukta *IleRS*

5'-O-(N-(L-izoleucil)sulfamoil)adenozin (5'-O-Ile-AMS) i **5'-O-(N-(L-valil)sulfamoil)adenozin (5'-O-Val-AMS)** sintetizirani su na Zavodu za organsku kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, prema smjernicama u ¹³⁶.

3.2. Metode

3.2.1. Metode evolucijske biologije²

Radi konstrukcije filogenetskog stabla bakterijskih i arhejskih izoleucil-tRNA-sintetaza (IleRS), iz javno dostupne baze UniProt¹⁶² [\[Hiperlink 1\]](#) preuzeto je 738 proteinskih sljedova. Baza je pretražena ručno i uz pomoć BLAST algoritma¹⁶³ [\[Hiperlink 2\]](#). Ako su bili dostupni, preferirani su proteinski sljedovi iz ručno kuriranih baza UniProtKB/SwissProt ili RefSeq. Prikupljeni sljedovi potom su obrađeni prema opisu u ¹³⁶, što je ovdje ukratko izloženo. Korištenjem alata HMM search (SV: 2.4.1.2)¹⁶⁴ uz Pfam HMM profil PF00133¹⁶⁵ identificirani su sljedovi katalitičkih domena IleRS. Nepotpune sekvence ručno su uklonjene, a preostale su klasterirane na 70 % identiteta pomoću alata CD-HIT (SV: 4.8.1)¹⁶⁶. Takvom neredundantnom skupu od 370 sljedova IleRS dodatno su pridružene sekvence četiri valil-tRNA-sintetaze (ValRS). Konačni set višestruko je poravnat korištenjem alata MAFFT (SV: 7.50)¹⁶⁷ uz opciju „--linsi“. Pomoću alata TrimAI (SV: 1.2)¹⁶⁸ i opcije „-gappyout“ uklonjene su praznine u poravnanju. Filogenetsko stablo konstruirano je metodom maksimalne vjerojatnosti (ML) (engl. *Maximum Likelihood*) prema evolucijskom modelu JTT (*Jones-Taylor-Thornton*), pomoću alata FastTree (SV: 2.1)¹⁶⁹ uz parametre „--pseudo“, „--spr4“, „--slownni“, „--mlacc2“. Filogenetsko stablo ukorijenjeno je korištenjem sljedova ValRS i anotirano u programskom paketu iTOL (SV: 6.7)¹⁷⁰.

3.2.2. Rad s nepatogenim genetski modificiranim organizmima (np-GMO)

Rad s bakterijskim kulturama u tekućim medijima i na krutim hranjivim podlogama provodio se u skladu s preporukama navedenim u laboratorijskom priručniku: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*¹⁷¹. S bakterijskim kulturama radilo se u laminarnom ormaru s uključenim puhanjem i izvorom otvorenog plamena. Kako bi se spriječila kontaminacija kultura kompetitivnim sojevima i plijesnima, materijali i alati koji su dolazili u kontakt s bakterijskim kulturama sterilizirani su autoklaviranjem, spaljivanjem u otvorenom plamenu ili

² Filogenetska analiza provedena je u suradnji s dr. sc. Jagodom Jablonskom, *Weizmann Institute of Science*, 7610001, Rehovot, Israel. Dr. sc. Jablonska provela je poravnanje sljedova te konstrukciju filogenetskog stabla, dok je autor disertacije proveo pretraživanje baza podataka, filtriranje i anotaciju sljedova te anotaciju i grafičku obradu filogenetskog stabla.

dezinfekcijom s apsolutnim etanolom. Selektivni markeri i antibiotici primjenjivani su u slučajevima kada je to dopuštao fenotip bakterijskog soja. Budući da su se u eksperimentalnom radu koristili genetski modificirani organizmi, posebna je pažnja posvećena biološkoj sigurnosti i sprječavanju njihova nekontroliranog ispuštanja u okoliš. Prije odlaganja, tekuće su kulture inaktivirane otopinom 5 % (v/v) natrijeva hipoklorita tijekom noći, a krute bakterijske podloge autoklavirane 30 minuta pri 120 °C. Radne površine u kontaktu s bakterijskim kulturama sterilizirane su apsolutnim etanolom.

3.2.2.1. *Uvjeti uzgoja bakterijskih kultura*

Za potrebe uzgoja na krutim podlogama, glicerolska kultura željenog soja razmazana je u sterilnim uvjetima po pločama s krutim hranjivim medijem. Ploče su inkubirane tijekom noći pri temperaturi 37 °C. Za uzgoj u tekućoj kulturi, sterilni tekući medij inokuliran je glicerolskom kulturom željenog soja ili pojedinačnim kolonijama s krutih podloga. Tekuće su kulture uzgajane uz aeraciju protresanjem, u pravilu pri 250 okretaja u minuti i temperaturi od 37 °C, osim tijekom indukcije ekspresije proteina, kada su protresane pri 200 okretaja u minuti na specifičnoj temperaturi indukcije. Volumen tikvica za uzgoj biran je tako da premašuje pet volumena bakterijske kulture, kako bi se spriječilo prolijevanje i osigurala kvalitetna aeracija.

3.2.2.2. *Dugoročna pohrana bakterijskih kultura*

Bakterijske su kulture dugoročno pohranjene u obliku glicerolskih kultura. Zasićena kultura željenog soja u stacionarnoj fazi rasta ohlađena je inkubacijom na ledu te, u sterilnim uvjetima rada, pomiješana ekvivolumno sa sterilnom 50 % (v/v) otopinom glicerola, nakon čega je pohranjena u kriogenom hladnjaku na –80 °C.

3.2.2.3. *Priprema kompetentnih stanica bakterije E. coli*

Kompetentnost bakterijskih stanica označava njihovu sposobnost za unos strane DNA metodom elektroporacije (Poglavlje 3.2.2.4) ili kemijskom transformacijom (Poglavlje 3.2.2.5). Početni koraci pripreme kemijski i elektrokompetentnih stanica su identični te uključuju pripravu sterilnog taloga bakterijskih stanica u ranoj logaritamskoj fazi rasta ($0,4 < OD_{600} < 0,6$)¹⁷². Za potrebe eksperimentalnog rada pripremljene su elektrokompetentne stanice ekspresijskih sojeva BL21(DE3) i Rosetta2 (DE3) te kemijski kompetentne stanice klonirajućeg soja XL10-Gold bakterije *Escherichia coli*. Priprava elektrokompetentnih stanica provedena je prema ¹⁷¹, dok je za pripremu kemijski kompetentnih stanica korišten *Inoueov* protokol¹⁷³. Soj BL21(DE3) uzgajan je u SOB-mediju bez antibiotika, dok je medij za uzgoj sojeva Rosetta2

(DE3) te XL10-Gold bio suplementiran kloramfenikolom (Poglavlje 3.1.11). Do postizanja rane eksponencijalne faze rasta, bakterijske su kulture uzgajane pri 37 °C (elektrokompetentni sojevi), odnosno 18 °C (kemijski kompetentni sojevi). Talog elektrokompetentnih stanica dva je puta temeljito ispran s 10 ml hladne sterilne otopine 10 % (v/v) glicerola, dok je talog kemijski kompetentnih stanica ispran jednom s 20 ml sterilnog transformacijskog pufera (10 mmol dm⁻³ PIPES pH=6,7 pri 20 °C, 250 mmol dm⁻³ KCl, 55 mmol dm⁻³ MnCl₂, 15 mmol dm⁻³ CaCl₂). Isprane stanice su istaložene centrifugiranjem i resuspendirane u 2 ml ohlađene otopine 10% (v/v) glicerola (elektrokompetentne stanice) ili 4 ml ohlađene otopine transformacijskog pufera. U suspenziju kemijski kompetentnih stanica postupno je dodano još 375 µl 100 % dimetil-sulfoksida (DMSO). Ovako pripravljene suspenzije bakterijskih stanica alikvotirane su (100 µl) u ohlađene sterilne mikroepruvete. Suspenzije su potom smrznute u tekućem dušiku i pohranjene u kriogenom hladnjaku na temperaturi -80 °C do upotrebe. Prije upotrebe kompetentnih stanica u eksperimentima, određena im je kompetentnost (Poglavlje 3.2.2.6).

3.2.2.4. Transformacija elektrokompetentnih stanica

Transformacija elektrokompetentnih stanica stranom DNA (elektroporacija) temelji se na kratkotrajnom povećanju propusnosti membrane bakterijskih stanica pod utjecajem jakog električnog polja. Alikvot elektrokompetentnih stanica sojeva BL21(DE3) ili Rosetta2 (DE3) odmrznut je na ledu, nakon čega je dodano 10–50 ng plazmidne DNA u obliku koncentrirane otopine. Stanice su inkubirane na ledu 5 minuta, a zatim prenesene u ohlađenu elektrokivetu s razmakom elektroda od 4 mm. Stanice u elektrokiveti podvrgnute su kratkotrajnom električnom pulsu (6 ms) jačine 2,49 kV cm⁻¹ pomoću elektroporatora (*Bio-Rad*). Nakon pulsa, stanice su resuspendirane u 500 µl SOB-medija te oporavljane 60 minuta uz protresanje pri 300 okretaja u minuti pri temperaturi 37 °C. Alikvoti oporavljene bakterijske kulture (10–50 µl) nanjeni su na selektivne krute hranjive podloge (Poglavlje 3.1.10).

3.2.2.5. Transformacija kemijski kompetentnih stanica

Transformacija kemijski kompetentnih stanica stranom DNA temelji se na kratkotrajnom povećanju propusnosti bakterijske membrane uslijed neletalnog temperaturnog šoka. Alikvot kemijski kompetentnih stanica soja XL10-Gold odmrznut je na ledu, nakon čega je, bez resuspenzije stanica, dodano 10–50 ng plazmidne DNA u obliku koncentrirane otopine. Stanice su inkubirane na ledu 30 minuta nakon čega su podvrgnute temperaturnom šoku na 42 °C u trajanju točno 30 sekundi. Nakon temperaturnog šoka, stanice su dodatno inkubirane na ledu 5

minuta, zatim resuspendirane u 500 µl SOB-medija i oporavljane jedan sat uz protresanje pri 300 okretaja u minuti pri temperaturi 37 °C. Alikvoti bakterijske kulture (15–50 µl) nanášeni su na selektivne krute hranjive podloge (Poglavlje 3.1.10).

3.2.2.6. *Provjera kompetencije kemijski kompetentnih i elektrokompetentnih stanica*

Kompetentnost bakterijskih stanica predstavlja njihovu sposobnost stvaranja kolonija (CFU, engl. *Colony Forming Units*) nakon transformacije stanica poznatom masom kontrolnog plazmida. Kao kontrolni plazmid korišten je pUC18 (Poglavlje 3.1.12). Alikvoti kemijski i elektrokompetentnih stanica transformirani su poznatom masom plazmida pUC18 metodom elektroporacije (Poglavlje 3.2.2.4) ili kemijskom transformacijom (Poglavlje 3.2.2.5). Nakon oporavka u SOB-mediju, poznati volumen kulture razmazan je na selektivne krute hranjive podloge s antibiotikom. Ploče su inkubirane preko noći pri temperaturi 37 °C, a sljedeći su dan izbrojene pojedinačne kolonije na njima. Kompetencija je izračunata po formuli:

$$E \text{ [CFU/}\mu\text{g]} = \frac{N(\text{CFU})}{\frac{V_p}{V_o} \times m(\text{pUC18}) \text{ [}\mu\text{g]}}$$

pri čemu je *E* – kompetencija stanica izražena u [CFU µg⁻¹], a temelji se na sljedećim eksperimentalnim parametrima: *N*(CFU) – broj pojedinačnih kolonija na pločama, *V_p* – volumen suspenzije stanica nanášene na krutu hranjivu podlogu, *V_o* – volumen medija u kojem su stanice oporavljane nakon transformacije i *m*(pUC18) – masa transformiranog plazmida pUC18 izraženu u [µg]. Očekivana kompetencija bakterijskih stanica iznosi 10⁶–10⁸ CFU µg⁻¹ pUC18.

3.2.3. *Metode rada s DNA*

3.2.3.1. *Izolacija plazmidne DNA upotrebom komercijalnih kompleta*

Za izolaciju plazmidne DNA iz zasićene kulture bakterijskih stanica korišten je komercijalni komplet QIAprep Spin Miniprep Kit (*Qiagen*), sukladno uputama proizvođača, uz iznimku da je plazmidna DNA s kolone eluirana u 30 µL pufera EB umjesto preporučenih 50 µL, radi povećanja koncentracije izolirane DNA.

3.2.3.2. *Agarozna gel-elektroforeza*

Gelovi s 1 - 2 % (w/v) agaroze pripravljeni su izlijevanjem vruće otopine agaroze u TAE puferu (40 mmol dm⁻³ Tris-HCl, pH = 8,0 pri 20 °C, 1 mmol dm⁻³ EDTA) u kalup za izlijevanje

agaroznih gelova (*Thermo Fisher Scientific*). Prije polimerizacije gela umetnut je češljic za formiranje jažica, a gel je potom ostavljen da polimerizira. Nakon polimerizacije, gel je pohranjen i čuvan u TAE puferu do najviše mjesec dana. Uzorci za elektroforezu pripremljeni su miješanjem uzorka nukleinskih kiselina (20–200 ng) s 1/6 volumena pufera za nanošenje uzoraka Gel Loading Dye, Purple (6X), no SDS (*NEB*), suplementiranog s 60 mg dm⁻³ interkalacijske boje GelRed (*Biotium*). Nakon nanošenja uzoraka u jažice gela, elektroforeza je provedena u TAE puferu pri 120 V tijekom 45 minuta za gelove duljine 10 cm.

3.2.3.3. Izolacija genomske DNA iz taloga bakterijskih stanica

Izolacija genomske DNA iz taloga bakterijskih stanica provedena je prema dostupnom protokolu¹⁷⁴. Konačni talog izolirane genomske DNA resuspendiran je u TE puferu sastava 10 mmol dm⁻³ Tris-HCl, pH = 8,0 pri 20 °C, 0,1 mmol dm⁻³ EDTA. Koncentracija i čistoća izolirane DNA provjerene su spektrofotometrijski (Poglavlje 3.2.3.4) i agaroznom elektroforezom (Poglavlje 3.2.3.2).

3.2.3.4. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije nukleinskih kiselina

Masena koncentracija pročišćenih uzoraka DNA određena je spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 260 nm na uređaju NanoDrop One (*Thermo Fisher Scientific*). Kvaliteta pročišćenih nukleinskih kiselina procijenjena je na temelju omjera A_{260} / A_{280} i A_{260} / A_{230} . Omjer $A_{260} / A_{280} > 1,8$ za DNA upućuje na odsutnost proteinske kontaminacije, dok omjer $A_{260} / A_{230} > 2$ ukazuje na čistoću uzorka obzirom na moguće organske kontaminante (npr. fenol, kloroform)¹⁷⁵. Za mjerenje koncentracije i čistoće, nukleinske kiseline su uvijek otapane u TE puferu (10 mmol dm⁻³ Tris-HCl, pH = 8,0 pri 20 °C, 0,1 mmol dm⁻³ EDTA), budući da je poznato da ionska jakost i pH vrijenost pufera mogu značajno utjecati na izmjerene vrijednosti¹⁷⁶.

3.2.3.5. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Metoda lančane reakcije polimerazom (PCR, engl. **P**olymerase **C**hain **R**eaction)¹⁷⁷ u ovom je radu korištena za umnažanje kodirajućeg slijeda *ileS2* iz genomske DNA bakterije *Deinococcus radiodurans* R1 (*DrIleRS2*), umnažanje sintetskih kazeta za kazetnu mutagenezu *DrIleRS2* (Poglavlje 3.2.3.9) te umnažanje slijeda *ileS2* s plazmida TEx18A077. Početnice (Tablica 2) su dizajnirane tako da sadrže 15–20 nukleotida komplementarnih kalupu, uz sastav GC nukleotida od 40–60 % i razliku temperatura mekšanja dvaju početnica ne veću od 5 °C. Općenito, početnice su dizajnirane vodeći se načelima opisanima u literaturi¹⁷⁸. Na 5'-krajevima početnica

dodani su slijedovi restrikcijskih mjesta za pogodnu endonukleazu (Tablica 3) te repetitivni slijedovi 5'-(GA)₃-3' ili 5'-(GT)₃-3' koji poboljšavaju vezanje restrikcijskih nukleaza na uvedeno restrikcijsko mjesto. Korištenjem internetskog servisa Oligocalc (SV: 3.27)¹⁷⁹, dostupnog na [\[Hiperlink 3\]](#), potvrđeno je da početnice ne tvore sekundarne strukture zbog palindromskih, ponavljajućih ili obrnuto ponavljajućih slijedova. Jednolančane oligonukleotide DNA sintetizirale su po narudžbi tvrtke *Macrogen Europe B.V.* ili *Microsynth AG*. Za PCR umnažanje korištena je komercijalno dostupna DNA-polimeraza Phusion (*Thermo Fisher Scientific*). Reakcija umnažanja postavljena je prema uputama proizvođača, na način koji je naveden u tablici 4. Za umnažanje slijedova s umjerenim udjelom GC parova baza korišten je HF pufer u kojem polimeraza ima najveću deklariranu točnost, dok je za umnažanje zahtjevnih, GC-bogatih slijedova (> 60 % GC) korišten GC pufer. Za umnažanje slijedova s plazmida korišteno je 10 ng, dok je za umnažanje slijedova s genomske DNA korišteno 50 ng kalupa. Reakcija je provedena u uređaju za PCR prema programu navedenom u tablici 5. Temperatura sparivanja početnica određena je upotrebom nekomercijalnog servisa Thermo Scientific *T_m-calculator*, dostupnog na [\[Hiperlink 4\]](#), pri čemu je za izračun korišten samo kalupu komplementaran slijed. Temperatura sljepljivanja početnica bila je 5 °C niža od temperature mekšanja početnice s nižom temperaturom mekšanja. Ukoliko je temperatura sljepljivanja početnica bila viša od 70 °C, PCR ciklus modificiran je tako da su koraci sljepljivanja početnica i ekstenzije spojeni u jedan korak, proveden pri 72 °C, prema načelu dvostupanjskog PCR-a (engl. *two-step PCR*). Produkti lančane reakcije polimeraze provjereni su agaroznom elektroforezom (Poglavlje 3.2.3.2) kako bi se potvrdilo prisustvo produkta te njegova odgovarajuća veličina i čistoća.

Tablica 2. Početnice korištene za umnažanje sljedova *ileS* i tRNA^{Ile} s različitim kalupa. Crveno su označeni repetitivni dinukleotidi, podebljano su označena mjesta vezanja restrikcijskih enzima, dok je normalnim tekstom označen dio početnice komplementaran kalupu.

Ime početnice	Slijed početnice 5' → 3'	GC / %	T _m / °C
Twist_F	GAAGTGCCATTCCGCCTGACCT	59	70
Twist_R	CACTGAGCCTCCACCTAGCCT	62	69
T7_F	TAATACGACTCACTATAGGG	40	56
BlpI_TtileS2_R	GTGTGTGTCG ACCAGCCGGATCATTATTAC	50	56
NdeI_DrileS2_F	GAGAGACATATG ACCAAACGTACCTTC	44	52
BamHI_DrileS2_R	GAGAGAGGATCCT CAAAGCTTCTTGAGCGT	50	60
XhoI_ΔSD3_PmileS1_R	GAGAGACTCGAGT TAACTTACAACAATTGAAGC ATAGC	39	62
NheI_PmileS1_F	GAGAGAGGCTAG CATGGAATATAAAGATACAT TATTGATGCC	38	62

Tablica 3. Postavljene reakcije PCR umnažanja

Ime početnice	Kalup	PCR produkt	bp	GC / %
Twist_F	pTwist ^{Amp} HC_DrF1	DrF1	452	62
Twist_R	[pTwist ^{Amp} HC_DrF2]	[DrF2]	[452]	[62]
T7_F	TEx18A077	TtileS2	3305	65
BlpI_TtileS2_R				
NdeI_DrileS2_F	<i>D. radiodurans</i> gDNA	DrileS2	3258	66
BamHI_DrileS2_R				
XhoI_ΔSD3_PmileS1_R	pET28b(+)_PmileS1	ΔSD3-PmileS1	2669	41
NheI_PmileS1_F				

Tablica 4. Sastav reakcijske smjese za PCR umnažanje slijeda s plazmida ili genomske DNA

Komponenta reakcije	Volumen	Finalna koncentracija
5× HF pufer + 7.5 mmol dm ⁻³ MgCl ₂ [5× GC pufer + 7.5 mmol dm ⁻³ MgCl ₂]	10 μl [10 μl]	1× HF + 1.5 mmol dm ⁻³ MgCl ₂ [1× GC + 1.5 mmol dm ⁻³ MgCl ₂]
10 μmol dm ⁻³ uzvodna početnica	2,5 μl	0,5 μmol dm ⁻³
10 μmol dm ⁻³ nizvodna početnica	2,5 μl	0,5 μmol dm ⁻³
10 ng dm ⁻³ DNA kalup	1–5 μl	10–50 ng
MilliQ voda	30–34 μl	-

Tablica 5. Postavke temperature i trajanje pojedinih ciklusa PCR reakcije

Broj ciklusa	Korak ciklusa	θ / °C	t / s
1×	Početna denaturacija	98	60
35×	Denaturacija	98	10
	Sparivanje početnica	T _a	30
	Ekstenzija	72	30 s / kb
1×	Završno produljenje	75	300
1×	Pohrana	4	∞

3.2.3.6. Razgradnja DNA restrikcijskim endonukleazama

Za potrebe ovog rada korištene su restrikcijske endonukleaze tipa II koje specifično režu DNA unutar restrikcijskog mjesta¹⁸⁰. Reakcija razgradnje postavljena je u volumenu 50 µl u trajanju 3 sata pri temperaturi 37 °C. Pogodni restrikcijski pufer za provođenje reakcije određen je pomoću internetskog servisa NEBcloner (SV: 1.13.10.) koji je dostupan na poveznici [\[Hiperlink 5\]](#). Reakcijska smjesa sadržavala je do 1500 ng DNA (PCR-produkt ili plazmidni vektor) u TE puferu (10 mmol dm⁻³ Tris-HCl, pH = 8,0 pri 20 °C; 0,1 mmol dm⁻³ EDTA). U tablici 6 navedene su provedene razgradnje.

Tablica 6. Restrikcijske razgradnje PCR produkata i plazmidne DNA. Navedeni su korišteni enzimi, reakcijski puferi te mogućnost termičke inaktivacije enzima na kraju reakcije

DNA podvrgnuta razgradnji	Enz. I.	Enz. II.	Enz. III.	Pufer	Inakt. [†]	Produkt razgradnje	bp	GC / %
DrF1	NdeI	XhoI	-	rCS*	DA	NdeI-XhoI-H61G-DrileS2	353	65
DrF2	NdeI	XhoI	-	rCS*	DA	NdeI-XhoI-A59H-L60V-H61G-DrileS2	353	65
pET28b(+)_DrIleS2	NdeI	XhoI	rSAP	rCS*	DA	NdeI-XhoI-pET28b(+)-DrIleS2	8217	58
TtileS2	NdeI	BlpI	-	rCS*	NE	NdeI-BlpI-TtileS2	3239	67
pET28b(+)	NdeI	BlpI	rSAP	rCS*	NE	NdeI-BlpI-rSAP-pET28b(+)	5212	53
DrileS2	NdeI	BamHI	-	r3.1 [#]	NE	NdeI-BamHI-DrileS2	3239	67
pET28b(+)	NdeI	BamHI	rSAP	r3.1 [#]	NE	NdeI-BamHI-rSAP-pET28b(+)	5331	53

* - rCutSmart, [#] - NEBuffer r3.1, [†] - Termička inaktivacija pri 65 °C u trajanju 20 minuta

Za razgradnju je korišteno ukupno 20 U restrikcijske endonukleaze. Gdje je bilo moguće, DNA je istovremeno tretirana s dva enzima. U tom slučaju, za reakcijski pufer je odabran onaj u kojem oba enzima imaju maksimalnu aktivnost bez nespecifične aktivnosti. Ukoliko se radilo o razgradnji plazmidnog vektora, u cilju smanjenja recirkulizacije vektora, isti je dodatno tretiran s 1 U rekombinantne alkalne fosfataze iz škampa (rSAP) koja defosforilira 5'-krajeve DNA i time sprječava recirkularizaciju¹⁸¹. rSAP je dodana izravno u reakcijsku smjesu restrikcije, nakon čega je smjesa inkubirana dodatnih 30 minuta pri temperaturi 37 °C. Nakon restrikcijske razgradnje, ukoliko su se restrikcijski enzimi mogli termički inaktivirati, inaktivirani su prema uputama proizvođača, a zatim je reakcijska smjesa pročišćena korištenjem komercijalnog kompleta QiaQuick PCR Purification Kit (Qiagen) prema uputama proizvođača. U posljednjem koraku pročišćavanja DNA je eluirana s kolone u volumenu od 30 µl pufera EB, umjesto u 50 µl, radi povećanja koncentracije eluata. Pročišćenoj restrikcijski razgrađenoj DNA spektrofotometrijski je određena koncentracija (Poglavlje

3.2.3.4), a zatim je analizirana na agaroznom gelu (Poglavlje 3.2.3.2). Fragmenti s komplementarnim stršećim krajevima međusobno su ligirani kako je opisano u poglavlju 3.2.3.7.

3.2.3.7. Ligacija DNA fragmenata T4-DNA ligazom

Za ligaciju komplementarnih fragmenata DNA korištena je T4 DNA-ligaza (*TaKaRa*) prema uputama proizvođača, uz specifičnosti navedene u nastavku. Reakcijska smjesa sadržavala je plazmidni vektor i insert s komplementarnim stršećim krajevima u omjeru 7:1 u korist inserta. Sve reakcije ligacije provedene su korištenjem 50 ng pročišćenog restrikcijski razgrađenog plazmida u ligacijskoj smjesi. U tablici 7 navedene su kombinacije ligiranih restrikcijski razgrađenih inserata i plazmidnih vektora. Umjesto ligacije pri jednoj temperaturi, ligacija je provedena 12 sati u ponavljajućim ciklusima izmjene temperature (30 °C u trajanju 30 sekundi, 10 °C u trajanju 30 sekundi) u uređaju za PCR, što je značajno pridonijelo učinkovitosti reakcije¹⁸². Nakon završene reakcije ligacije, T4 DNA-ligaza termički je inaktivirana po uputama proizvođača, a inaktivirana ligacijska smjesa transformirana je u kemijski kompetentne stanice XL10-Gold (Poglavlje 3.2.2.5).

Tablica 7. Ligirane kombinacije restrikcijski razgrađenih inserata i plazmidnih vektora

Insert	bp	GC / %	Vektor	bp	GC / %
<i>NdeI-BamHI-DrileS2</i>	3237	67	<i>NdeI-BamHI-rSAP-pET28b(+)</i>	5333	53
<i>NdeI-Sall-TtileS2</i>	3132	67	<i>NdeI-Sall-rSAP-pET28b(+)</i>	5319	53
<i>NdeI-XhoI-H61G-DrileS2</i>	353	65	<i>NdeI-XhoI-pET28b(+)-DrileS2</i>	8217	58
<i>NdeI-XhoI-A59H-L60V-H61G-DrileS2</i>	353	65	<i>NdeI-XhoI-pET28b(+)-DrileS2</i>	8217	58

3.2.3.8. Ciljana mutagenaza

Za ciljanu mutagenazu u ovom radu korišten je komercijalni komplet Q5-SDM (*NEB*), uz dvije razlike u odnosu na protokol proizvođača. Umjesto DNA-polimeraze Q5 iz kompleta, korištena je DNA-polimeraza Phusion (*Thermo Fisher Scientific*), zbog veće učinkovitosti umnažanja zahtjevnih kalupa. Za većinu mutagenaza korištene su atipične početnice kod kojih su jednostruke i višestruke mutacije uvedene na njihovim nehibridiziranim 5'-krajevima. Izuzetak je priprava dvaju mutanata *TtIleRS2* (opisano u nastavku), kod kojih su mutagene početnice dizajnirane pomoću internetskog servisa NEBBaseChanger (SV: 2.3.1), dostupnog na [\[Hiperlink 6\]](#). Mutagene početnice korištene u ovom radu (Tablica 8) naručene su od proizvođača *Macrogen BV* ili *Microsynth AG*, bez fosforilacije na 5'-kraju. Mutagena PCR reakcija postavljena je na isti način kao i klasična PCR reakcija (Poglavlje 3.2.3.5) u volumenu

od 20 μ l. Po završetku reakcije, polovica reakcijske smjese (10 μ l) analizirana je agaroznom elektroforezom (Poglavlje 3.2.3.2) kako bi se potvrdila prisutnost produkta te njegova odgovarajuća veličina i čistoća. Preostalih 5 μ l reakcijske smjese tretirano je KLD smjesom enzima (*NEB*) po uputi proizvođača. KLD smjesa sadržava T4-polinukleotid kinazu, koja fosforilira 5'-krajeve DNA omogućujući ligaciju; T4-DNA ligazu koja povezuje 5'-fosforilirane krajeve dvolančane DNA; te restriksijsku endonukleazu DpnI koja razgrađuje roditeljski, nemutirani plazmidni kalup.

Tablica 8. Popis korištenih mutagenih početnica. Nehibridizirani 5'-krajevi početnica prikazani su podebljanim velikim, a mutagene pozicije podebljanim malim slovima.

Ime početnice	Slijed početnice 5' → 3'	GC / %	T _m / °C
P53A_PmIleRS2_F	g CTCACGTTGGGCACGCGC	74	69
P53A_PmIleRS2_R	CAAACCATTTGCTGTTGGAGGC	50	66
H54G_G56H_PmIleRS2_F	ggCGTgcac CACGCGCTAGGCCGGACG	78	71
H54G_G56H_PmIleRS2_R	GCGTGCCCAACGTGAGCC	72	69
G60N_R61K_PmIleRS2_F	aaCaa GACGATTAAAGACGTGGTGGC	46	64
G60N_R61K_PmIleRS2_R	TAGCGCGTGCCCAACG	69	66
Y126S_PmIleRS2_F	ag TGAAAAGCAGCAGCGCAC	55	64
Y126S_PmIleRS2_R	CACAAACACACTTTCCTTACAC	41	61
W130Q_PmIleRS2_F	ca GCGCACGTTTCACAGAGCA	60	66
W130Q_PmIleRS2_R	CTGCTTTTCATACACAAACACAC	39	62
H85G_EcIleRS1_F	gg TATTGGTCACTCGGTTAACAAG	46	61
H85G_EcIleRS1_R	AATGCTGCCATTTCGCATAAG	45	62
H85G_G87H_EcIleRS1_F	ggtatc GGTCACTCGGTTAACAAGATTC	46	61
H54G_TfIleRS2_R	GGCCTGGGCGTGCGCCAC gc CGGGGAGGCCGTTGG	83	88
H54G_G56H_TfIleRS2_R	GGCCTGGGCGTG tg CAC gc CGGGGAGGCCGTTGG	80	88
I63P_PmIleRS1_F	cc TCACATGGGACATGCATTAAATAAAAT	34	63
I63P_PmIleRS1_F1	cc TGGCATGCACCATGCATTAAATAAAAT	34	66
I63P_PmIleRS1_R	ATCGCCATTTCGCATATGGAG	50	63
N70G_PmIleRS1_F	gga AAAAATTTTAAAAGATTTTATCGTTTCG	24	58
N70G_PmIleRS1_R	TAATGCATGTCCCATGTG	44	57
N70G_PmIleRS1_R1	TAATGCATGGTGCATGCC	44	57
Q132Y_Y128S_PmIleRS1_F	TGGGAgtac GTAACGGCTGGCGTGAG	59	64
Q132Y_Y128S_PmIleRS1_R	acgcga CTGTTTCGCAAAGCTTACG	54	62
Q136W_PmIleRS1_F	tg GCGTGAGCAGTTTAAGCG	55	62
Q136W_PmIleRS1_R	GCCGTTTACTTGTTCCCAAG	50	62
F140T_PmIleRS1_F	acg AAGCGTTTAGGTGTACGCGG	57	66
F140T_PmIleRS1_R	CTGCTCACGC ca GCCGTTTA	60	68
E885A_K886A_PmIleRS1_F	GGcGcGgcaTGcGAaaGaTGt TGGGTTGTATCACCAACAGTT	47	63
K881A_E883A_PmIleRS1_R	TgCaGCggc ACTTACAACAATTGAAGCATAGC	47	61

U slučaju priprava H74G-H76G-TfIleRS2 i H76G-TfIleRS2 korišten je princip linearnog umnažanja s jednom početnicom, pri čemu nastaje jednolančani DNA-produkt. Reakcija je postavljena kao dvostupanjski PCR, uz povećanje broja ciklusa elongacije s 35 na 40. PCR-produkt tretiran je s 20 U endonukleaze DpnI *in situ* u trajanju 30 minuta pri temperaturi 37 °C.

Konačno, 5 µl mutagenih PCR-smjesa tretiranih na neki od prethodno opisanih načina, transformirano je u 50 µl kemijski kompetentnih stanica XL10-Gold (Poglavlje 3.2.2.5). Oporavljene stanice nasađene su na hranjive ploče s odgovarajućim selekcijskim biljgom. Nakon uzgoja preko noći, nekoliko kolonija s ploča uzgojeno je u tekućoj kulturi, iz koje je izoliran plazmid čiji je slijed potvrđen sekvenciranjem (Poglavlje 3.2.3.10). Nakon provjere slijeda sekvenciranjem, mutageni plazmidi transformirani su u ekspresijski soj radi ekspresije mutiranog proteina (Poglavlje 3.2.2.4).

3.2.3.9. Kazetna mutageneza

Primjenom kazetne mutageneze¹⁸³ pripremljeni su mutanti A56H-L60V-H61G-*DrIleRS2* (mut-HVGH-*DrIleRS2*) i H61G-*DrIleRS2* (mut-ALGH-*DrIleRS2*). Zbog visokog udjela repetitivnih GC-nukleotida u kodirajućem slijedu *DrIleRS2*, dizajn mutagenih početnica bio je otežan, što je onemogućilo dobivanje mutagenog PCR-produkta metodom klasične mutageneze (Poglavlje 3.2.3.8). Stoga je primijenjen alternativni eksperimentalni pristup u kojem je nukleotidni slijed između dvaju pogodnih restrikcijskih mjesta (tzv. kazeta) zamijenjen sintetskim slijedom koji sadržava željene mutacije. U slučaju *DrIleRS2*, odabrana kazeta obuhvaćala je prvih 353 nukleotida na 5'-kraju kodirajućeg slijeda, između restrikcijskih mjesta *NdeI* i *XhoI*. Odgovarajuće sintetske kazete sa željenim višestrukim mutacijama (Tablica 9) naručene su od proizvođača *Twist Bioscience Inc.*

Tablica 9. Popis korištenih mutagenih kazeta. Mjesta vezanja početnica Twist_F i Twist_R označena su šrafirano. Restrikcijska mjesta *NdeI* i *XhoI* prikazana su podebljanim i podvučenim velikim slovima, dok su mutacije slijeda označene smanjenim podebljanim slovima.

Ime kazete	Nukleotidni slijed kazete 5' → 3' (ne uključujući okosnicu vektora)
DrF1 (A59H-L60V-H61G- <i>DrIleRS2</i>)	GAAGTGCCATTCCGCCTGACCTCTGGTGCCGCGCGGCAGCC <u>CATATG</u> ACCAAACG TACCTTCGCCCCGTGCCCCACGCAGCCTAACTTCCGCCAATTGGAAGCCGACATC CTCCAGAAATGGAAGGATGAGCAGGTCTTCGAGCAGACGCAGACCCGCCCGCT CCGGCAGGCGAGTTCGTGTTCTATGAAGGGCCGCCACCGCCAACGGCAAGCCC acgtcggc GTGCTCGCCCCGCTCGTTCAAGGACCTCTTTCCCGCTTCAAGGTGATGCA GGGCCACACGTCACCCGCAAGGGCGGCTGGGACACCCACGGCCTGCCGGTGGA AATCAGCGTGGAAGAAAAAGCTCGGCTGGCTGGGCCGCAACCACGGGGCGAGCCG CGAGGA CTCGAG GAATTCAACCGCCTGTGCCGCACGTCCGTCTAGGCTAGGTG GAGGCTCAGTG
DrF2 (H61G- <i>DrIleRS2</i>)	GAAGTGCCATTCCGCCTGACCTCTGGTGCCGCGCGGCAGCC <u>CATATG</u> ACCAAACG TACCTTCGCCCCGTGCCCCACGCAGCCTAACTTCCGCCAATTGGAAGCCGACATC CTCCAGAAATGGAAGGATGAGCAGGTCTTCGAGCAGACGCAGACCCGCCCGCT CCGGCAGGCGAGTTCGTGTTCTATGAAGGGCCGCCACCGCCAACGGCAAGCCC GCCCT ggc GTGCTCGCCCCGCTCGTTCAAGGACCTCTTTCCCGCTTCAAGGTGAT GCAGGGCCACACGTCACCCGCAAGGGCGGCTGGGACACCCACGGCCTGCCGGT GGAAATCAGCGTGGAAGAAAAAGCTCGGCTGGCTGGGCCGCAACCACGGGGCGA GCCGCGAGGA CTCGAG GAATTCAACCGCCTGTGCCGCACGTCCGTCTAGGCTA GGTGGAGGCTCAGTG

Mutagene kazete dostavljene su klonirane u visokokopijski plazmid pTwist^{Amp}. Insert je bio okružen mjestima sljepljivanja univerzalnih početnica Twist_F i Twist_R, što je omogućilo umnažanje kazete lančanom reakcijom polimerazom (PCR). Konstrukti su dostavljeni u liofiliziranom obliku i prije upotrebe su resuspendirani u TE puferu (10 mmol dm⁻³ Tris-HCl, pH = 8,0 pri 20 °C, 0,1 mmol dm⁻³ EDTA) do koncentracije 10 ng µl⁻¹. Mutagene kazete umnožene su s plazmida korištenjem početnica Twist_F i Twist_R (Poglavlje 3.2.3.9). Dobiveni produkti umnažanja pročišćeni su korištenjem komercijalnog kompleta QiaQuick PCR Purification Kit (*Qiagen*). U sljedećem koraku, 1500 ng pročišćenih mutagenih kazeta i ekspresijskog plazmida s kodirajućim slijedom *DrIleRS2* (pET28b_*DrIleRS2*) razgrađeno pomoću 20 U enzima NdeI i XhoI (Poglavlje 3.2.3.6). Restriksijska smjesa s ekspresijskim vektorom pET28b_*DrIleRS2* dodatno je tretirana s 5 U rekombinantne alkalne fosfataze iz škampa (rSAP) u trajanju 60 minuta pri temperaturi 37 °C. Povećana količina rSAP i produljeno vrijeme inkubacije, omogućili su potpunu defosforilaciju razgrađenog plazmida, čime je smanjena vjerojatnost njegove recirkularizacije bez mutagene kazete. Produkti restriksijskih razgradnja ponovno su pročišćeni upotrebom komercijalnog kompleta QiaQuick PCR Purification Kit (*Qiagen*). Nakon pročišćavanja, 50 ng restriksijski razgrađenog pET28b_*DrIleRS2* ligirano je s restriksijski razgrađenim mutagenim kazetama kako je opisano u poglavlju 3.2.3.9, a dobivena ligacijska smjesa transformirana je u kemijski kompetentne stanice XL10-Gold (Poglavlje 3.2.2.5). Transformanti su uzgojeni na selektivnoj krutoj hranjivoj podlozi s kanamicinom, nakon čega je nekoliko pojedinačnih kolonija preneseno u tekući medij te uzgojeno u prekonoćnoj kulturi (Poglavlje 3.2.2.1). Iz taloga prekonoćnih kultura izolirani su plazmidi (Poglavlje 3.2.3.1), a njihov je slijed potvrđen sekvenciranjem (Poglavlje 3.2.3.10).

3.2.3.10. Sekvenciranje DNA

Plazmidna DNA izolirana iz prekonoćnih kultura resuspendirana je u TE puferu (10 mmol dm⁻³ Tris-HCl, pH = 8,0 pri 20 °C, 0,1 mmol dm⁻³ EDTA) do koncentracije 150 ng µl⁻¹. Tako pripremljeni uzorci poslani su kurirskom službom u tvrtku *Macrogen Europe B.V. (Maastricht, Nizozemska)*. Rezultati sekvenciranja, dostavljeni elektroničkim putem, analizirani su pomoću programa SnapGene Viewer (SV: 7.2.1). Budući da se sekvenciranjem uz jednu početnicu u jednoj reakciji može pouzdano očitati ~850 nukleotida, za potvrdu slijeda *IleRS* enzima (> 3 kb) rutinski je bilo potrebno 4–5 reakcija sekvenciranja s različitim početnicama. Sljedovi početnica korištenih za sekvenciranje su navedeni u tablici 10. Svi konstrukti su sekvencirani

korištenjem univerzalnih T7 početnica, budući da su bili klonirani u pET28b(+) na koji se ove početnice specifično vežu, a po potrebi dodatno uz jednu ili više slijed-specifičnih početnica.

Tablica 10. Popis korištenih početnica za sekvenciranje. Osim početnica specifičnih za sekvencirani slijed, svi su konstrukti dodatno sekvencirani upotrebom univerzalnih početnica T7_promotor i T7_terminator.

Ime početnice	Slijed početnice 5' → 3'	GC / %	T _m / °C
T7_terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	53	61
T7_promotor	TAATACGACTCACTATAGGG	40	56
PmIleRS1_seq1	GAATCTGCTTTAGCAGAAGCGG	50	65
PmIleRS1_seq2	TTTCTCGCCAACGTGCATGG	55	67
PmIleRS2_seq1_F	GCGGTGCATGAAGAGATGAG	55	64
PmIleRS2_seq2_F	CGATGCCGTTTGCACAGTATC	52	65
DrIleRS2_seq1_F	TGTATGTTTCGCTCCCAT	53	64
DrIleRS2_seq2_F	AAGATCAACTGGGTGCCCG	58	65
DrIleRS2_seq3_F	CGCTGTGGAACGTCTATTC	53	61
TtIleRS2_seq1_F	AAGGAGCCGAAGAAGC	56	59
TtIleRS2_seq2_F	TGCCAGGCGTGCG	77	62
TtIleRS2_seq3_F	CGGCCTACGCCACCC	80	65
EcIleRS1_seq1_F	GCCCGGACGACTATGTGATC	60	65
EcIleRS1_seq2_F	TGGCCGTTTCTGACGAG	59	62

3.2.4. Metode rada s proteinima

3.2.4.1. Preparativna pojačana ekspresija proteina

Pojačana ekspresija proteina od interesa provedena je u ekspresijskim sojevima BL21(DE3) ili Rossetta2 (DE3) bakterije *Escherichia coli* (Poglavlje 3.2.4.1), transformiranih plazmidnim vektorom koji sadrži kodirajući slijed ciljnog proteina. Za potrebe ekspresije, najprije je uzgojena zasićena prekonoćna kultura odgovarajućeg soja u LB/Mg mediju suplementiranom selekcijskim antibiotikom. Zasićena kultura zatim je razrijeđena u omjeru 1:50 u svježem LB/Mg mediju također suplementiranom sele antibiotikom i 0,1 mmol dm⁻³ ZnCl₂. Stanice su uzgajane uz protresanje pri 250 okretaja u minuti do rane eksponencijalne faze rasta (0,4 < OD₆₀₀ < 0,6). Rast kulture praćen je spektrofotometrijskim mjerenjem transmisije zračenja pri 600 nm (OD₆₀₀). Kada je optička gustoća dosegla željene vrijednosti, ekspresija proteina inducirana je dodatkom izopropil-β-D-tiogalaktopiranozida do konačne koncentracije 0,1–1,0 mmol dm⁻³. Ovisno o temperaturi indukcije, stanična suspenzija po potrebi je prethodno ohlađena inkubacijom na ledu u trajanju od 30 minuta prije dodatka induktora. Nakon dodatka induktora, stanice su zadržane u inducirajućim uvjetima od 3–18 sati uz protresanje pri 200 okretaja u minuti. Uvjeti pojačane ekspresije proteina eksprimiranih za potrebe ove disertacije, navedeni su u tablici 11. Nakon završetka ekspresije, stanice s pojačano eksprimiranim proteinima, istaložene su centrifugiranjem 10 minuta pri 8000 g. Dobiveni stanični talog ispran

je sterilnom vodom te ponovno taložen centrifugiranjem pod istim uvjetima. Stanični talog pohranjen je u kriogenom hladnjaku pri temperaturi -80°C do daljnje upotrebe.

Tablica 11. Uvjeti pojačane ekspresije za proteine i njihove mutirane varijante proizvedene i pročišćene u okviru ove disertacije

Protein	Rez.	Soj	$t_{\text{ind}} / \text{h}$	$\theta_{\text{ind}} / ^{\circ}\text{C}$	$c(\text{IPTG}) / \text{mmol dm}^{-3}$
<i>PmIleRS1</i> (wt-HMGGH- <i>PmIleRS1</i>)	Kan ^R	BL21(DE3)	4	30	0,1
mut-GMHH- <i>PmIleRS1</i> (mut-H64G-G66H- <i>PmIleRS1</i>)	Kan ^R	BL21(DE3)	18	15	0,1
mut-I63P- <i>PmIleRS1</i>	Kan ^R	BL21(DE3)	18	15	0,1
mut-I63P-N70G- <i>PmIleRS1</i>	Kan ^R	BL21(DE3)	18	15	0,1
mut- <i>PmIleRS1</i> -ΔZNF	Kan ^R	BL21(DE3)	18	15	0,1
mut-I63P-N70G-Q136W- <i>PmIleRS1</i>	Kan ^R	BL21(DE3)	18	15	0,1
mut-I63P-N70G-Q136W-F140T- <i>PmIleRS1</i>	Kan ^R	BL21(DE3)	18	15	0,1
mut-I63P-H64G-G66H-N70G- <i>PmIleRS1</i>	Kan ^R	BL21(DE3)	18	15	0,1
mut-I63P-H64G-G66H-N70G-Q136W- <i>PmIleRS1</i>	Kan ^R	BL21(DE3)	18	15	0,1
mut-I63P-H64G-G66H-N70G-Y128S-Q132Y-Q136W-F140T- <i>PmIleRS1</i>	Kan ^R	BL21(DE3)	18	15	0,1
mut-K881A-E883AE885A-K886A- <i>PmIleRS1</i>	Kan ^R	BL21(DE3)	18	15	0,1
<i>PmIleRS2</i> (wt-HVGGH- <i>PmIleRS2</i>)	Kan ^R	BL21(DE3)	18	15	0,1
mut-GMHH- <i>PmIleRS2</i> (mut-H54G-G64H- <i>PmIleRS2</i>)	Kan ^R	BL21(DE3)	18	15	0,1
mut-P53A-G60N-R61K- <i>PmIleRS2</i>	Kan ^R	BL21(DE3)	18	15	0,1
mut-W130Q- <i>PmIleRS2</i>	Kan ^R	BL21(DE3)	18	15	0,1
mut-Y126S-W130Q- <i>PmIleRS2</i>	Kan ^R	BL21(DE3)	18	15	0,1
mut-P53A-G60N-R61K-Y126S-W130Q- <i>PmIleRS2</i>	Kan ^R	BL21(DE3)	18	15	0,1
<i>EcIleRS1</i> (wt-HIGH- <i>EcIleRS1</i>)	Kan ^R	BL21(DE3)	3	37	0,1
mut-HIHH- <i>EcIleRS1</i> (mut-G87H- <i>EcIleRS1</i>)	Kan ^R	BL21(DE3)	18	15	0,1
mut-GIHH- <i>EcIleRS1</i> (mut-H85G-G87H- <i>EcIleRS1</i>)	Kan ^R	BL21(DE3)	18	15	0,1
<i>TrIleRS2</i> (wt-HVGGH- <i>TrIleRS2</i>)	Kan ^R	Rossetta2(DE3)	18	15	1,0 (+ 1% (v/v) glukoza)
mut-GVHH- <i>TrIleRS2</i> (mut-H54G-G56H- <i>TrIleRS2</i>)	Kan ^R	Rossetta2(DE3)	18	15	1,0 (+ 1% (v/v) glukoza)
<i>SgIleRS2</i> (wt-GIHH- <i>SgIleRS2</i>)	Kan ^R	BL21(DE3)	18	15	0,1
<i>DrIleRS2</i> (wt-ALHH- <i>DrIleRS2</i>)	Kan ^R	BL21(DE3)	18	15	0,1
mut-ALGH- <i>DrIleRS2</i> (mut-A59H- <i>DrIleRS2</i>)	Kan ^R	BL21(DE3)	18	15	0,1
mut-HVGGH- <i>DrIleRS2</i> (mut-A59H-L60V-H61G- <i>DrIleRS2</i>)	Kan ^R	BL21(DE3)	18	15	0,1

3.2.4.2. *Liza bakterijskih stanica*

Odmrznuti talog stanica s pojačano eksprimiranim proteinom resuspendiran je u IMAC A puferu sastava: 25 mmol dm⁻³ HEPES-KOH pH = 7,5 pri 20 °C, 500 mmol dm⁻³ NaCl, 15 mmol dm⁻³ imidazol pH = 7,5 pri 20 °C, 10 mmol dm⁻³ 2-merkaptoetanol, do optičke gustoće 60 OD₆₀₀ ml⁻¹. U suspenziju su dodani DNaza I (10 ng µl⁻¹), RNaza A (10 ng µl⁻¹), lizozim (50 ng µl⁻¹) te fenilmetilsulfonilfluorid (PMSF) u konačnoj koncentraciji 0,1 mmol dm⁻³. Stanična suspenzija podvrgnuta je sonikaciji sedam puta po 60 sekundi, pri 50 % snage ultrazvučnog pulsa, sondom promjera 6 mm, uz 60-sekundne pauze između pulseva. Tijekom sonikacije, uzorak je kontinuirano inkubiran na ledu radi sprječavanja pregrijavanja. Dobiveni stanični lizat centrifugiran je 60 minuta pri 25000 g pri temperaturi 4 °C. Topljiva frakcija zatim je profiltrirana kroz filter pora 0,22 µm te pročišćena afinitetnom kromatografijom (Poglavlje 3.2.4.4).

3.2.4.3. *Flokulacija proteinskog ekstrakta*

Proteinski ekstrakti s pojačano eksprimiranim termostabilnim enzimima (wt-HVGH-*Tt*IlleRS2 i pripadajućim mutantima) podvrgnuti su termičkoj obradi u trajanju od 30 minuta pri temperaturi 65 °C radi uklanjanja termolabilnih proteina. Flokulacija je odabrana kao metoda preliminarnog pročišćavanja zbog izuzetne termostabilnosti wt-HVGH-*Tt*IlleRS2 i njegovih pripadajućih mutanata¹⁸⁴. Nakon flokulacije, stanični ekstrakt centrifugiran je 60 minuta pri 25000 g na sobnoj temperaturi, u cilju razdvajanja topljive i netopljive frakcije. Topljiva frakcija koja sadrži termostabilni protein je profiltrirana kroz filter poroznosti 0,22 µm i podvrgnuta daljnjem kromatografskom pročišćavanju.

3.2.4.4. *Pročišćavanje proteina metodom afinitetne kromatografije na smoli s imobiliziranim metalnim ionima (IMAC)*

Afinitetnom kromatografijom na smoli s imobiliziranim metalnim ionima (IMAC) pročišćavani su proteini eksprimirani u fuziji s N-terminalnim heksahistidinskim privjeskom. Metoda se temelji na specifičnoj interakciji imobiliziranih metalnih iona na kromatografskom punilu i imidazolnih skupina u bočnim ograncima heksahistidinskog fuzijskog privjeska. Kromatografija je provedena na sustavu Äkta Pure 25 (Cytiva), opremljenom injekcijskim ventilom V9-Inj, ventilima za kolonu V9-Cs i V9-Os, skupljačem frakcija F9-R, UV-Vis detektorom U9-M i konduktometrijskom ćelijom C9. Za pročišćavanje su korištene kromatografske kolone HisTrap 5ml HP (Cytiva), deklariranog kapaciteta do 200 mg fuzijskog proteina. Profiltrirani stanični ekstrakt tri je puta propušten kroz kolonu uravnoteženu s 10 CV

pufera IMAC A (25 mmol dm^{-3} HEPES-KOH pH = 7,5 pri 20°C , 500 mmol dm^{-3} NaCl, 15 mmol dm^{-3} imidazol pH = 7,5 pri 20°C , 10 mmol dm^{-3} 2-merkaptetanol). Uzorak je nanošen na kolonu peristaltičkom pumpom MiniPuls 3 (Gilson) te ispiran s 10 CV pufera IMAC A. Nakon toga, kroz kolonu je propušteno 5 CV pufera IMAC B, istog sastava kao IMAC A, osim što je sadržavao 50 mmol dm^{-3} . Smanjenjem ionske jakosti pufera tijekom ispiranja nevezane frakcije omogućeno je neposredno povezivanje IMAC pročišćavanja s ionskom izmjenom, bez potrebe za diskontinuiranom izmjenom pufera. Nakon *in situ* izmjene pufera na koloni, elucija proteina od interesa postignuta je primjenom linearnog gradijenta pufera IMAC C (25 mmol dm^{-3} HEPES-KOH pH = 7,5 pri 20°C , 50 mmol dm^{-3} NaCl, 100 mmol dm^{-3} imidazol pH = 7,5 pri 20°C , 10 mmol dm^{-3} 2-merkaptetanol) kroz 20 CV. Odmah nakon elucije proteina od interesa, kolona je isprana s 5 CV pufera IMAC C, a zatim kondicionirana s 5 CV pufera IMAC A. Pojedinačni koraci kromatografskog pročišćavanja u primijenjenoj metodi prikazani su u tablici 12.

Tablica 12. Definicije koraka za kromatografsko pročišćavanje fuzijskih proteina eksprimiranih s heksahistidinskim privjeskom metodom afinitetne kromatografije na smoli s imobiliziranim metalnim ionima (IMAC). Za pročišćavanje je korištena komercijalno dostupna kolona HisTrap 5 ml HP (Cytiva).

Faza definirana metodom	Trajanje faze / CV ^a	Protok / ml	ϕ (IMAC B) / %	ϕ (IMAC C) / %	Položaj V9-Os ^b	V _{frac} / ml
Uravnoteženje kolone u IMAC A	10	5	0	0	Waste	-
Nanošenje uzorka	U diskontinuiranom režimu, korištenjem peristaltičke pumpe Gilson MiniPuls 3					
Elucija nevezane frakcije	10	5	0	0	Waste	-
<i>In situ</i> izmjena pufera (ispiranje s IMAC B)	5	5	100	0	Waste	
Elucija vezanog proteina gradijentom IMAC C	20	1	0	0-100	Frac	1 ml
Čišćenje kolone s IMAC C	5	5	0	100	Waste	-
Prevođenje kolone u IMAC A	5	5	0	0	Waste	-
^a - Volumen punila stacionarne faze kolone (engl. <i>Column Volume</i>) ^b - Ventil V9-Os je 2-položajni, 6-portni ventil. Moguće su dvije konfiguracije fluidike: Waste – protok s kolone je usmjeren u otpad te Frac – protok s kolone je usmjeren na skupljač frakcija.						

Frakcije bogate proteinom tijekom elucije prikupljane su na skupljaču frakcija. Koncentracija proteina u tim frakcijama određena je spektrofotometrijski (Poglavlje 3.2.4.9), a njihova čistoća analizirana je denaturirajućom elektroforezom na poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijeva dodecil-sulfata (SDS-PAGE) (Poglavlje 3.2.4.10). Frakcije kvantitativno bogate čistim proteinom ($A_{260} / A_{280} < 0,65$) spojene su i dodatno pročišćene metodom ionske izmjene (Poglavlje 3.2.4.5).

3.2.4.5. Pročišćavanje proteina metodom ionske izmjene

Metoda ionske izmjene korištena je za dodatno pročišćavanje proteina prethodno počišćenih IMAC metodom (Poglavlje 3.2.4.4). U okviru ovog rada primijenjena je tehnika anionske izmjene na koloni MonoQ HR 16/10 (Amersham Bioscience), deklariranog kapaciteta 200 mg proteina. Spojene IMAC frakcije propuštene su kroz kolonu uravnoteženu s 5 CV pufera IEX A (25 mmol dm^{-3} HEPES-KOH pH = 7,5 pri 20 °C, 50 mmol dm^{-3} NaCl, 10 mmol dm^{-3} 2-merkaptetanol). Uzorak je na kolonu nanošen pomoću petlje volumena 10 ili 25 ml (Superloop, Cytiva) instalirane na injekcijskom ventilu V9-Inj kromatografskog sustava Äkta Pure 25 (Cytiva). Tijekom nanošenja uzorka na kolonu, prikupljane su frakcije volumena 5 ml u slučaju da se protein nije vezao na smolu. Nakon nanošenja uzorka, kolona je isprana s minimalno 10 CV pufera IEX A, odnosno do stabilizacije bazne linije pri 280 nm. Elucija proteina od interesa postignuta je primjenom linearnog gradijenta pufera IEX B (25 mmol dm^{-3} HEPES-KOH pH = 7,5 pri 20 °C, 50 mmol dm^{-3} NaCl, $1000 \text{ mmol dm}^{-3}$ 2-merkaptetanol) kroz 10 CV. Po završetku elucije, kolona je isprana s najmanje 5 CV pufera IEX B. Koraci kromatografskog pročišćavanja u korištenoj metodi sistematizirani su u tablici 13.

Tablica 13. Definicije koraka kromatografskog pročišćavanja proteina metodom anionske izmjene. Za pročišćavanje je korištena komercijalna kolona MonoQ HR 16/10 (Amersham Bioscience).

Faza definirana metodom	CV ^a	Protok / ml	ϕ (IEX B) / %	Položaj V9-Inj ^b	Položaj V9-Os ^c	V _{frac} / ml
Uravnoteženje kolone s IEX A	5	2,0	0	Load	Waste	-
Nanošenje uzorka	-	1,0	0	Inject	Frac	5 ml
Elucija nevezane frakcije	10	1,0	0	Load	Frac	5 ml
Elucija vezanog proteina	10	1,0	0-100	Load	Frac	1 ml
Čišćenje kolone s IEX B	5	2,0	100	Load	Waste	-
Prevođenje kolone u IEX A	5	2,0	0	Load	Waste	-

^a - Volumen punila stacionarne faze kolone (engl. *Column Volume*)
^b - Ventil V9-Inj je 2-položajni, 7-portni ventil. Moguće su dvije konfiguracije fluidike:
Load - protok s pumpe usmjeren je na kolonu bez protoka kroz injekcijsku petlju te **Inject** - protok s pumpe usmjeren je na kolonu kroz injekcijsku petlju radi nanošenja uzorka.
^c - Ventil V9-Os je 2-položajni, 6-portni ventil. Moguće su dvije konfiguracije fluidike:
Waste – protok s kolone je usmjeren u otpad te **Frac** – protok s kolone je usmjeren na skupljač frakcija.

Tijekom elucije, frakcije bogate proteinom prikupljane su pomoću skupljača frakcija. Koncentracija proteina u tim frakcijama određena je spektrofotometrijski (Poglavlje 3.2.4.9), nakon čega je njihova čistoća analizirana denaturirajućom elektroforezom na poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijeva dodecil-sulfata (SDS-PAGE) (Poglavlje 3.2.4.10). Frakcije kvantitativno bogate čistim proteinom ($A_{260} / A_{280} < 0,52$) spojene su, prevedene u skladišni pufer te ugušćene ultrafiltracijom (Poglavlje 3.2.4.7).

3.2.4.6. Provjera agregacije proteina metodom gel-filtracijske kromatografije

Iz praktičnih razloga, biološki materijal namijenjen kristalizacijskim eksperimentima bio je smrzavan prije upotrebe, što je potencijalno moglo dovesti do njegove agregacije i taloženja iz otopine prilikom ponovnog taljenja^{185,186}. Radi procjene utjecaja ciklusa smrzavanja i ponovnog taljenja na stabilnost proteina, metodom gel-filtracijske kromatografije analizirani su svježije pripremljeni uzorci te uzorci podvrgnuti jednom ciklusu smrzavanja i taljenja. Koncentracija uzoraka bila je 25 mg ml⁻¹, odnosno barem ~10 % veća od koncentracije planirane za kristalizacijskim eksperimentima. Za kromatografsku analizu korištena je kolona Superdex 200 10/300GL (*GE Healthcare*) s rasponom separacije molekulskih masa 10–600 kDa. Prije upotrebe, kolona je ekvilibrirana SEC puferom (5 mmol dm⁻³ HEPES-KOH pH = 7,5 pri 20 °C, 50 mmol dm⁻³ NaCl, 10 mmol dm⁻³ 2-merkaptetanol) pri protoku 2 ml min⁻¹ u trajanju 5 CV. Uzorak je na kolonu nanošen pomoću petlje volumena 500 µl instalirane na ventilu INV-907 kromatografskog sustavu Äkta Purifier 10 (*GE Healthcare*), pri protoku 0,5 ml min⁻¹. Nakon nanošenja uzorka na kolonu, elucija je postignuta izokratski pri protoku 1 ml min⁻¹, uz praćenje UV signala pri 280 nm. Frakcije nisu skupljane. Koraci kromatografskog pročišćavanja u korištenoj metodi sistematizirani su u tablici 14.

Tablica 14. Definicija koraka kromatografske analize agregacije proteina metodom gel-filtracije

Faza definirana metodom	CV ^a	Protok / ml	Položaj INV-907 ^b
Uravnoteženje kolone sa SEC	5	2,0	Load
Nanošenje uzoraka	-	0,5	Inject
Elucija vezanog proteina	20	1,0	Load
^a - Volumen punila stacionarne faze kolone (engl. <i>Column Volume</i>) ^b - Ventil INV-907 je 2-položajni, 7-portni ventil. Moguće su dvije konfiguracije fluidike: Load – protok s pumpe usmjeren je na kolonu bez protoka kroz injekcijsku petlju te Inject – protok s pumpe usmjeren je na kolonu kroz injekcijsku petlju radi nanošenja uzorka.			

3.2.4.7. Izmjena pufera i ugušćivanje proteina ultrafiltriranjem

Frakcijama čistog proteina, dobivenima pročišćavanjem metodom ionske izmjene, zamijenjen je pufer te su ugušćene ultrafiltracijom kroz anizotropnu membranu. U ovom radu korišteni su Amicon Ultra centrifugalni filtri (*Merck Millipore*), s nominalnom deklariranom MWCO vrijenosti dvostruko manjom od molekulske mase proteina. Postupak je proveden prema uputama proizvođača, pri čemu je centrifugiranje provedeno na temperaturi 4 °C pri 5000 g. Budući da skladišni pufer (25 mmol dm⁻³ HEPES-KOH pH = 7,5 pri 20 °C, 50 mmol dm⁻³ NaCl, 10 mmol dm⁻³ 2-merkaptetanol) nije sadržavao krioprotektante te je imao nisku ionsku jakost, centrifugiranje je provedeno uz povremenu resuspenziju otopine pipetom kako bi se

spriječilo taloženje proteina. Pufer se smatrao izmijenjenim nakon što je kroz filter propušteno 100 ml skladišnog pufera. Koncentriranje otopine provedeno je smanjenjem volumena pufera do postizanja ciljane koncentracije, koja je određena spektrofotometrijski (Poglavlje 3.2.4.9).

3.2.4.8. Smrzavanje otopine proteina za kristalizaciju

Kako bi se spriječilo stvaranje kristalnog leda, otopine proteina za kristalizaciju smrzavane su potapanjem alikvota volumena 50 μ l u tekući dušik. Smrznuti alikvoti preneseni su iz tekućeg dušika u kriogeni hladnjak na -80°C u kojem su bili pohranjeni do upotrebe.

3.2.4.9. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije proteina

Masena koncentracija pročišćenih proteina određivana je spektrofotometrijski, mjerenjem apsorbancije otopine pri valnoj duljini od 280 nm na uređaju NanoDrop ND-1000 (*Thermo Fisher Scientific*). Za provedbu mjerenja bilo je potrebno poznavati vrijednosti molarnog apsorpcijskog koeficijenta i molekulske mase proteina. Oba su parametra izračunata na temelju poznate primarne strukture proteina, upotrebom alata *ProtParam* implementiranog na mrežnim stranicama *Expasy SiB* [[Hiperlink 7](#)]. Za divlje tipove enzima i njihove točkaste mutante korištene su iste vrijednosti molarnog apsorpcijskog koeficijenta i molekulske mase, izračunate na temelju slijeda divljeg tipa proteina (Tablica 15). Pri izračunu je pretpostavljeno da su svi bočni ogranci cisteina u reduciranom obliku. Jedinu iznimku činio je mutant *mut-PmIleRS1- Δ ZNF*, koji je zbog uklonjene SD3-poddomene C-terminalne antikodon-vezujuće domene imao značajno izmijenjen primarni slijed u odnosu na divlji tip enzima. Stoga je molarni apsorpcijski koeficijent za njega izračunat na temelju njegova krnjeg aminokiselinskog slijeda. Kvaliteta pročišćenih proteina procjenjivana je na temelju omjera A_{260} / A_{280} . Omjeri $0,5 < A_{260} / A_{280} < 0,6$ upućuju na odsutnost kontaminacije proteina nukleinskim kiselinama, dok omjeri $A_{260} / A_{280} > 0,6$ ukazuju na prisutnost kontaminacije nukleinskim kiselinama¹⁸⁷.

Tablica 15. Vrijednosti molarnog apsorpcijskog koeficijenta i molekulske mase proteina korištene za mjerenje koncentracije proteina. Vrijednosti su izračunate za slijed divljeg tipa enzima, ali su zbog zanemarive razlike u vrijednosti primjenjive i za mjerenje koncentracije otopina točkastih mutanata tih enzima.

Protein	M_r / kDa	$10^3 \epsilon$ / $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{cm}^{-1}$
wt-ALHH-DrIleRS2	122,44	209,13
wt-GIHH-SgIleRS2	119,12	222,19
wt-HMGGH-PmIleRS1	107,41	172,12
wt-HVGGH-PmIleRS2	119,93	184,04
wt-HIGH-EcIleRS1	106,10	175,67

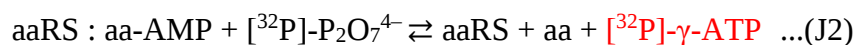
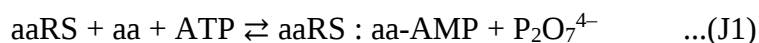
3.2.4.10. Denaturirajuća elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijeva dodecil-sulfata (SDS-PAGE)

Denaturirajuća elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijeva dodecil-sulfata (SDS-PAGE) korištena je za procjenu čistoće proteinskih pripravaka. Razdvajanje proteina provedeno je na ručno izlivanim dvokomponentnim poliakrilamidnim gelovima, uz korištenje aparature Protean Tetra (*Bio-Rad*). Gelovi dimenzija 8,3 cm × 7,3 cm, debljine 0,75–1,5 mm, sadržavali su 6 cm debeli sloj gela za razdvajanje, nadslojen s 1,3 cm gela za sabijanje. Gel za razdvajanje sadržavao je: 9 % (w/v) akrilamid : bisakrilamid (29:1), 375 mmol dm⁻³ Tris-HCl, pH = 8,8 pri 20 °C, 0,1 % (w/v) SDS, 0,7 µg ml⁻¹ APS, 0,05 % (w/v) TEMED. Gel za sabijanje sadržavao je: 4 % (w/v) akrilamid-bisakrilamid (29:1), 125 mmol dm⁻³ Tris-HCl pH = 6,8 pri 20 °C, 0,1 % (w/v) SDS, 0,7 µg mL⁻¹ APS, 0,05 % (w/v) TEMED. Uzorci proteina otopljeni su u puferu za nanošenje uzoraka (62,5 mmol dm⁻³ Tris-HCl pH = 6,8 pri 20 °C, 12,5 mmol dm⁻³ 2-merkaptetanol, 6,25 % (v/v) glicerol, 1,25 % (w/v) SDS, 0,002 % (w/v) bromfenol plavo) te su zatim termički denaturirani u trajanju 5 minuta pri temperaturi 95 °C. Uz uzorke, na gel je nanošen proteinski marker Precision Plus Protein Standards (*Bio-Rad*), radi procjene molekulske mase proteina u uzorku od interesa. Elektroforeza se provodila u dva koraka, u puferu koji je sadržavao: 3 g dm⁻³ Tris, 14,4 dm⁻³ glicin, 0,1 % (w/v) SDS. U prvom koraku elektroforeze – koraku sabijanja – proteini su sabijeni na granici gela za razdvajanje i sabijanje pri naponu 120 V tijekom 10–15 minuta. Nakon sabijanja, u koraku razdvajanja, napon je povećan na 180 V, čime je omogućeno razdvajanje proteina unutar gela za razdvajanje. Razdvajanje je provođeno sve dok fronta boje za praćenje, bromfenol plavog, nije dosegla 5 mm iznad donjeg ruba gela. Elektroforetski razdvojeni proteini vizualizirani su bojanjem gela u otopini koja je sadržavala: 2,5 g dm⁻³ Coomassie Brilliant Blue R-250, 10 % (v/v) octenu kiselinu i 45 % (v/v) etanol u trajanju 30 minuta. Višak nespecifično vezane boje uklonjen je inkubacijom gela u vrućoj vodi.

3.2.5. Kinetičke metode

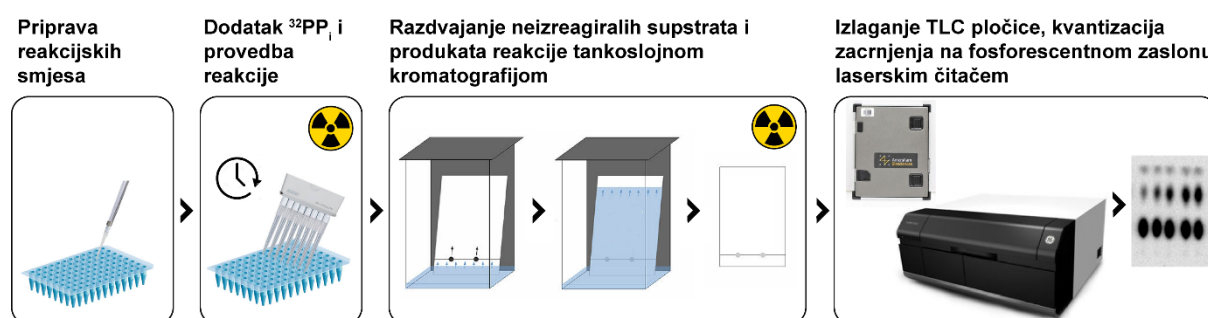
3.2.5.1. Aktivacija aminokiseline mjerena metodom izmjene pirofosfata

Brzina aktivacije aminokiseline na aaRS određuje se kao brzina ravnotežne izmjene radioaktivnog biljega između ATP-a i radioaktivno bilježenog pirofosfata, koji je prisutan u suvišku u reakcijskoj smjesi (Jednadžbe J1 i J2).



Jednadžba J1 prikazuje korak aktivacije aminokiseline, dok jednadžba J2 opisuje korak ravnotežne izmjene radioaktivnog biljega. U ovom je radu izmjena pirofosfata korištena za određivanje kinetičkih parametara za aminokiselinu i ATP u reakciji aktivacije odabranih divljih tipova i mutanata izoleucil-tRNA-sintetaza. Prilagođena verzija kinetičkog testa (Poglavlje 3.2.5.2) korištena je za određivanje konstante inhibicije mupirocina prema izoleucinu i ATP-u u koraku aktivacije aminokiseline. Kinetički testovi provedeni su u reguliranom okruženju pod dozimetrijskom kontrolom zbog primjene tekućih otvorenih izvora zračenja. Reakcija je provedena pri temperaturi od 30 °C (za sve enzime i mutante osim wt-ALHH-DrIleRS2) ili 37 °C (za wt-ALHH-DrIleRS2 i njegove mutante) u mikrotitarskim pločicama zaobljenog dna (*Kisker Biotech GmbH*), volumena 20 µl. Reakcijska smjesa za određivanje kinetičkih parametara prema izoleucinu sadržavala je: 55 mmol dm⁻³ HEPES-NaOH, pH = 7,5 pri 20 °C, 30 mmol dm⁻³ MgCl₂, 1 mmol dm⁻³ Na₄P₂O₇, 0,4 µCi µmol⁻¹ [³²P]-Na₄P₂O₇, 5 mmol dm⁻³ DTT, 0,15 mg ml⁻¹ BSA, 10 × K_M (ATP), (0,1–10) × K_M (Ile), te ovisno o njihovoj aktivnosti, 20 nmol dm⁻³–15 µmol dm⁻³ enzima. Reakcijska smjesa za određivanje kinetičkih parametara u odnosu na ATP postavljena je jednako kao i smjesa za aminokiselinu, s time da je koncentracija aminokiseline iznosila 10 × K_M(Ile), dok je koncentracija ATP-a varirana u rasponu (0,1–10) × K_M (ATP). Okvirne vrijednosti K_M(ATP), K_M(Ile) te koncentracije enzima određene su iz preliminarnih kinetičkih ispitivanja. Reakcija je započinjana dodatkom četvrtine ukupnog volumena reakcijske smjese otopinom enzima razrijeđenog na koncentraciju četiri veću od potrebne, u puferu sastava: 20 mmol dm⁻³ HEPES-NaOH, pH = 7,5 pri 20 °C, 0,6 mg ml⁻¹ BSA. Nakon započinjanja reakcije, u odabranim vremenskim intervalima, alikvoti reakcijske smjese volumena 2 µl pipetirani su u 3 µl otopine za zaustavljanje reakcije (engl. *quench*) sastava: 0,5 mol dm⁻³ NaOAc, pH = 4,5 pri 20 °C i 0,1 % (w/v) SDS. Volumen od 2,5 µl zaustavljene reakcijske smjese nanošen je na PEI300 TLC pločice (*Macherey-Nagel*), prethodno aktivirane u vodi. Mobilna faza za tankoslojnu

kromatografiju bila je sastava: $750 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, $\text{pH} = 3,5$ pri 20°C , 4 mol dm^{-3} ureja. Kromatografija je provedena dok fronta mobilne faze nije dosegla gornji rub pločice. Razvijene pločice su osušene i izlagane od 2 do 18 sati na zaslonu s pohranjenim fosforom, a potom snimljene na uređaju za fotostimuliranu luminescenciju Phosphorimager Typhoon 9410 (*General Electric*). Tijek kinetičkog eksperimenta grafički je sumiran na slici 14.



Slika 14. Shematski prikaz tijeka kinetičkog eksperimenta. Nakon provedbe reakcije, reakcijski produkti su razdvojeni od neizreagiranih supstrata pomoću tankoslojne kromatografije. Budući da reakcijski produkt čiji se nastanak prati nosi radioaktivni biljeg, moguće ga je vizualizirati izlaganjem TLC pločice zaslonu s pohranjenim fosforom. Intenziteti zacrnjenja na zaslonu, koji nastaju kao posljedica ionizirajućeg zračenja, kvantificiraju se pomoću uređaja za fotostimuliranu luminescenciju. Kvantificirani intenziteti zacrnjenja proporcionalni su koncentraciji reakcijskog produkta s radioaktivnim biljegom.

Karakteristična zacrnjenja na TLC pločici, koja odgovaraju $[\text{}^{32}\text{P}]\text{-P}_2\text{O}_7^{4-}$, $[\text{}^{32}\text{P}]\text{-PO}_4^{3-}$ i $[\text{}^{32}\text{P}]\text{-}\gamma\text{-ATP}$ kvantificirana su u programu ImageQuant (SV: 5.2, *General Electric*). Na osnovu rezultata kvantizacije određene su koncentracije nastalog $[\text{}^{32}\text{P}]\text{-}\gamma\text{-ATP}$ prema relaciji J3:

$$c([\text{}^{32}\text{P}]\text{-}\gamma\text{-ATP}) = \frac{I([\text{}^{32}\text{P}]\text{-}\gamma\text{-ATP}) \times c(\text{P}_2\text{O}_7^{4-})^{\text{tot}}}{I([\text{}^{32}\text{P}]\text{-}\gamma\text{-ATP}) + I([\text{}^{32}\text{P}]\text{-PO}_4^{3-}) + I([\text{}^{32}\text{P}]\text{-P}_2\text{O}_7^{4-})} \quad \dots \text{ (J3)}$$

gdje $c([\text{}^{32}\text{P}]\text{-}\gamma\text{-ATP})$ predstavlja koncentraciju obilježenog $[\text{}^{32}\text{P}]\text{-}\gamma\text{-ATP}$ nastalog ravnotežnom izmjenom, $c(\text{P}_2\text{O}_7^{4-})^{\text{tot}}$ ukupnu koncentraciju pirofosfatnih iona u reakcijskom puferu uključujući i nacijepljeni $[\text{}^{32}\text{P}]\text{-}\gamma\text{-P}_2\text{O}_7^{4-}$, dok $I(x)$ predstavlja intenzitet zacrnjenja koji odgovara $[\text{}^{32}\text{P}]\text{-}\gamma\text{-ATP}$, $[\text{}^{32}\text{P}]\text{-P}_2\text{O}_7^{4-}$ ili $[\text{}^{32}\text{P}]\text{-PO}_4^{3-}$. Porast koncentracije $[\text{}^{32}\text{P}]\text{-}\gamma\text{-ATP}$ u vremenu prikazan je upotrebom programskog paketa GraphPad Prism (SV: 6.01, *GraphPad Software*), nakon čega su početne brzine reakcije za svaku od korištenih koncentracija supstrata određene kao nagibi odgovarajućih pravca (J4):

$$dc([\text{}^{32}\text{P}]\text{-}\gamma\text{-ATP}) = v_o dt \quad \dots \text{ (J4)}$$

Ovisnost početne brzine reakcije o koncentraciji supstrata opisana je hiperbolnom funkcijom poznatom kao Michaelis–Mentenova jednadžba (J5):

$$v_o = \frac{V_M \times [S]}{K_M + [S]} \dots (J5)$$

gdje je v_o početna brzina enzimski katalizirane reakcije, $[S]$ koncentracija supstrata pri kojoj je postignuta početna brzina, V_M maksimalna brzina enzima postignuta u uvjetima kada $[S] \rightarrow \infty$, a K_M Michaelisova konstanta za supstrat. Michaelisova konstanta označuje koncentraciju supstrata pri kojoj enzim postiže polovinu svoje maksimalne brzine, a karakteristična je za specifičan par enzima i supstrata. Jednadžba J5 vrijedi u uvjetima ustaljenog stanja, kada su koncentracije reakcijskih međuprodukata konstantne i kada je u početnoj fazi reakcije količina produkta zanemariva. Michaelisova konstanta za supstrat (K_M) i maksimalna brzina enzima (V_M) izračunate su nelinearnom regresijom eksperimentalnih podataka prema Michaelis-Menteninoj jednadžbi u programu GraphPad Prism. Tijekom izračuna definirani su sljedeći uvjeti: $[S] > 0$, $V_M > 0$.

Precizniji pokazatelj katalitičke učinkovitosti enzima jest obrtni broj, k_{cat} , definiran kao omjer maksimalne brzine enzimski katalizirane reakcije, V_M , te koncentracije aktivnog enzima u reakcijskoj smjesi, c_E (J6):

$$k_{cat} = \frac{V_M}{c_E} \dots (J6)$$

Obrtni broj enzima neovisan je o koncentraciji supstrata i označuje maksimalni broj pretvorbi supstrata u produkt koje enzim može katalizirati u jedinici vremena po molekuli enzima. Za pouzdano određivanje obrtnog broja bilo je nužno točno poznavati koncentraciju aktivnog enzima u reakcijskoj smjesi. Stoga su se enzimski testovi provodili s visoko pročišćenim i homogenim preparacijama enzima. Obrtni broj enzima k_{cat} izračunat je primjenom jednadžbe J6, pri čemu su korišteni podatci o maksimalnoj brzini dobiveni nelinearnom regresijom te poznata koncentracija enzima u reakcijskoj smjesi.

3.2.5.2. Inhibicija mupirocinom u reakciji aktivacije praćena metodom izmjene pirofosfata

Reakcija aktivacije u prisutnosti mupirocina provedena je prema istom protokolu kao i standardna reakcija aktivacije (Poglavlje 3.2.5.1). Za enzime čija je konstanta inhibicije $K_I(\text{MUP})$ bila manja od $100 \mu\text{mol dm}^{-3}$, reakcijske smjese za inhibirane reakcije bile su suplementirane mupirocinom otopljenim u vodi, bez korekcije ionske jakosti pufera. Ti su

eksperimenti provedeni u reakcijskom puferu koji je sadržavao 55 mmol dm^{-3} HEPES-NaOH, $\text{pH} = 7,5$ pri 20°C . U inhibicijskim testovima s enzimima čija je konstanta inhibicije $K_I(\text{MUP})$ bila veća od $100 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$, porast koncentracije mupirocina mijenjao je ionsku jakost i puferski kapacitet smjese, jer je zbog slabe topljivosti u vodi mupirocin bio otopljen u 1 mol dm^{-3} HEPES-NaOH, $\text{pH} = 7,5$ pri 20°C . Kako bi se umanjio utjecaj promjene sastava reakcijskog pufera na brzinu reakcije, njegova je koncentracija u tim pokusima povećana s 55 mmol dm^{-3} na 255 mmol dm^{-3} . Pojedinačne reakcijske smjese stoga su dodatno suplementirane otopinom 1 mol dm^{-3} HEPES-NaOH $\text{pH}=7,5$ pri 20°C do konačne koncentracije 255 mmol dm^{-3} . Utjecaj povišene ionske jakosti i puferskog kapaciteta reakcijske smjese na aktivnost odabranih IleRS enzima procijenjen je usporedbom njihove maksimalne brzine u puferu s 255 mmol dm^{-3} HEPES-NaOH, $\text{pH}=7,5$ pri 20°C , s brzinom u standardnim uvjetima (55 mmol dm^{-3}).

Rezultat inhibicijskih pokusa bio je niz krivulja koje prikazuju ovisnost početne brzine enzima o koncentraciji supstrata pri različitim koncentracijama inhibitora. Eksperimentalni podaci obrađeni su u programskom paketu GraphPad Prism (SV: 6.01, *GraphPad Software*), prilagodbom modelu kompetitivne inhibicije, budući da je poznato da mupirocin djeluje kao kompetitivni inhibitor IleRS enzima. Nelinearna regresija provedena je uz sljedeće uvjete: $[S] > 0$, $K_I(\text{MUP}) > 0$, $V_M > 0$, pri čemu su parametri $K_I(\text{MUP})$ i V_M bili zajednički (engl. *shared*) za sve skupove podataka. Rezultati takvog utočnjavanja uključuju konstantu inhibicije $K_I(\text{MUP})$ prema odabranom supstratu, K_M za isti supstrat te V_M , odnosno maksimalnu brzinu enzima. Na temelju poznate koncentracije aktivnog enzima korištenog u inhibicijskom pokusu, iz maksimalne brzine izračunat je i obrtni broj enzima, k_{cat} (Poglavlje 3.2.5.1).

3.2.6. Metode strukturne biologije

3.2.6.1. Pronalazak inicijalnih kristalizacijskih uvjeta za odabrane enzime

U svrhu pronalaska uvjeta pogodnih za spontanu nukleaciju i rast kristala, apoprotein ili željeni kompleks postavljeni su na kristalizaciju metodom sjedeće kapi¹⁸⁸, koristeći komercijalno dostupne setove kristalizacijskih otopina, navedene u tablici 16.

Tablica 16. Osnovne karakteristike korištenih komercijalnih setova kristalizacijskih otopina

Kratica	Komplet	Proizvođač	Klasa precipitanta	Primjena
SA	SaltRx HT (HR2-136)	Hampton Research	Soli	Solubilni proteini, nukleinske kiseline i nukleoproteinski kompleksi
NA	Natrix HT (HR2-131)	Hampton Research	Soli, polimeri, PEG	Nukleinske kiseline i nukleoproteinski kompleksi
PI	PEG/Ion HT (HR2-139)	Hampton Research	Soli, organske kiseline, PEG	Solubilni proteini
I	Index HT (HR2-134)	Hampton Research	Soli, organske kiseline, PEG	Solubilni proteini, peptidi, nukleinske kiseline i nukleoproteinski kompleksi
JC	JCSG+ (MD1-37)	Molecular Dimensions	Soli, alkoholi, polioli	Solubilni proteini

Volumen od 100 nl otopine apoproteina ili njegovog kompleksa pomiješan je u jednakom omjeru s kristalizacijskom otopinom, a smjesa je ekvilibrirana prema 70 µl iste otopine u rezervoaru. Za pipetiranje malih volumena korišteni su kristalizacijski roboti Crystal Gryphon (*Art Robbins Instruments*), opremljen nanolitarskim piezoelektričnim dispenzerom, i Oryx 8 (*Douglas Instruments*), opremljen trokanalnim nanokapilarnim dispenzerom. Kristalizaciji su bili podvrgnuti apoprotein te kompleksi proteina s nehidrolizabilnim analozima reakcijskog međuprodukta i mupirocinom (Tablica 17). Kristalizacijske ploče pipetirane su u duplikatu te inkubirane na 4 °C i 20 °C radi ispitivanja utjecaja temperature na nukleaciju i kristalni rast. Tijekom prva dva tjedna nakon postavljanja, ploče s kristalizacijskim uvjetima pregledavane su svaka dva dana stereo mikroskopom, radi praćenja tijeka kristalizacije.

Tablica 17. Uvjeti inicijalne kristalizacije apoproteina i njihovih kompleksa s 5'-O-Ile-AMS, ili mupirocinom. Kratice imena korištenih komercijalnih kristalizacijskih otopina usklađene su s Tablicom 16.

Protein	$\gamma / \text{mg ml}^{-1}$	Kokristalizirani ligand	Korišteni komplet
wt-HMGH- <i>PmIleRS1</i>	20,0	<i>apo</i>	SA, PI, I, JC
		+ 2,5 mmol dm ⁻³ 5'-O-Ile-AMS	
		+ 3 mmol dm ⁻³ mupirocin	
wt-HVGH- <i>PmIleRS2</i>	16,5	<i>apo</i>	SA, PI, I, JC
		+ 2,5 mmol dm ⁻³ 5'-O-Ile-AMS	
		+ 10 mmol dm ⁻³ mupirocin	
wt-GIHH- <i>SgIleRS2</i>	19,9	<i>apo</i>	SA, PI, I, JC
		+ 2,5 mmol dm ⁻³ 5'-O-Ile-AMS	
wt-ALHH- <i>DrIleRS2</i>	21,0	<i>apo</i>	SA, PI, I, JC
		+2,5 mmol dm ⁻³ 5'-O-Ile-AMS	
		+2,5 mmol dm ⁻³ 5'-O-Val-AMS	
		+ 10 mmol dm ⁻³ mupirocin	
mut-HVGH- <i>DrIleRS2</i>	15,0	<i>apo</i>	SA, PI, I, JC
		+2,5 mmol dm ⁻³ 5'-O-Ile-AMS	
		+ 10 mmol dm ⁻³ mupirocin	

3.2.6.2. Optimizacija rasta kristala

Kristalizacijski uvjeti u kojima su opaženi proteinski monokristali, dvodimenzionalni kristali ili kristalne sraslice ručno su optimirani s ciljem dobivanja većih kristala prikladnih za difrakciju. U tu je svrhu 1 μl otopine apoproteina ili kompleksa pomiješan u jednakom omjeru s ručno pripremljenim precipitantom, a dobivena kap ekvilibrirana prema 300 μl iste otopine u rezervoaru. Optimizacija je provedena dvodimenzijски, uz istovremeno variranje dvaju parametara kristalizacijskog uvjeta. Koncentracija precipitanta i pH vrijednost pufera, odnosno koncentracija soli, mijenjane su u malim koracima oko vrijednosti iz inicijalnih kristalizacijskih uvjeta, u parovima. pH vrijednost mijenjana je u koracima od 0,1 do 0,25 pH jedinica, unutar uporabnog raspona danog pufera. Koncentracija precipitanta mijenjana je u koracima od 2,5 do 5 % (w/v), a koncentracija soli u koracima od 0,05 do 0,1 mol dm⁻³. Gdje je bilo moguće, precipitanti i soli zamijenjeni su ekvivalentnim ili srodnim solima drugih metala. Nakon postavljanja proteina na kristalizaciju, ploče su zatvorene prozirnou trakom Duck Crystal Clear Tape (*Henkel*) i inkubirane na temperaturi pri kojoj su prethodno opaženi inicijalni kristali. Ako je reprodukcija kristala u većim kapima bila uspješna, procijenjeni su morfologija i veličina kristala, a najuspješniji uvjeti zadržani za daljnju dvodimenzijску optimizaciju. Kristalizacijski uvjeti sustavno su optimirani sve dok nisu dobiveni trodimenzionalni proteinski monokristali.

3.2.6.3. Sijanje kristala

Ako nakon duljeg vremena (~20 dana) od postavljanja ploče nije došlo do kristalizacije niti precipitacije u kapi, nukleacija kristala potaknuta je dodatkom smrvljenih kristala loše morfologije istog ili drugog proteina metodom sijanja (engl. *seeding*)¹⁸⁹. Kap s kristalima je otvorena, a kristali su smrvljeni pomoću kapilare sa zataljenim krajem. Smrvljeni kristali preneseni su u kapi bez precipitacije pomoću alata za sijanje (HR8-133, *Hampton*), nakon čega je ploča ponovno zatvorena. Pojava eventualnih kristala praćena je redovitim promatranjem kapi pod stereo mikroskopom.

3.2.6.4. Umrežavanje kristala

Kristali skloni usoljavanju i otapanju stabilizirani su prije krioprotekcije metodom umrežavanja, izlaganjem parama koncentrirane otopine glutaraldehida¹⁹⁰. U tu svrhu, kap s makromolekulskim kristalima je otvorena, a u rezervoar je umetnut mikro-most (HR3-310, *Hampton*) napunjen otopinom 25 % (v/v) glutaraldehida. Kap je zatvorena, a kristali su izlagani parama glutaraldehida u trajanju od 1 do 60 sekundi. Tijekom umrežavanja pod stereo mikroskopom su praćene promjene u morfologiji, veličini i optičkim svojstvima kristala. Nakon dovršenog umrežavanja, kristali su kriostabilizirani (Poglavlje 3.2.6.5) te su provjerena njihova difrakcijska svojstva (Poglavlje 3.2.6.6).

3.2.6.5. Krioprotekcija i smrzavanje kristala

Kap s makromolekulskim kristalima otvorena je, a 50 µl otopine iz rezervoara pomiješano je s 50 µl krioprotekcijskog reagensa (Tablica 18), čime je dobivena stabilizacijska otopina. Dobivena otopina dodana je u jednakom volumenu kapljici s kristalima, nakon čega su kristali pažljivo promatrani pod mikroskopom. Ako je unutar 5 minuta nakon dodatka krioprotektanta došlo do pucanja, otapanja ili deformacije kristala, pokušana je stabilizacija drugim krioprotektantom. U okviru ovog rada ispitana je mogućnost primjene velikog broja različitih klasa krioprotektanata (Tablica 18), sve dok nije pronađen barem jedan krioprotektant čija primjena ne uzrokuje morfološku deformaciju kristala i/ili gubitak difrakcijskih svojstava.

U slučaju da je dodatak stabilizacijske otopine izazvao pucanje kristala, ali ne i njihovo otapanje, kristali su stabilizirani u nekoliko koraka progresivnim dodatkom otopina s postupno rastućom koncentracijom krioprotektanta. Nakon stabilizacije pogodnim krioprotektantom, veličina kristala procijenjena je pod mikroskopom, a kristali su pažljivo montirani u 20 µm najlonske omčice CryoLoop (*Hampton*), pričvršćene na pinove kompatibilne sa sinkrotronskim

goniometrom (*Hampton*). Montirani kristali smrznuti su u tekućem dušiku i pohranjeni u kazetu, u kojoj su, također pod tekućim dušikom, transportirani do sinkrotronskog izvora zračenja.

Tablica 18. Popis korištenih krioprotektanata za stabilizaciju makromolekulskih kristala.

Klasa spojeva	Krioprotektant	Finalna koncentracija
Polioli	100 % (v/v) glicerol (GOL)	25 % (v/v)
	100 % (v/v) 2-metil-2,4-pentandiol (MPD)	25 % (v/v)
	100% (v/v) etilenglikol (EG)	25 % (v/v)
Polimeri / Polioli	50 % (w/v) pentaeritritolpropoksilat (5/4 PO/OH)	12,5 % (v/v)
	100 % (v/v) polietilenglikol 400 (PEG400)	25 % (v/v)
	100 % (v/v) polietilenglikol 1000 (PEG1000)	25 % (v/v)
	100 % (v/v) polipropilenglikol 400 (PPG400)	25 % (v/v)
Soli	2 mol dm ⁻³ litijev sulfat	1 mol dm ⁻³
	10 mol dm ⁻³ litijev klorid	5 mol dm ⁻³
	4 mol dm ⁻³ litijev format	2 mol dm ⁻³
Osmoliti	4 mol dm ⁻³ trimetilamin-N-oksidi dihidrat (TMAO)	2 mol dm ⁻³
	6 mol dm ⁻³ L-prolin	3 mol dm ⁻³
Šećeri	70% (w/v) D-(+)-saharoza	35 % (v/v)
	70% (w/v) D-(+)-glukoza monohidrat	35 % (v/v)

3.2.6.6. Difrakcijski eksperimenti na sinkrotronskom izvoru zračenja

Difrakcijski eksperimenti na smrznutim makromolekulskim kristalima provedeni su na zrakama X06SA (PXI) i X06DA (PXIII) sinkrotronskog izvora zračenja instaliranog pri Paul Scherrer Institutu u Villigen, Švicarska. Glavna svojstva dviju zraka navedena su u tablici 19.

Tablica 19. Svojstva korištenih zraka za makromolekulsku kristalografiju na sinkrotronskom izvoru zračenja instaliranom pri Paul Schärer Institutu, Villigen, Švicarska

Zraka →	X06SA (PXI)	X06DA (PXIII)
Raspon valnih duljina (Å)	0,7–2,2	0,71–2,25
Raspon energija (keV)	5,7–17,5	5,5–17,5
Tok fotona pri 12,4 keV i 400 mA (ph/s)	2×10^{12}	5×10^{11}
Dimenzije fokusirane zrake v x š (µm)	5 × 5 do 100 × 100	90 × 45
Detektor	EIGER 16 M X (133 Hz)	PILATUS 2M-F
Izmjena uzoraka	Automatska, TELL robotska ruka, 20 s / uzorku	Automatska, CATS robotska ruka, 30 s / uzorku

S obzirom na veći tok zračenja, mogućnost prilagodbe aperture zrake, napredniji detektor i automatizirani izmjenjivač uzoraka, zraka X06SA bila je preferirani izbor za difrakcijske eksperimente. Prije difrakcijskog eksperimenta, kristali su rasterirani u mreži dimenzija 50 µm × 70 µm radi pronalaska dijela s najboljim difrakcijskim svojstvima. Dio rastera s najboljom difrakcijom potom je centriran u fokus zrake, a prikupljanje podataka započeto je pri oscilacijskom kutu goniometra koji je iznosio polovinu izmjerenog mozaiciteta, najčešće 0,5°.

Udaljenost detektora od kristala iznosila je od 130 do 250 mm, ovisno o razlučivosti skupa podataka. Ekspozicija kristala zraci iznosila je od 0,1 do 0,25 sekundi na zraci X06SA i od 0,05 do 0,1 sekundi na zraci X06DA, pri valnoj duljini od 1,0 Å. Ovisno o stabilnosti kristala u zraci, prikupljeni su difrakcijski podaci u rasponu od 180 do 360°.

3.2.6.7. Računalne metode za rješavanje kristalne strukture

Za rješavanje kristalne strukture proteina iz razlučenog difraktograma korišten je niz računalnih metoda, prikazanih u tablici 20. Programska oprema korištena je u skladu s uputama iz pripadajućih korisničkih priručnika. Po potrebi su kao ulazni podaci korišteni podaci iz javno dostupnih repozitorija nukleinskih sljedova (NCBI GenBank, [\[Hiperlink 8\]](#)), proteinskih sljedova (Uniprot, [\[Hiperlink 1\]](#)) te riješenih kristalnih struktura (RCSB Protein Data Bank, [\[Hiperlink 9\]](#)).

Tablica 20. Popis programskih paketa korištenih za rješavanje kristalnih struktura IleRS enzima metodom rendgenske difrakcije na makromolekulskim monokristalima.

Programski paket	Opis i primjena
XDS (SV: 20190806) XSCALE (SV: 20190806)	Indeksiranje i integriranje refleksa u pojedinačnim difraktogramima Spajanje indeksiranih refleksa i skaliranje seta podataka
CCP4i (SV: 7.0.077) - PHASER - CCP4i POINTLESS - FFT - MATTHEWS_COEF	Rješavanje strukture metodom molekulske zamjene Određivanje Laueove grupe Transformacija mapa elektronske gustoće brzom Fourierovom transformacijom Određivanje Matthewsovog koeficijenta za kristalno pakiranje
PHENIX (SV: 1.20.1_4487)	Iterativno utočnjavanje i statistička validacija molekuskog modela.
COOT (SV: 0.8.9.2)	Iterativna izgradnja i vizualizacija molekuskog modela
Pymol (SV: 2.3.2)	Vizualizacija i grafička obrada molekuskog modela
AlphaFold2 (SV: 2.3.2)	Matematičko modeliranje trodimenzionalne strukture proteina

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

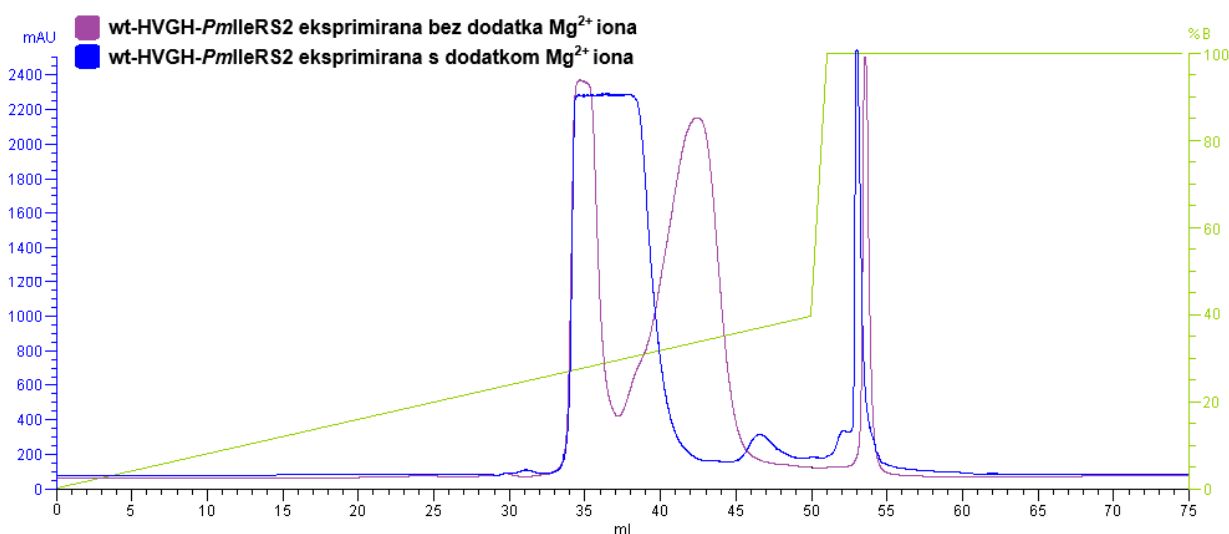
4.1. Proizvodnja i pročišćavanje biološkog materijala za kinetičke i strukturne studije

Biološki materijal za kinetičke i strukturne studije pripremljen je primjenom standardnih biokemijskih metoda. Međutim, zbog specifičnih zahtjeva u pogledu količine, čistoće i homogenosti, pojedine su procedure posebno prilagođene, kako je opisano u sljedećim poglavljima.

4.1.1. Proizvodnja i pročišćavanje divljih tipova enzima

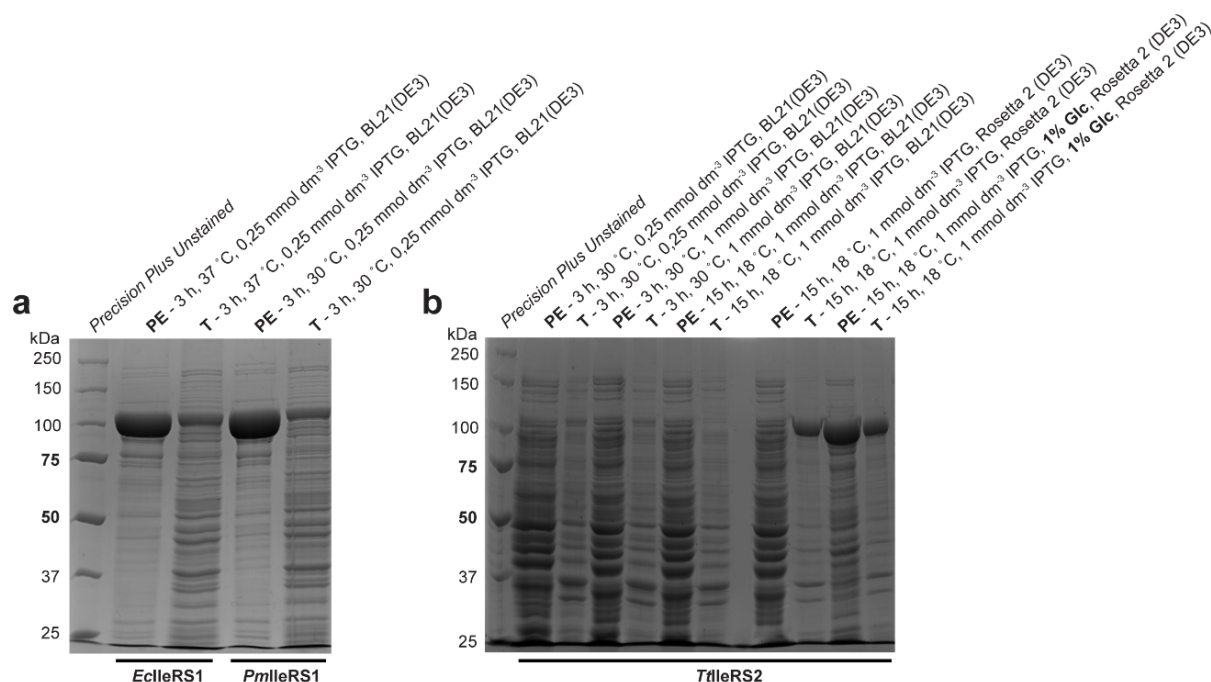
U okviru ovog rada pročišćeni su divlji tipovi sljedećih enzima: IleRS2 iz *Deinococcus radiodurans* (wt-ALHH-DrIleRS2), IleRS2 iz *Thermus thermophilus* (wt-HVGH-TtIleRS2), IleRS1 iz *Escherichia coli* (wt-HIGH-EcIleRS1), IleRS1 i IleRS2 iz *Priestia megaterium* (wt-HMGH-PmIleRS1 i wt-HVGH-PmIleRS2) te IleRS2 iz *Streptomyces griseus* (wt-GIHH-SgIleRS2). Kodirajući sljedovi za divlje tipove enzima umnoženi su lančanom reakcijom polimerazom (PCR) s izolata genomske DNA (wt-ALHH-DrIleRS2) ili komercijalnih plazmida (wt-HVGH-TtIleRS2) te metodama restrikcijsko-ligacijskog kloniranja klonirani u plazmidni vektor pET28b(+). Ekspresijski vektori za neke divlje tipove IleRS (wt-HIGH-EcIleRS1¹²⁵, wt-GIHH-SgIleRS2¹², wt-HMGH-PmIleRS1⁴⁰, te wt-HVGH-PmIleRS2⁴⁰) bili su dostupni iz laboratorijske zbirke plazmida i stoga nisu ponovno pripremljeni. U svim korištenim plazmidima, kodirajući slijed bio je u okviru čitanja heksahistidinskog privjeska (His₆) na 5'-kraju, dok je cijeli konstrukt bio pod kontrolom inducibilnog *lac*-promotora. Zbog specifičnog načina kloniranja, konstrukti su eksprimirani u fuziji s N-terminalnim heksahistidinskim privjeskom radi pročišćavanja metodom afinitetne kromatografije na kolonama s imobiliziranim metalnim ionima. Nakon provjere slijeda sekvenciranjem, plazmidni vektor je transformiran u ekspresijski soj radi pojačane ekspresije proteina. Kao ekspresijski medij korišten je LB-medij suplementiran s 1 mmol dm⁻³ MgCl₂ i 0,1 mmol dm⁻³ ZnCl₂. Cinkovi ioni dodavani su u medij jer IleRS posjeduju strukturne cinkove ione¹⁵⁹, pri čemu je njihovo dodavanje uslijedilo tek nakon što su stanice postigle optičku gustoću pogodnu za indukciju, budući da su slobodni cinkovi ioni citotoksični¹⁹¹. Dodatak magnezijevih iona u medij povećao je prinos eksprimiranih proteina (do 50 % za wt-HMGH-PmIleRS1), a u slučaju wt-HVGH-

PmIleRS2 pridonio je njihovoj stabilnosti¹⁹². Tijekom pročišćavanja metodom ionske izmjene, wt-HVGH-*PmIleRS2*, pojačano eksprimiran bez dodatka magnezijevih iona, pri višim koncentracijama bio je sklon formiranju dviju kromatografskih frakcija. Proteini iz tih frakcija pokazivali su sklonost precipitaciji i nisu bili pogodni za kristalizacijske eksperimente (Slika 15). Pozitivan učinak dodatka magnezijevih iona u ekspresijski medij u skladu je s literaturno poznatom činjenicom da visoko koordinirani magnezijevi metalni centri u blizini peptidil-transferaznog centra ribosoma stabiliziraju lokalnu strukturu ribosomske RNA, ključnu za ribozimsku aktivnost, čime mogu pridonijeti učinkovitosti translacije¹⁹³.



Slika 15. Usporedba kromatograma ionske izmjene wt-HVGH-*PmIleRS2* dobivenih za protein eksprimiran u LB-mediju bez dodatka magnezijeva klorida (roza krivulja) te za protein eksprimiran u mediju suplementiranom s 1 mmol dm⁻³ magnezijeva klorida (plava krivulja). Tijekom pročišćavanja metodom ionske izmjene, wt-HVGH-*PmIleRS2* pojačano eksprimiran bez dodatka magnezijevih iona, pri visokim koncentracijama bio je sklon formiranju dviju kromatografskih frakcija. Proteini u tim frakcijama pokazivali su sklonost precipitaciji i nisu bili pogodni za kristalizacijske eksperimente.

Svi *IleRS* enzimi, osim wt-HVGH-*TtIleRS2*, pojačano su eksprimirani u ekspresijskom soju BL21(DE3). Budući da se wt-HVGH-*TtIleRS2* nije eksprimirao u soju BL21(DE3), za njegovu je ekspresiju korišten soj Rosetta2(DE3), koji kotranskripcijom tRNA za rijetke kodone omogućuje ekspresiju kodirajućih sljedova s rijetkim i neoptimiranim kodonima¹⁹⁴. Osim promjene ekspresijskog soja, pojačana ekspresija wt-HVGH-*TtIleRS2* zahtijevala je četiri puta veću koncentraciju induktora u odnosu na ostale enzime te supresiju cureće ekspresije dodatkom 1 % (w/v) glukoze u ekspresijski medij¹⁹⁵. Slika 16 prikazuje reprezentativni ekspresijski profil većine sintetaza u soju BL21(DE3) te promjenu ekspresijskih svojstava wt-HVGH-*TtIleRS2* pri promjeni ekspresijskog soja i uvjeta ekspresije.

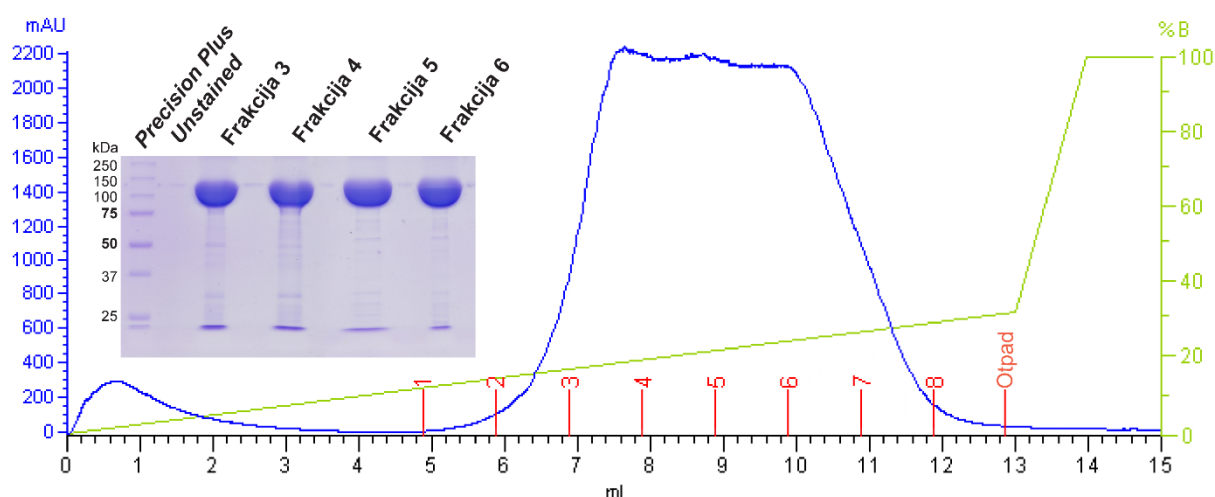


Slika 16. Reprezentativni primjeri ekspresijskih profila IleRS. (a) Tipični ekspresijski profili IleRS enzima eksprimiranih u ovom radu (osim wt-HVGH-*TtleRS2*), prikazani na primjerima ekspresije wt-HIGH-*EclleRS1* i wt-HMGH-*PmlleRS1*. Proteini se eksprimiraju u topljivom obliku pri niskim koncentracijama induktora u soju BL21(DE3). (b) Promjena ekspresijskih svojstava wt-HVGH-*TtleRS2* pri promjeni ekspresijskog soja i uvjeta ekspresije. Kodirajući slijed wt-HVGH-*TtleRS2*, s neoptimiranim kodonima, eksprimira se u topljivom obliku isključivo u soju Rosetta2(DE3), uz dodatak visoke koncentracije induktora i supresiju cureće ekspresije dodatkom 1 % (w/v) glukoze u ekspresijski medij. Na slici, oznaka *PE* odnosi se na proteinski ekstrakt, odnosno frakciju topljivih proteina zaostalu nakon lize stanica, dok *T* označava netopljivi talog nastao nakon lize stanica. *Precision Plus Unstained* predstavlja marker molekulskih masa.

Pojačano eksprimirane IleRS su iz taloga stanica oslobođene soniciranjem uz dodatak litičkih enzima lizozima ili lizonaze, DNaze I i RNaze A kako je opisano u ⁴⁰ i u Poglavlju 3.2.4.2. Ciklus smrzavanja i odmrzavanja stanica značajno je pridonio učinkovitosti lize, bez negativnog utjecaja na stabilnost i katalitičku aktivnost enzima¹⁹⁶.

Svi stanični lizati, osim onoga s pojačano eksprimiranim wt-HVGH-*TtleRS2*, pročišćavani su kromatografski bez prethodnog tretmana. Stanični lizat s wt-HVGH-*TtleRS2*, zbog termostabilnosti pojačano eksprimiranog enzima, najprije je podvrgnut termičkoj denaturaciji, pri čemu dolazi do taloženja termolabilnog dijela staničnog proteoma^{102,197} (Poglavlje 3.2.4.3.). Nakon flokulacije, u otopini je zaostao termostabilni protein u znatno jednostavnijoj matrici, što je dodatno pojednostavilo postupak pročišćavanja.

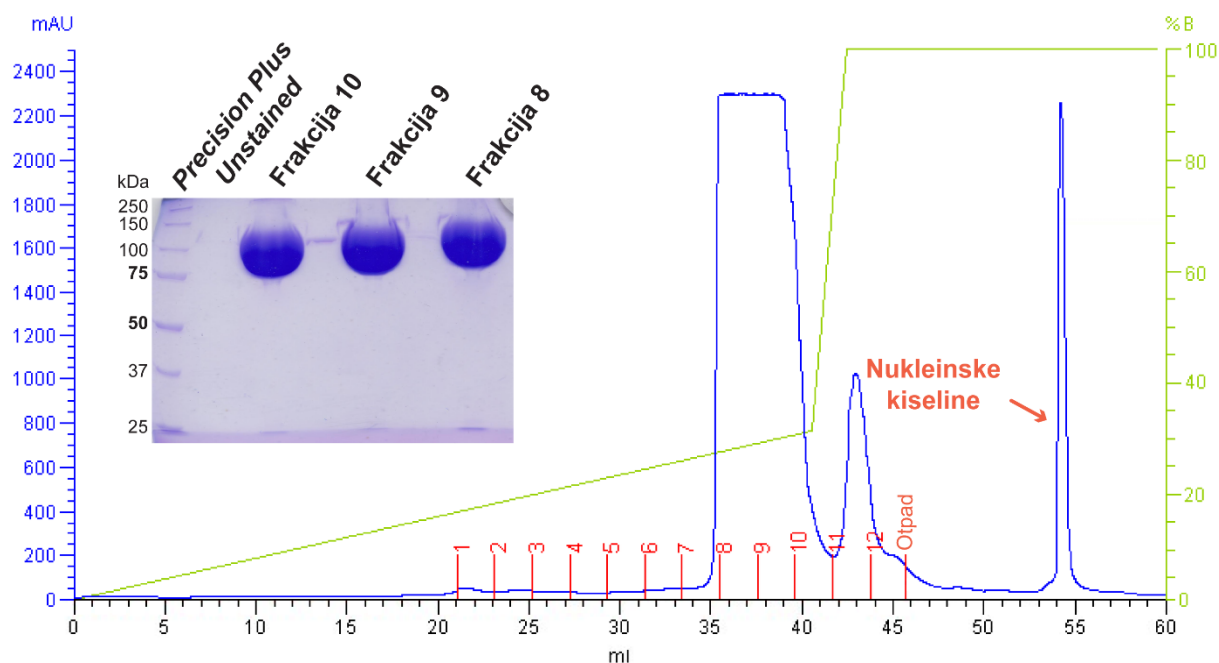
Topljivi proteini iz (termički tretiranog) staničnog lizata pročišćavani su afinitetnom kromatografijom s imobiliziranim metalnim ionima. Zbog veće učinkovitosti u odnosu na ručno punjene kolone, za pročišćavanje su korištene komercijalne kolone HisTrap 5 ml HP (Cytiva) s kapacitetom od 200 mg fuzijskog proteina. Prije elucije proteina s kolone primjenom linearnog gradijenta imidazola, kolona je isprana puferom niske ionske jakosti (50 mmol dm⁻³ NaCl) i niske koncentracije imidazola (10 mmol dm⁻³ imidazol) radi *in situ* izmjene pufera (Poglavlje 3.2.4.4.). Izmjena pufera na ovakav način smanjila je vjerojatnost precipitacije proteina tijekom izmjene pufera na anizotropnoj membrani, što je pridonijelo homogenosti preparacije. Vezani protein u puferu niske ionske jakosti eluiran je s kolone u linearnom gradijentu imidazola. Reprezentativni kromatogram pročišćavanja proteina wt-ALHH-DrIleRS2 afinitetnom kromatografijom prikazan je na slici 17.



Slika 17. Reprezentativni primjer pročišćavanja wt-ALHH-DrIleRS2 afinitetnom kromatografijom s imobiliziranim metalnim ionima. Protein se s kolone eluirao u linearnom gradijentu imidazola. Frakcije s najvećom koncentracijom proteina analizirane su denaturirajućom elektroforezom u poliakrilamidnom gelu u prisustvu natrijeva dodecil sulfata (SDS-PAGE), radi procjene njihove čistoće (umetnuta slika).

Iako proteini pročišćeni na ovaj način nisu bili značajno kontaminirani nukleinskim kiselinama ($0,55 < A_{280} / A_{230} < 0,65$), zbog koelucije drugih proteina ipak nisu bili pogodni za kristalogrfske eksperimente koji zahtijevaju visoku čistoću i homogenost uzorka. Stoga su proteini pročišćeni afinitetnom kromatografijom dodatno pročišćeni metodom ionske izmjene. Najčišće frakcije iz afinitetne kromatografije nanosene su na kondicioniranu ionsko-izmjenjivačku kolonu izravno u puferu niske ionske jakosti (50 mmol dm⁻³ NaCl), budući da je zamjena pufera bila provedena *in situ* tijekom afinitetne kromatografije (Poglavlje 3.2.4.5). Razdvajanje i eluiranje proteina postignuto je primjenom linearnog gradijenta ionske jakosti.

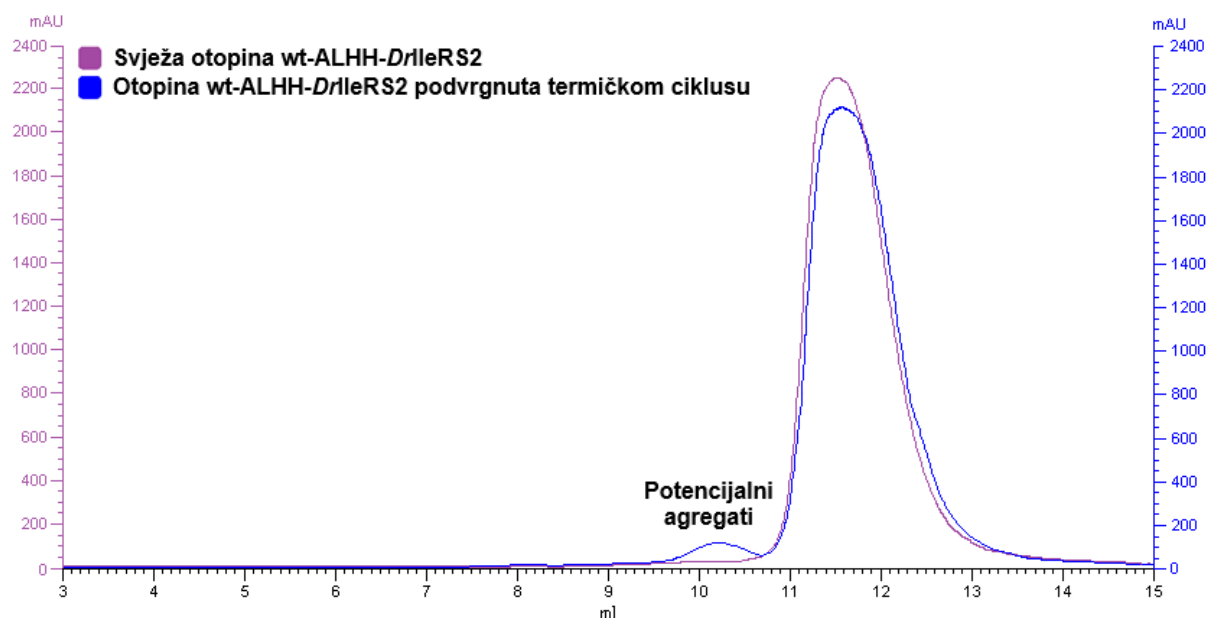
Nakon ionske izmjene, protein je pokazivao znatno viši stupanj čistoće s obzirom na prisutnost drugih proteina i nukleinskih kiselina ($0,50 < A_{280} / A_{230} < 0,52$). U tipičnom kromatogramu (Slika 18) bio je vidljiv vrh koji se eluirao pri visokoj ionskoj jakosti vjerojatno porijeklom od nukleinskih kiselina.



Slika 18. Reprezentativni primjer pročišćavanja wt-ALHH-DrIleRS2 ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom na koloni MonoQ HR 16/16 nakon pročišćavanja afinitetnom kromatografijom s imobiliziranim metalnim ionima. Eluiranje proteina s kolone ostvareno je primjenom linearnog gradijenta soli. Najkoncentriranije frakcije analizirane su denaturirajućom elektroforezom u poliakrilamidnom gelu s natrijevim dodecil sulfatom (SDS-PAGE), kako bi im se procijenila čistoća.

Prosječan prinos dvostruko pročišćenog proteina iznosio je ~40 mg po litru bakterijske kulture, dok je procijenjeni gubitak proteina iznosio je ~30 %, prvenstveno zbog toga što su za daljnje korake pročišćavanja korištene isključivo najčišće frakcije iz prethodne faze. Pročišćenim proteinima izmijenjen je pufer, a nakon alikvotiranja bili su smrznuti uranjanjem u tekući dušik. Skladišni pufer nije sadržavao krioprotektante jer oni smanjuju vjerojatnost nukleacije i rasta kristala¹⁹⁸. Stoga je smrzavanje alikvota pročišćenih proteina provođeno u tekućem dušiku kako bi se spriječilo stvaranje kristaličnog leda te posljedična denaturacija i precipitacija proteina¹⁹⁹. Budući da su iz praktičnih razloga za kristalizacijske eksperimente korišteni prethodno smrznuti, a ne svježe pripremljeni proteini, metodom gel-filtracije, procijenjen je stupanj agregacije uzrokovane smrzavanjem, čime je istodobno evaluirana primjenjivost eksperimentalnog pristupa. Rezultati gel-filtracije wt-ALHH-DrIleRS2 pokazali

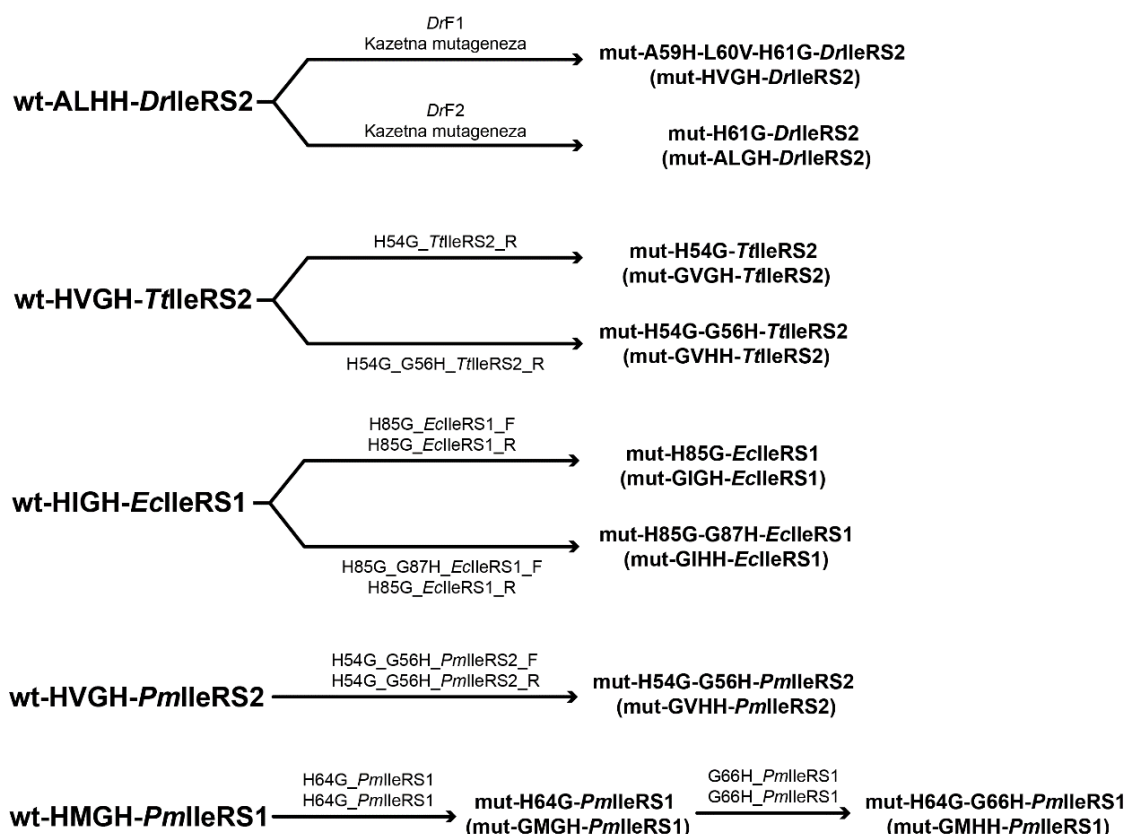
su zanemarivu razinu agregacije nakon jednog ciklusa smrzavanja i odmrzavanja (Slika 19). Shodno tome, u kinetičkim i strukturnim analizama korišteni su alikvoti proteina odmrznuti neposredno prije upotrebe. Eventualni makromolekulski precipitati uklonjeni su iz odmrznute otopine centrifugiranjem pri 30000 g neposredno prije upotrebe.



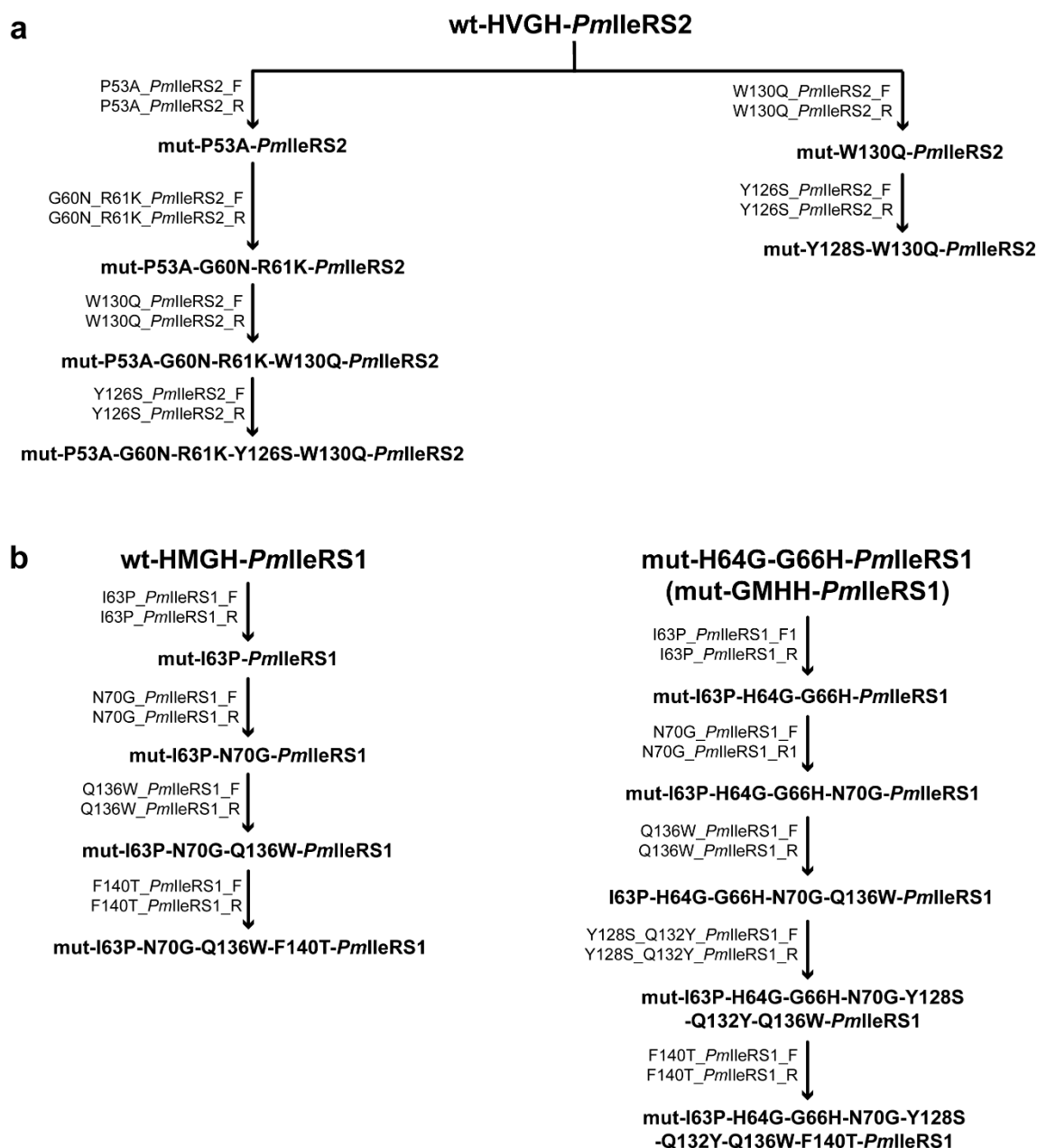
Slika 19. Reprezentativni primjer gel-filtracijske kromatografije: svježe pripravljenog (nesmrznutog) uzorka wt-ALHH-DrIleRS2 (roza krivulja) te istog proteina koji je podvrgnut jednom ciklusu smrzavanja i odmrzavanja u skladišnom puferu bez prisutnosti krioprotektanta (plava krivulja). Rezultati ukazuju na minimalan nastanak agregata uzrokovan jednim ciklusom smrzavanja i odmrzavanja, pod uvjetom da je smrzavanje alikvota proteina provedeno brzo, metodom uranjanja u tekući dušik.

4.1.2. *Proizvodnja i pročišćavanje izmijenjenih varijanti proteina*

U okviru ove disertacije priređen je niz jednostrukih i višestrukih mutanata divljih tipova IleRS, čija je priprema detaljno opisana u poglavljima 3.2.3.8 i 3.2.3.9. Ciljevi priprave mutanata bili su dvostruki: 1) potvrda povezanosti slijeda strukturnog motiva IleRS (HXGH-motiv) s rezistencijom na mupirocin i 2) razumijevanje razlika u specifičnosti dvaju tipova bakterijskih IleRS prema mupirocinu. Na slici 20 prikazan je eksperimentalni pristup za ostvarenje prvog cilja, dok slika 21 ilustrira pristup za ostvarenje drugog cilja na modelnim enzimima iz *P. megaterium*.

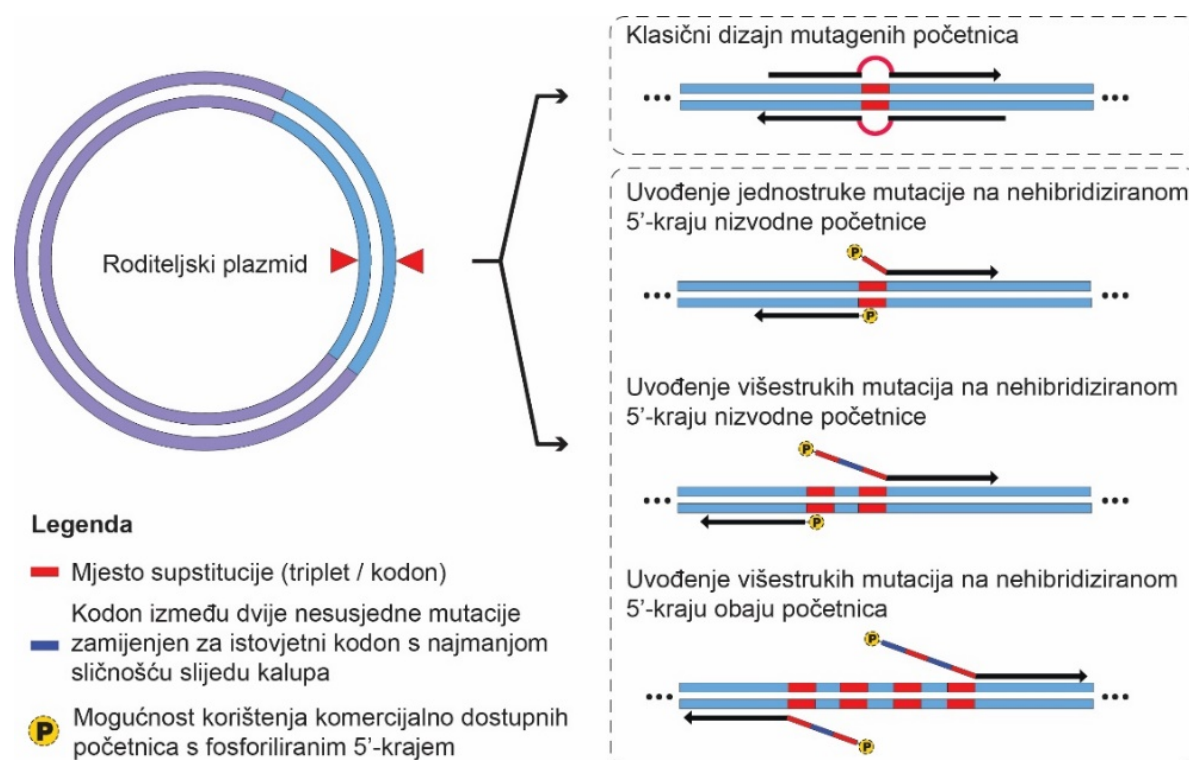


Slika 20. Dizajn mutanata: wt-ALHH-DrIleRS2, wt-HVGH-TfIleRS2, wt-HIGH-EcIleRS1, wt-HVGH-PmIleRS2 i wt-HMGGH-PmIleRS1. Ovi su mutanti služili za proučavanje povezanosti slijeda strukturnog motiva IleRS s rezistencijom na prirodni antibiotik mupirocin. Mutant wt-HMGGH-PmIleRS1 priredio je i ustupio dr. sc. Vladimir Zanki.



Slika 21. Dizajn različitih jednostrukih i višestrukih mutanata: a) wt-HVGH-*PmIleRS2* i b) wt-HMGH-*PmIleRS1*. Navedeni mutanti pripremljeni su kako bi se razjasnio mehanizam različite osjetljivosti dvaju tipova *IleRS*-a na prirodni antibiotik mupirocin.

Za pripravu većine jednostrukih i višestrukih mutanata, osim pripreve mut-H64G-*TtIleRS2* (mut-GVGH-*TtIleRS2*), mut-H64G-G66H-*TtIleRS2* (mut-GVHH-*TtIleRS2*), mut-H64G-*PmIleRS1* (mut-GMGGH-*PmIleRS1*) te mut-H64G-G64H-*PmIleRS1* (mut-GMHH-*PmIleRS1*), korišten je komercijalni komplet Q5 SDM (*NEB*), uz specifično dizajnirane mutagene početnice. Umjesto klasičnih, preklapajućih mega-početnica duljine >30 bp sa supstitucijama u sredini slijeda, dizajnirane su nepreklapajuće, kratke početnice usmjerene od mjesta mutacije, sa supstitucijama na nehibridiziranim 5'-krajevima (Slika 22).



Slika 22. Usporedba klasičnog dizajna mutagenih početnica s pristupom u kojem se mutacije uvode na nehibridizirane 5'-krajeve jedne ili obje početnice. U usporedbi s klasičnim pristupom, novi dizajn omogućuje uporabu kratkih, nepreklapajućih početnica, čime se eliminira nastanak njihovih dimera. Manja veličina početnica dodatno smanjuje mogućnost njihova nespecifičnog vezanja na kalup. Početnice omogućuju učinkovito uvođenje višestrukih, nesusjednih mutacija, pri čemu se kodoni između pojedinih mutacijskih mjesta zamjenjuju istovjetnim kodonima minimalne sličnosti s kalupom.

Ovakav inovativni dizajn mutagenih početnica donosi nekoliko prednosti u odnosu na klasični pristup. Zahvaljujući kraćoj duljini i djelomičnoj nehibridiziranosti novodizajniranih početnica, smanjuje se nespecifična hibridizacija na kalup te nastanak neželjenih sekundarnih struktura. Istovremeno, potpuna međusobna nekomplementarnost početnica onemogućuje nastanak dimera, koji umanjuju prinos mutagene PCR reakcije. Dizajn također omogućava uvođenje većeg broja međusobno nesusjednih mutacija, pri čemu se kodoni između mutacijskih mjesta zamjenjuju za analoge (npr. $\text{Leu}^{\text{TTA}} \rightarrow \text{Leu}^{\text{CTG}}$) s minimalnom nukleotidnom sličnosti, što rezultira nastankom nehibridiziranih 5'-krajeva oko mjesta mutacije. Konačno, različite višestruke mutacije moguće je simultano uvesti korištenjem obiju početnica, čime se značajno povećava broj mutacija u jednom eksperimentu. Unatoč prednostima u odnosu na klasični dizajn početnica, novi pristup ima i određene nedostatke. U klasičnoj mutagenizi, PCR produkt može se izravno transformirati u bakterijske stanice nakon tretmana restriktivnim enzimom DpnI, koji uklanja nemutirani roditeljski kalup, zahvaljujući komplementarnim stršećim

krajevima PCR produkta. Primjenom nepreklapajućih, nefosforiliranih početnica usmjerenih od mjesta mutacije, dobiva se PCR produkt s tupim krajevima (efektivno dvolančani lom DNA), koji se ne može ciklizirati nakon transformacije u stanicu. Stoga je, nakon tretmana endonukleazom DpnI, potrebno dodatno obraditi PCR smjesu kinazom koja fosforilira 5'-krajeve DNA te ligazom koja popravljiva dvolančani lom. Naposljetku, ovakav dizajn mutagenih početnica nije primjenjiv na kalupe čiji su nukleotidni slijedovi općenito nepovoljni za specifično vezanje početnica (repetitivni, GC-bogati, palindromski). U okviru ovog rada, neovisno o dizajnu početnica, klasična mutageneza nije bila primjenjiva na primjerima A59H-L60V-H61G-*DrIleRS2* (mut-HVGH-*DrIleRS2*) i H61G-*DrIleRS2* (mut-ALGH-*DrIleRS2*). Navedeni mutanti pripremljeni su metodom kazetne mutageneze, pri čemu je nukleotidni slijed između dvaju pogodnih jedinstvenih restrikcijskih mjesta (kazeta) zamijenjen slijedom sa željenim mutacijama (mutagena kazeta).

Postupak pojačane ekspresije mutiranih varijanti *IleRS* enzima bio je jednak kao i za odgovarajuće divlje tipove (Poglavlje 3.2.4.1). Budući da uvedene mutacije nisu značajno utjecale na stabilnost proteina ni na njegova fizikalno-kemijska svojstva, uvjeti ekspresije, pročišćavanja afinitetnom kromatografijom i ionskom izmjenom te skladištenja mutiranih varijanti ostali su jednaki kao i za odgovarajuće divlje tipove.

4.2. Nekanonski oblik HXGH motiva, rasprostranjen među bakterijskim IleRS2, obdaruje ih mupirocinskom hiper-rezistencijom

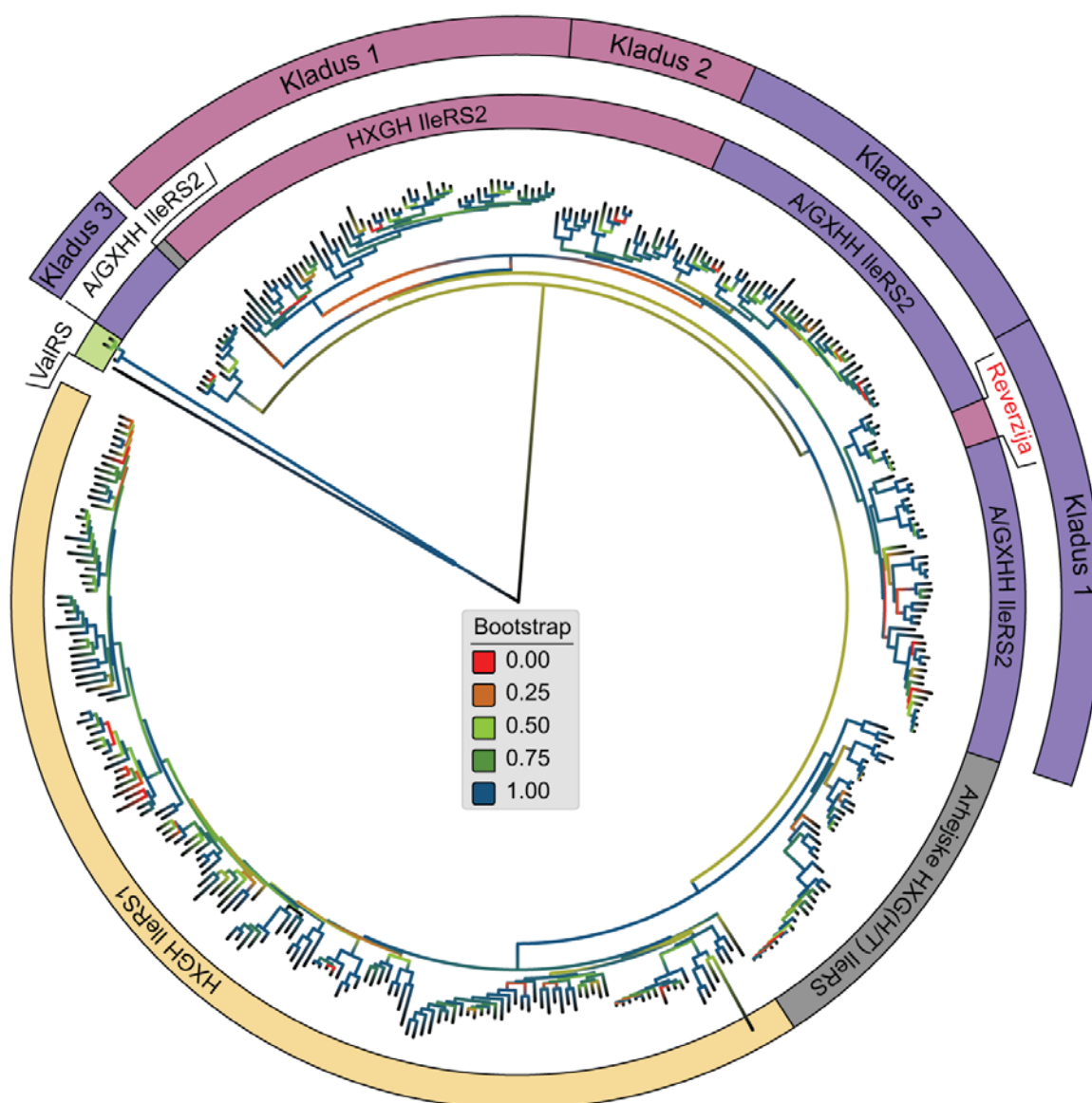
4.2.1. Filogenetska analiza bakterijskih IleRS

Cvetešić *et al.* prethodno su pokazali da je wt-GIHH-SgIleRS2 značajno rezistentnija prema mupirocinu od ostalih IleRS2 enzima. S konstantom inhibicije od 10 mmol dm^{-3} za mupirocin u koraku aktivacije, ovaj enzim višestruko je rezistentniji prema antibiotiku od drugih IleRS2, čije se konstante inhibicije nalaze u mikromolarnom području^{7,12,13,17,146,152,161}. Ipak, budući da mupirocinska rezistencija nije bila u fokusu njihova istraživanja, istraživači nisu dalje proučavali opaženi učinak, pa je pitanje otpornosti ovog izuzetnog enzima ostalo nejasno.

Kako bi se utvrdilo postoje li druge hiper-rezistentne IleRS slične wt-GIHH-SgIleRS2, provedena je filogenetska analiza bakterijskih i arhejskih IleRS enzima.^{III} Iako su ranije provedene slične analize, po prvi je put sustavno praćena filogenija isključivo bakterijskih i arhejskih IleRS enzima^{12,40}. Sustavnom pretragom baza proteinskih sljedova Uniprot¹⁶² i PFAM¹⁶⁵, izdvojeni su sljedovi PFAM domena 379 bakterijskih IleRS. Bakterijskim enzimima dodatno su pridruženi 41 slijed arhejskih IleRS i četiri slijeda bakterijskih valil-tRNA-sintetaza (ValRS). Proteinski sljedovi odabrani su tako da ravnomjerno pokrivaju stablo života, nakon čega su poravnati. Filogenetsko stablo prikazano na slici 23 konstruirano je na temelju višestrukog poravnanja uz korištenje ValRS sljedova za ukorjenjivanje (engl. *outgroup root*).

Rezultati filogenetske analize pokazali su jasnu podjelu između bakterijskih IleRS1 i IleRS2 enzima na razini primarnog slijeda očuvanih fragmenata katalitičkih domena (PFAM slijed), što je u skladu s prethodnim istraživanjima^{12,40,41}. Većina bakterijskih rodova posjeduje jednu genomsku kopiju IleRS (IleRS1 ili IleRS2), dok su u samo nekoliko rodova (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*) istodobno prisutni i IleRS1 i IleRS2 enzimi. U ukorijenjenom stablu, bakterijske IleRS1 i arhejske IleRS čine monofiletske kladuse sa zajedničkim pretkom, što podupire hipotezu o njihovoj zajedničkom evolucijskom porijeklu.

^{III} Filogenetska analiza provedena je u suradnji s dr. sc. Jagodom Jablonskoms instituta Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel.



Slika 23. Rezultati filogenetske analize bakterijskih i arhejskih IleRS. U skladu s prethodnim rezultatima, bakterijske IleRS grupiraju se na razini slijeda katalitičke domene u dvije skupine, IleRS1 i IleRS2. Kladus IleRS1 enzima je monofilteski te ovi enzimi sadrže isključivo kanonski oblik strukturnog motiva (HXGH). Evolucijsko porijeklo IleRS2 u odnosu na IleRS1 znatno je složenije. Identificirana su dva kladusa IleRS2 enzima s kanonskim (HXGH) i tri kladusa s nekanonskim strukturnim motivom (GXHH). U kladusu 1 IleRS2 enzima s nekanonskim motivom opažena je spontana reverzija GXHH slijeda u HXGH slijed.

Za razliku od IleRS1, koje isključivo sadrže kanonski slijed očuvanog strukturnog motiva razreda I aaRS (histidil-X-glicil-histidin, HXGH), samo ~ 50 % analiziranih IleRS2 sadrže taj motiv. Preostalih ~50 % IleRS2 sadrže nekanonski slijed alanil/glicil-X-histidil-histidin (A/GXHH), u kojem su u odnosu na kanonski slijed efektivno zamijenjene prva i treća pozicija. Neobičnost ovih rezultata naglašava činjenica da je HXGH motiv inače visoko očuvan, jer predstavlja ključni katalitički element aktivnog mjesta svih aaRS enzima razreda I^{9,11}.

Prvi histidin u HXGH motivu igra ključnu ulogu u stabilizaciji prijelaznog stanja tijekom aktivacije aminokiseline, a njegove mutacije značajno utječu na brzinu katalitičkog koraka reakcije^{200,201}. Istodobno, treća pozicija slijeda (glicin) mora biti sterički mala kako bi se omogućilo pravilno pozicioniranje adeninske baze ATP-a tijekom vezanja supstrata, čime se omogućuje nastanak reakcijskog međuprodukta (Ile-AMP)^{13,148}. Uz varijabilnost u slijedu strukturnog motiva, pokazano je da IleRS2 enzimi imaju znatno složeniju evolucijsku povijest od IleRS1. Identificirana su tri kladusa bakterijskih IleRS2 s nekanonskim GXHH motivom, te jedan kladus s kanonskim HXGH motivom, podijeljen u dvije podskupine. U jednom od kladusa GXHH-IleRS2 unutar roda *Deinococcus-Thermus*, opažena je spontana reverzija nekanonskog GXHH slijeda u kanonski HXGH. Sveukupno, rezultati upućuju na to da su IleRS2 enzimi GXHH oblik motiva stekli višekratno tijekom evolucije. Značajna zastupljenost nekanonskog slijeda među IleRS2, uz povremene reverzije u kanonski oblik, ukazuje na funkcionalnu vijabilnost GXHH-IleRS2 te mogućnost reverzije i u suvremenim enzimima, bez većeg utjecaja na katalitičku aktivnost. Nasuprot tome, stroga očuvanost kanonskog HXGH slijeda kod IleRS1 upućuje na njihovu nisku toleranciju prema mutacijama u nekanonski oblik motiva.

Ovi rezultati filogenetske analize otvorili su niz novih istraživačkih pitanja. Budući da hiper-rezistentna wt-GIHH-SgIleRS2 sadrži nekanonski oblik strukturnog motiva, postavilo se pitanje moguće povezanosti između mupirocinske rezistencije i slijeda motiva. Dodatno, prisutnost heterogenosti u slijedu strukturnog motiva kod IleRS2, ali ne i kod IleRS1, potaknula je pitanje mogućnosti modifikacije tog slijeda u suvremenim enzimima te utjecaja takvih promjena na njihovu enzimsku aktivnost i mupirocinsku rezistenciju.

4.2.2. Kinetička karakterizacija odabranih IleRS i njihovih varijanti s promijenjenim slijedom strukturnog motiva

U cilju odgovora na pitanja otvorena filogenetskom analizom, kinetički su okarakterizirani odabrani IleRS1 i IleRS2 enzimi te njihovi mutanti s promijenjenim slijedom strukturnog motiva (kanonski u nekanonski i obrnuto). Kinetička karakterizacija obuhvatila je mjerenje kinetičkih parametara (k_{cat} , K_M) u koraku aktivacije aminokiseline u odsutnosti tRNA, budući da je pokazano kako prisutnost tRNA nema utjecaja na brzinu aktivacije aaRS enzima razreda Ia, kojemu pripada i IleRS^{9,10}. Budući da je mupirocin kompetitivni inhibitor u koraku aktivacije aminokiseline, pretpostavljeno je da ne utječe na brzinu prijenosa aminokiseline, te sukladno tome inhibicija nije dodatno testirana ni u koraku prijenosa ni u ukupnoj reakciji aminoaciliranja. Konstanta inhibicije za mupirocin u koraku aktivacije određena je u odnosu na oba supstrata (Ile i ATP). Rezultati kinetičke analize, kao i relevantni podatci dostupni u literaturi, prikazani su u tablici 21, dok je reprezentativni primjer Michaelis-Mentenine krivulje prikazan na slici 24.

Tablica 21. Literaturno dostupni i eksperimentalno određeni kinetički parametri za odabrane IleRS1 i IleRS2 u koraku aktivacije aminokiseline^a

Enzim	Strukt. motiv ^c	k_{cat} / s^{-1} (b)	$K_M, Ile / \mu mol\ dm^{-3}$	$K_M, ATP / \mu mol\ dm^{-3}$	$K_I (MUP)_{Ile} / \mu mol\ dm^{-3}$	$K_I (MUP)_{ATP} / \mu mol\ dm^{-3}$
wt-ALHH-DrIleRS2	NK	45,5 ± 0,6	44 ± 2	620 ± 20	6600 ± 400	7700 ± 400
mut-ALGH-DrIleRS2	I	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
mut-HVGH-DrIleRS2	NK→K	24,4 ± 0,3	17,9 ± 0,5	390 ± 10	8,1 ± 0,3	9,3 ± 0,4
wt-HVGH-TtIleRS2	K	27,9 ± 0,4	18,7 ± 0,6	2200 ± 100	0,20 ± 0,01	0,20 ± 0,01
mut-GVHH-TtIleRS2	K→NK	7,0 ± 0,1	42 ± 1	3300 ± 200	35 ± 2	34 ± 2
wt-HVGH-PmIleRS2 ^d	K	66 ± 2	49 ± 2	1600 ± 100	1,08 ± 0,06	1,08 ± 0,06
mut-GVHH-PmIleRS2	K→NK	6,2 ± 0,1	237 ± 6	3400 ± 100	460 ± 10	480 ± 10
wt-HMGH-PmIleRS1 ^d	K	30 ± 2	2,1 ± 0,3	395 ± 32	0,00029 ± 0,00002	0,00029 ± 0,00002
wt-HIGH-EcIleRS1 ^e	K	55 ± 9	4,6 ± 0,5 6,3 ^f	400 ^g	0,006 ^f	n.a.
mut-GIGH-EcIleRS1	I	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
mut-GIHH-EcIleRS1	K→NK	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

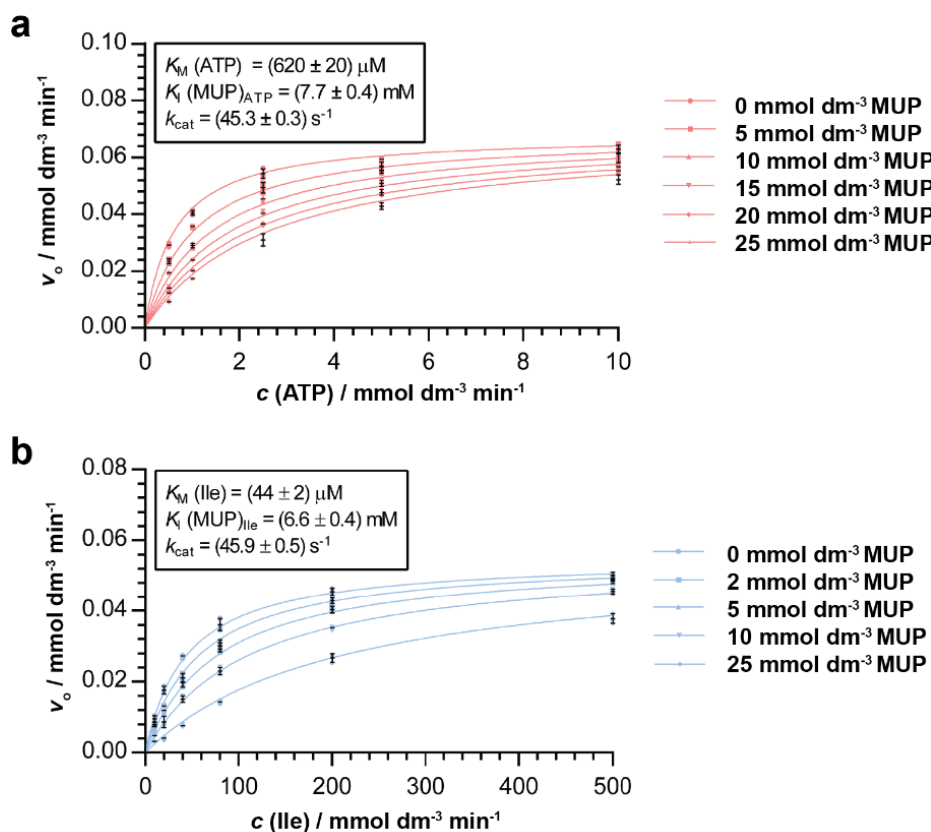
^a Mjereno metodom izmjene pirofosfata

^b Prikazana vrijednost iz eksperimenta s aminokiselinom (Ile) kao varijabilnim supstratom

^c K – Prirodno kanonski slijed, NK – Prirodno nekanonski slijed, K→NK – Mutacija iz prirodno kanonskog u nekanonski slijed, NK→K – Mutacija iz prirodno nekanonskog u kanonski slijed, I – intermedijerni oblik

^d Vrijednosti preuzete iz ^{40,41}, ^e Vrijednosti preuzete iz ^{151,202}, ^f Vrijednosti preuzete iz ¹⁴, ^g Vrijednost preuzeta iz ²⁰³

n.d. – Vrijednost nije određena zbog neaktivnosti enzima, **n.a.** – Vrijednost nije eksperimentalno određena
Eksperimentalno određene vrijednosti prikazane su kao srednja vrijednost ± SD za tri neovisna mjerenja.



Slika 24. Reprezentativni primjeri Michaelis-Menteninih krivulja za kinetičku analizu wt-ALHH-DrIleRS2: (a) Variranjem koncentracije ATP-a pri više koncentracija mupirocina, uz izoleucin u suvišku, određena je konstanta inhibicije mupirocina u odnosu na ATP kao supstrat; (b) Variranjem koncentracije izoleucina pri više koncentracija mupirocina, uz ATP u suvišku, određena je konstanta inhibicije mupirocina u odnosu na izoleucin kao supstrat. U oba slučaja, iz podataka neinhibiranih reakcija izračunate su Michaelisove konstante za supstrate, maksimalna brzina enzima i konačno obrtni broj enzima.

Rezultati kinetičke analize pokazali su da kinetička aktivnost IleRS1 i IleRS2 enzima ovisi o stabilizaciji prijelaznog stanja putem interakcija s aminokiselinama strukturnog motiva, što je u skladu s ranijim istraživanjima na tirozil-tRNA-sintetazi²⁰⁴. Kod IleRS1 prijelazno stanje stabilizira isključivo prva pozicija (histidin), dok je kod enzima IleRS2 stabilizacija moguća interakcijama s prvom ili trećom pozicijom (histidin) strukturnog motiva. To potvrđuje kinetička karakterizacija IleRS1 i IleRS2 enzima, kod kojih su prva i treća pozicija strukturnog motiva zamijenjene glicinom (mut-GIGH-*Ec*IleRS1 i mut-ALGH-*Dr*IleRS2), a koji su neaktivni. To je opažanje u skladu s rezultatima filogenetske analize, koja nije identificirala nijedan IleRS enzim s glicinom istodobno na prvoj i trećoj poziciji strukturnog motiva (GXGH). Neaktivni su i IleRS1 enzimi kod kojih je kanonski slijed strukturnog motiva zamijenjen nekanonskim, što je također u skladu s filogenetskom analizom koja nije identificirala IleRS1 enzime s prirodnim nekanonskim slijedom (GXHH). Najzanimljivije

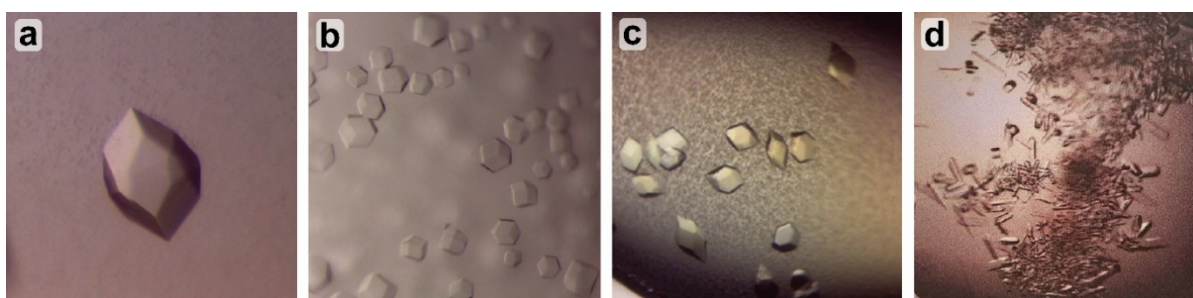
rezultate dala je kinetička analiza IleRS2 i njihovih varijanti s promijenjenim slijedom strukturnog motiva. Po prvi je puta utvrđena korelacija između nekanonskog slijeda strukturnog motiva u IleRS2 i mupirocinske hiperrezistencije, što je prethodno prikazano na IleRS2 iz bakterije *S. griseus*¹². Tako wt-ALHH-*DrIleRS2* s prirodnim nekanonskim slijedom, kao i mut-GVHH-*TtIleRS2* i mut-GVHH-*PmIleRS2* dobiveni mutagenezom, pokazuju konstante inhibicije 200 do 1000 puta veće u odnosu na svoje (prirodne ili mutirane) varijante s kanonskim slijedom strukturnog motiva. U slučaju *DrIleRS2* i *TtIleRS2*, mutacijska promjena slijeda strukturnog motiva nije dovela do gubitka kinetičke aktivnosti. Najvjerojatnije objašnjenje jest spontana reverzija motiva koja se tijekom evolucije dogodila u rodu *Deinococcus-Thermus*, čime su aktivna mjesta tih enzima postala općenito bolje prilagođena takvim supstitucijama. Kod enzima koji pripadaju rodovima evolucijski udaljenijima od *Deinococcus-Thermus*, poput *PmIleRS2* iz roda *Priestia*, supstitucija kanonskog slijeda nekanonskim i dalje rezultira visokom mupirocinskom rezistencijom, ali ovoga puta uz izraženiji gubitak kinetičke aktivnosti. S obzirom na to da je motiv HXGH najkonzerviranije arhetipsko obilježje aktivnog mjesta IleRS-a, ključno za stabilizaciju prijelaznog stanja, te da suvremeni enzimi s prirodnim kanonskim slijedom nisu predisponirani za nekanonski slijed, iznenađuje što gubitak aktivnosti nije bio izraženiji.

4.3. Specifična konformacija vrha zavojnice α_1 omogućava akomodaciju nekanonskog slijeda strukturnog motiva u IleRS2

4.3.1. Kristalizacija kompleksa *PmIleRS1* i *PmIleRS2* s 5'-O-Ile-AMS

Rezultati filogenetske i kinetičke analize bakterijskih enzima pokazali su da IleRS2 enzimi mogu akomodirati nekanonski slijed strukturnog motiva (GXHH), što je povezano s razvojem hiperrezistencije na mupirocin. Nasuprot tome, uvođenje nekanonskog slijeda u IleRS1 enzime dovelo je do njihove inaktivacije. Radi razjašnjenja opaženih fenomena određene su kristalne strukture wt-HMGH-*PmIleRS1* i wt-HVGH-*PmIleRS2* te njihovih mutanata s nekanonskim slijedom (mut-GMHH-*PmIleRS1* i mut-GVHH-*PmIleRS2*). Strukture su određene u kompleksu s nehidrolizabilnim analogom reakcijskog međuprodukta, 5'-O-(N-(L-izoleucil)sulfamoil)adenozinom (5'-O-Ile-AMS). Kristali navedenih kompleksa dobiveni su metodom difuzije para u sjedećoj kapi, pod sljedećim uvjetima:

- **wt-HMGH-*PmIleRS1*:5'-O-Ile-AMS i mut-GMHH-*PmIleRS1*:5'-O-Ile-AMS:** 1 μ l otopine enzima (20 mg ml⁻¹), suplementirane s 2,5 mmol dm⁻³ 5'-O-Ile-AMS, pomiješano je s 1 μ l otopine koja je sadržavala 300 mmol dm⁻³ Li₂SO₄, 150 mmol dm⁻³ Na₂SO₄ i 15–25 % PEG3350. Dobivena kap ekvilibrirana je s 300 μ l matične otopine istog sastava pri 19 °C (Slike 25 a, b).
- **wt-HVGH-*PmIleRS2*:5'-O-Ile-AMS i mut-GVHH-*PmIleRS2*:5'-O-Ile-AMS:** 1 μ l otopine enzima (16,5 mg ml⁻¹) suplementirane s 2,5 mmol dm⁻³ 5'-O-Ile-AMS, pomiješano je s 1 μ l otopine koja je sadržavala 200–500 mmol dm⁻³ amonijevog tartarata i 10–20% PEG3350. Dobivena kap ekvilibrirana je s 300 μ l matične otopine istog sastava pri 4 °C (Slike 25 c, d).



Slika 25. Kristali odgovarajuće difrakcijske kvalitete: (a) wt-HMGH-*PmIleRS1*:5'-O-Ile-AMS, (b) mut-GMHH-*PmIleRS1*:5'-O-Ile-AMS, (c) wt-HVGH-*PmIleRS2*:5'-O-Ile-AMS, (d) mut-GVHH-*PmIleRS2*:5'-O-Ile-AMS

Kristali su kriostabilizirani s 20 % (v/v) glicerola (za *PmIleRS1*) ili 20 % (v/v) PEG 400 (za *PmIleRS2*), zamrznuti u tekućem dušiku i podvrgnuti difrakcijskoj analizi na sinkrotronskom izvoru zračenja (*Paul Scherrer Institut*, Villigen, Švicarska). Prikupljeno je najmanje 3600 difraktograma pri oscilacijskom kutu koji je iznosio polovicu vrijednosti kristalnog mozaiciteta, određenog preliminarnim rasteriranjem kristala^{205,206}. Difraktogrami atomske rezolucije indeksirani su i skalirani pomoću programskog paketa XDS²⁰⁷, nakon čega su kristalografske faze određene metodom molekulske zamjene²⁰⁸, korištenjem modula PHASER²⁰⁹ unutar programskog paketa CCP4i²¹⁰. Za molekulsku zamjenu korišteni su molekulski modeli javno dostupni u bazi RCSB PDB²¹¹, a prikazani u tablici 22.

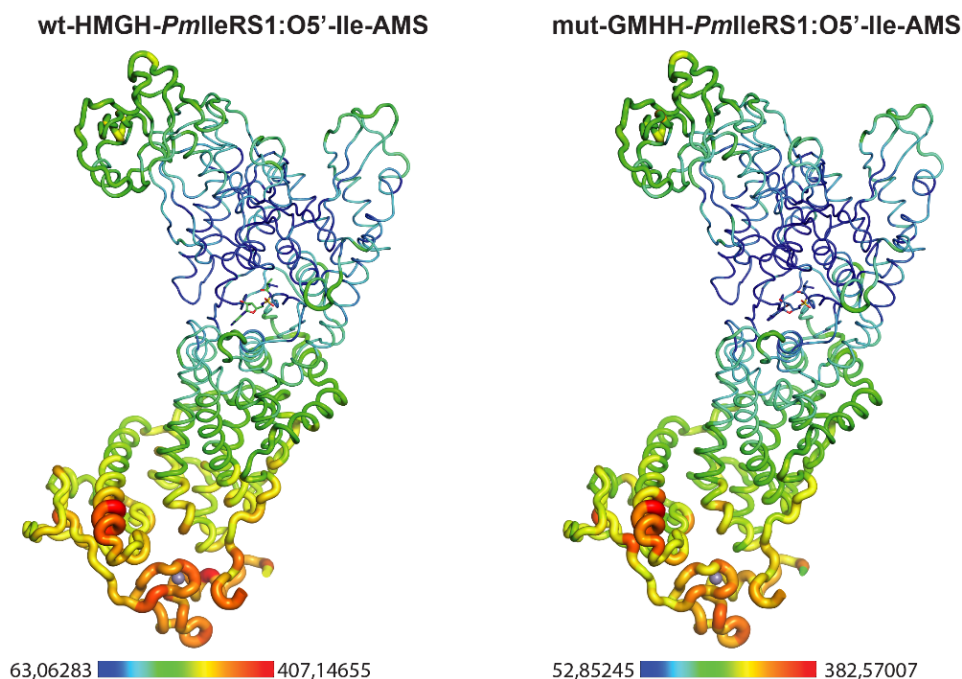
Tablica 22. Popis kristalnih struktura korištenih za molekulsku zamjenu*

Riješena kristalna struktura	Početni model za molekulsku zamjenu
wt-HMGH- <i>PmIleRS1</i> :5'-O-Ile-AMS (8C9E)	Lanac B [1-917] iz (1QU2) ²⁶ (<i>SalIleRS1</i> :tRNA ^{Ile} : mupirocin) Lanac A [1-147] iz (1WKA) ¹⁹⁷ (Domena za popravak pogreške nakon prijenosa <i>TtValRS2</i>)
mut-GMHH- <i>PmIleRS1</i> :5'-O-Ile-AMS (8C9F)	Lanac A [1-921] iz 8C9E ²¹² * (wt-HMGH- <i>PmIleRS1</i> :5'-O-Ile-AMS)
wt-HVGH- <i>PmIleRS2</i> :5'-O-Ile-AMS (8C8V)	Lanac A [1-1032] iz 8C8U ²¹³ * (wt-HVGH- <i>PmIleRS2</i> :mupirocin)
mut-GVHH- <i>PmIleRS2</i> :5'-O-Ile-AMS (8C8W)	Lanac A [1-1032] iz 8C8V ²¹⁴ * (wt-HVGH- <i>PmIleRS2</i> :5'-O-Ile-AMS)
* Strukture deponirane u bazi RCSB PDB, generirane unutar ove studije	

Modeli dobiveni molekulskom zamjenom iterativno su poboljšavani kroz višestruke cikluse ručne izgradnje u programskom paketu Coot²¹⁵ te kroz cikluse optimizacije koordinata, B-faktora i TLS parametara (samo za *PmIleRS1*) u paketu Phenix²¹⁶. Tijekom utočnjavanja wt-HMGH-*PmIleRS1*:5'-O-Ile-AMS i mut-GMHH-*PmIleRS1*:5'-O-Ile-AMS model je dodatno ograničen TLS parametrima kako bi se postigla konvergencija vrijednosti R_{free} . TLS parametrizacijom model je podijeljen u manje krute skupine atoma za koje je pretpostavljeno korelirano gibanje (rotacija, translacija, uvijanje) tijekom utočnjavanja²¹⁷. Korištenjem TLMSD poslužitelja određeno je ukupno devet TLS skupina za *PmIleRS1* enzime: A[1–19], A[20–155], A[156–180], A[181–409], A[410–584], A[585–632], A[633–791], A[792–881] i A[882–921]^{218,219}. Primjenom navedenih TLS krutih skupina tijekom utočnjavanja, vrijednost R_{free} konačnih modela smanjena je za ~5%.

Konačne modele wt-HMGH-*PmIleRS1*: 5'-O-Ile-AMS i mut-GMHH-*PmIleRS1*: 5'-O-Ile-AMS karakteriziraju povišene vrijednosti izotropnog B-faktora (Slika 26). B-faktor aproksimira anizotropiju izazvanu termičkim fluktuacijama molekula u kristalu²²⁰. U

strukturama *PmIleRS1* enzima visoke prosječne vrijednosti B-faktora rezultat su neuređenosti C-terminalne domene, koja je fleksibilna u odsutnosti tRNA. Zbog fleksibilnosti, kristalno je pakiranje bilo lošije, što je u konačnici rezultiralo smanjenom lokalnom kvalitetom mape elektronske gustoće.



Slika 26. Distribucija B-faktora u modelima wt-HMGH-*PmIleRS1*:5'O-Ile-AMS i mut-GMHH-*PmIleRS1*:5'O-Ile-AMS. Uočeno je da B-faktori aminokiselina N-terminusa te poddomena SD2 i SD3 C-terminalne domene znatno premašuju prosječnu vrijednost za cijelu strukturu. U odsutnosti tRNA, navedene poddomene iskazuju povećanu konformacijsku fleksibilnost.

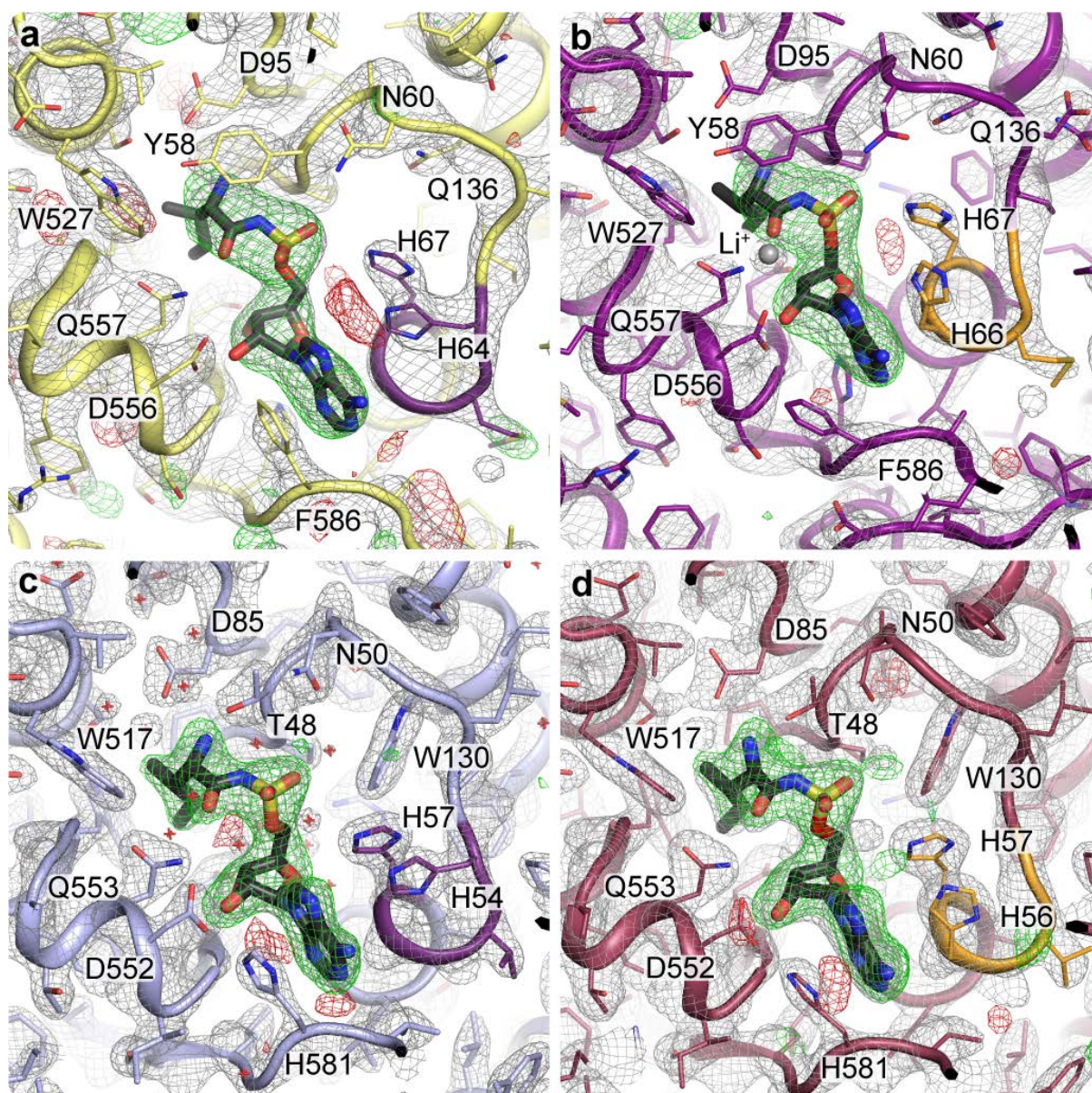
Radi dobivanja što točnijeg modela, u mapu elektronske gustoće kao kruto tijelo uklopljena je struktura C-terminalne domene (AK: 750–921), dobivena pomoću programskog paketa AlphaFold^{221,IV}. Nakon modeliranja, spojevi između eksperimentalnog i računalnog modela ručno su prilagođeni u programu Coot. U ovom je slučaju utočnjavanje računalnog modela u suboptimalnu mapu elektronske gustoće dovelo do značajnog poboljšanja kvalitete konačnog molekuskog modela. Statistički parametri konačnih modela prikazani su u tablici 23.

^{IV} AlphaFold model wt-HMGH-*PmIleRS1* generirao je i na raspolaganje stavio dr. sc. Marc Leibundgut, istraživač na ETH Zürich.

Tablica 23. Rezultati strukturne analize: wt-HMGH-*PmIleRS1*:5'-O-Ile-AMS, mut-GMHH-*PmIleRS1*:5'-O-Ile-AMS, wt-HVGH-*PmIleRS2*:5'-O-Ile-AMS i mut-GVHH-*PmIleRS2*:5'-O-Ile-AMS

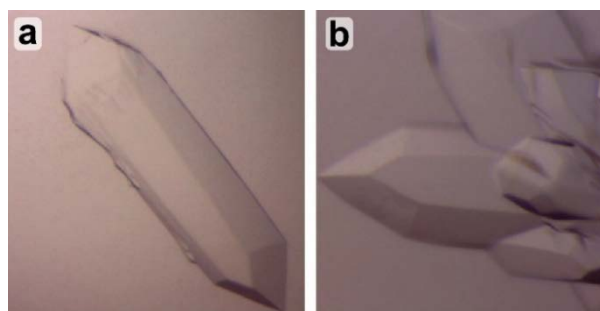
	wt-HMGH- <i>PmIleRS1</i> : 5'-O-Ile-AMS (8C9E)	mut-GMHH- <i>PmIleRS1</i> : 5'-O-Ile-AMS (8C9F)	wt-HVGH- <i>PmIleRS2</i> : 5'-O-Ile-AMS (8C8V)	mut-GVHH- <i>PmIleRS2</i> : 5'-O-Ile-AMS (8C8W)
Akvizicija				
Prostorna grupa	P3 ₁ 2 1	P3 ₁ 2 1	P4 ₁ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2
Dimenzije ćelije				
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	127,09; 127,09; 163,22	127,04; 127,04; 163,38	108,15; 108,15; 240,18	107,92; 107,92; 239,36
α , β , γ (°)	90, 90, 120	90, 90, 120	90, 90, 90	90, 90, 90
Rezolucija (Å)	45,6–2,9 (3,004–2,900)	48,8–3,1 (3,211–3,100)	49,3–2,2 (2,279–2,200)	47,3–2,29 (2,372–2,290)
<i>R</i> _{sym} ili <i>R</i> _{merge}	0,06695 (3,219)	0,1224 (3,731)	0,07646 (1,32)	0,1209 (2,125)
<i>I</i> / σ <i>I</i>	30,66 (0,98)	19,70 (1,00)	26,51 (1,66)	16,65 (1,20)
Kompletnost (%)	92,86 (74,11)	90,83 (69,78)	94,10 (81,54)	92,59 (76,38)
Redundantnost	20,8 (22,0)	20,7 (21,8)	12,7 (10,4)	13,0 (12,4)
Utočnjavanje				
Rezolucija (Å)	45,6–2,9 (3,004–2,900)	48,8–3,1 (3,211–3,100)	49,3–2,2 (2,279–2,200)	47,3–2,29 (2,372–2,290)
Broj refleksa	713744 (74146)	582567 (60230)	927990 (73039)	835655 (74879)
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	0,2421 (0,3893) / 0,2685 (0,4451)	0,2395 (0,3840) / 0,2766 (0,4368)	0,1955 (0,2881) / 0,2289 (0,3507)	0,1981 (0,3267) / 0,2317 (0,3612)
Broj atoma				
Protein	7408	7408	8357	8343
Ligand/ion	106	108	73	73
Voda	0	0	376	260
<i>B</i> -faktori				
Protein	155,34	153,36	57,83	64,78
Ligand/ion	142,57	144,20	62,74	72,63
Voda	0,00	0,00	50,14	53,00
Devijacije				
Duljina veza (Å)	0,002	0,002	0,003	0,003
Vezni kutovi (°)	0,430	0,440	0,530	0,510
*Vrijednosti u zagradama se odnose za ljusku najveće rezolucije				

U razlikovnim mF_o–DF_c mapama elektronske gustoće enzima i njihovih mutanata jasno je uočljiva gustoća unutar aktivnog mjesta, u koju je bilo moguće modelirati molekulu 5'-O-Ile-AMS (Slika 27). U mapama visoke razlučivosti (*PmIleRS2* i njegov mutant), kofaktor je modeliran *de novo*, jer je cijela molekula, uključujući i bočni lanac izoleucina, bila razlučena. Kofaktor u aktivnim mjestima *PmIleRS1* i njegova mutanta modeliran je prema strukturama wt-HVGH-*TlIleRS2*:Ile-AMS (1JZQ⁹⁰) te strukturi wt-HVGH-*PmIleRS2*:5'-O-Ile-AMS, budući da bočni lanac izoleucina nije bio jasno razlučen. Budući da *IleRS1* i *IleRS2* enzimi vežu reakcijski međuprodukt analogno, homologno modeliranje omogućilo je određivanje ispravne konformacije međuprodukta u aktivnim mjestima dvaju *PmIleRS* enzima.



Slika 27. $2mF_o-DF_c$ te mF_o-DF_c OMIT mape elektronske gustoće aktivnih mjesta divljih tipova i mutanata *PmIleRS* enzima. (a) $2mF_o-DF_c$ mapa kompleksa wt-HMGH-*PmIleRS*1 (sivo) razlučena je na 2,9 Å i prikazana na razini $+2\sigma$. mF_o-DF_c OMIT mapa istog aktivnog mjesta, prikazana na razinama $+2\sigma$ (zeleno) i -2σ (crveno), (b) $2mF_o-DF_c$ i odgovarajuće mF_o-DF_c OMIT mape aktivnog mjesta mut-GMHH-*PmIleRS*1. Mape su razlučene na 3,2 Å, s bojama i razinama prikaza kao i pod (a), (c) $2mF_o-DF_c$ mapa i odgovarajuće mF_o-DF_c OMIT mape aktivnog mjesta wt-HVGH-*PmIleRS*2 razlučene na 2,2 Å i prikazane na razini od $+4\sigma$ (sivo) i $\pm 4\sigma$ (zeleno/crveno), (d) $2mF_o-DF_c$ i odgovarajuće mF_o-DF_c OMIT mape aktivnog mjesta mut-GVHH-*PmIleRS*2 s razlučenjem 2,3 Å i razinama prikaza kao pod (c). Za generiranje mF_o-DF_c OMIT mape, kofaktori su uklonjeni iz modela, nakon čega su krnji modeli rafinirani do konvergencije R-faktora (5 ciklusa) u programskom paketu *Phenix*. Prije minimizacije, početna vrijednost B-faktora postavljena je na 100 Å², a kartezijanske koordinate svih atoma nasumično su pomaknute za 0,1 Å. U svim slučajevima, rezultirajuće $2mF_o-DF_c$ i mF_o-DF_c mape elektronske gustoće jasno potvrđuju prisutnost i konformaciju nehidrolizabilnog analoga izoleucil-adenilata (5'-O-Ile-AMS), a u slučaju mutanata s nekanonskim slijedom strukturnog motiva, njegovu pravilnu poziciju u aktivnom mjestu.

Premda je razlučivost molekulskih modela *PmIleRS1* enzima bila dostatna za modeliranje analoga reakcijskog međuprodukta u aktivnom mjestu, kristali su difraktirali tek do umjerene razlučivosti (2,9 i 3,1 Å), uz vrijednosti izotropnog B-faktora veće od očekivanih za strukture slične razlučivosti u bazi podataka RCSB PDB^{220,222}. S ciljem poboljšanja difrakcijskih svojstava kristala, ispitano je nekoliko strategija za optimizaciju njihova rasta. U okviru početnih eksperimenata ispitana je kristalizacija uz dodatak nekog od 18 aditiva iz seta Additive Screen HT (*Hampton*), do koncentracije od 10 % (v/v), u kristalizacijsku otopinu iz koje su dobiveni kristali. Nažalost, nijedan od testiranih aditiva nije rezultirao kristalima zadovoljavajuće morfologije pri 4 °C ili 19 °C. Uz ispitivanje utjecaja aditiva, provedena je i kristalizacija s alternativnim sulfatnim solima. Iako su kristali oba kompleksa pokazivali znatno bolju morfologiju kada su dobiveni u prisutnosti 100–500 mmol dm⁻³ (NH₄)₂SO₄ pri 4 °C, bili su mehanički nestabilni te su se otapali i pucali tijekom krioprotekcije (Slika 28). Stabilizacija kristala nije bila moguća ni postupnim dodatkom različitih krioprotektanata.

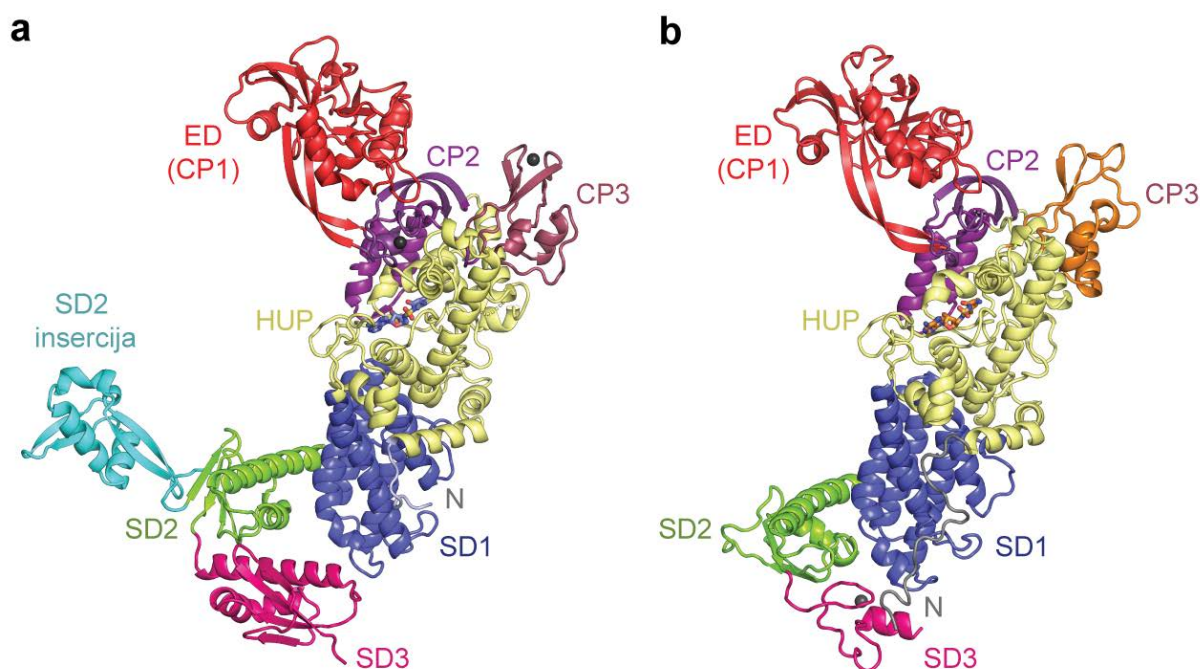


Slika 28. Kristali: (a) wt-HMGH-*PmIleRS1*:5'-O-Ile-AMS i (b) mut-GMHH-*PmIleRS1*:5'-O-Ile-AMS, kristalizirani iz otopine koja je sadržavala 100–500 mmol dm⁻³ (NH₄)₂SO₄ i 10–25% PEG3350 pri temperaturi 4 °C. Unatoč znatno boljoj morfologiji, kristale nije bilo moguće uspješno krioprotektirati.

Budući da optimizacija početnih kristalizacijskih uvjeta nije rezultirala poboljšanjem difrakcijskih svojstava, pristupilo se redizajnu kristalnih kontakata na površini proteina. Takvim se pristupom uklanjaju površinski izložene fleksibilne aminokiseline (lizin, arginin, glutamat) ili domene koje nepovoljno utječu na entropijski doprinos slobodnoj energiji kristalizacije. Literatura pokazuje da ovakav redizajn proteina može rezultirati kristalima znatno poboljšanih difrakcijskih svojstava²²³⁻²²⁵. U prijašnjim pokušajima kristalizacije IleRS enzima, uklanjanje C-terminalne domene pokazalo se učinkovitim pristupom za dobivanje kristala difrakcijske kvalitete^{13,148}. Stoga je konstruiran mutant mut-*PmIleRS1*-ΔZNF s uklonjenom CP3 poddomenom C-terminalne domene (ostaci 886–921). Pročišćeni protein postavljen je na kristalizaciju u istim uvjetima kao i enzim divljeg tipa. Nažalost, unatoč svojoj stabilnosti, krnji protein, nije kristalizirao.

4.3.2. Tercijarna struktura *PmIleRS1* i *PmIleRS2* u kompleksu s 5'-O-Ile-AMS

Iako su ranije riješene kristalne strukture bakterijskih IleRS1 i IleRS2 enzima, rješavanjem struktura wt-HMGH-*PmIleRS1*:5'-O-Ile-AMS i wt-HVGH-*PmIleRS2*:5'-O-Ile-AMS po prvi su put dobivene strukture oba tipa IleRS iz istog organizma^{13,148,152,159}. Na razini tercijarne strukture, riješene kristalne strukture (Slika 29) slične su deponiranim strukturama IleRS enzima u bazi RCSB PDB te analogne strukturama istih enzima s izmijenjenim slijedom strukturnog motiva (mut-GMHH-*PmIleRS1*:5'-O-Ile-AMS i mut-GVHH-*PmIleRS2*:5'-O-Ile-AMS). U strukturama enzima ističe se nekoliko domena: HUP domena, insercijske domene CP1–CP3, tip-specifični N-terminalni polipeptid te modularna C-terminalna antikodon-vezujuća domena. N-terminalni polipeptid *PmIleRS1* duži je od onoga u *PmIleRS2* te je na razini tercijarne strukture sastavni dio C-terminalne regije *PmIleRS1*. Taj je lanac u IleRS1 važan za pravilno prepoznavanje posttranskripcijskih modifikacija tRNA^{Ile} [156]. C-terminalne domene dvaju *PmIleRS* enzima također se značajno razlikuju u svojoj topologiji.

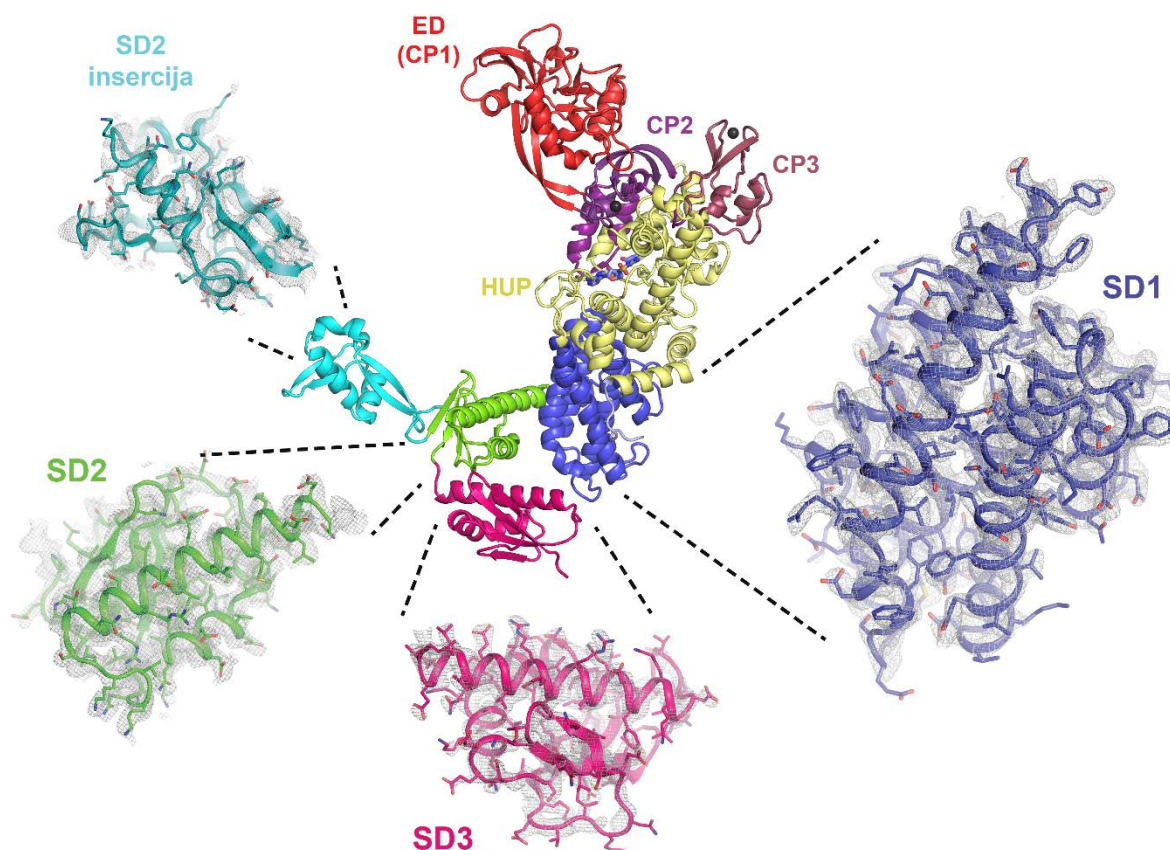


Slika 29. Kristalne strukture: (a) wt-HVGH-*PmIleRS2*:5'-O-Ile-AMS, (b) wt-HMGH-*PmIleRS1*:5'-O-Ile-AMS. U strukturama enzima ističe se nekoliko domena: HUP domena Rossmannove topologije (žuto), CP1 domena s aktivnim mjestom za popravak pogreške nakon prijenosa (crveno), insercijske domene CP2 (ljubičasto) i CP3 (narančasto), tip-specifični N-terminalni polipeptid (sivo) te modularna C-terminalna antikodon-vezujuća domena s tri poddomene (SD1 – tamnoplavo, SD2 – zeleno, SD3 – ružičasto). U *PmIleRS2*, poddomena SD2 dodatno sadrži inserciju (cijan).

Aktivno mjesto oba enzima smješteno je unutar dvodijelne HUP domene s topologijom Rossmannovog nabora¹⁰¹. Prvu polovicu aktivnog mjesta čine elementi sekundarne strukture β_1 – α_1 – β_2 – α_2 – β_3 , a drugu polovicu α_3 – β_4 – α_4 – β_5 . Između α_3 i β_3 smještene su insercijske domene, uključujući i domenu za popravak pogreške nakon prijenosa. Za razliku od *PmIleRS1*, CP2 i CP3 domene *PmIleRS2* sadrže po jedan cinkov ion.

Iako danas više nije jedina^{38,39,226}, struktura wt-HVGH-*PmIleRS2* u kompleksu s 5'-O-Ile-AMS-om bila je u trenutku deponiranja u bazu RCSB PDB jedina struktura s potpuno razlučenom C-terminalnom domenom nekog IleRS2 enzima. Naime, tada dostupne kristalne strukture IleRS2 enzima – *ScIleRS2* u kompleksu s reveromicinom A (7D5C¹⁴⁷), *CaIleRS2* u kompleksu s izoleucil-adenilatom (6LDK³¹) te *TtIleRS2* u kompleksu s mupirocinom (1JZS²⁹) i izoleucil-N-sulfamoil adenozinom (1JZQ³⁰) – bile su deponirane u krnjem obliku. Fleksibilnost domene, a moguće i njezina lokalna neuređenost u odsutnosti tRNA, sprječavale su rast kristala difrakcijske kvalitete^{13,148,149}. Tek je nedavnim objavljivanjem strukture *ScIleRS2* u kompleksu s tRNA^{Ile} i izoleucinom (8WND³⁸, 8Z1P³⁹), postala dostupna i druga kristalna struktura IleRS2 enzima s potpuno razlučenom C-terminalnom domenom.

Kompozitna OMIT mapa modela, prikazana na slici 30, nedvojbeno prikazuje ustroj C-terminalne antikodon-vezujuće domene *PmIleRS2*. U njezinoj modularnoj građi, kao i u *PmIleRS1* i *SaIleRS1* (1QU2²⁶, 1QU3²⁷, 1FFY²⁸), ističu se tri poddomene: SD1, SD2 i SD3. Poddomene SD1 i SD2 u *PmIleRS2* ekvivalentne su odgovarajućim poddomenama *PmIleRS1*, odnosno drugih IleRS1 enzima^{26,27,28,152}. Jedina razlika je prisutnost umetka $\beta\alpha\beta$ -topologije, veličine ~50 aminokiselina, u SD2 poddomeni *PmIleRS2*. SD3 poddomena *PmIleRS2* topološki je ekvivalentna njegovoj SD2 poddomeni, bez ikakve strukturne sličnosti sa SD3 poddomenom *PmIleRS1*. Ova u *PmIleRS2* enzimima ne sadrži karakteristični cinkov prst prisutan u IleRS1 enzimima, koji stabilizira lokalnu strukturu uključenu u prepoznavanje prve baze antikodona. Izostanak cinkovog prsta u SD3 poddomeni IleRS2 enzima upućuje na to da IleRS1 i IleRS2 prvu bazu antikodona prepoznaju različitim mehanizmom¹⁵⁹. Drugu i treću bazu antikodona IleRS1 i IleRS2 enzimi vjerojatno prepoznaju na sličan način, budući da su SD2 poddomene uključene u to prepoznavanje homologne u *PmIleRS1*, odnosno *SaIleRS1* i *PmIleRS2*. Insercija u SD2 poddomeni *PmIleRS2* povezana je s tijelom domene fleksibilnim linkerima, što joj omogućuje zauzimanje konformacija pogodnih za interakciju s molekulom tRNA. Ipak, za potvrdu takvih interakcija potrebna je kristalna struktura enzima u kompleksu s tRNA ili simulacije molekulske dinamike enzima s dokiranom tRNA.

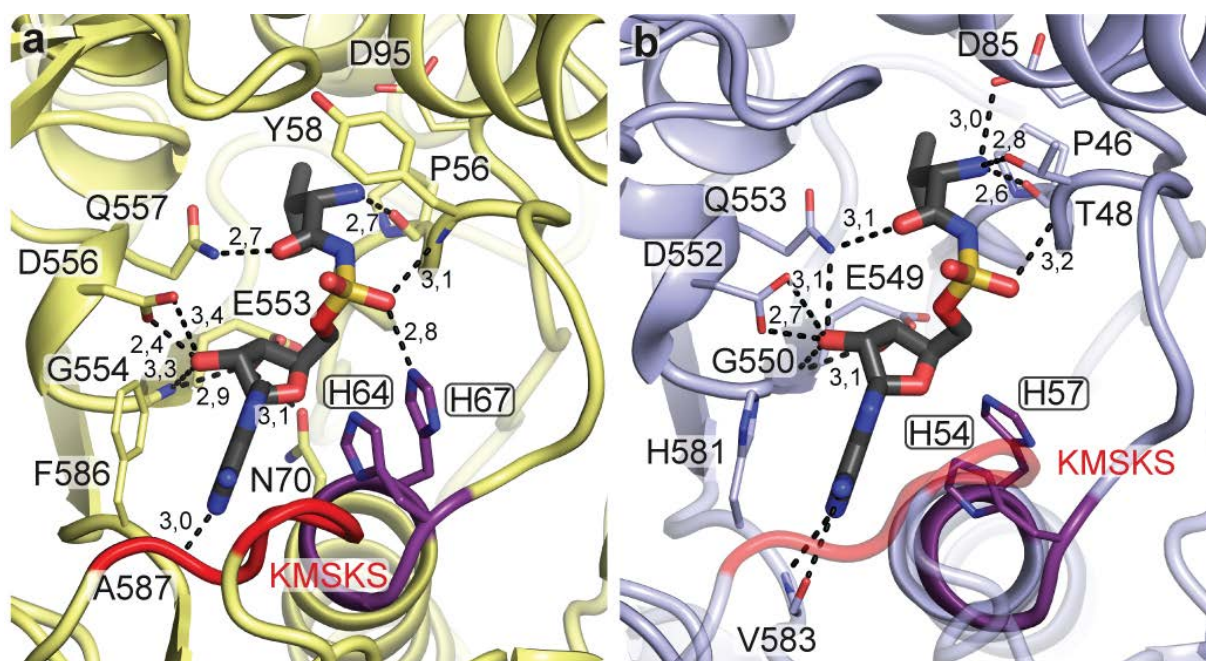


Slika 30. Struktura C-terminalne antikodon-vezujuće domene IleRS2. U strukturi wt-HVGH-*PmIleRS2* modelirana je cjelovita C-terminalna antikodon-vezujuća domena, sastavljena od triju poddomena. SD1 i SD2 strukturno su homologne odgovarajućim poddomenama IleRS1 enzima. U IleRS2 enzimima, poddomena SD3 homolog je SD2, dok odgovarajuća domena u IleRS1 enzimima ima topološki nepovezan $\alpha\beta$ -nabor s cinkovim prstom (Slika 29 b). Nadalje, SD2 poddomena IleRS2 enzima sadrži tip-specifičnu inserciju $\beta\alpha\beta$ -topologije. Siva mreža oko molekuskog modela predstavlja nepristranu kompozitnu OMIT mapu elektronske gustoće, konturiranu na razini od $+2\sigma$.

4.3.3. Prepoznavanje i vezanje analoga reakcijskog međuprodukta

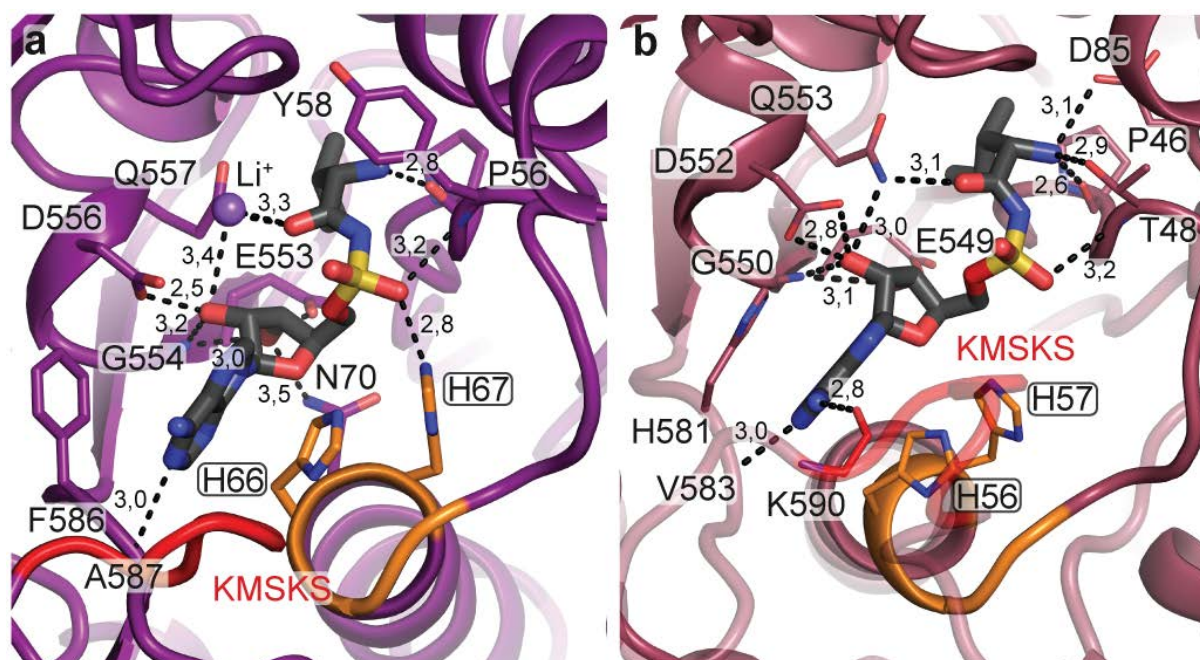
Mehanizam prepoznavanja nehidrolizabilnog analoga reakcijskog međuprodukta (5'-O-Ile-AMS), u divljim tipovima *PmIleRS* enzima je kanonski te u skladu s prethodno publiciranim strukturama drugih IleRS enzima, uz neke specifičnosti kod dva enzima^{13,148,152}. Molekula analoga čvrsto je vezana u sintetičkom aktivnom mjestu smještenom u procjepu između dviju polovica Rossmannova nabora (Slika 31). Adeninska jedinica molekule 5'-O-Ile-AMS stabilizirana je interakcijama slaganja (engl. *stacking*) – u wt-HMGGH-*PmIleRS1* putem bočnog ogranka Phe586, a u wt-HVGH-*PmIleRS2* putem bočnog ogranka His581. Bočna skupina izoleucina stabilizirana je van der Waalsovima interakcijama s hidrofobnim džepom, koji u wt-HMGGH-*PmIleRS1* tvore bočni ogranci Pro56, Trp527 i Trp561, a u wt-HVGH-*PmIleRS2* Pro46, Trp517 i Trp557. Karbonilna skupina izoleucina stabilizirana je u oba enzima na jednak

način – vodikovom vezom s Gln557 u wt-HMGH-*PmIleRS1*, odnosno Gln553 u wt-HVGH-*PmIleRS2*. Najznačajnije razlike u vezanju analoga međuprodukta između dvaju *PmIleRS* enzima odnose se na stabilizaciju sulfonilne skupine, amino skupine izoleucina i riboze. Amino skupina izoleucina bolje je stabilizirana u wt-HVGH-*PmIleRS2*, gdje ostvaruje interakcije s O_{δ2} karboksilne skupine Asp85, hidroksilnom skupinom Thr48 te karbonilnom skupinom peptidne okosnice Pro46. Kod wt-HMGH-*PmIleRS1*, jedina opažena stabilizirajuća interakcija amino skupine je vodikova veza s karbonilnom skupinom peptidne okosnice Pro56. Iako se interakcija s Asp95 smatra dijelom kanonskog seta, u molekulskom modelu wt-HMGH-*PmIleRS1* nije opažena. Naime, udaljenost O_{δ2} karboksilne skupine Asp95 od amino skupine analoga reakcijskog međuprodukta iznosi 3,9 Å. Moguće je da se interakcija ostvaruje s pravim reakcijskim međuproduktom (Ile-AMP), ali ne i s njegovim analogom korištenim za kristalizaciju, ili pak da Asp95 nije ključan za vezanje međuprodukta u *PmIleRS1*. Sulfonilnu skupinu Ile-AMS u wt-HMGH-*PmIleRS1* stabilizira vodikova veza s N_ε atoma His67 iz strukturnog motiva HXGH, dok ta interakcija u wt-HVGH-*PmIleRS2* izostaje zbog zakreta α₁ zavojnice na kojoj se motiv nalazi. Specifična zakrenutost vrha α₁ zavojnice u *PmIleRS2* razmatrana je u kontekstu akomodacije nekanonskog slijeda strukturnog motiva (**GXHH**) te će biti detaljnije komentirana u narednim poglavljima. Konačno, 2'- i 3'- hidroksilne skupine riboze međuprodukta u wt-HVGH-*PmIleRS2* stabilizira mreža vodikovih veza s Gln553 (N_ε), Asp552 (O_{δ1} i O_{δ2}) te amidnom skupinom iz peptidne okosnice Gly550. U wt-HMGH-*PmIleRS1* ostvarene su slične interakcije s bočnim ogrankom Asp556 (O_{δ1} i O_{δ2}) te amidnom skupinom peptidne okosnice Gly554. Izostaje stabilizacija 2-OH skupine riboze bifurkiranom vodikovom vezom s Gln557 (N_ε) kakva je prisutna u wt-HVGH-*PmIleRS2* preko Gln553 (N_ε). Konačno, u odnosu na wt-HVGH-*PmIleRS2*, 3'-OH skupina riboze u wt-HMGH-*PmIleRS1* dodatno je stabilizirana vodikovom vezom s amino skupinom Asn70 (N_δ) iz 70-NK-71 motiva, koji se nalazi nizvodno od strukturnog motiva HXGH. Bočni ogranci Asn70 i Lys71 međusobno interagiraju vodikovom vezom, čime potencijalno mogu pridonijeti stabilizaciji konformacije vrha α₁ zavojnice u *PmIleRS1*.



Slika 31. Interakcije nehidrolizabilnog analoga reakcijskog međuprodukta u aktivnim mjestima divljih tipova dvaju *PmIleRS* enzima: (a) wt-HMGH-*PmIleRS1* i (b) wt-HVGH-*PmIleRS2*. Ljubičastom bojom istaknut je kanonski slijed HXGH, dok je crvenom bojom istaknut KMSKS slijed.

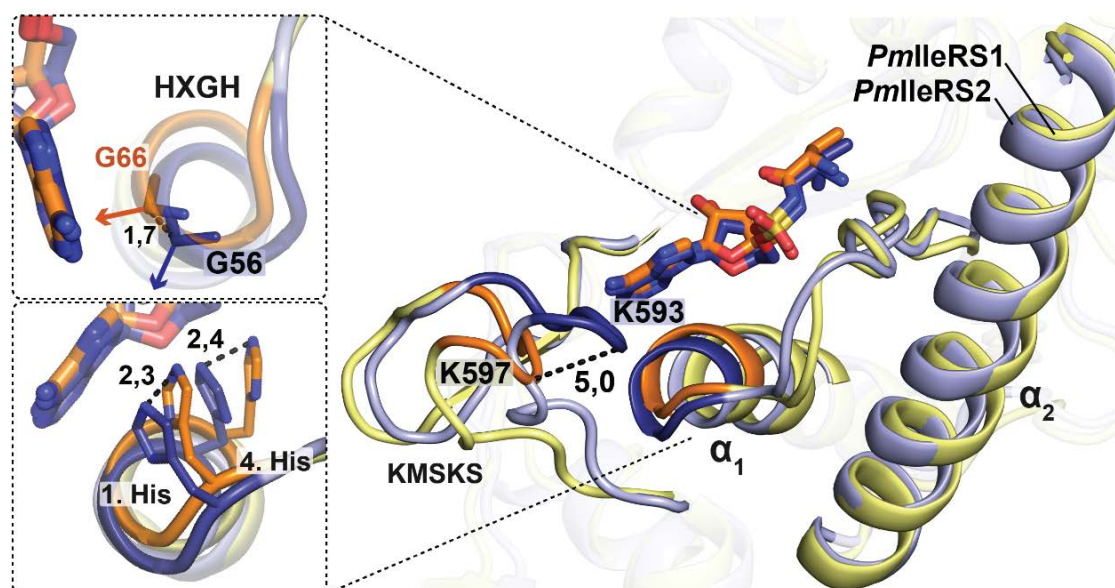
Strukture aktivnih mjesta mutanata s izmijenjenim slijedom strukturnog motiva (Slika 32) uvelike su slične onima u strukturama divljih tipova enzima (Slika 31). To je osobito iznenađujuće u slučaju mut-GMHH-*PmIleRS1*, s obzirom na to da je dotični mutant potpuno kinetički neaktivan. U strukturi mut-HMGH-*PmIleRS1* reakcijski međuprodukt ostvaruje istovjetne interakcije kao i u enzimu divljeg tipa, što upućuje na to da uvođenje nekanonskog slijeda u *PmIleRS1* ne utječe na njegovu sposobnost vezanja reakcijskog međuprodukta, a vjerojatno ni supstrata. Disruptivni učinak uvođenja nekanonskog slijeda u *PmIleRS1* vjerojatno se očituje kroz onemogućavanje ključnog kinetičkog koraka u prijelaznom stanju, što je u skladu s literaturno poznatom ulogom HXGH motiva u njegovoj stabilizaciji⁹. Jedina značajno oslabljena interakcija u aktivnom mjestu mutiranog enzima je interakcija slaganja Phe586 s adeninskom jedinicom nehidrolizabilnog analoga, budući da dva aromatična sustava više nisu koplanarna. S obzirom na to da je za katalitičku pretvorbu ključno postizanje pravilne geometrije u prijelaznom stanju, gubitak stabilizacije adeninske jedinice mogao bi rezultirati inaktivacijom enzima, što će biti dodatno razmotreno u sljedećim poglavljima. S druge strane, u strukturi mut-HVGH-*PmIleRS2* opažena je dodatna interakcija – vodikova veza između N₇ atoma Lys590 i N10 pozicije adeninske baze međuprodukta. Ta se interakcija ostvaruje uslijed zatvaranja KMSKS omče mutanta, što je izravna posljedica supstitucije His54 u Gly54.



Slika 32. Interakcije nehidrolizabilnog analoga reakcijskog međuprodukta u aktivnim mjestima: (a) mut-GMHH-*PmIleRS1* i (b) mut-GVHH-*PmIleRS2*. Narančastom bojom istaknut je nekanonski slijed **GXHH**, dok je crvenom bojom istaknut KMSKS slijed.

4.3.4. Specifičnosti u vezanju analoga reakcijskog međuprodukta kod dva tipa *PmIleRS*

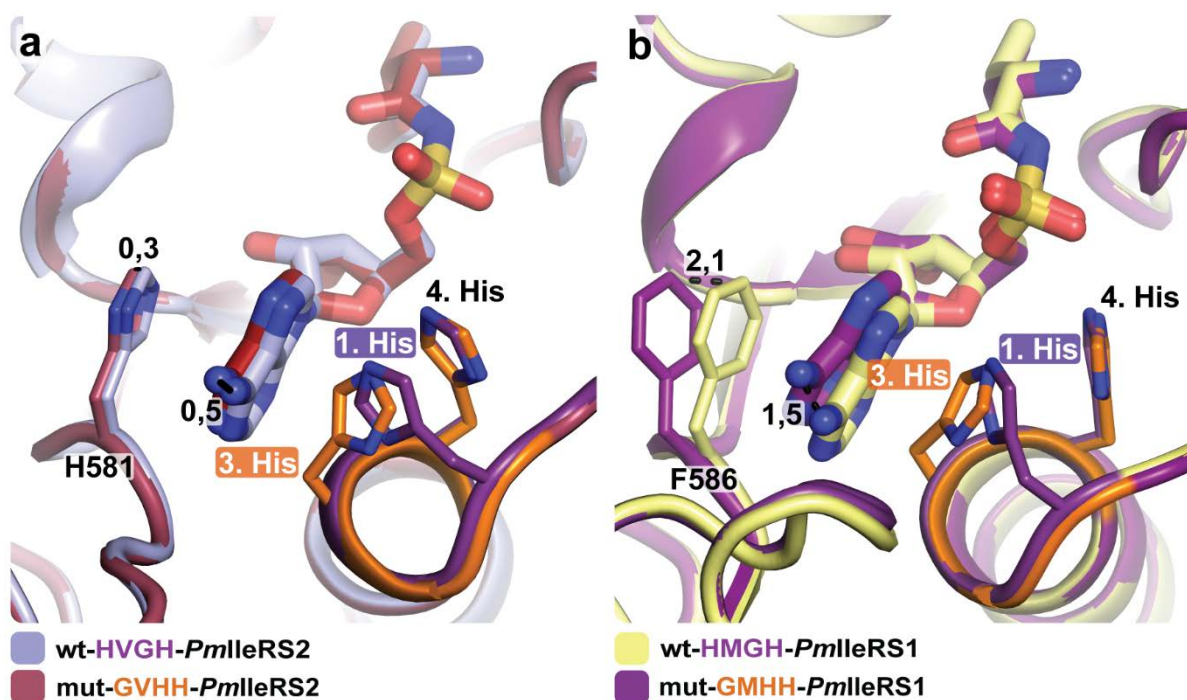
U cilju boljeg razumijevanja razlika u stabilizaciji (analog) reakcijskog međuprodukta kod dva tipa *PmIleRS* enzima, poravnate su njihove kristalne strukture. Poravnanje cjelovitih enzima nije bilo optimalno zbog različitog ustrojstva C-terminalne antikodon-vezujuće domene te različitih orijentacija domena za popravak pogreške nakon prijenosa. Zbog toga su za poravnanje očuvane katalitičke srži, definirane kao ostaci 50–174 i 523–635 za *PmIleRS1* te 40–168 i 513–632 za *PmIleRS2*. Na razini tih katalitičkih fragmenata, poravnanje je otkrilo nekoliko značajnih razlika u konformaciji aktivnih mjesta dvaju tipova *PmIleRS* enzima. Mjereno prema položaju prvog lizina **KMSKS** omče (Lys597 u *PmIleRS1*, Lys593 u *PmIleRS2*), KMSKS omča u wt-HVGH-*PmIleRS2* nalazi se u zatvorenijoj konformaciji, s KMSKS slijedom pomaknutim za 5,0 Å bliže α_1 zavojnici u odnosu na strukturu wt-HMGH-*PmIleRS1*. Osim toga, sam vrh α_1 zavojnice ima drugačiju konformaciju – N_ε atomi bočnih ograna prvog i četvrtog histidina strukturnog motiva (**HXGH**) pomaknuti su za 2,4 Å odnosno 2,3 Å kod wt-HVGH-*PmIleRS2* u usporedbi s wt-HMGH-*PmIleRS1*. Ti pomaci uzrokuju i razliku od 1,7 Å u položaju C_α atoma glicina na trećoj poziciji HX**G**H motiva između dvaju enzima (Slika 33).



Slika 33. Preklapanje katalitičkih srži wt-HMGGH-*PmIleRS1* (žuto) i wt-HVGGH-*PmIleRS2* (plavo) otkriva razlike u konformaciji aktivnih mjesta dvaju tipova *PmIleRS* enzima. Kod wt-HVGGH-*PmIleRS2*, KMSKS omča je za 5 Å zatvorenija prema vrhu α₁ zavojnice koja nosi strukturni motiv, u odnosu na istu omču u wt-HMGGH-*PmIleRS1*. Istodobno je i sam vrh α₁ zavojnice wt-HVGGH-*PmIleRS2*, mjereno prema položaju N_ε histidina na prvoj i četvrtoj poziciji strukturnog motiva, pomaknut za ~2,4 Å u odnosu na wt-HMGGH-*PmIleRS1*. Takva konformacija vrha α₁ zavojnice rezultira razlikom od 1,7 Å u položaju C_α atoma glicina na trećoj poziciji kanonskog strukturnog motiva dvaju enzima.

Opaženi pomak položaja glicina kod wt-HVGGH-*PmIleRS2* ključan je za akomodaciju nekanonskog slijeda strukturnog motiva (GXHH), jer sprječava sterički sudar metilenske skupine bočnog ogranka histidina na njegovoj trećoj poziciji s adeninskom bazom (analog) međuprodukta. Suprotno tome, kod wt-HMGGH-*PmIleRS1* vrh α₁ zavojnice zakrenut je tako da je C_α atom Gly66 usmjeren izravno prema adeninskoj bazi (Slika 33), zbog čega njegova mutacija u histidin dovodi do steričkih smetnji. Navedene steričke smetnje destabiliziraju međuprodukt, supstrate ili prijelazno stanje te uzrokuju gubitak enzimске aktivnosti.

Kako bi se dublje razumjela funkcionalna akomodacija nekanonskog slijeda u *PmIleRS2*, ali ne i u *PmIleRS1*, poravnate su katalitičke domene divljih tipova s njihovim mutantnim varijantama. Na razini tercijarne strukture, preklapanje je bilo izuzetno dobro jer su i divlji tipovi enzima i njihove mutirane varijante s nekanonskim slijedom kristalizirali u istim uvjetima i unutar iste prostorne grupe (Tablica 23). Ipak, u načinu vezanja međuprodukta uočene su razlike u pozicioniranju adeninske baze (Slika 34).



Slika 34. Preklapanje katalitičkih srži divljih tipova *PmIleRS* enzima i njihovih mutiranih varijanti s nekanonskim slijedom strukturnog motiva: (a) wt-HMGGH-*PmIleRS1* i mut-GMHH-*PmIleRS1* u kompleksu s 5'O-Ile-AMS; (b) wt-HVGH-*PmIleRS2* i mut-GVHH-*PmIleRS2* u kompleksu s 5'O-Ile-AMS. Uvođenje nekanonskog slijeda strukturnog motiva u *PmIleRS1* dovodi do steričkih konflikata koji uzrokuju promjene u vezanju adeninske baze (analog) reakcijskog međuprodukta. Suprotno tome, kod *PmIleRS2* specifična konformacija vrha α_1 zavojnice omogućuje akomodaciju nekanonskog slijeda bez značajne promjene geometrije aktivnog mjesta. Kanonski slijed strukturnog motiva prikazan je ljubičastom bojom, dok je nekanonski istaknut narančasto.

U aktivnom mjestu *PmIleRS2*, mutacija kanonskog slijeda strukturnog motiva (HXGH) u nekanonski (GXHH) nije narušila vezivanje (analog) reakcijskog međuprodukta (Slika 34 a). Histidin na prvoj poziciji u kanonskom slijedu divljeg tipa enzima (HXGH), komplementiran je histidinom na trećoj poziciji u nekanonskom slijedu (GXHH). Time je očuvan položaj katalitički presudnog N ϵ atoma histidina, uz očuvanje slaganja His581 s adeninskom bazom (analog) reakcijskog međuprodukta. Aktivno mjesto *PmIleRS2* tolerira izmjenu slijeda strukturnog motiva zahvaljujući pomaku vrha α_1 zavojnice (Slika 33), čime se izbjegava promjena položaja adeninske baze u aktivnom mjestu mutanta.

Nasuprot tome, uvođenje nekanonskog slijeda u *PmIleRS1* dovodi do značajnih rearanžmana aktivnog mjesta. Budući da vrh α_1 zavojnice u *PmIleRS1* nema odgovarajuću konformaciju prisutnu u *PmIleRS2* (Slika 33), mutacija glicina na trećoj poziciji kanonskog slijeda (HXGH) u histidin nekanonskog slijeda (GXHH) sterički ometa akomodaciju adeninske baze (analog) međuprodukta (Slika 34 b). Kao posljedica, adeninska baza u mutantu

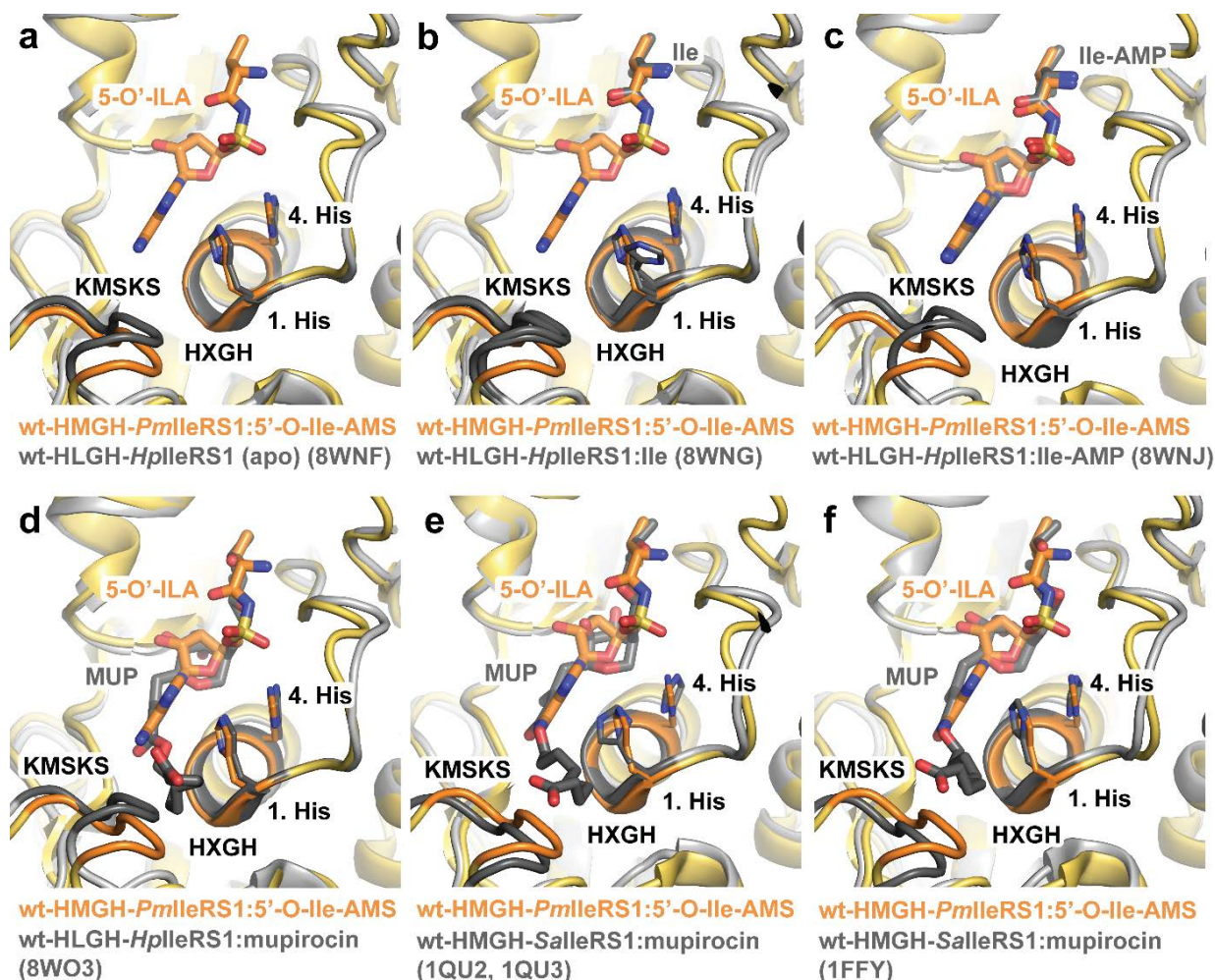
pomaknuta je za 1,5 Å u odnosu na divlji tip enzima, uz gubitak slaganja s bočnim ogrankom Phe586. Iako kristalna struktura enzima s nehidrolizabilnim analogom međuprodukta ne predstavlja idealan prikaz prijelaznog stanja ili *apo* oblika enzima, nije nerazumno zaključiti da su uzrok kinetičke neaktivnosti mut-GMHH-*PmIleRS1* ili gubitak pravilne koordinacije u prijelaznom stanju, ili slabije vezanje adenozin-5'-trifosfata kao supstrata. Budući da mutirani enzim s nekanonskim slijedom veže analog reakcijskog međuprodukta, koji je strukturno sličan ATP-u, vjerojatno je, iako eksperimentalno nepotvrđeno, da nekanonski slijed ne ometa vezanje supstrata (ATP). Ipak, konformacija u kojoj se supstrati vežu vjerojatno jest suboptimalna, što sprječava nastanak povoljne konformacije u prijelaznom stanju i onemogućuje katalitički korak reakcije.

Uzimajući u obzir presudnu ulogu različite konformacije vrha α_1 zavojnice u dvama tipovima *PmIleRS* enzima u akomodaciji nekanonskog slijeda strukturnog motiva, uložen je znatan napor u identifikaciju ključnih bočnih ogrankova koji omogućuju steričku fleksibilnost vrha α_1 zavojnice u *PmIleRS2*, ali ne i u *PmIleRS1* (vidi sljedeća poglavlja).

4.3.5. *Fleksibilnost vrha α_1 zavojnice kao univerzalno svojstvo IleRS2?*

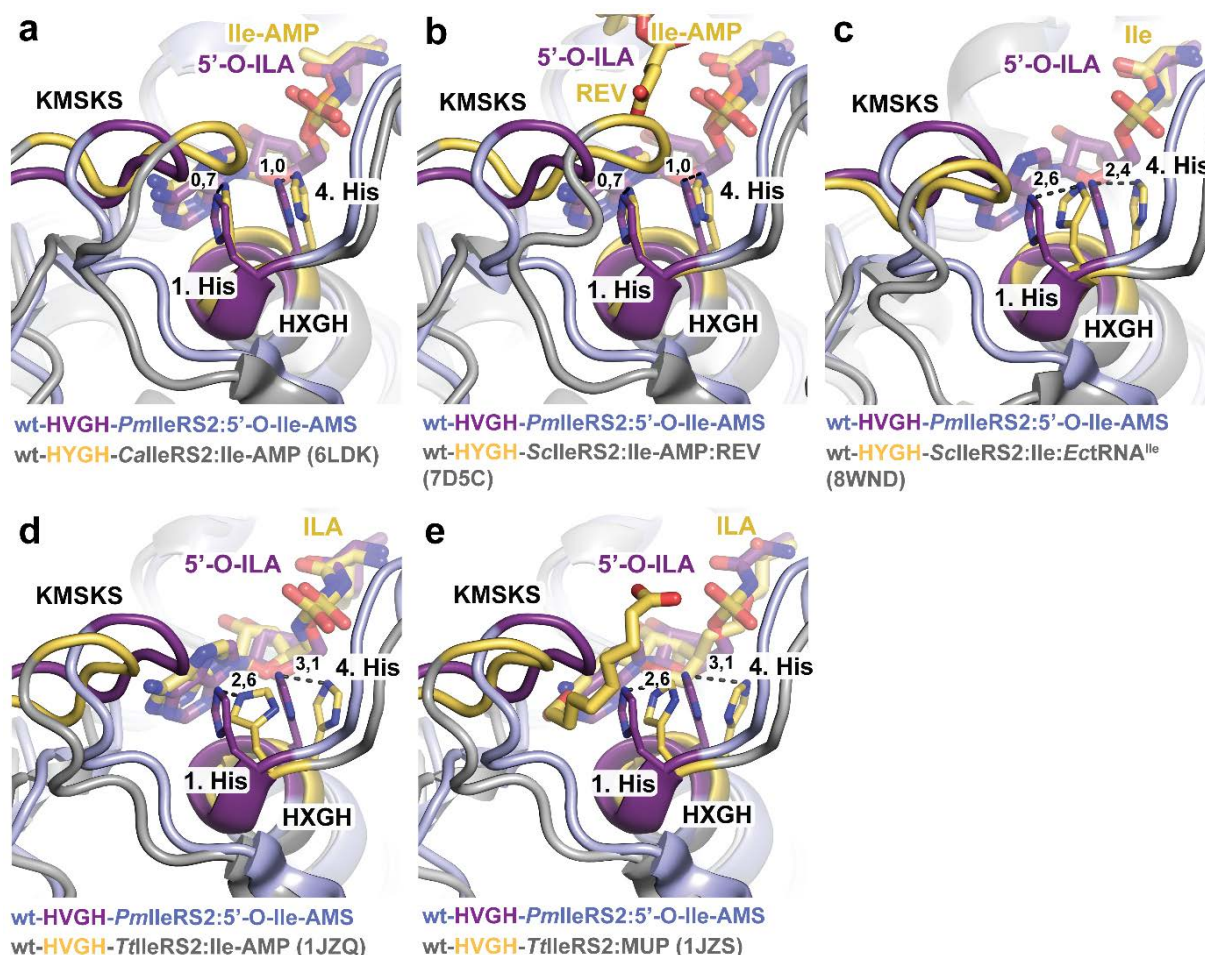
U prethodnim poglavljima pokazano je da rotiranost vrha α_1 zavojnice u *PmIleRS2* predstavlja elegantan mehanizam za akomodaciju nekanonskog slijeda strukturnog motiva u njegovu aktivnom mjestu. Suprotno tome, rigidnost vrha α_1 zavojnice u *PmIleRS1* onemogućuje analognu prilagodbu aktivnog mjesta tog enzima nekanonskom slijedu. No ostaje pitanje je li ovakav mehanizam akomodacije nekanonskog slijeda univerzalan za sve IleRS2 enzime te imaju li svi IleRS1 enzimi rigidan vrh α_1 zavojnice? Kinetička analiza odabranih IleRS enzima (Poglavlje 4.2.2) podupire ovu pretpostavku, budući da su svi testirani IleRS2 enzimi s nekanonskim slijedom bili kinetički aktivni, za razliku od testiranih IleRS1. Ipak, kako bi se razjasnila univerzalnost ovog mehanizma, potrebno je usporediti riješene kristalne strukture dvaju *PmIleRS* enzima s prethodno publiciranim strukturama drugih IleRS enzima. U analizu su stoga uključena strukturna poravnanja sljedećih IleRS enzima dobivenih istraživanjima drugih istraživačkih skupina: *TtIleRS2* u kompleksu s Ile-AMS (1JZQ²⁹) i mupirocinom (1JZS³⁰), *CaIleRS2* u kompleksu s Ile-AMP (6LDK³¹), *ScIleRS2* u kompleksu s Ile-AMS i reveromicinom (7D5C¹⁴⁷), odnosno *EctRNA*^{Ile} i izoleucinom (8WND³⁸, 8Z1P³⁹), *HpIleRS1* u *apo* obliku (8WNF³²), u kompleksu s izoleucinom (8WNG³⁵), Ile-AMP (8WNJ³³) i mupirocinom (8WO3³⁴) te *SaIleRS1* u kompleksu s mupirocinom i tRNA^{Ile} (1QU2²⁶, 1QU3²⁷, 1FFY²⁸).

Katalitičke srži IleRS1 enzima, čije su strukture određene istraživanjima drugih istraživačkih skupina, dobro se preklapaju s katalitičkom srži wt-HMGH-*PmIleRS1* (ostaci 50–174 i 523–635), pri čemu najveće razlike proizlaze iz konformacije KMSKS omče, poznate po varijabilnosti ovisno o vezanom ligandu²²⁷. Suprotno tome, konformacija HXGH motiva kod svih strukturno sravnjenih IleRS1 enzima gotovo je identična (Slika 35), što podupire pretpostavku o konformacijskoj zakočenosti vrha α_1 zavojnice u IleRS1 enzimima.



Slika 35. Usporedba katalitičke srži wt-HMGH-*PmIleRS1*:5'-O-Ile-AMS (ostaci 50–174 i 523–635) s katalitičkim sržima prethodno publiciranih struktura IleRS1 enzima: (a) apo oblikom wt-HLGH-*HpIleRS1* (8WNF), (b) wt-HLGH-*HpIleRS1* u kompleksu s Ile (8WNG), (c) wt-HLGH-*HpIleRS1* u kompleksu s Ile-AMP (8WNJ), (d) wt-HLGH-*HpIleRS1* u kompleksu s mupirocinom (8WO3), (e) wt-HMGH-*SalleRS1* u kompleksu s mupirocinom i tRNA^{Ile} (koja nije prikazana) (1QU2 i 1QU3), (f) wt-HMGH-*SalleRS1* u kompleksu s mupirocinom i tRNA^{Ile} (koja nije prikazana) (1FFY). Strukture (e) i (f) predstavljaju dvije odvojene depozicije iste kristalne strukture wt-HMGH-*SalleRS1* u kompleksu s mupirocinom i tRNA^{Ile}, pri čemu je mupirocin modeliran različito. Preklapanje struktura pokazuje gotovo identičnu konformaciju vrha α_1 zavojnice sa strukturnim motivom HXGH kod svih analiziranih IleRS1 enzima.

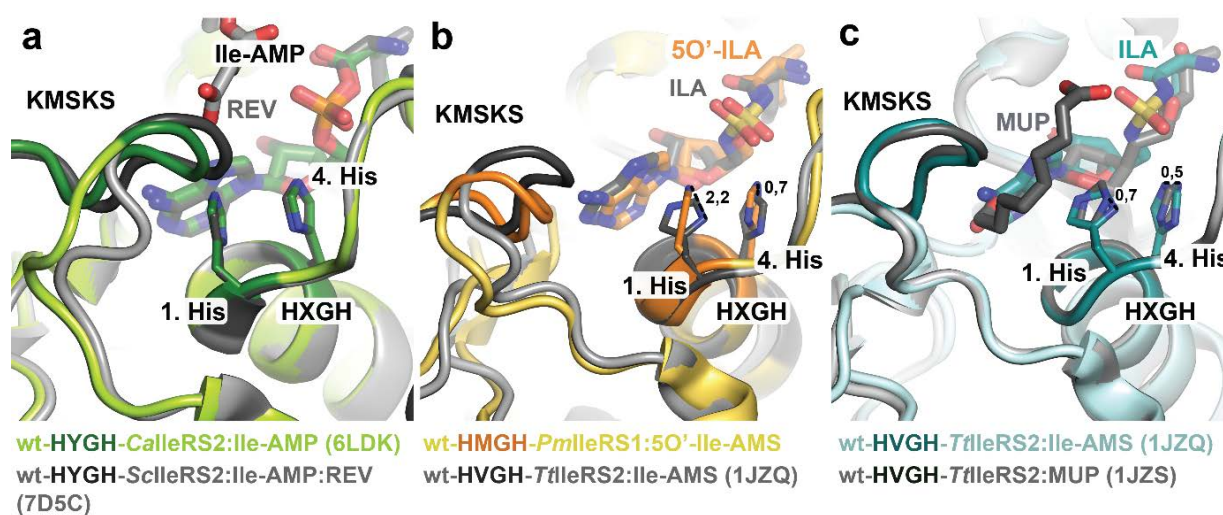
Preklapanje katalitičke srži wt-HVGH-*PmIleRS2* (ostatci 40–168 i 513–632) s katalitičkim sržima *IleRS2* enzima, čije su strukture određene u istraživanjima drugih istraživačkih skupina, pokazalo se manje informativnim. Vrh α_1 zavojnice wt-HVGH-*PmIleRS2* preklapa se tek umjereno s vrhovima α_1 zavojnica wt-HYGH-*CalIleRS2* (Slika 36 a) i wt-HYGH-*ScIleRS2* (Slika 36 b), oba u kompleksu s reakcijskim međuproduktom (*Ile*-AMP). Mjereno prema pomacima N_ϵ atoma prvog i četvrtog histidina strukturnog motiva, razlike u oba primjera iznose 0,7 Å, odnosno 1,0 Å. Male razlike u konformaciji strukturnog motiva ovih enzima u odnosu na wt-HVGH-*PmIleRS2* vjerojatno proizlaze iz činjenice da su kristalizirani s pravim reakcijskim međuproduktom (*Ile*-AMP), za razliku od wt-HVGH-*PmIleRS2* koji je kristaliziran s njegovim nehidrolizabilnim analogom (5'-O-*Ile*-AMS).



Slika 36. Usporedba katalitičke srži wt-HVGH-*PmIleRS2*:5'-O-*Ile*-AMS (40–168 i 513–632) s katalitičkim sržima drugih publiciranih *IleRS2* struktura: (a) wt-HYGH-*CalIleRS2* u kompleksu s *Ile*-AMP (6LDK), (b) wt-HYGH-*ScIleRS2* u kompleksu s *Ile*-AMP i reveromicinom (7D5C), (c) wt-HYGH-*ScIleRS2* u kompleksu s izoleucinom i *EctRNA*^{lle} (8WND), (d) wt-HVGH-*TrIleRS2* u kompleksu s *Ile*-AMS (1JZQ), (e) wt-HVGH-*TrIleRS2* u kompleksu s mupirocinom (1JZS). Preklap struktura ukazuje na razlike u konformaciji vrha α_1 zavojnice sa strukturnim motivom HXGH kod *IleRS2* enzima.

Na to da je konformacija aktivnog mjesta suptilno promijenjena kada je vezan prirodni reakcijski međuprodukt i njegov nehidrolizabilni analog, upućuje i preklapanje katalitičkih srži wt-HYGH-*Cal*leRS2 i wt-HYGH-*Sc*leRS2 u kompleksu s prirodnim reakcijskim međuproduktom (Ile-AMP), gdje je preklapanje strukturnog motiva izvrsno (Slika 37 a).

Zanimljiva je i usporedba katalitičke srži wt-HVGH-*Pm*leRS2 u kompleksu s HYGH-*Sc*leRS2 u kompleksu s *Ect*RNA^{lle} i izoleucinom (8WND³⁸) (Slika 36 c), gdje se veliki pomak vrha α_1 zavojnice može pripisati utjecaju vezane *Ect*RNA^{lle}. Preklapanje katalitičke srži wt-HVGH-*Pm*leRS2 s katalitičkom srži wt-HVGH-*Tt*leRS2 u kompleksu s Ile-AMS (Slika 36 d) i mupirocinom (Slika 36 e) također otkriva značajne razlike u konformaciji strukturnog motiva. Mjereno prema pomacima N_ε atoma prvog i četvrtog histidina strukturnog motiva, razlike iznose 2,6 Å, odnosno 3,1 Å pri usporedbi obje katalitičke srži. Takvi pomaci dovode HXGH motiv wt-HVGH-*Tt*leRS2 u konformaciju bližu onoj prisutnoj u wt-HMGH-*Pm*leRS1 nego onoj karakterističnoj za ostale IleRS2 enzime (Slika 37 b). Ipak, moguće je da je neka od kristalnih struktura wt-HVGH-*Tt*leRS2 djelomično pogrešno modelirana. Naime, unatoč tome što su dvije kristalne strukture wt-HVGH-*Tt*leRS2 kristalizirane s drastično različitim ligandima (Ile-AMS i mupirocin), dva modela preklapaju se neočekivano dobro, uključujući i konformaciju inače fleksibilne KMSKS omče (Slika 37 c). RMSD vrijednost pri poravnanju svih C_α atoma dvaju modela iznosi svega 0,435 Å. Neovisna provjera modela nije moguća jer za strukture u bazi RCSB PDB nisu deponirane mape elektronske gustoće.



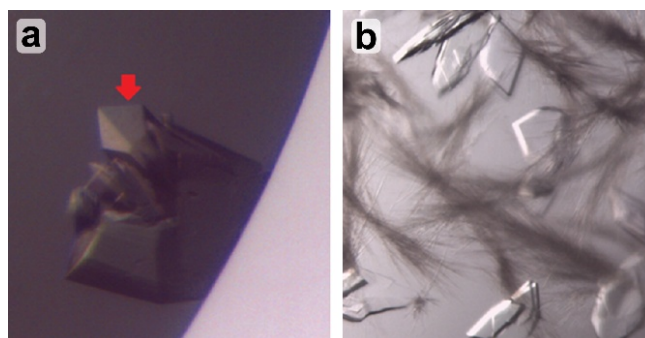
Slika 37. Usporedba katalitičkih srži: (a) wt-HYGH-*Cal*leRS2 u kompleksu s Ile-AMP (6LDK) i wt-HYGH-*Sc*leRS2 u kompleksu s Ile-AMP i reveromicinom (7D5C), (b) wt-HMGH-*Pm*leRS1 u kompleksu s 50'-Ile-AMS i wt-HVGH-*Tt*leRS2 u kompleksu s Ile-AMS (1JZQ), (c) wt-HVGH-*Tt*leRS2 u kompleksu s Ile-AMS (1JZQ) i wt-HVGH-*Tt*leRS2 u kompleksu s mupirocinom (1JZS).

4.4. Mupirocinska rezistencija IleRS

4.4.1. Kristalizacija *PmIleRS* enzima u kompleksu s mupirocinom

Istraživanja provedena u sklopu ove disertacije pokazala su povezanost nekanonskog slijeda strukturnog motiva IleRS (GXHH) s visokom razinom rezistencije na mupirocin (Poglavlje 4.2.2), što je u skladu s rezultatima ranijih studija¹². S ciljem potkrijepljenja navedenih rezultata strukturnim modelima, pokušana je kristalizacija divljih tipova *PmIleRS1* i *PmIleRS2* te njihovih mutiranih varijanti s nekanonskim slijedom strukturnog motiva u kompleksu s mupirocinom. Mutirane varijante enzima s nekanonskim slijedom strukturnog motiva nisu kristalizirale zbog niskog afiniteta prema mupirocinu te njegove tenzidne prirode pri višim koncentracijama potrebnima za vezanje²²⁸. S druge strane, divlji tipovi *PmIleRS* enzima uspješno su kristalizirani u kompleksu s mupirocinom pod sljedećim uvjetima:

- **wt-HMGH-*PmIleRS1*:mupirocin:** 1 μl otopine enzima (20 mg ml^{-1}), suplementirane s 3 mmol dm^{-3} mupirocina, pomiješan je s 1 μl otopine sastava: 400–900 mmol dm^{-3} LiCl i 10–20 % (w/v) PEG3350. Dobivena kap ekvilibrirana je prema 300 μl matične otopine istog sastava pri 19 °C (Slika 38 a).
- **wt-HVGH-*PmIleRS2*:mupirocin:** 1 μl otopine enzima (16,5 mg ml^{-1}), suplementirane s 10 mmol dm^{-3} mupirocina, pomiješan je s 1 μl otopine sastava: 200–500 mmol dm^{-3} amonijeva tartarata i 10–20 % (w/v) PEG3350. Dobivena kap ekvilibrirana je prema 300 μl matične otopine istog sastava pri 4 °C (Slika 38 b).



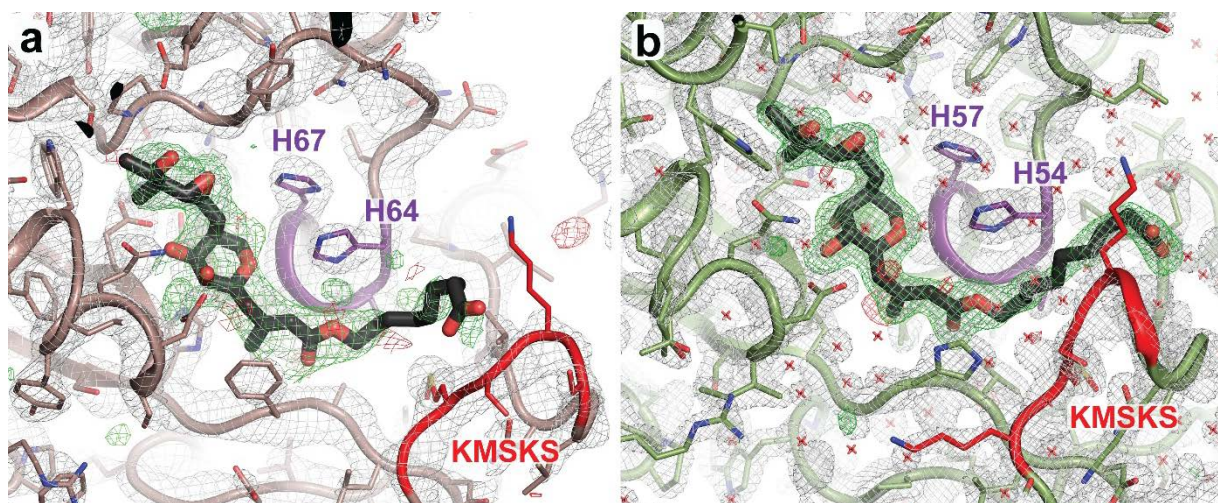
Slika 38. Kristali odgovarajuće difrakcijske kvalitete: (a) wt-HMGH-*PmIleRS1*:mupirocin, (b) wt-HVGH-*PmIleRS2*:mupirocin

Kristali wt-HMGH-*PmIleRS1* u kompleksu s mupirocinom rasli su kao sraslice, pri čemu ni nakon opsežne optimizacije kristalizacijskih uvjeta nije bilo moguće dobiti pojedinačne kristale. Ipak, pažljivom manipulacijom bilo je moguće izdvojiti segmente kristala prikladne za difrakciju. Kristali (ili izdvojeni dijelovi sraslica) oba kompleksa smrznuti su u tekućem dušiku nakon krioprotekcije u kristalizacijskom likvoru suplementiranom s 20 % (v/v) PEG 400. Stabilizirani kristali podvrgnuti su rendgenskoj difrakciji na sinkrotronskom izvoru zračenja (Paul Scherrer Institut, Villigen, Švicarska), na liniji PXIII. Prikupljanje i obrada difraktograma provedeni su prema protokolu korištenom za kristale enzima u kompleksu s 5'-O-Ile-AMS (Poglavlje 4.3.1). Problem određivanja kristalografskih faza ponovno je riješen metodom molekulske zamjene, korištenjem javno dostupnih modela navedenih u tablici 24. Inicijalni modeli dobiveni molekulskom zamjenom iterativno su poboljšani višestrukim ciklusima ručne gradnje u programskom paketu Coot²¹⁵ te optimizacijom koordinata i B-faktora u paketu Phenix²¹⁶. Za razliku od modela *PmIleRS1*, TLS parametrizacija modela *PmIleRS2* nije bila potrebna, jer je konvergencija R-faktora postignuta i bez dodatnih ograničenja.

Tablica 24. Popis kristalnih struktura korištenih za molekulsku zamjenu

Kristalna struktura	Početni model za molekulsku zamjenu
wt-HMGH- <i>PmIleRS1</i> :mupirocin (8C9G)	Lanac A [1–921] iz wt-HMGH- <i>PmIleRS1</i> :5'-O-Ile-AMS (8C9E ²¹²)*
wt-HVGH- <i>PmIleRS2</i> :mupirocin (8C8U)	Lanac A [1–821] iz wt-HVGH- <i>TtIleRS2</i> :Ile-AMS (1JZS ³⁰)
* Molekulski modeli generirani unutar ove studije i deponirani u bazi RCSB PDB	

Budući da rješenje molekulske zamjene za wt-HVGH-*PmIleRS2* u kompleksu s mupirocinom nije uključivalo strukturu C-terminalne antikodon-vezujuće domene, a rezolucija mape elektronske gustoće bila je visoka, njezina je struktura određena automatiziranom gradnjom u modulu *Phenix.autobuild*²¹⁶. Zbog slabog lokalnog razlučenja, segment C-terminalne domene wt-HVGH-*PmIleRS2* (aminokiseline 882–887) modeliran je kao poliadeninski lanac. Statistički parametri konačnih molekulskih modela prikazani su u tablici 25. U mF_o-DF_c mapama elektronske gustoće, za oba enzima jasno je u aktivnom mjestu bila vidljiva razlikovna gustoća koju se moglo nedvosmisleno pripisati molekuli vezanog mupirocina (Slika 39).



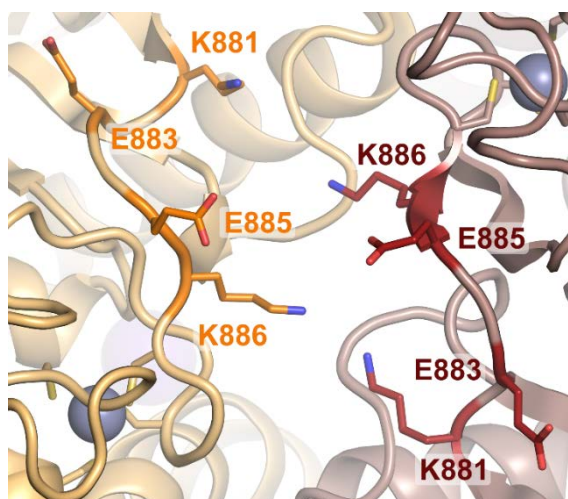
Slika 39. $2mF_o-DF_c$ te mF_o-DF_c OMIT mape elektronske gustoće aktivnih mjesta divljih tipova *PmIleRS* enzima u kompleksu s mupirocinom. **(a)** $2mF_o-DF_c$ mapa kompleksa wt-HMGH-*PmIleRS1* (plava), razlučena je na 1,9 Å, prikazana na razini od $+2\sigma$. mF_o-DF_c OMIT mapa istog aktivnog mjesta, prikazana je na razinama od $+5\sigma$ (zeleni) i -5σ (crveni). **(b)** $2mF_o-DF_c$ i odgovarajuće mF_o-DF_c OMIT mape aktivnog mjesta wt-HVGH-*PmIleRS2*. Mape su razlučene na 2,95 Å, s bojama kao u **(a)**, te prikazane na razini $+2\sigma$ za $2mF_o-DF_c$ mapu i $\pm 2\sigma$ za mF_o-DF_c OMIT mape. Za generiranje mF_o-DF_c OMIT mapa, kofaktori su uklonjeni iz modela, a zatim su krnji modeli optimirani do konvergencije R-faktora (5 ciklusa) u programskom paketu Phenix. Prije minimizacije, B-faktori su postavljeni na $100 \text{ \AA}^3$, a kartezijanske koordinate svih atoma nasumično pomaknute za 0,1 Å. U svim slučajevima, dobivene $2mF_o-DF_c$ i mF_o-DF_c mape elektronske gustoće jasno prikazuju prisutnost i konformaciju mupirocina u aktivnim mjestima enzima. U oba prikaza, molekula mupirocina istaknuta je crnom bojom, dok su aminokiseline strukturnih motiva HXGH i KMSKS istaknute ljubičastom, odnosno crvenom bojom.

Tablica 25. Statistički parametri molekulskih modela wt-HMGH-*PmIleRS1* i wt-HVGH-*PmIleRS2* u kompleksu s mupirocinom

	wt-HMGH- <i>PmIleRS1</i> :mupirocin (8C9E)	wt-HVGH- <i>PmIleRS2</i> :mupirocin (8C8U)
Akvizicija		
Prostorna grupa	P3 ₁ 2 1	P2 ₁ 2 ₁ 2
Dimenzije ćelije		
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	127,09; 127,09; 163,22	89,58; 124,83; 114,46
α , β , γ (°)	90, 90, 120	90, 90, 90
Rezolucija (Å)	45,63–2,9 (3,004–2,9)	48,2–1,9 (1,969–1,901)
<i>R</i> _{sym} ili <i>R</i> _{merge}	0,06695 (3,219)	0,13 (2,579)
<i>I</i> / σI	30,66 (0,98)	14,93 (1,01)
Kompletnost (%)	92,86 (74,11)	90,60 (74,27)
Redundantnost	20,8 (22,0)	13,3 (13,4)
Utočnjavanje		
Rezolucija (Å)	45,63–2,9 (3,004–2,9)	48,2–1,9 (1,969–1,901)
Broj refleksa	713744 (74146)	1348929 (133421)
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	0,2421 (0,3893) / 0,2685 (0,4451)	0,1875 (0,3291) / 0,2276 (0,3613)
Broj atoma		
Protein	7408	8223
Ligand/ion	106	73
Voda	0	764
<i>B</i> -faktori		
Protein	155,34	40,34
Ligand/ion	142,57	39,28
Voda	0,00	42,64
Devijacije		
Duljina veza (Å)	0,002	0,008
Vezni kutovi (°)	0,430	0,890

*Vrijednosti u zagradama se odnose za ljusku najveće rezolucije

U jediničnoj ćeliji kristala wt-HMGH-*PmIleRS1*, molekulskom zamjenom identificirane su dvije molekule kompleksa. Analiza interakcijskog sučelja pokazala je da su kontakti molekula u kristalu ostvareni putem entropijski nepovoljnih bočnih ograna (Lys881, Glu883, Glu885, Lys886) (Slika 40). Površinska entropija molekule, osobito u području kristalnih kontakata, negativno utječe na kristalizaciju, a njezino smanjenje može znatno poboljšati difrakcijska svojstva kristala^{223,224,229}. S ciljem zamjene entropijski nepovoljnih aminokiselina na kristalnom sučelju u entropijski povoljne, provedena je alaninska mutageneza prethodno navedenih aminokiselina. Višestruko mutirani protein uspješno je pročišćen te postavljen na kristalizaciju. Nažalost, isti nije kristalizirao u uvjetima u kojima je kristalizirao divlji tip enzima. Pogodan kristalizacijski uvjet nije identificiran ni nakon opsežne optimizacije sastava otopine, temperature kristalizacije, odnosno dodatka aditivâ.



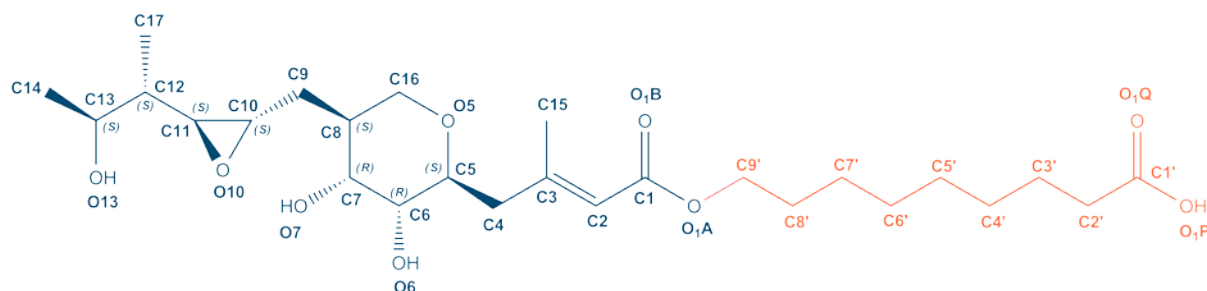
Slika 40. Prikaz interakcijskog sučelja na kristalnom kontaktu dviju molekula kompleksa wt-HMGH-*PmIleRS1*:mupirocin u jediničnoj ćeliji. Sučeljem dominiraju aminokiseline čiji bočni ogranci nepovoljno utječu na slobodnu energiju kristalizacije. Dvije molekule kompleksa u jediničnoj ćeliji prikazane su različitim bojama.

4.4.2. Tercijarna struktura *PmIleRS1* i *PmIleRS2* u kompleksu s mupirocinom

Na razini tercijarne strukture, molekulski modeli wt-HMGH-*PmIleRS1* i wt-HVGH-*PmIleRS2* u kompleksu s mupirocinom jednaki su onima s 5'-O-Ile-AMS (Poglavlje 4.3.2). Struktura wt-HMGH-*PmIleRS1* s mupirocinom pokazuje niži izotropni B-faktor u odnosu na strukturu wt-HMGH-*PmIleRS1* s 5'-O-Ile-AMS, zbog čega su mape elektronske gustoće, osobito u području C-terminalne domene, bolje razlučene. Kod wt-HVGH-*PmIleRS2*, aminokiseline 882–887 modelirane su kao alanini zbog lošeg lokalnog razlučenja mapa elektronske gustoće.

4.4.3. Indeksiranje atoma u molekuli mupirocina

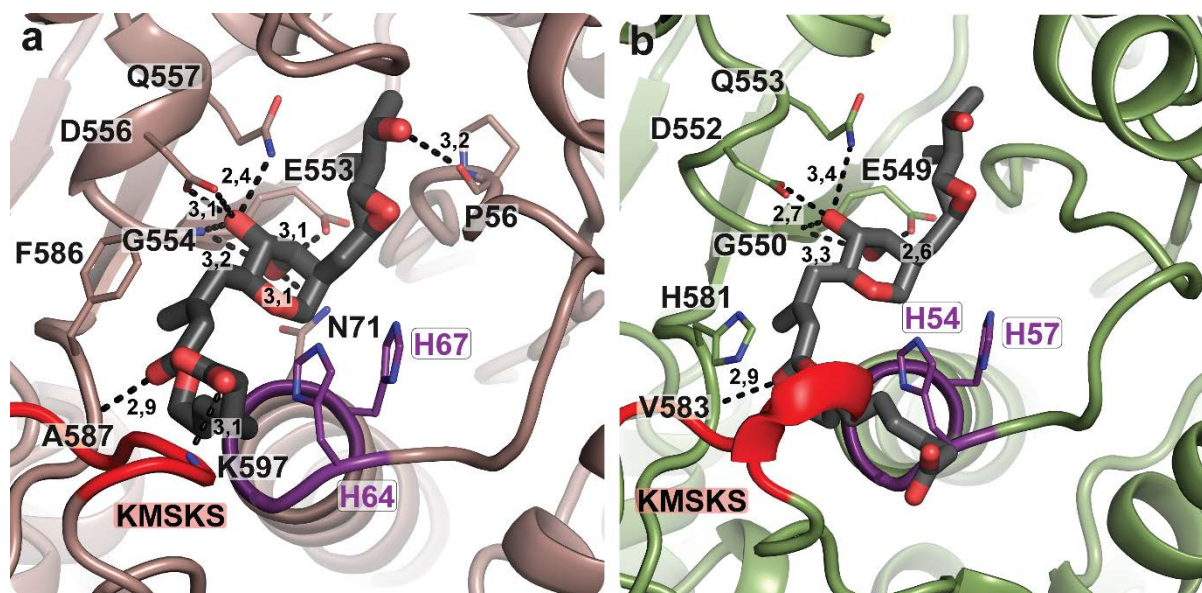
Radi jednostavnijeg indeksiranja funkcionalnih skupina mupirocina, potrebno je prethodno definirati numeraciju (indeks) atoma. Iako indeksiranje može biti provedeno na više načina (uključujući i numeraciju prema načelima IUPAC nomenklature), radi jednostavnosti odabrana je numeracija prema bazi RCSB PDB koja će biti korištena u nastavku (Slika 41).



Slika 41. Struktura mupirocina s označenim indeksom atoma. Na slici je naznačena apsolutna konfiguracija kiralnih centara te indeksacija atoma sukladna onoj pohranjenoj u bazi RCSB PDB.

4.4.4. Prepoznavanje i vezanje mupirocina

Prepoznavanje mupirocina u aktivnim mjestima divljih tipova dvaju *PmIleRS* enzima analogno je onome u wt-HVGH-*TlIleRS2* (1JZS³⁰), wt-HMGH-*SalIleRS1* (1FFY²⁸), i nedavno objavljenoj strukturi wt-HLGH-*HpIleRS1* (8WO3^{37,152}). Kao kompetitivni inhibitor, mupirocin zauzima vezno mjesto izoleucina i ATP-a, oponašajući vezanje reakcijskog međuprodukta^{13,148,152}. Skupina mupirocina koja morfološki imitira bočni ogranak izoleucina (atomi C11–C14 i C17) smješta se putem van der Waalsovih interakcija u hidrofobni džep specifičan za izoleucin. U wt-HMGH-*PmIleRS1* taj džep čine Pro56, Trp527 i Trp527, dok je u wt-HVGH-*PmIleRS2* sastavljen od Pro46, Trp517 i Trp557. Hidroksilna skupina na atomu C13 mupirocina ne sudjeluje u interakcijama s wt-HVGH-*PmIleRS2*, dok u wt-HMGH-*PmIleRS1* ostvaruje vodikovu vezu s karbonilnom skupinom Pro56, čime pridonosi specifičnosti vezanja mupirocina (Slika 42).

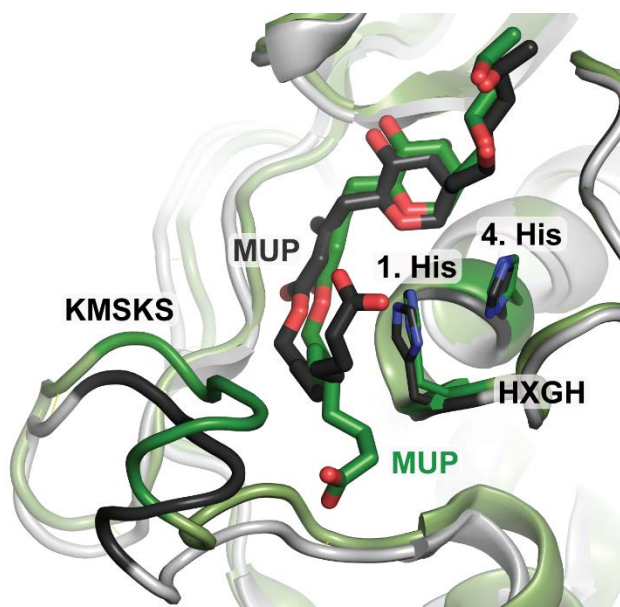


Tetrahidropiranski prsten predstavlja najspecifičnije stabiliziran dio mupirocina kod oba tipa *PmIleRS* enzima te se prepoznaje analogno heterocikličkom prstenu riboze reakcijskog međuprodukta (Slika 31, Poglavlje 4.3.3). Hidroksilne skupine na atomima C6 i C7 mupirocina stabilizirane su višestrukim vodikovim vezama s visoko očuvanim pozicijama u aktivnim mjestima *PmIleRS* enzima. Kod wt-HMGGH-*PmIleRS1* te se interakcije ostvaruju s bočnim ograncima Gly554 (-NH- skupina), Asp556, Gln557, Glu553 i Asn70. Kod wt-HVGGH-*PmIleRS2* izostaje stabilizacija mupirocina interakcijom s Asn70, budući da se na analognoj poziciji nalazi Gly60. Preostale interakcije hidroksilnih skupina na atomima C6 i C7 mupirocina kod wt-HVGGH-*PmIleRS2* analogne su onima u wt-HMGGH-*PmIleRS1* i ostvaruju se s Gly550 (-NH- skupina), Asp552, Gln553 i Glu549. Prije nego što su riješene strukture para *PmIleRS* enzima u kompleksu s mupirocinom, te naknadno i struktura wt-HLGGH-*HpIleRS1* s mupirocinom (8WO3³⁷), na temelju tada dostupnih struktura nije bilo jasno vežu li *IleRS1* i *IleRS2* enzimi mupirocin u istoj konformaciji. Naime, u strukturi wt-HVGGH-*TtIleRS2* s mupirocinom (1JZS³⁰), atomi C6 i C7 tetrahidropiranskog prstena modelirani su s apsolutnom konfiguracijom (*S,S*), za razliku od strukture wt-HMGGH-*SaIleRS1* s mupirocinom (1QU2²⁶, 1UQ3²⁷) gdje su isti atomi imali apsolutnu konfiguraciju (*R,R*). Suprotno strukturama 1QU2 i 1UQ3, treća depozicija iste strukture wt-HMGGH-*SaIleRS1* s mupirocinom (1FFY²⁸) ima atome C6 i C7 u konformaciji (*S,S*). Tek je rješavanjem kristalne strukture wt-HMGGH-*PmIleRS1* s mupirocinom, a nedugo zatim i strukture wt-HLGGH-*HpIleRS1* s mupirocinom (8WO3³⁷), pokazano da je ispravna konfiguracija atoma C6 i C7 tetrahidropiranskog prstena (*S,S*).

Nezasićeni konjugirani sustav mupirocina (od C1 do C3 atoma mupirocina) interagira s bočnim lancem Phe586 putem π - π interakcija kod wt-HMGGH-*PmIleRS1*, odnosno s His581 kod wt-HVGGH-*PmIleRS2*. Karbonilna esterska skupina na atomu C1 mupirocina stabilizirana je vodikovom vezom s amidnom skupinom Ala587 kod wt-HMGGH-*PmIleRS1* te Val583 kod wt-HVGGH-*PmIleRS2*. Interakcije koje ostvaruje konjugirani sustav mupirocina analogne su onima kojima je stabilizirana adeninska baza reakcijskog međuprodukta (Slika 31, Poglavlje 4.3.3). To znači da konjugirani sustav između atoma C1 i C3 mupirocina funkcionalno oponaša adeninski prsten reakcijskog međuprodukta.

Najveća razlika u vezanju mupirocina između dvaju tipova *PmIleRS* enzima jest u načinu stabilizacije 9-hidroksinonanoične kiseline. Ista je kod oba enzima stabilizirana interakcijama s KMSKS omčom, ali na različit način. Kod wt-HMGGH-*PmIleRS1*, 9-hidroksinonanoična kiselina ostvaruje vodikovu vezu s polipeptidnom okosnicom prvog lizina

KMSKS motiva (Lys597). Ta interakcija nije opažena u strukturama kompleksa wt-HMGH-SalleRS1 s tRNA^{Ile} i mupirocinom (depozicije 1QU2²⁶ i 1QU3²⁷), ali jest u alternativnoj depoziciji iste strukture pod oznakom 1FFY²⁸, kao i u strukturi wt-HLGH-*Hp*IleRS1 s mupirocinom (8WO3³⁷). Postojanje specifične interakcije karboksilne skupine 9-hidroksinonanoične kiseline mupirocina s KMSKS omčom u skladu je s prethodnim biokemijskim eksperimentima koji su pokazali da mupirocin štiti KMSKS omču IleRS1 iz bakterije *E. coli* od tripsinske razgradnje¹⁵⁰. Strukture wt-HMGH-*Pm*IleRS1 i wt-HLGH-*Hp*IleRS1 u kompleksu s mupirocinom stoga upućuju na to da je ovakva stabilizacija 9-hidroksinonanoične kiseline mupirocina univerzalno svojstvo IleRS1 enzima. Vodikove veze molekula s nabijenim akceptorima doprinose energiji vezanja u iznosu od 3 do 4 kcal mol⁻¹, čime mogu značajno utjecati na specifičnost prepoznavanja liganda^{230,231}. Na brojnim primjerima, uključujući oksidaze D-aminokiselina²³², tirozil-tRNA-sintetaze²³⁰, DNA-polimeraze^{233,234} i eukariotske proteinske kinaze²³⁵, pokazano je da promjena polarnih interakcija unutar aktivnog mjesta može modulirati enzimsku aktivnost, specifičnost i afinitet makromolekule prema ligandu. Uzimajući navedeno u obzir, uz općenito jaču stabilizaciju mupirocina u aktivnim mjestima IleRS1 enzima u odnosu na IleRS2, stabilizacija karboksilne skupine 9-hidroksinonanoične kiseline može biti presudan čimbenik višeg afiniteta IleRS1 prema mupirocinu. Za razliku od wt-HMGH-*Pm*IleRS1, u wt-HVGH-*Pm*IleRS2 9-hidroksinonanoična kiselina mupirocina smještena je u hidrofobni kanal između KMSKS omče i α_1 zavojnice s HXGH motivom, zbog čega ne ostvaruje specifične interakcije s KMSKS omčom enzima (Slike 42 b i 43). Usporedba katalitičke srži wt-HVGH-*Pm*IleRS2 s katalitičkom srži wt-HVGH-*Tt*IleRS2 u kompleksu s mupirocinom (1JZS³⁰) upućuje na to da se radi o univerzalnom svojstvu IleRS2 enzima, budući da stabilizacija 9-hidroksinonanoične kiseline mupirocina izostaje i u ovom slučaju (Slika 43). Gubitak stabilizacije karboksilne skupine smanjuje afinitet enzima prema mupirocinu smanjenjem energije njegova vezanja. Budući da je riječ o dugolančanom alkanu, 9-hidroksinonanoična kiselina u odsustvu specifičnih interakcija vjerojatno pokazuje visoku konformacijsku dinamičnost. Na to upućuje strukturno poravnanje katalitičkih srži wt-HVGH-*Pm*IleRS2 s mupirocinom i wt-HVGH-*Tt*IleRS2 s mupirocinom (1JZS³⁰), koje otkriva različitu konformaciju 9-hidroksinonanoične kiseline mupirocina u dvama aktivnim mjestima (Slika 43).



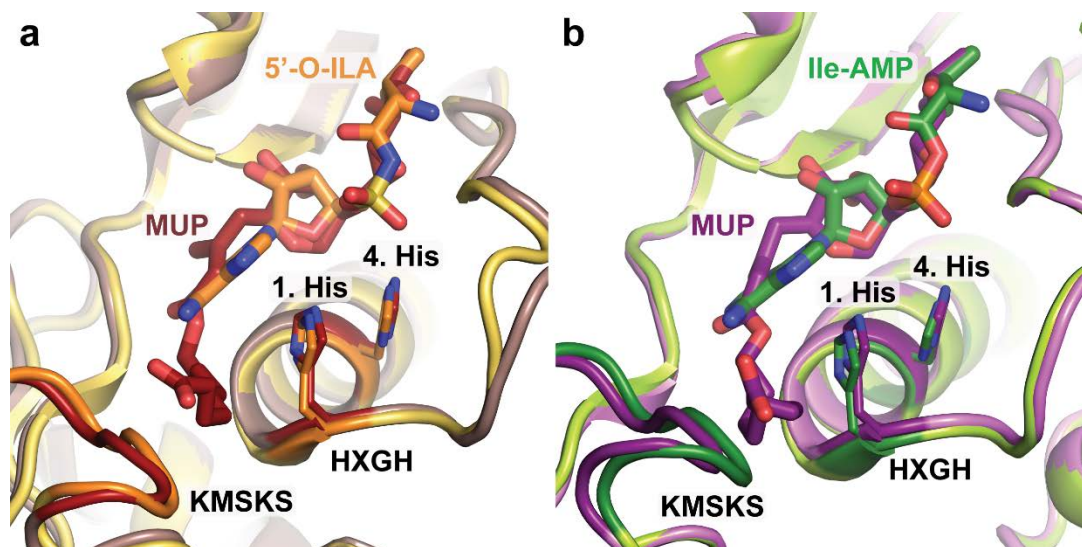
Slika 43. Usporedba katalitičkih srži wt-HVGH-*PmIleRS2* s mupirocinom (zeleno) i wt-HVGH-*TIleRS2* s mupirocinom (1JZS) (sivo). Tamnijim nijansama odgovarajućih boja istaknuti su mupirocin, prva i četvrta pozicija strukturnog motiva HXGH te slijed KMSKS omče. Monična kiselina mupirocina dobro se preklapa u oba molekulska modela, dok 9-hidroksinonanoična kiselina, koja nije specifično stabilizirana ni u jednom od enzima, zauzima znatno različite konformacije.

Povećana dinamičnost liganda u vezanom stanju smanjuje vjerojatnost nastanka energetski stabilnog kompleksa, čime se umanjuje afinitet enzima prema ligandu²³⁶. Vjerojatno je da smanjeni afinitet wt-HVGH-*PmIleRS2* prema mupirocinu proizlazi iz kombinacije manjeg broja stabilizirajućih interakcija i povećane konformacijske dinamičnosti 9-hidroksinonanoične kiseline mupirocina u vezanom stanju.

4.4.5. Dinamičnost kod prepoznavanja i vezanja mupirocina

Analiza interakcija mupirocina u aktivnim mjestima *PmIleRS* enzima ukazala je da je broj interakcija važan čimbenik koji modulira afinitet prema mupirocinu. Ipak, ova analiza nije uzela u obzir konformacijske promjene enzima koje mogu pratiti vezanje antibiotika. Radi razumijevanja konformacijske dinamike aktivnih mjesta dvaju tipova *PmIleRS* enzima tijekom vezanja mupirocina, preklopljene su i uspoređene njihove katalitičke srži (ostaci 50–174 i 523–635 u wt-HMGH-*PmIleRS1*, odnosno 40–168 i 513–632 u wt-HVGH-*PmIleRS2*) u kompleksu s mupirocinom ili nehidrolizabilnim analogom reakcijskog međuprodukta (5'-O-Ile-AMS). Preklapanje katalitičkih srži wt-HMGH-*PmIleRS1* u kompleksu s mupirocinom i 5'-O-Ile-AMS-om pokazuje minimalan rearanžman aktivnog mjesta pri vezanju antibiotika. Konformacija vrha α_1 zavojnice sa strukturnim motivom HXGH, kao i inače fleksibilne KMSKS omče, identične su u obje kristalne strukture, što upućuje na efektivnu

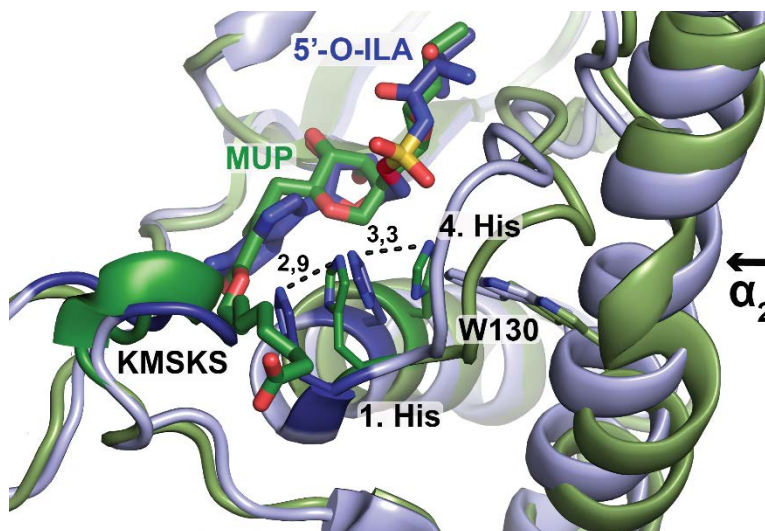
prekonfiguriranost aktivnog mjesta wt-HMGH-*PmIleRS1* za vezanje mupirocina visokim afinitetom (Slika 44 a). Sličan rezultat opaža se i kod preklapanja katalitičkih srži wt-HLGH-*HpIleRS1* u kompleksu s izoleucil-adenilatom (8WNJ³³) i mupirocinom (8WO3³⁷) (Slika 44 b), što sugerira da je prekonfiguriranost aktivnog mjesta za vezanje mupirocina visokim afinitetom zajedničko svojstvo svih *IleRS1* enzima.



Slika 44. Usporedba katalitičkih srži *IleRS1* enzima u kompleksu s reakcijskim međuproduktom, njegovim analogom ili mupirocinom: (a) Poravnanje wt-HMGH-*PmIleRS1*:5'-O-Ile-AMS (žuto) i wt-HMGH-*PmIleRS1*:mupirocin (smeđe); (b) Poravnanje wt-HLGH-*HpIleRS1*:Ile-AMP (8WNJ, zeleno) i wt-HLGH-*HpIleRS1*:mupirocin (8WO3, ljubičasto). Preklapanja struktura ukazuju na efektivnu prekonfiguriranost aktivnih mjesta *IleRS1* enzima za vezanje mupirocina s visokim afinitetom. Za isticanje funkcionalno značajnih elemenata aktivnog mjesta (strukturni motiv HXGH i KMSKS omča), korištene su zasićenije nijanse pripadajućih boja.

S druge strane, vezanje mupirocina u aktivno mjesto wt-HVGH-*PmIleRS2* koincidira sa značajnim promjenama konformacije vrha α_1 zavojnice sa strukturnim motivom HXGH, kao i narušavanjem sekundarne strukture α_2 zavojnice (ostaci 122–128). Interesantno je da vezanje ne uzrokuje promjenu konformacije KMSKS omče, koja unatoč literaturno poznatoj fleksibilnosti u oba kompleksa zauzima jednaku konformaciju²²⁷. Vrh α_1 zavojnice s HXGH motivom u mupirocinskom kompleksu pomaknut je u odnosu na kompleks s analogom za 2,9 Å, odnosno 3,3 Å, mjereno pomakom N_e atoma prvog, odnosno četvrtog histidina HXGH motiva. To rezultira širim procjepom između KMSKS omče i α_1 zavojnice, što omogućuje smještanje 9-hidroksinonanoične kiseline mupirocina, bez koje mupirocin gubi svoja inhibicijska svojstva²⁵. Iz tog razloga konformacijska promjena α_1 zavojnice, koja proširuje procjep između KMSKS omče i α_1 zavojnice, ima esencijalnu važnost u procesu molekuskog prepoznavanja i vezanja mupirocina na wt-HVGH-*PmIleRS2*. Promjenu konformacije α_1

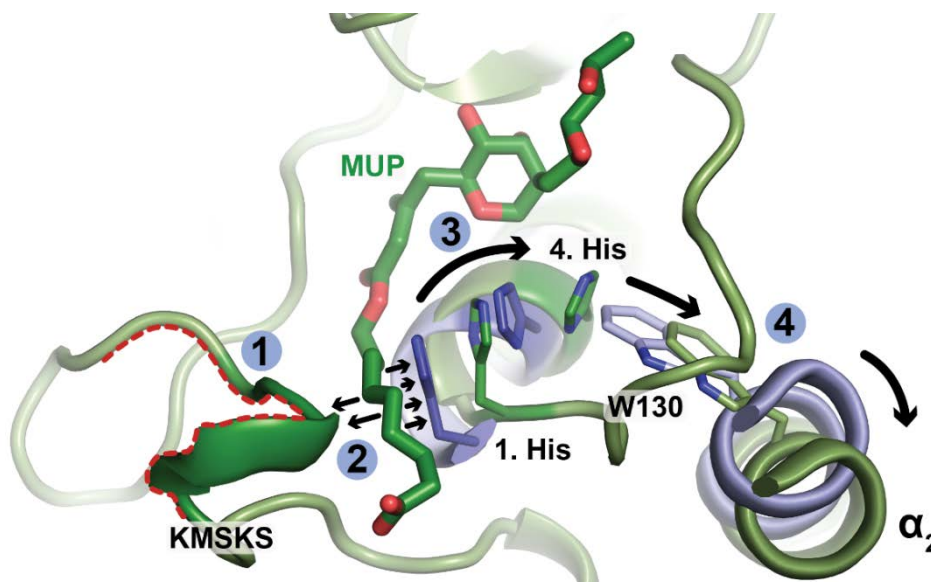
zavojnice prati narušavanje sekundarne strukture α_2 zavojnice, koja se deformira na sučelju interakcije četvrtog ostatka HXGH motiva (His54) i visoko očuvanog Trp136 u α_2 zavojnici (Slika 45).



Slika 45. Poravnanje katalitičkih srži wt-HVGH-*PmIleRS2* enzima u kompleksu s nehidrolizabilnim analogom reakcijskog međuprodukta (5'-O-Ile-AMS, plavo) i mupirocinom (zeleno). Strukturno poravnanje pokazuje značajne promjene unutar aktivnog mjesta enzima koje koincidiraju s vezanjem mupirocina. Za isticanje funkcionalno značajnih elemenata aktivnih mjesta enzima prikazanih na slikama (strukturni motiv HXGH i KMSKS omča) korištena je zasićenija nijansa pripadajuće boje.

Budući da vezanje mupirocina na wt-HVGH-*PmIleRS2* koincidira s rearanžmanom aktivnog mjesta, analizirana je primjenjivost mehanizama induciranog pristajanja i konformacijske selekcije u cilju objašnjenja manjeg afiniteta ovog enzima prema mupirocinu. Inducirano pristajanje podrazumijeva početno vezanje liganda s niskim afinitetom, nakon čega se kroz niz konformacijskih promjena receptora i liganda afinitet povećava. S druge strane, konformacijska selekcija pretpostavlja dinamičku ravnotežu različitih oblika receptora u otopini, koji mogu vezati ligand s različitim afinitetom. Ligand se u tom slučaju dominantno veže na najzastupljeniji oblik receptora, koji omogućava vezanje s visokim afinitetom. Sličnost dva mehanizma leži u tome što oba pretpostavljaju konformacijsku promjenu kao preduvjet vezanja liganda. Razlika je u tome pretpostavlja li se da konformacijska promjena prethodi vezanju (konformacijska selekcija) ili se događa nakon vezanja ili kao posljedica vezanja (inducirano pristajanje)²³⁷⁻²³⁹.

U kontekstu vezanja mupirocina na wt-HVGH-*PmIleRS2*, mehanizam inducirano pristajanja pretpostavlja uzročno-posljedičnu vezu između vezanja mupirocina i narušavanja sekundarne strukture α_2 zavojnice, što je opaženo u kristalnoj strukturi s mupirocinom. Posljedica navedenog bio bi usmjereni prijenos sile sa sučelja KMSKS omče i α_1 zavojnice na sučelje zavojnica α_1 i α_2 tijekom vezanja mupirocina (Slika 46).



Slika 46. Hipotetski mehanizam vezanja mupirocina u aktivno mjesto wt-HVGH-*PmIleRS2* induciranim pristajanjem: (1) KMSKS omča sterički je zaključena i djeluje kao uporište. Bez vezanog mupirocina, α_1 zavojnica sa strukturnim motivom HXGH nalazi se u relaksiranoj konformaciji, a hidrofobni kanal između vrha α_1 zavojnice i KMSKS omče je uzak. (2) Vezanje nonanoične kiseline mupirocina u kanal između α_1 zavojnice i KMSKS omče izaziva steričke smetnje koje uzrokuju proširenje kanala. (3) Događa se usmjereni prijenos sile koji pomiče vrh α_1 zavojnice sa strukturnim motivom HXGH. (4) Zbog steričke sprege četvrte pozicije HXGH motiva i aminokiseline Trp130 dolazi do deformacije α_2 zavojnice. Deformacija uređene sekundarne strukture energetski je zahtjevan proces koji se odvija nauštrb nižeg afiniteta wt-HVGH-*PmIleRS2* prema mupirocinu.

Energetski zahtjevan proces, poput deformacije uređene sekundarne strukture unutar veznog mjesta, može biti razlog niskog afiniteta receptora prema ligandu. Ipak, ovakav mehanizam čini se malo vjerojatnim iz dva razloga. Prvi razlog je manjak specifičnih i jakih interakcija nonanoične kiseline mupirocina, čiji bi nastanak trebao biti pokretačka sila konformacijskog rearanžmana aktivnog mjesta. Inducirano pristajanje često je prisutno u biološkim sustavima u kojima se vezanje ostvaruje specifičnim, energetski povoljnim interakcijama. Tako je, primjerice, kod vezanja aminoacilirane tRNA u A-mjesto ribosoma pokazano da inducirano pristajanje sprječava preuranjenu hidrolizu vezane aminoacilirane tRNA²⁴⁰. Na primjeru DNA-polimeraze β , inducirano pristajanje doprinosi diskriminaciji neprikladnih nukleotida jer je prijelaz iz neaktivne otvorene forme enzima u kinetički

produktivnu zatvorenu formu moguć samo ako je vezan pripadni nukleotid. U slučaju vezanja neprikladnog nukleotida, izostaje inducirano pristajanje, te kompleks ostaje u nestabilnoj otvorenoj konformaciji koja potiče disocijaciju²⁴¹. U oba slučaja enzima kod kojih je inducirano pristajanje relevantno za vezanje liganda, inicijalno vezanje ostvareno je jakim, specifičnim interakcijama, što nije slučaj u kompleksu wt-HVGH-*PmIleRS2* s mupirocinom, gdje je vezanje nonanoične kiseline ostvareno slabim hidrofobnim interakcijama. Drugi razlog protiv mehanizma inducirano pristajanja mupirocina jest odsustvo steričke rigidnosti KMSKS omče. Naime, da bi postojao usmjeren prijenos sile od KMSKS omče do α_2 zavojnice prilikom vezanja mupirocina, KMSKS omča morala bi biti rigidan element sekundarne strukture kako bi djelovala kao uporište. Uzimajući u obzir da se radi o nestrukturiranom elementu sekundarne strukture, to se čini izuzetno malo vjerojatnim. Dapače, na primjeru tirozil-tRNA-sintetaze (TyrRS), koja, kao i IleRS, pripada razredu I. sintetaza, pokazano je da je KMSKS omča izuzetno fleksibilna tijekom katalitičkog ciklusa enzima, pri čemu njezina konformacija ovisi o vezanom ligandu²²⁷. U tom smislu, analogna konformacija KMSKS omče opažena u kristalnim strukturama wt-HVGH-*PmIleRS2* s 5'-O-Ile-AMS i mupirocinom vjerojatno je posljedica kristalnog pakiranja, a ne relevantan dokaz da je ta omča rigidna.

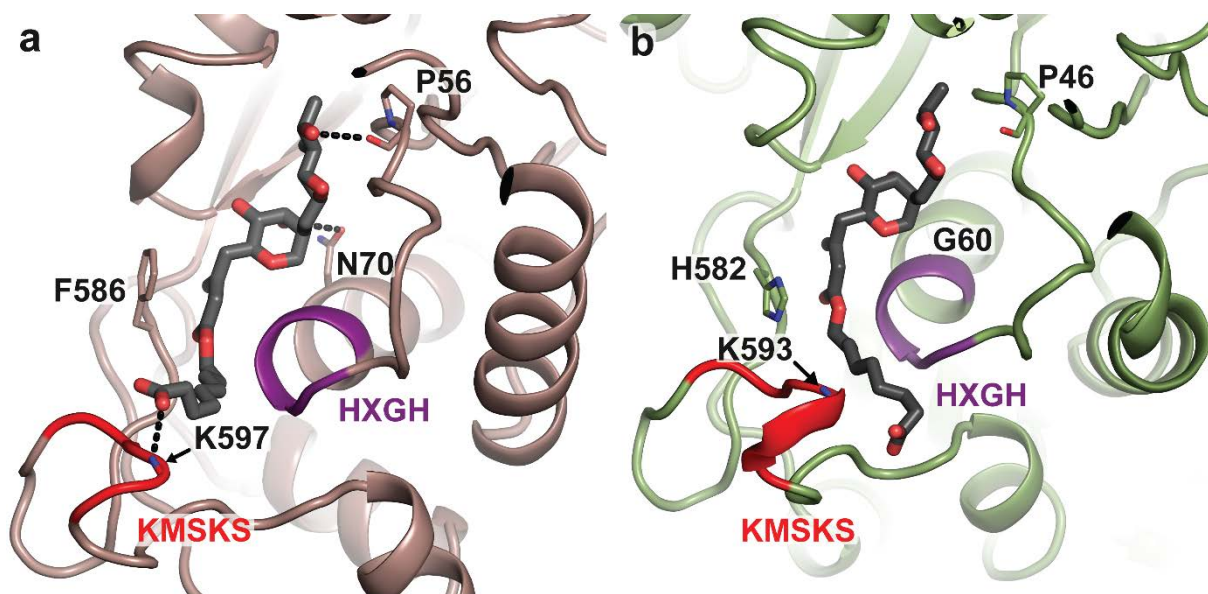
Osim mehanizma inducirano pristajanja, vezanje mupirocina evaluirano je i kroz prizmu mehanizma konformacijske selekcije. Ukoliko konformacijska selekcija postoji, u otopini bi morala postojati dinamička ravnoteža barem dva ansambla wt-HVGH-*PmIleRS2* struktura sa značajnom razlikom u afinitetu prema mupirocinu. Također, specifične konformacijske promjene vrha α_1 i α_2 zavojnice, opažene u strukturi s mupirocinom (u odnosu na strukturu s molekulom 5'-O-Ile-AMS), morale bi biti fiziološki relevantne, a ne posljedica kristalnog pakiranja. Da bi afinitet enzima prema ligandu bio nizak, ansambl struktura receptora s niskim afinitetom morao bi biti glavna frakcija u otopini, odnosno svi ansamblu sposobni vezati ligand visokim afinitetom morali bi biti slabije zastupljeni. To znači da mora postojati energetska barijera za konformacijsku promjenu receptora iz forme niskog afiniteta u formu visokog afiniteta ili da ta promjena mora biti spora.

U cilju razumijevanja jesu li konformacijske promjene opažene u strukturi wt-HVGH-*PmIleRS2* s mupirocinom indikacija konformacijske selekcije ili posljedica kristalnog

pakiranja, provedena je simulacija molekulske dinamike u trajanju od 360 ns^V. Molekulskom dinamikom analizirane su kristalne strukture wt-HVGH-*PmIleRS2* u kompleksu s mupirocinom i 5'-O-Ile-AMS, kao i dvije *apo* strukture nastale uklanjanjem ovih liganda *in silico*. Rezultati istraživanja ukazali su na inherentnu dinamičnost aktivnog mjesta wt-HVGH-*PmIleRS2*, koja vjerojatno nije povezana s konformacijskom selekcijom za mupirocin. Naime, simulacija svih struktura pokazala je da lom α_2 zavojnice nastaje izuzetno brzo, neovisno o tipu i prisutnosti liganda, te se zadržava tijekom cijelog trajanja simulacije. Jedini izuzetak bila je struktura wt-HVGH-*PmIleRS2* u kompleksu s 5'-O-Ile-AMS, gdje je lom α_2 zavojnice nastao tek nakon 180 ns simulacije. Rezultati upućuju na to da je lom α_2 zavojnice dio inherentne fleksibilnosti aktivnog mjesta wt-HVGH-*PmIleRS2* te da nije posljedica kristalnog pakiranja. Ipak, budući da konformacijska promjena nije specifična za kompleks s mupirocinom, ona ne može biti preduvjet za njegovu konformacijsku selekciju. Rezultati ipak ne isključuju mogućnost da se mupirocin i 5'-O-Ile-AMS preferencijalno vežu na različite konformacije enzima u otopini¹³⁶.

Uzimajući u obzir rezultate istraživanja, nije moguće sa sigurnošću tvrditi da inducirano pristajanje ili konformacijska selekcija za mupirocin igraju značajnu ulogu u smanjenju afiniteta wt-HVGH-*PmIleRS2* prema ovom antibiotiku u odnosu na wt-HMGH-*PmIleRS1*. Iako dva enzima pokazuju različitu dinamičnost aktivnog mjesta, trenutačni eksperimentalni podaci upućuju na to da je uzrok razlike u afinitetu prema mupirocinu jednostavniji nego što se isprva pretpostavljalo. Stabilizacija monične kiseline mupirocina u wt-HMGH-*PmIleRS1* putem dviju dodatnih interakcija u odnosu na wt-HVGH-*PmIleRS2*, zajedno s dodatnom stabilizacijom nonanoične kiseline, najvjerojatnije predstavlja temelj većeg afiniteta wt-HMGH-*PmIleRS1* prema mupirocinu u usporedbi s njegovim IleRS2 homologom (Slika 47). Ipak, tek je publiciranjem kristalnih struktura *PmIleRS1* i *HpIleRS1* u kompleksu s mupirocinom nedvojbeno pokazano da karboksilna skupina 9-hidroksinonanoične kiseline sudjeluje u stabilizaciji liganda u aktivnom mjestu IleRS1 enzima, putem interakcije s KMSKS omčom. Naime, prije određivanja ovih kristalnih struktura, ta interakcija nije bila nedvosmisleno vizualizirana u tada jedino dostupnim modelima IleRS1 enzima u kompleksu s mupirocinom – modelima *SaIleRS1* (1QU2²⁶, 1QU3²⁷, 1FFY²⁸).

^V Simulacije molekulske dinamike provela je dr. sc. Aleksandra Maršavelski i publicirane su u ¹³⁶.



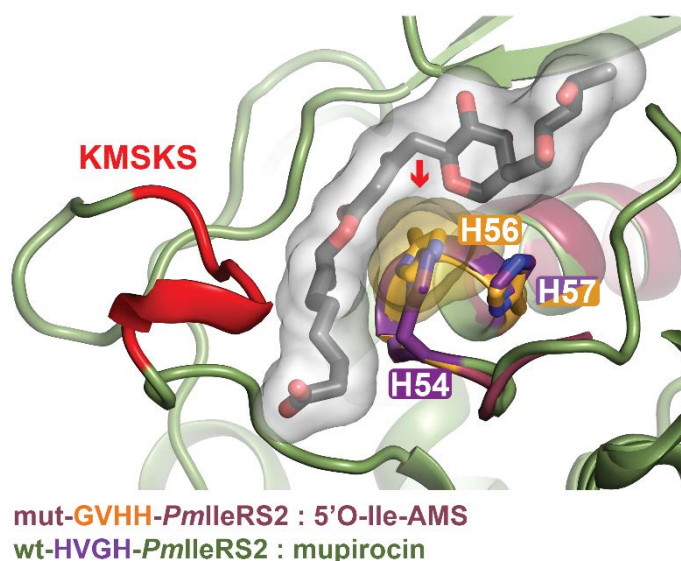
Slika 47. Razlike u interakcijama mupirocina u aktivnim mjestima dvaju tipova IleRS enzima prikazane na primjerima: (a) wt-HMGH-*PmIleRS1* i (b) wt-HVGH-*PmIleRS2*. Mupirocin u aktivnom mjestu wt-HMGH-*PmIleRS1* ostvaruje dodatne interakcije (označene crnom bojom), koje su odsutne u kompleksu s wt-HVGH-*PmIleRS2*. To su: interakcija atoma O7 s Asn70, O1P s amidnom skupinom Lys597 te O13 s karbonylnom skupinom Pro56. Slaganje π -sustava između atoma C1 i C3 mupirocina izraženije je u wt-HMGH-*PmIleRS1* zahvaljujući prisutnosti aromatskog bočnog lanca Phe586. U oba je primjera molekula mupirocina prikazana crnom bojom, dok su HXGH motiv i KMSKS omča prikazani ljubičasto, odnosno crveno.

4.4.6. Predloženi mehanizam mupirocinske hiper-rezistencije IleRS2 enzima

Kinetički eksperimenti pokazali su da uvođenje nekanonskog slijeda strukturnog motiva (GXHH) u IleRS2 enzime povećava njihovu rezistenciju prema mupirocinu za tri reda veličine, sve do milimolarnog raspona (Poglavlje 4.2.2). Zbog izrazito niskog afiniteta tih enzima prema mupirocinu, mehanizam rezistencije nije bilo moguće razjasniti kristalizacijom mutiranih varijanti u kompleksu s mupirocinom. Stoga je mehanizam hiper-rezistencije uvjetovan nekanonskim motivom predložen na temelju molekulskog modeliranja. U kristalnoj strukturi wt-HVGH-*PmIleRS2* s mupirocinom, α_1 zavojnica s kanonskim slijedom strukturnog motiva zamijenjena je *in silico* α_1 zavojnicom iz strukture mut-GVHH-*PmIleRS2* s 5'-O-Ile-AMS-om, koja sadrži nekanonski slijed. U hibridnom molekulskom modelu uočeni su izraženi sterički konflikti između histidina na trećoj poziciji nekanonskog slijeda (GXHHH) i monične kiseline mupirocina (Slika 48). Takav sterički konflikt otežava vezanje molekule mupirocina, značajno smanjujući afinitet mut-GVHH-*PmIleRS2* prema ovom antibiotiku.

Budući da se o mehanizmu hiper-rezistencije zaključuje neizravno, primjenom molekulskog modeliranja, važno je razmotriti uvjete koji moraju biti ispunjeni da bi model bio fiziološki relevantan. Ključni preduvjet pritom je da uvođenje nekanonskog slijeda strukturnog

motiva ne mijenja konformacijsku dinamiku aktivnog mjesta opaženu pri vezanju mupirocina na divlji tip enzima. Naime, vezanje mupirocina na wt-HVGH-*PmIleRS2* popraćeno je deformacijom α_2 zavojnice te pomakom vrha α_1 zavojnice za 2,9 Å (His54) odnosno 3,3 Å (His57) u odnosu na strukturu s analogom reakcijskog međuprodukta (5'-O-Ile-AMS) (Slika 45). Važnost ovih konformacijskih promjena ogleda se u tome što vrh α_1 zavojnice dovode u prostornu blizinu monične kiseline mupirocina. Samo u toj konformaciji, treća pozicija strukturnog motiva orijentirana je tako da njezina zamjena glicina u kanonskom slijedu histidinom u nekanonskom slijedu rezultira steričkim konfliktom s molekulom mupirocina.



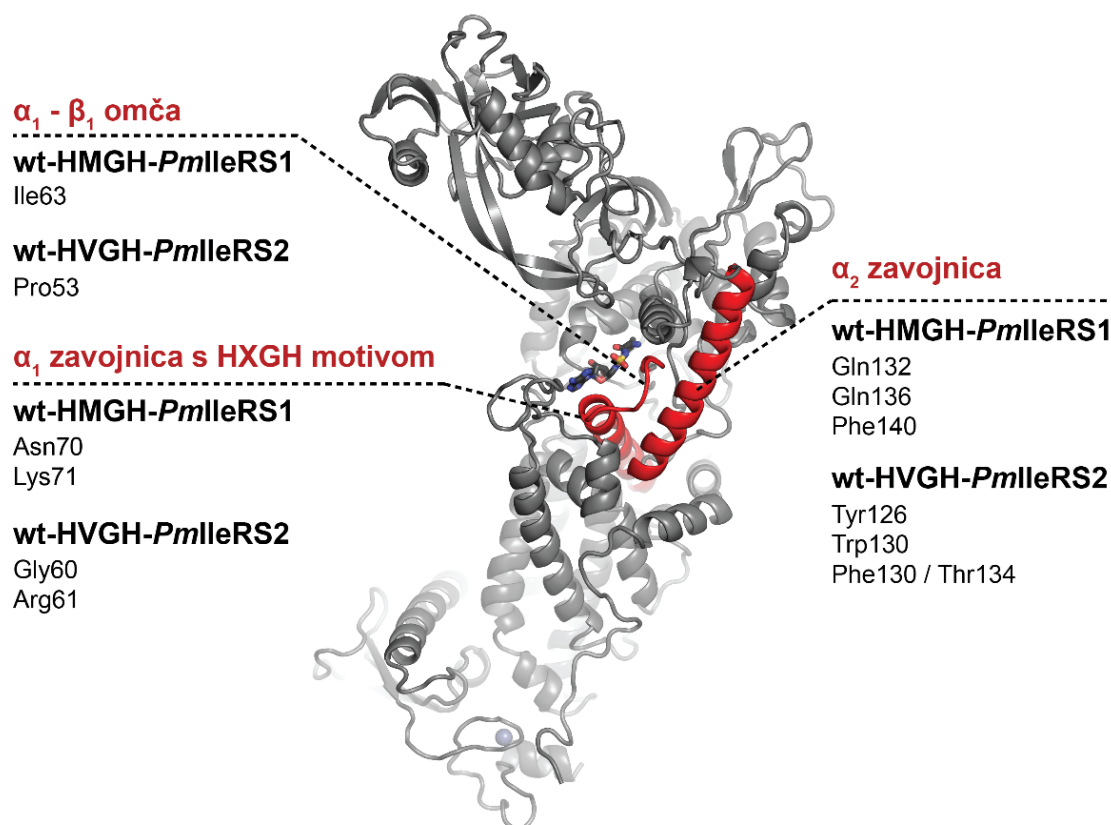
Slika 48. Molekulski model koji ilustrira mehanizam hiper-rezistencije mut-GVHH-*PmIleRS2* prema mupirocinu. α_1 zavojnica s nekanonskim strukturnim motivom (GXHH) iz strukture mut-GVHH-*PmIleRS2* s 5'-O-Ile-AMS-om (prikazana bordo bojom) superponirana je na strukturu wt-HVGH-*PmIleRS2* s mupirocinom (prikazana zelenom bojom). Dobiveni kimerni molekulski model prikazuje steričke smetnje treće pozicije nekanonskog slijeda strukturnog motiva (GXHH) na molekulu mupirocina. Dijelovi molekule mupirocina koji se nalaze pod utjecajem steričkih smetnji nekanonskog strukturnog motiva označeni su crvenom strelicom i preklapajućim konturama molekule. Takve steričke smetnje smanjuju vjerojatnost vezanja mupirocina u produktivnoj konformaciji, čime se povećava rezistencija enzima na ovaj antibiotik. U prikazu, molekula mupirocina označena je crnom bojom, dok je KMSKS omča prikazana crvenom bojom. Kanonski HXGH motiv označen je ljubičastom, a nekanonski GXHH motiv narančastom bojom.

4.5. Redizajn *PmIleRS* enzima metodom racionalne mutageneze

4.5.1. Racional dizajna mutanata

Prethodna kinetička istraživanja pokazala su da IleRS2 enzimi mogu funkcionalno akomodirati nekanonski slijed strukturnog motiva (GXHH), uz znatno povećanje rezistencije prema mupirocinu (Poglavlje 4.2.2). Strukturna analiza *PmIleRS* enzima i njihovih mutanata s nekanonskim slijedom u kompleksu s 5'-O-Ile-AMS-om pokazala je da funkcionalna akomodacija nekanonskog slijeda ovisi o specifičnoj konformaciji vrha α_1 zavojnice wt-HVGH-*PmIleRS2* (Poglavlja 4.3.3 i 4.3.5). Mjereno prema N_ε atomima prvog i trećeg histidina HXGH motiva, vrh α_1 zavojnice wt-HVGH-*PmIleRS2* pomaknut je za 2,3 Å, odnosno 2,4 Å u odnosu na wt-HMGH-*PmIleRS1*, što omogućuje funkcionalnu akomodaciju nekanonskog slijeda. Kod wt-HMGH-*PmIleRS1*, zakočenost vrha α_1 zavojnice ne dopušta akomodaciju nekanonskog slijeda, što rezultira kinetičkom neaktivnošću takvih mutanata.

Razumijevanje dinamike vrha α_1 zavojnice kod IleRS enzima stoga bi omogućilo: (1) dizajn funkcionalnih varijanti IleRS1 enzima s nekanonskim GXHH slijedom, potencijalno visoko rezistentnih prema mupirocinu, te (2) dizajn IleRS2 enzima bez mogućnosti akomodacije nekanonskog GXHH slijeda, koji bi bili znatno osjetljiviji na inhibiciju mupirocinom. Iako je prethodnim eksperimentima potvrđen biološki učinak, temeljni mehanizam koji određuje fleksibilnost vrha α_1 zavojnice kod wt-HVGH-*PmIleRS2* ostao je nerazjašnjen. Kako bi se razjasnio ovaj mehanizam, u višestrukom poravnanju PFAM domena IleRS1 i IleRS2 enzima (Poglavlje 4.2.1) analizirane su diferencijalno očuvane pozicije koje bi mogle sudjelovati u modulaciji konformacije α_1 zavojnice. Potencijalno značajne pozicije identificirane su unutar α_1 i α_2 zavojnica te α_1 - β_1 omče (Slika 49).

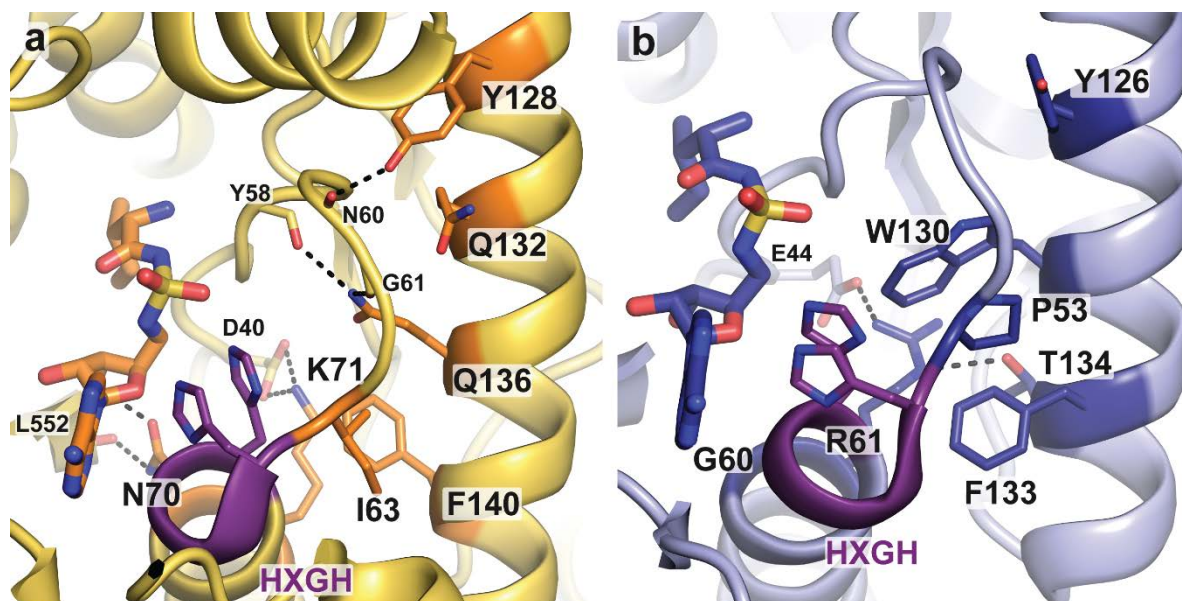


Slika 49. Diferencijalno očuvane pozicije u wt-HMGH-*PmIleRS1* i wt-HVGH-*PmIleRS2*. Navedene pozicije potencijalno moduliraju dinamiku vrha α_1 zavojnice sa slijedom strukturnog motiva HXGH. Nakon izmjene navedenih pozicija u *PmIleRS* enzimima, dobivene mutirane varijante podvrgnute su kinetičkoj i/ili strukturnoj karakterizaciji.

Polazeći od pozicija u samoj α_1 zavojnici i α_1 - β_1 omči, kao najzanimljivije diferencijalno očuvane pozicije istaknute su Pro53, Gly60 te Arg61 kod wt-HVGH-*PmIleRS2* te odgovarajuće Ile63, Asn70 i Lys71 kod wt-HMGH-*PmIleRS1*. Pro53 potpuno je očuvana pozicija smještena neposredno ispred HXGH slijeda na α_1 - β_1 omči IleRS2 enzima. Prisustvo sterički zakočenog prolina ispred α_1 zavojnice, u kombinaciji s konformacijski slobodnim Gly60 nizvodno od strukturnog motiva, može doprinijeti specifičnoj konformaciji vrha α_1 zavojnice opaženoj kod wt-HVGH-*PmIleRS2* (Slika 45, Poglavlje 4.4.5). Poznato je da glicin i prolin značajno utječu na stabilnost i konformacijsku dinamiku elemenata sekundarne strukture u proteinima²⁴². Za razliku od wt-HVGH-*PmIleRS2*, kod wt-HMGH-*PmIleRS1* vrh α_1 zavojnice nije sterički napet jer nedostaje prolin, budući da se odgovarajućoj poziciji nalazi očuvani Ile63. Dodatno, α_1 zavojnica wt-HMGH-*PmIleRS1* stabilizirana je interakcijama bočnih skupina Asn70 i Lys71, koje se nalaze nizvodno od strukturnog slijeda (Slika 50 a). Ove su dvije aminokiseline univerzalno očuvane među IleRS1 enzimima te formiraju specifičan „NK“-motiv¹². Asn70 kod

wt-HMGGH-*PmIleRS1* dodatno ostvaruje vodikovu vezu s 3'-hidroksilnom skupinom riboze nehidrolizabilnog analoga reakcijskog međuprodukta (Slika 31, Poglavlje 4.3.3). Ta je interakcija vjerojatno prisutna i s analognom skupinom ATP-a tijekom vezanja supstrata te bi mogla objasniti niže vrijednosti Michaelisove konstante za ATP kod *IleRS1* enzima¹⁵² (Poglavlje 4.2.2). Tijekom vezanja mupirocina, hidroksilna skupina na C6 atomu molekule ostvaruje vodikovu vezu s Asn60, čime se povećava specifičnost aktivnog mjesta wt-HMGGH-*PmIleRS1* za mupirocin (Slike 42 i 48, Poglavlje 4.4.5).

Osim pozicija unutar α_1 zavojnice, analizirane su i različito očuvane pozicije na sučeljima između α_1 i α_2 zavojnica te između α_2 zavojnice i α_1 - β_1 omče. Sterički učinak aminokiselina na tim pozicijama mogao bi utjecati na konformaciju vrha α_1 zavojnice, izravno ili posredstvom α_1 - β_1 omče. Kod wt-HVGGH-*PmIleRS2*, najistaknutije različito očuvane pozicije se nalaze unutar α_2 zavojnice i uključuju Trp130 te Tyr126. Na analognim pozicijama kod wt-HMGGH-*PmIleRS1* nalaze se Gln136 i Gln132. Indolni prsten Trp130 usmjeren je okomito na ravninu imidazolnog prstena His56 u wt-HVGGH-*PmIleRS2* te je koplanaran s prstenom Pro53 (Slika 50 b). Na taj je način stvoren put prijenosa sile koji povezuje pomak vrha α_1 zavojnice s deformacijom α_2 zavojnice, opaženom u kristalnoj strukturi wt-HVGGH-*PmIleRS2* s mupirocinom. Tyr126 kod wt-HVGGH-*PmIleRS2* lokalno deformira konformaciju α_1 - β_1 omče, što može također pridonijeti pomaku vrha α_1 zavojnice opaženom u ovom enzimu. Iako nije bilo moguće jednoznačno dokazati da je deformacija α_2 zavojnice povezana s nižim afinitetom wt-HVGGH-*PmIleRS2* prema mupirocinu ili da je uzrokovana njegovim vezanjem (Poglavlje 4.4.5), jasno je da sprema pomaka vrha α_1 zavojnice i deformacije α_2 zavojnice čini sastavni dio konformacijske dinamike aktivnog mjesta wt-HVGGH-*PmIleRS2*. Takva dinamika izostaje kod wt-HMGGH-*PmIleRS1*, gdje su analogne pozicije zauzete sterički nezahtjevnim i konformacijski fleksibilnim glutaminima. Konačno, Phe140 kod wt-HMGGH-*PmIleRS1* te Phe133 i Thr134 kod wt-HVGGH-*PmIleRS2* potencijalno određuju međuosnu udaljenost zavojnica α_1 i α_2 , pridonoseći stabilizaciji konformacije α_1 zavojnice.



Slika 50. Različito očuvane pozicije u aktivnim mjestima: (a) wt-HMGH-*PmIleRS1* i (b) wt-HVGH-*PmIleRS2* koje potencijalno određuju stupanj konformacijske slobode vrha α_1 zavojnice. Kod wt-HMGH-*PmIleRS1*, α_1 zavojnica stabilizirana je vodikovom vezom između Asn70 i karbonilne skupine Leu552 te ionskim mostom između Lys71 i Asp40. U aktivnom mjestu wt-HVGH-*PmIleRS2*, analogna stabilizacija ostvarena je interakcijama Arg61 s Thr134 i Glu44. Međuosnu udaljenost između α_1 i α_2 zavojnice kod wt-HMGH-*PmIleRS1* potencijalno određuju Phe140 te interakcije Gln136 s Gly41 i Tyr58 iz α_1 - β_1 omče. Neposredno ispred HXGH motiva wt-HMGH-*PmIleRS1* nalazi se Ile63 – aminokiselina koja nije sterički zakočena. U aktivnom mjestu wt-HVGH-*PmIleRS2*, međuosnu udaljenost α_1 i α_2 zavojnica određuje sterički zahtjevno sučelje koje tvore His54 (četvrta pozicija HXGH motiva), Trp130 i Phe133. U suprotnosti s wt-HMGH-*PmIleRS1*, neposredno ispred HXGH motiva u wt-HVGH-*PmIleRS2* nalazi se sterički zakočeni Pro53 koji stabilizira konformaciju Trp130. Tyr126 iz α_2 zavojnice lokalno narušava konformaciju α_1 - β_1 omče, pri čemu se ta deformacija potencijalno spreže s pomakom strukturnog motiva preko Pro53.

4.5.2. Kinetička karakterizacija odabranih mutanata *PmIleRS1* i *PmIleRS2*

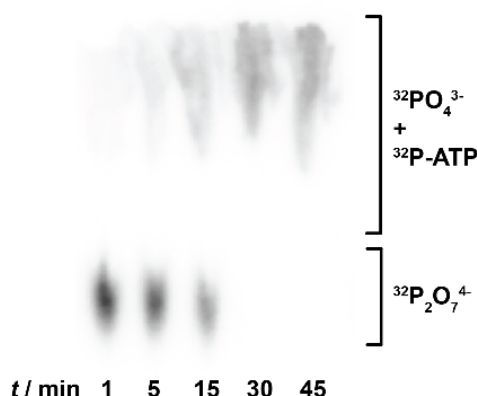
U skladu s prethodnom analizom aktivnog mjesta, pripremljen je niz jednostrukih i višestrukih mutanata wt-HMGH-*PmIleRS1* i wt-HVGH-*PmIleRS2* enzima (Poglavlje 3.2.3.8). Mutirane varijante enzima bile su pojačano eksprimirane, pročišćene do visokog stupnja čistoće i homogenosti, te su zatim podvrgnute kinetičkoj karakterizaciji. Kinetička karakterizacija obuhvaćala je mjerenje parametara aktivacije te određivanje konstante inhibicije za mupirocin, ako je enzim bio kinetički aktivan. Rezultati kinetičke analize prikazani su u tablici 26 i pokazuju niz zanimljivih zapažanja.

Tablica 26. Eksperimentalno određeni kinetički parametri u reakciji aktivacije za odabrane mutante *PmIleRS1* i *PmIleRS2*^a

	Varijanta enzima	k_{cat} / s^{-1} (b)	$K_M, Ile / \mu mol\ dm^{-3}$	$K_M, ATP / mmol\ dm^{-3}$	$K_I (MUP)_{Ile} / \mu mol\ dm^{-3}$	$K_I (MUP)_{ATP} / \mu mol\ dm^{-3}$
<i>PmIleRS2</i>	mut-P53A-G60N-R61K- <i>PmIleRS2</i>	$6,1 \pm 0,1$	191 ± 10	$2,6 \pm 0,1$	$3,1 \pm 0,2$	$3,2 \pm 0,2$
	mut-W130Q- <i>PmIleRS2</i>	$3,86 \pm 0,06$	$11,6 \pm 0,8$	$2,4 \pm 0,2$	$1,04 \pm 0,05$	$1,18 \pm 0,07$
	mut-Y126S-W130Q- <i>PmIleRS2</i>	$5,2 \pm 0,1$	$18,7 \pm 1,3$	$2,8 \pm 0,2$	$3,2 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,1$
	mut-P53A-G60N-R61K-Y126S-W130Q- <i>PmIleRS2</i>	$17,0 \pm 0,2$	68 ± 2	$7,5 \pm 0,2$	$21,1 \pm 0,7$	$22,7 \pm 0,6$
<i>PmIleRS1</i>	mut-I63P- <i>PmIleRS1</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	mut-I63P-N70G- <i>PmIleRS1</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	mut-I63P-N70G-Q136W- <i>PmIleRS1</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	mut-I63P-N70G-Q136W-F140T- <i>PmIleRS1</i>	0,0077	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	mut-I63P-H64G-G66H-N70G- <i>PmIleRS1</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	mut-I63P-H64G-G66H-N70G-Q136W- <i>PmIleRS1</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	mut-I63P-H64G-G66H-N70G-Y128S-Q132Y-Q136W-F140T- <i>PmIleRS1</i>	0,0036	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
^a Mjereno metodom izmjene pirofosfata ^b Prikazana je vrijednost iz eksperimenta s aminokiselinom (Ile) kao varijabilnim supstratom n.d. - Vrijednost nije određena zbog neaktivnosti enzima Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost $\pm$ SD za dva neovisna mjerenja.						

Većina *PmIleRS1* mutanata bila je potpuno kinetički neaktivna, zbog čega nije bilo moguće odrediti njihove kinetičke parametre za supstrate i mupirocin u reakciji aktivacije. Izuzetak je bio višestruki mutant mut-I63P-N70G-Q136W-F140T-*PmIleRS1*, kojem je izmjeren obrtni broj $0,0077\ s^{-1}$, što je ~ 3900 puta niže od kinetičke aktivnosti divljeg tipa enzima. Važno je istaknuti da je, zbog vrlo niske enzimske aktivnosti, kinetičko mjerenje provedeno pri suvišku supstrata i uz koncentraciju od $15\ \mu mol\ dm^{-3}$ pročišćenog enzima u reakcijskoj smjesi. U takvim reakcijskim uvjetima, i najmanja kopurifikacija kinetički aktivne IleRS iz ekspresijskog soja mogla bi rezultirati lažno pozitivnim rezultatom. Ipak, budući da je enzim bio dvostruko pročišćen ortogonalnim metodama (Poglavlja 3.2.4.4 i 3.2.4.5) te da su istim postupkom pročišćeni i drugi mutanti koji su pokazali potpunu neaktivnost, razumno je izmjerenu aktivnost pripisati mutantu, a ne tragovima kopurificirane IleRS iz ekspresijskog soja. Dodatno, opažena je i potencijalna pirofosfatazna aktivnost ovog mutanta, jer je tijekom

kinetičke karakterizacije uočen vremenski ovisan pad signala pirofosfata (Slika 51). Takva pirofosfatazna aktivnost zabilježena je isključivo kod ovog mutanta.



Slika 51. TLC kromatogram reakcijske smjese za aktivaciju aminokiseline pomoću mut-I63P-N70G-Q136W-F140T-*PmIleRS1*. Uočen je spor nastanak produkta te vremenski ovisna pirofosfatazna aktivnost.

Za razliku od *PmIleRS1* mutanata, svi mutanti *PmIleRS2* bili su kinetički aktivni, pri čemu su njihove aktivnosti bile usporedive s onima divljeg tipa enzima. Glavni učinak mutacija očitovao se na Michaelisovoj konstanti za supstrate, dok je obrtni broj enzima u većini slučajeva ostao nepromijenjen. Osjetljivost na mupirocin kod većine mutanata bila je vrlo slična onoj divljeg tipa, unutar granica eksperimentalne pogreške, uključujući i mut-W130Q-*PmIleRS2*, za koji se očekivalo povećanje osjetljivosti. Jedini izuzetak bio je mut-P53A-G60N-R61K-Y126S-W130Q-*PmIleRS2*, koji je pokazao približno 20 puta veću rezistenciju na mupirocin u odnosu na wt-HVGH-*PmIleRS2*. Taj je mutant, zajedno s mut-W130Q-*PmIleRS2*, bio podvrgnut strukturnoj analizi.

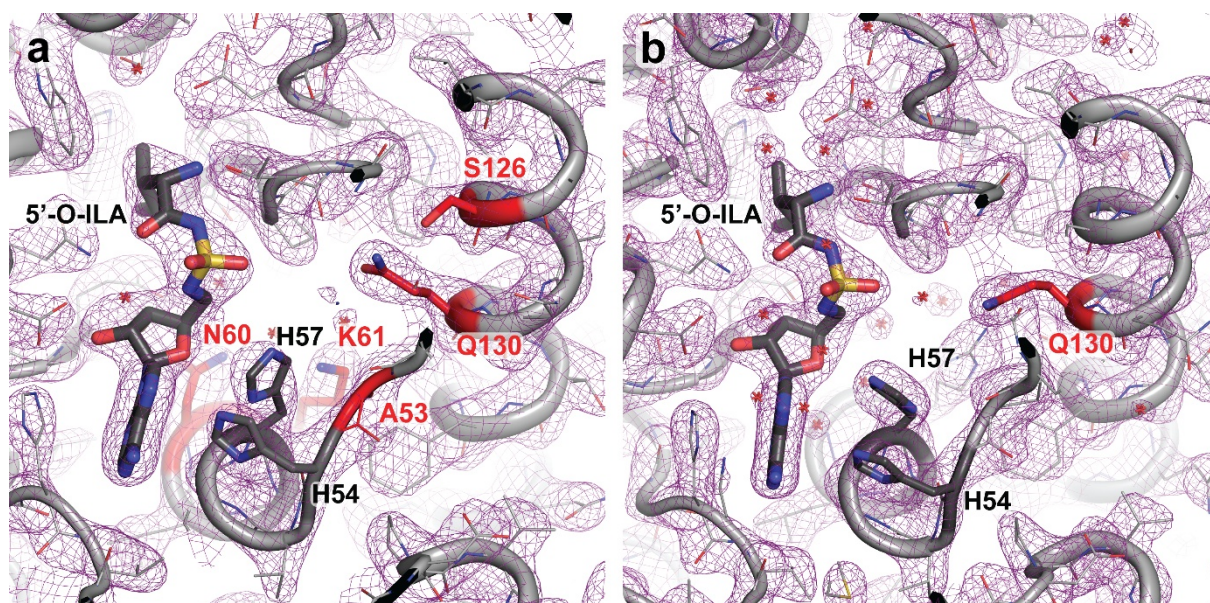
4.5.3. Strukturna karakterizacija odabranih mutanata *PmIleRS2*

Dva mutanta, mut-W130Q-*PmIleRS2* i mut-P53A-G60N-R61K-Y126S-W130Q-*PmIleRS2*, nakon kinetičke karakterizacije identificirana su kao zanimljivi kandidati za strukturnu analizu. Očekivalo se da će mutacija očuvanog Trp130 u Gln130 u aktivnom mjestu *PmIleRS2* utjecati na pomak vrha α_1 zavojnice, mijenjajući time osjetljivost enzima na mupirocin. Stoga je potpuna indiferentnost enzima prema mutaciji inače strogo očuvane pozicije bila izuzetno neočekivana. Nasuprot tome, mut-P53A-G60N-R61K-Y126S-W130Q-*PmIleRS2* bio je zanimljiv za strukturnu analizu zbog izraženije rezistencije prema mupirocinu u odnosu na divlji tip enzima. Kristali oba mutanta u kompleksu s 5'-O-Ile-AMS dobiveni su u istim uvjetima kao i kristali divljeg tipa enzima (Poglavlje 4.4.1). Iako je kristalna morfologija bila jednaka, kristali mutanata bili su osjetljiviji i skloniji pucanju tijekom krioprotekcije i

smrzavanja. Unatoč tome, uspješno su stabilizirani na isti način kao i kristali divljeg tipa enzima te podvrgnuti difrakciji na sinkrotronskom izvoru zračenja (Paul Scherrer Institut, Villigen, Švicarska). Prikupljanje i obrada difrakcijskih podataka provedeni su na jednak način kao i u slučaju kristala enzima u kompleksu s 5'-O-Ile-AMS (Poglavlje 3.2.6.6). Kristalografske faze određene su izravnim utočnjavanjem modela divljeg tipa enzima u eksperimentalnu elektronsku gustoću mutanta, uz ručnu izmjenu relevantnih aminokiselina u modelu. Kao i u prethodnim eksperimentima, inicijalni modeli su iterativno poboljšavani kroz višestruke cikluse ručne gradnje u programskom paketu Coot²¹⁵ te optimizacije koordinata i B-faktora u programskom paketu Phenix²¹⁶. Statistički pokazatelji konačnih molekulskih modela prikazani su u tablici 27. Na slici 52 prikazane su mape elektronske gustoće u području aktivnog mjesta enzima te uklapanje modeliranih molekula u eksperimentalnu gustoću.

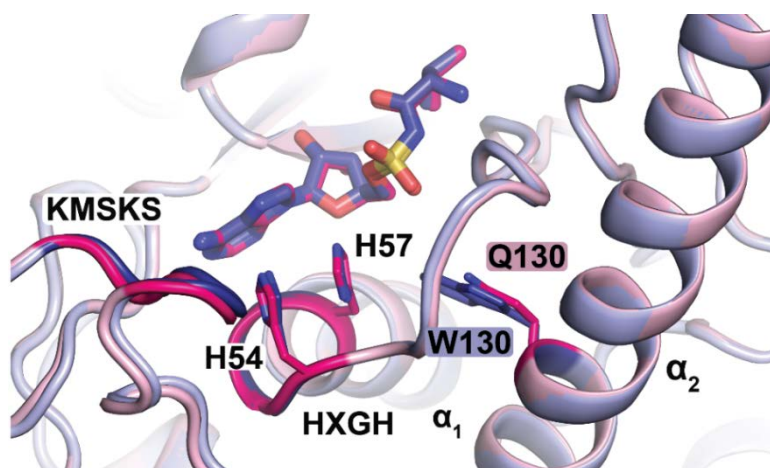
Tablica 27. Strukturna analiza mutanata mut-W130Q-*PmIleRS2* i mut-P53A-G60N-R61K-Y126S-W130Q-*PmIleRS2* u kompleksu s 5'-O-Ile-AMS-om

	mut-W130Q- <i>PmIleRS2</i> : 5'-O-Ile-AMS (8C9D)	mut-P53A-G60N-R61K-Y126S-W130Q- <i>PmIleRS2</i> :5'-O-Ile-AMS (model nije deponiran u RCSB PDB)
Akvizicija		
Prostorna grupa	P4 ₃ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2
Dimenzije ćelije		
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	108,22; 108,22; 240,44	108,17; 108,17; 240,09
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90
Rezolucija (Å)	48,4–2,3 (2,382–2,300)	48,4–2,6 (2,693–2,600)
<i>R</i> _{sym} ili <i>R</i> _{merge}	0,1511 (2,303)	0,2027 (3,224)
<i>I</i> / σ <i>I</i>	22,62 (1,38)	20,88 (1,17)
Kompletnost (%)	93,27 (81,00)	92,16 (76,98)
Redundantnost	25,6 (21,0)	26,2 (26,0)
Utočnjavanje		
Rezolucija (Å)	48,4–2,3 (2,382–2,300)	48,38–2,6 (2,693–2,600)
Broj refleksa	1645223 (131464)	1170371 (113868)
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	0,2013 (0,2965) / 0,2398 (0,3922)	0,2159 (0,3779) / 0,2568 (0,4525)
Broj atoma		
Protein	8327	8391
Ligand/ion	83	73
Voda	295	77
B-faktori		
Protein	59,83	74,38
Ligand/ion	63,66	90,13
Voda	49,54	52,41
Devijacije		
Duljina veza (Å)	0,003	0,002
Vezni kutovi (°)	0,590	0,490
*Vrijednosti u zagradama se odnose za ljusku najveće rezolucije		



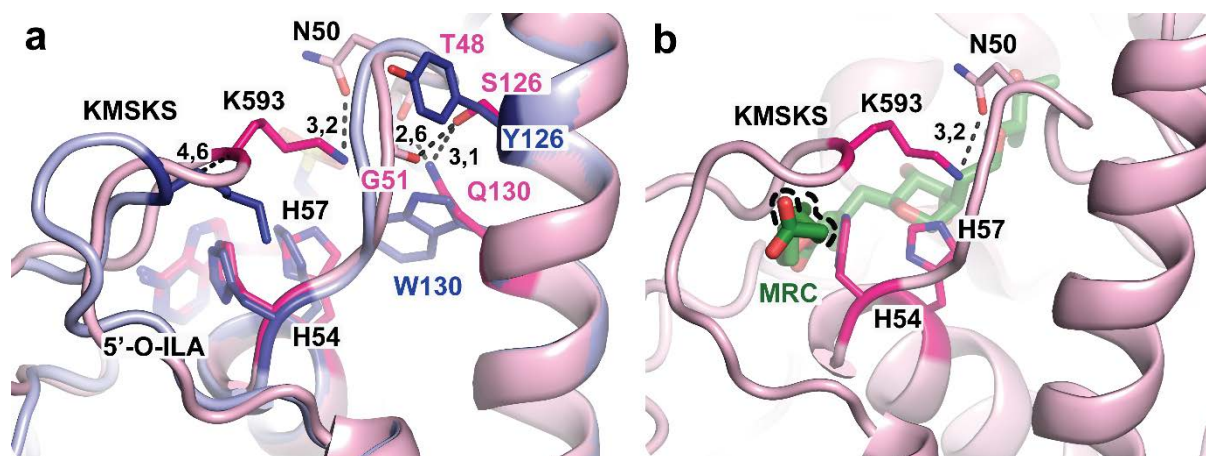
Slika 52. Nepristrane kompozitne OMIT mape aktivnih mjesta mutiranih varijanti enzima *PmIleRS2*. Mape su prikazane na konturiranoj razini od $+2\sigma$ i prikazuju prisutnost te konformaciju analoga reakcijskog međuprodukta, kao i mutirane pozicije u aktivnim mjestima: **(a)** mut-P53A-G60N-R61K-Y126S-W130Q-*PmIleRS2* u kompleksu s 5'-O-Ile-AMS-om, **(b)** mut-W130Q-*PmIleRS2* u kompleksu s 5'-O-Ile-AMS-om.

Usporedbom katalitičkih srži wt-HVGH-*PmIleRS2* i mutanta mut-W130Q-*PmIleRS2* ustanovljena je neočekivana invarijantnost aktivnog mjesta *PmIleRS2* prema mutaciji strogo očuvane pozicije Trp130. Naime, Gln130 u mutantu se jednostavno akomodirao u vezno mjesto predviđeno za veću aminokiselinu, bez očitih promjena konformacije α_1 zavojnice u odnosu na divlji tip enzima (Slika 53). Unatoč minimalnom rearanžmanu aktivnog mjesta, mutaciju Trp130Gln prati značajan gubitak enzimske aktivnosti — približno 20 puta u odnosu na divlji tip. Budući da su Michaelisove konstante za supstrate ostale tek neznatno izmijenjene (pri čemu je konstanta za izoleucin čak smanjena četiri puta), smanjena aktivnost enzima primarno proizlazi iz gubitka katalitičke efikasnosti, najvjerojatnije zbog promjene konformacije prijelaznog stanja. Trp130 u sinergiji s His57 i Pro53 stabilizira konformaciju α_1 - β_1 omče (aminokiseline 45–56), unutar koje se nalaze očuvani ostaci s poznatom ulogom u katalitičkom koraku aktivacije aminokiseline^{151,243}.



Slika 53. Mutant *mut-W130Q-PmIleRS2* ne pokazuje promijenjenu specifičnost prema mupirocinu. Prikazano je poravnanje katalitičke srži *wt-HVGH-PmIleRS2* (plavo) i *mut-W130Q-PmIleRS2* (rozo), oba u kompleksu s nehidrolizabilnim analogom reakcijskog međuprodukta, 5'-O-Ile-AMS-om. Poravnanje ukazuje na minimalan rearanžman aktivnog mjesta *PmIleRS2* unatoč zamjeni strogo očuvane pozicije Trp130 s Gln130.

Kristalna struktura mutanta *mut-P53A-G60N-R61K-Y126S-W130Q-PmIleRS2* u kompleksu s 5'-O-Ile-AMS-om pokazuje značajno zatvoreniju KMSKS omču u odnosu na divlji tip enzima. Mjerenjem pomaka C_{α} atoma Lys593 iz KMSKS slijeda utvrđeno je da se omča u mutantu zatvorila za 4,6 Å prema HXGH slijedu, u odnosu na aktivno mjesto divljeg tipa enzima. Iako pomak KMSKS omče nije bio praćen značajnijom promjenom konformacije α_1 zavojnice s HXGH slijedom, lokalne konformacijske promjene α_1 - β_1 omče i sučelja α_1 i α_2 zavojnica omogućile su nastanak jake vodikove veze između Lys593 iz **K**MSSKS omče i Asn50. Ta je interakcija stabilizirala zatvorenu konformaciju KMSKS omče opaženu u mutantu. Zatvaranje je suzilo hidrofobni kanal koji formiraju KMSKS omča i vrh α_1 zavojnice, a u koji se inače veže nonanoična kiselina mupirocina, što dovodi do opaženog smanjenja afiniteta mutanta prema mupirocinu (Slika 54 a). Modeliranje molekule mupirocina u aktivno mjesto *mut-P53A-G60N-R61K-Y126S-W130Q-PmIleRS2* ukazuje na značajne steričke smetnje koje pozicije iz KMSKS omče uzrokuju prilikom vezanja alifatskog lanca mupirocina (Slika 54 b). Zanimljiva je i konformacija His57 iz HXGH slijeda u ovom mutantu. Imidazolna skupina bočnog ogranka histidina rotirana je za $\sim 90^\circ$ u odnosu na divlji tip enzima (Slika 54 a). Gubitak konformacije ovog bočnog ogranka povezan je s nestankom steričkog utjecaja indolne skupine Trp130 uslijed mutacije Trp130Gln te s promjenom konformacije α_1 - β_1 omče izazvane mutacijom Tyr126Ser.



Slika 54. Mehanizam povećane rezistencije na mupirocin kod mutanta *mut-P53A-G60N-R61K-Y126S-W130Q-PmIleRS2*: (a) Strukturno poravnanje katalitičkih srži wt-HVGH-*PmIleRS2* (plavo) i *mut-P53A-G60N-R61K-Y126S-W130Q-PmIleRS2* (rozo) u kompleksu s 5'-O-Ile-AMS-om pokazuje zatvaranje KMSKS omče mutanta za 4,6 Å u odnosu na divlji tip enzima, mjereno prema pomaku Lys593 iz KMSSKS slijeda. Lys593 ostvaruje vodikovu vezu s Asn50 (3,2 Å), čime se stabilizira zatvorena konformacija KMSKS omče. U mutantu Gln130 i Ser126 stabiliziraju konformaciju α_1 - β_1 omče putem interakcija s Gly51 i Thr48. Međutim, Gln130, za razliku od Trp130 u divljem tipu enzima, ne može stabilizirati konformaciju imidazolnog prstena His57, što rezultira njegovom rotacijom. (b) Superpozicija koordinata mupirocina iz strukture wt-HVGH-*PmIleRS2*: mupirocin (zeleno) s aktivnim mjestom *mut-P53A-G60N-R61K-Y126S-W130Q-PmIleRS2* iz kojeg je uklonjen 5'-O-Ile-AMS (rozo) pokazuje steričke smetnje koje zatvorena KMSKS omča stvara pri vezanju nonanoične kiseline mupirocina. Prisustvo steričkih smetnji pri vezanju mupirocina objašnjava opaženo povećanje rezistencije mutanta *mut-P53A-G60N-R61K-Y126S-W130Q-PmIleRS2* na mupirocin.

4.5.4. Evolvabilnost *IleRS2* suprotstavljena rigidnosti *IleRS1*

Kinetičke analize mutanata *PmIleRS1* i *PmIleRS2* ukazuju na izraženu plastičnost i takozvanu „evolvabilnost“ aktivnog mjesta *PmIleRS2* u usporedbi s *PmIleRS1* — načelo koje je vjerojatno primjenjivo i na ostale *IleRS* enzime. U ovom kontekstu, evolvabilnost označava sposobnost aktivnog mjesta *IleRS2* da tolerira mutacije uz minimalan utjecaj na enzimsku aktivnost. *IleRS1* i *IleRS2* potječu iz različitih evolucijskih grana, pri čemu se smatra da su *IleRS1* evolucijski starije te da dijele zajedničkog pretka s arhejskim *IleRS* enzimima^{12,101}. Shodno tome, evolucijski pritisci kojima su ova dva tipa *IleRS* bili izloženi razlikovali su se, što je rezultiralo različitim oblikovanjem njihovih funkcionalnih svojstava. *IleRS1* enzimi pretežito djeluju kao glavni stanični izooblici brzo rastućih bakterija, kojima omogućuju prednost u kompetitivnom okolišu u kojem i najmanji kompromisi u brzini staničnih procesa mogu dovesti do smanjenja stanične prilagodljivosti^{40,41}. Tijekom dugotrajnog evolucijskog razvoja, *IleRS1* enzimi su stoga bili pod stalnim selekcijskim pritiskom da očuvaju visoku enzimsku aktivnost. Posljedično, njihova su aktivna mjesta evoluirala kao izrazito rigidna i netolerantna na mutacije. S druge strane, *IleRS2* koje su evolucijski mlađe, u nekim slučajevima

zastupljene u stanici zajedno s IleRS1 te dominantne u organizmima s sporijim tempom diobe, nisu iskusile evolucijski pritisak kao njihovi sestrinski IleRS1 enzimi. Posljedično, njihova su aktivna mjesta imala veću slobodu evolucijskog oblikovanja, razvijajući se u relaksiranije i tolerantnije strukture koje podnose mutacije, što je vjerojatno doprinijelo razvoju mupirocinske rezistencije kao korisnog fenotipskog obilježja.

Promjene očuvanih pozicija unutar aktivnog mjesta ili njegove neposredne okoline često rezultiraju inaktivacijom enzima te su stoga pod snažnim negativnim evolucijskim pritiskom koji sprječava njihovu izmjenu²⁴³. Rezultati strukturne i kinetičke analize mutanta mut-W130Q-*PmIleRS2*, koji su pokazali da mutacija Trp130Gln u *PmIleRS2* ima tek minimalan utjecaj na strukturu aktivnog mjesta, bili su iznenađujući. Naime, iako Trp130 ne sudjeluje izravno u vezanju supstrata, njegov doprinos stabilizaciji kroz slaganje s Pro53 i interakcije s His57 ključan je za pravilno pozicioniranje vrha α_1 zavojnice s kinetički važnim HXGH motivom. Stoga je izostanak fenotipske promjene nakon mutacije u skladu s hipotezom o visokoj plastičnosti i mutacijskoj tolerantnosti aktivnog mjesta IleRS2 enzima. Nasuprot tome, strukturna analiza mutanta mut-P53A-G60N-R61K-Y126S-W130Q-*PmIleRS2* u kompleksu s 5'-O-Ile-AMS-om pružila je dosad najsnažniji dokaz o utjecaju zatvorenosti KMSKS omče na afinitet IleRS2 prema mupirocinu^{148,152}. U odnosu na divlji tip enzima, zatvorenija konformacija KMSKS omče u ovom mutantu ometa vezanje nonanoične kiseline mupirocina, koja je pokazana kao ključna za njegovo inhibicijsko djelovanje²⁵. Zanimljivo je da ovaj mutant, unatoč nizu ciljano uvedenih točkastih mutacija, ne pokazuje promjene u konformaciji vrha α_1 zavojnice u usporedbi s divljim tipom enzima. Konformacijska fleksibilnost vrha α_1 zavojnice pokazala se presudnom za akomodaciju nekanonskog GXHH motiva, koji IleRS2 enzimima omogućuje rezistenciju na mupirocin u milimolarnom rasponu koncentracija (Poglavlje 4.4.5). Činjenica da niz mutacija očuvanih pozicija unutar aktivnog mjesta *PmIleRS2* nije utjecao na stabilizaciju vrha α_1 zavojnice upućuje na to da je njezina konformacijska fleksibilnost duboko ukorijenjena u samoj topološkoj organizaciji aktivnog mjesta IleRS2 enzima.

4.6. Kristalizacija drugih IleRS enzima i njihovih mutiranih varijanti

Samo je mali broj enzima analiziranih u ovoj doktorskoj disertaciji dao kristale difrakcijske kvalitete, na temelju kojih je njihova kristalna struktura mogla biti određena pri atomskoj rezoluciji. Sljedeće poglavlje ukratko prikazuje rad na enzimima koji nisu dali kristale difrakcijske kvalitete, ali koji bi, uz optimizaciju kristalizacijskih uvjeta, mogli poslužiti kao polazna točka za buduća strukturna istraživanja.

4.6.1. Kristalizacija IleRS2 iz bakterije *Streptomyces griseus* (wt-GIHH-SgIleRS2)

IleRS2 iz *S. griseus* (wt-GIHH-SgIleRS2) prirodno sadrži nekanonski GIHH strukturni motiv i pokazuje izrazitu rezistenciju na inhibiciju mupirocinom, što ju je činilo poželjnim modelnim enzimom za kristalizaciju¹². Na kristalizaciju je postavljena otopina 22,8 mg ml⁻¹ wt-GIHH-SgIleRS2 u *apo* formi, ili otopina dodatno suplementirana s 2,5 mmol dm⁻³ 5'-O-Ile-AMS-a ili 10 mmol dm⁻³ mupirocina. Inicijalni kristali apoproteina pojavili su se nakon 7 dana inkubacije pri 19 °C, u kristalizacijskom uvjetu JCSG+ G2, sastava: 0,1 mol dm⁻³ HEPES-KOH, pH=7,5; 20 mol dm⁻³ MgCl₂ i 22 % (w/v) natrijev poliakrilat 5100. Kristali su uspješno reproducirani u kapima većeg volumena, korištenjem natrijevog poliakrilata nominalnih masa 5100 i 8000. Dvodimenzijском optimizacijom koncentracije precipitanta (16–26 % (w/v) natrijev poliakrilat 5100) i pH-vrijednosti (6,8–8,2) dobiveni su znatno veći kristali poboljšane morfologije (Slika 55 a–c).



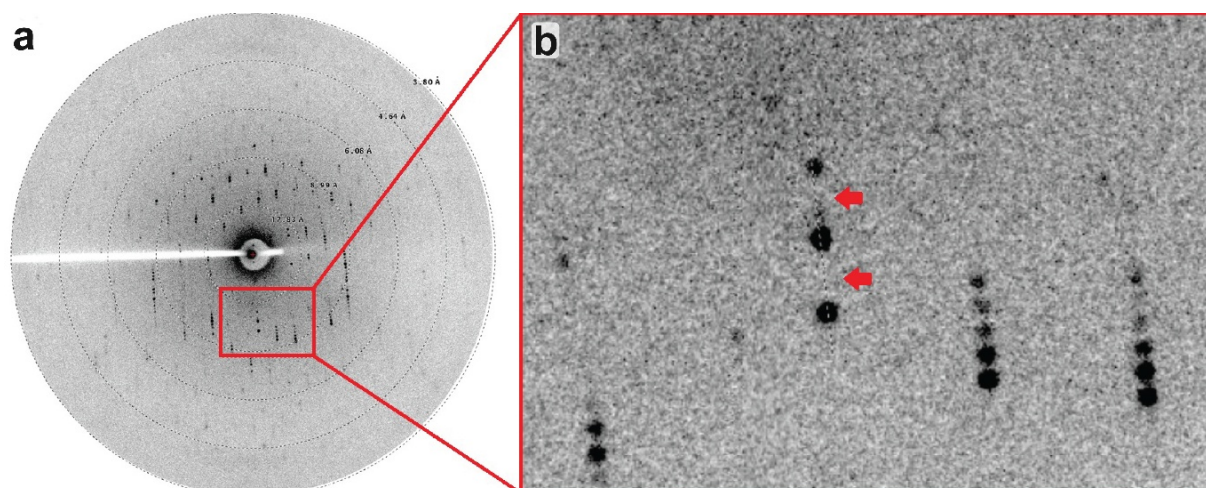
Slika 55. Kristali apoproteina wt-GIHH-SgIleRS2: (a) Inicijalni kristali u uvjetu JCSG+ G2 sastava: 0,1 mol dm⁻³ HEPES-KOH, pH=7,5; 20 mol dm⁻³ MgCl₂ i 22 % (w/v) natrijev poliakrilat 5100, nakon 7 dana inkubacije pri temperaturi 19 °C, (b) Optimirani kristali u uvjetu sastava: 0,1 mol dm⁻³ HEPES-KOH (pH = 8,0 pri 20 °C); 20 mol dm⁻³ MgCl₂ i 18 % (w/v) natrijev poliakrilat 5100 nakon 14 dana inkubacije pri temperaturi 19 °C, (c) Optimirani kristali u uvjetu sastava: 0,1 mol dm⁻³ HEPES-KOH (pH = 7,5 pri 20 °C); 20 mmol dm⁻³ MgCl₂ i 16 % (w/v) natrijev poliakrilat 5100 nakon 14 dana inkubacije pri temperaturi 19 °C.

Tijekom smrzavanja ovih kristala pojavio se neočekivan problem formiranja ljepljive poliakrilatne opne na površini kapi u kontaktu sa zrakom. Opnu je bilo potrebno mehanički ukloniti, što je često rezultiralo pucanjem ili gubitkom kristala blizu površine kapi. Dio kristala

bio je zalijepljen za dno sjedeće kapi te su morali biti mehanički potaknuti na odvajanje. Kristali koji su ostali suspendirani u otopini dobro su podnijeli krioprotekciju etilen glikolom do konačne koncentracije od 25 % (v/v). Difraktogram kristala snimljen je na laboratorijskom difraktometru Rigaku RU200, opremljenom detektorom MAR345, pri valnoj duljini zračenja $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$). Prikupljen je set od 2300 difraktograma uz oscilacijski kut od $0,5^\circ$. Statistički parametri prikupljenog seta prikazani su u tablici 28. Eksperimentalni podaci razlučeni su do $\sim 5 \text{ \AA}$, a procesirani do $4,3 \text{ \AA}$ prema kriteriju $\text{CC}_{1/2} > 0,6$. Kristalno pakiranje bilo je heksagonsko, u prostornoj grupi $P3_1 2 1$ (152), što je potvrđeno prepoznavanjem sustavnih pogašenja duž prve kristalografske osi, u skladu s postojanjem vijčane osi karakteristične za prostornu grupu $P3_1 2 1$ (Slika 56).

Tablica 28. Statistika prikupljenog seta podataka za kristale wt-GIHH-SgIIeRS2. U obzir su uzeti samo refleksi za koje vrijedi $\text{CC}_{1/2} > 0,6$

Dimenzija jedinične ćelije, $\text{\AA}$	95,32; 95,32; 269,49 (90, 90, 120)
Prostorna grupa	$P3_1 2 1$ (152)
Valna duljina, $\text{\AA}$	1,541800
Razlučenje, $\text{\AA}$	38,9–4,3 (4,465–4,311)
Jedinstveni refleksi	10097 (885)
Kompletnost, %	94,81 (90,04)
$\text{CC}_{1/2}$	0,993 (0,639)
Redundantnost	6,3 (6,5)
$I / \sigma I$	7,72 (2,32)



Slika 56. Difraktogram kristala wt-GIHH-SgIIeRS2 u apo formi nakon krioprotekcije etilen glikolom: (a) Najveća opažena razlučivost difraktograma je $\sim 5 \text{ \AA}$, (b) Sustavna pogašenja refleksija uzduž kristalografske osi ukazuju na prisutnost vijčane osi te su omogućila određivanje prostorne grupe $P3_1 2 1$ (152), koja je u skladu s opaženim simetrijskim elementima kristalne rešetke.

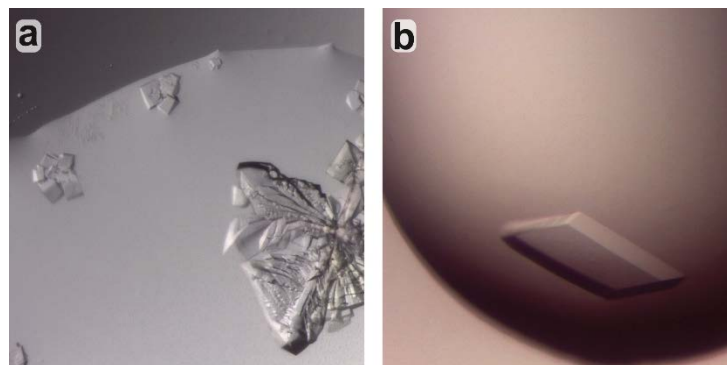
Metodom molekulske zamjene, koristeći strukturu wt-HVGH-*TtIleRS2* u kompleksu s Ile-AMS-om (1JZQ²⁹) kao početni model, uspješno je riješen problem kristalografskih faza. U jediničnoj ćeliji utvrđena je prisutnost jedne molekule wt-GIHH-*SgIleRS2*, uz udio otapala od 57,3 %. Budući da je niska rezolucija difrakcijskih podataka posljedica inherentnog kristalnog pakiranja, a ne manipulacije kristalima, jednostavnom optimizacijom uvjeta kristalizacije nije bilo moguće poboljšati razlučivost ove kristalne forme. Planirana je kontrolirana dehidratacija kristala – metoda poznata po značajnom poboljšanju difrakcijskih svojstava pojedinih kristala smanjenjem udjela intermolekulskog otapala^{244–246}. Nažalost, globalne okolnosti, uključujući pandemiju COVID-19 tijekom 2020., kao i promjena istraživačke strategije, prekinule su daljnje radove na kristalizaciji ovog proteina.

4.6.2. Kristalizacija *IleRS2* iz bakterije *Deinococcus radiodurans* (wt-ALHH-*DrIleRS2*)

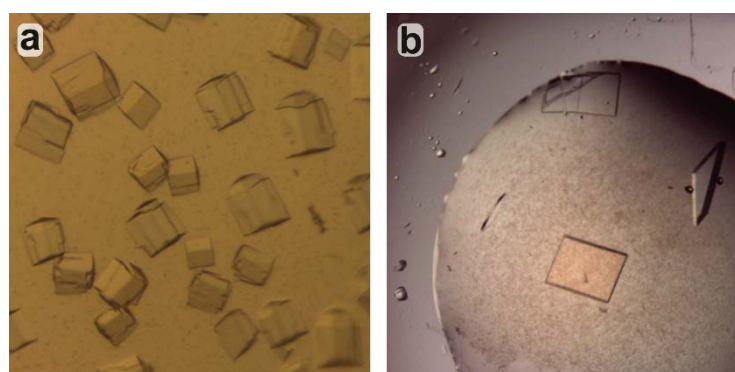
IleRS2 iz *D. radiodurans* (wt-ALHH-*DrIleRS2*) je enzim koji prirodno sadrži nekanonski slijed ALHH motiva, zbog čega je odabran kao poželjan modelni protein. Za kristalizaciju u *apo* obliku ili u kompleksu s ligandima 5'-O-Ile-AMS ili 5'-O-Val-AMS, korištena je otopina 14,25 mg ml⁻¹ wt-ALHH-*DrIleRS2*. Inicijalni kristali, neovisno o prisutnom ligandu, pojavili su se nakon 7 do 14 dana u više srodnih kristalizacijskih uvjeta pri temperaturi od 19 °C. Za daljnju optimizaciju, na temelju morfologije inicijalnih kristala (Slika 57), odabrana su dva uvjeta:

- **Indeks E10:** 0,1 mol dm⁻³ Bis-Tris, pH = 7,5; 30 % (v/v) PPG400 – za kristalizirani *apo* protein
- **PEG/Ion C12:** 0,2 mol dm⁻³ natrijev tartarat; 20 % (w/v) PEG3350 – za kristalizirani kompleks proteina s 5'-O-Val-AMS-om

Odabrani uvjeti dodatno su optimizirani u većem volumenu kapi, dvodimenzijском varijacijom koncentracije precipitanta, soli i pH-vrijednosti pufera. pH-vrijednost je varirana u koracima od 0,1 (Bis-Tris) ili 0,05 jedinica (HEPES), koncentracija soli u koracima od 0,1 mol dm⁻³, a koncentracija precipitanta u koracima od 2–2,5 % (w/v). Za uvjet PEG/Ion C12 dodatno je ispitana upotreba amonijevog tartarata kao alternative natrijevom tartaratu. Ploče s kristalizacijskim uvjetima postavljane su u duplikatu na dvije temperature: 4 °C i 19 °C. Inicijalni kristali iz oba uvjeta uspješno su reproducirani u većem volumenu kapi (Slika 58).



Slika 57. Inicijalni kristali wt-ALHH-DrIlleRS2 u sljedećim kristalizacijskim uvjetima: (a) kristali *apo* proteina u uvjetu Index E10 sastava: $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ Bis-Tris, pH = 7,5; 30 % (v/v) PPG 400, **(b)** kristali kompleksa s 5'-O-Val-AMS-om u uvjetu PEG/Ion C12 sastava: $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ natrijev tartarat, 20 % (v/w) PEG3350.



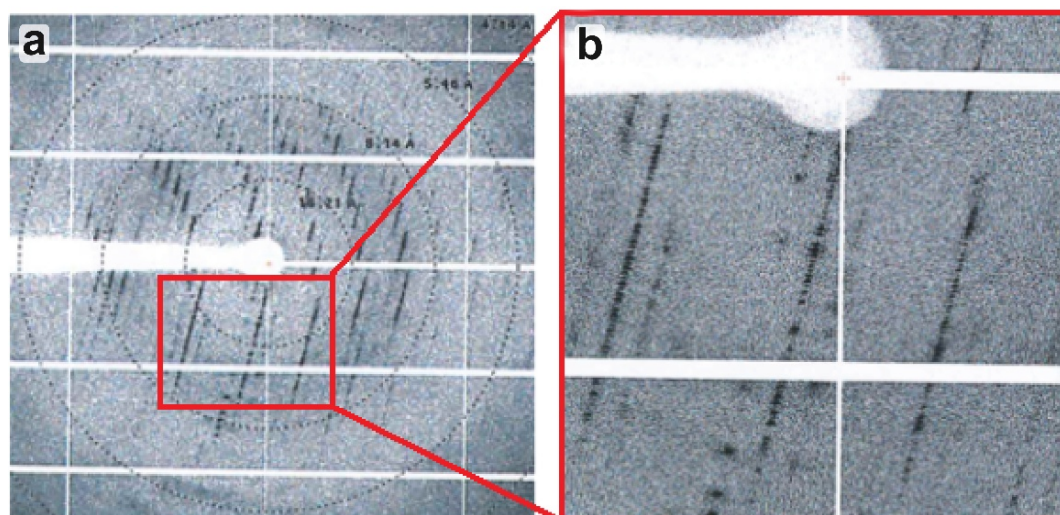
Slika 58. Optimirani kristali wt-ALHH-DrIlleRS2 u sljedećim uvjetima: (a) kristali *apo* proteina u uvjetu sastava: $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ Bis-Tris (pH = 7,5 pri 20°C); 30 % (v/v) PPG 400, **(b)** kristali kompleksa s 5'-O-Val-AMS-om u uvjetu sastava: $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ amonijev tartarat, 17,5 % (w/v) PEG3350.

Nažalost, niti jedna kristalna forma nije bila stabilna tijekom krioprotekcije. Po otvaranju kapi, zbog pojave usoljavanja (engl. *salt in*), dolazilo je do pucanja i otapanja kristala. Ovaj proces karakterizira povećanje topljivosti kristala uslijed porasta ionske jakosti otopine zbog isparavanja otapala iz kapi²⁴⁷. Kontroliranje vlažnosti radnog prostora i brza provedba postupka smanjili su usoljavanje te omogućili krioprotekciju kristala. Dodatak osmolita (glukoza, saharoza, L-prolin) izazvao je trenutačno pucanje i otapanje kristala. Kristale je bilo moguće kriostabilizirati dodatkom klorida alkalijskih metala do konačne koncentracije od 2 mol dm^{-3} , bez promjene morfologije kristala, ali uz potpun gubitak difrakcijskih svojstava. PEG400 i trimetilamin-N-oksid (TMAO) bili su pogodni za smrzavanje pod uvjetom da je koncentracija postupno povećavana do 20 % (v/v) u koracima od 5 % (v/v). Kristali s PPG400 kao precipitantom nisu zahtijevali dodatnu krioprotekciju, budući da je PPG400 sam po sebi krioprotektant. Difrakcija svih kristala kretala se u rasponu od 5,0–7,5 Å. U cilju poboljšanja razlučenja, osim klasične krioprotekcije, na kristalima kompleksa s 5'-O-Val-AMS-om

dobivenim u uvjetu sastava: 0,2 mol dm⁻³ amonijev tartarat, 17,5 % (w/v) PEG3350, pokušana je stabilizacija umreženjem¹⁹⁰. Kristali su izloženi parama svježeg glutaraldehida u trajanju od 1–30 minuta, prije nego što su kriostabilizirani. Umreženje je značajno stabiliziralo kristale bez promjene njihove morfologije. Kristali boljih mehaničkih svojstava bez poteškoća su stabilizirani dodatkom 20 % (v/v) PEG400, 20 % (v/v) glicerola ili 20 % (v/v) etilen glikola. Nažalost, umreženje nije poboljšalo difrakcijska svojstva kristala, budući da je maksimum razlučenja i dalje ostao ~7,5 Å. Sve kristalne forme karakterizirala je duga kristalografska os, zbog čega je razlučenje pojedinačnih intenziteta uzduž te osi bilo moguće samo uz veliku udaljenost kristala od detektora (Slika 59). U konačnici, najbolje razlučeni set difraktograma pripadao je *apo* formi kristaliziranog proteina, s rezolucijom od 4,6 Å. Statistika kristalografskih podataka za taj kristal prikazana je u tablici 29.

Tablica 29. Statistika difrakcijskih podataka za kristal wt-ALHH-DrIlleRS2 u *apo* formi. U obzir su uzeti samo refleksi za koje vrijedi $CC_{1/2} > 0,6$.

Dimenzija jedinične ćelije, Å	101,02; 101,02; 655,32 (90, 90, 90)
Prostorna grupa	P4 ₁ 2 ₁ 2
Valna duljina, Å	0,999879
Razlučenje, Å	63,6–4,6 (4,765–4,601)
Jedinstveni refleksi	19564 (1572)
Kompletnost, %	91,68 (81,29)
CC1/2	0,998 (0,608)
Redundantnost	7,1 (7,3)
$I / \sigma I$	7,04 (1,13)



Slika 59. Difraktogram kristala wt-ALHH-DrIlleRS2 u *apo* formi: (a) Najveće opaženo razlučenje difraktograma je ~5 Å. (b) Kristalnu formu karakterizira izrazito duga kristalografska os duljine 655,32 Å. Zbog toga je difraktogram sniman na velikoj udaljenosti kristala od detektora kako bi se omogućilo razlučivanje pojedinačnih refleksa uzduž ove duge osi.

§ 5. ZAKLJUČAK

- Postoje IleRS kod kojih je kanonski slijed strukturnog motiva histidil-X-glicil-histidin (HXGH) prirodno mutiran u nekanonski slijed glicil-X-histidil-histidin (GXHH). U nekanonskom motivu, efektivno su sterički zamijenjene prva i treća pozicija u motivu.
- Filogenetska analiza IleRS enzima razdvaja ih u mupirocin-osjetljive IleRS1 i mupirocin-rezistentne IleRS2. IleRS1 se grupiraju u jedan kladus, dok se IleRS2 dijele u tri kladusa koja se razlikuju u slijedu očuvanog strukturnog motiva razreda I sintetaza (HXGH motiv).
- Kod IleRS2 prisutni su i kanonski (HXGH) i nekanonski (GXHH) oblici strukturnog motiva, dok IleRS1 akomodiraju isključivo kanonski HXGH motiv. Tijekom evolucije, u rodu *Deinococcus-Thermus*, došlo je do spontane reverzije prirodnog nekanonskog GXHH slijeda u kanonski HXGH slijed. Postojanje takvog reverzijskog događaja, zajedno s činjenicom da se GXHH motiv pojavljuje u dva udaljena kladusa IleRS2, upućuje na to da su IleRS2 ovaj motiv stekle neovisno barem dva puta tijekom evolucije.
- Nekanonski GXHH slijed povezan s izuzetnom rezistencijom na prirodni antibiotik mupirocin. Razina rezistencije GXHH-enzima veća je do tri reda veličine u odnosu na HXGH-IleRS2 enzime i nazvana je hiper-rezistencijom na mupirocin.
- Suvremeni IleRS2 enzimi funkcionalno akomodiraju i kanonski (HXGH) i nekanonski (GXHH) oblik strukturnog motiva uz minimalan utjecaj na katalitičku aktivnost, ali uz značajnu promjenu osjetljivosti na mupirocin. Suprotno tome, uvođenje GXHH slijeda u moderne IleRS1 enzime dovodi do njihove kinetičke inaktivacije.
- Strukturna analiza HXGH varijanti *PmIleRS1* i *PmIleRS2* enzima u kompleksu s mupirocinom i 5'-O-Ile-AMS-om otkrila je razlike u vezanju mupirocina koje proizlaze iz konfirmacije KMSKS omče. U *PmIleRS1*, KMSKS omča zauzima otvorenu konformaciju koja omogućava formiranje vodikove veze između karboksilne skupine 9-hidroksinonanoične kiseline mupirocina i peptidne okosnice **K**MMSKS motiva. Nasuprot tome, u *PmIleRS2*, 9-hidroksinonanoična kiselina mupirocina veže se u kanal između vrha α_1 zavojnice i generalno zatvorene KMSKS omče bez specifičnih interakcija. Gubitak ovih interakcija zbog različite dinamike KMSKS omče predstavlja

moгуći mehanizam veće rezistencije IleRS2 enzima na mupirocin u usporedbi s IleRS1 enzimima.

- Strukturna analiza GXHH varijanti *PmIleRS1* i *PmIleRS2* enzima u kompleksu s 5'-O-Ile-AMS-om pokazala je da je rotacija vrha α_1 zavojnice preduvjet funkcionalne akomodacije GXHH slijeda u IleRS2, ali ne i u IleRS1 enzime. Zahvaljujući toj rotaciji, kod GXHH-IleRS2 enzima izbjegava se sterički utjecaj metilenske skupine trećeg histidina nekanonskog strukturnog motiva (GXHH) na adeninsku bazu reakcijskog međuprodukta. U odsutnosti ove rotacije, sterički utjecaji vjerojatno bi se ispoljavali i kod prepoznavanja adeninske baze ATP-a u koraku vezanja supstrata, što bi dovelo do deformacije aktivnog mjesta i gubitka kinetički produktivne konformacije prijelaznog stanja.
- Rotacija vrha α_1 zavojnice, karakteristična za IleRS2 enzime, te njezina odsutnost u IleRS1 enzimima, vjerojatno su duboko ukorijenjene u arhitekturi njihovih aktivnih mjesta. Racionalnom mutagenezom regije oko vrha α_1 zavojnice u *PmIleRS1* i *PmIleRS2* enzimima nije bilo moguće identificirati pojedinačne bočne ogranke odgovorne za rotaciju opaženu u *PmIleRS2*, niti one koji bi mogli objasniti steričku rigidnost prisutnu u *PmIleRS1*.
- Hiper-rezistencija prema mupirocinu u GXHH-IleRS2 enzimima uzrokovana je steričkim utjecajem histidina na trećoj poziciji nekanonskog GXHH motiva na moničnu kiselinu mupirocina.
- Vizualizirana je struktura cjelokupne C-terminalne antikodon-vezujuće domene bakterijskog IleRS2 enzima, pri čemu je pokazana podjela te domene na tri poddomene (SD1, SD2, SD3) te postojanje IleRS2-specifične insercije unutar SD2.

§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ

6.1. Popis kratica korištenih u radu

aa – aminokiselina

aa-AMP – aminoacil-adenilat, reakcijski međuprodukt aminoacil-tRNA sintetaza

aaRS – aminoacil-tRNA-sintetaza

aa-tRNA^{aa} – izoakceptor tRNA za aminokiselinu **aa**, aminoaciliran aminokiselinom **aa**

acp³U – 3-(3-amino-3-karboksipropil)uridin, modificirana baza RNA

AIEX – anionsko izmjenjivačka kromatografija, engl. *Anion ion exchange chromatography*

AMP – adenzin-5'-monofosfat

APS – amonijev persulfat

ATP – adenzin-5'-trifosfat

BSA – albumin goveđeg seruma, engl. *Bovine serum albumin*

BTP – bis-tris propan, pufer

CaIleRS2 – izoleucil-tRNA-sintetaza tipa 2 iz gljivice *Candida albicans*

CP_x – insercijska domena, engl. *Connective peptide*, $x = 1, 2, 3...$

D – dihidrouridin, modificirana baza RNA

D – diskriminacijski faktor

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

DrIleRS2 – izoleucil-tRNA-sintetaza tipa 2 iz bakterije *Deinococcus radiodurans*

DTT – ditiotritol

EcIleRS1 – izoleucil-tRNA-sintetaza tipa 1 iz bakterije *Escherichia coli*

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

EF – elongacijski faktor

EPE – kratica za HEPES u programskom paketu Coot

G_m – 2'-O-metilguanozin, modificirana baza RNA

GOL – kratica za glicerol u programskom paketu Coot

GXXH – aminokiselinski slijed glicil-X-histidil-histidin

HEPES – N-(2-hidroksietil)piperazin-N'-2-etansulfonska kiselina, pufer

HEPES-NaOH – Pufer HEPES titriran s NaOH do željene pH vrijednosti

- HEPES-KOH** – Pufer HEPES titiran s KOH do željene pH vrijednosti
- HpIleRS1** – izoleucil-tRNA-sintetaza tipa 1 iz bakterije *Helicobacter pylori*
- HXGH** – aminokiselinski slijed histidil-X-glicil-histidin
- HUP** – Superfamilija enzima s HIGH-strukturnim motivom, UspA enzima i PP-ATPaza, engl. *HIGH-signature proteins, UspA superfamily and the PP-ATPase superfamily*
- IC50** – koncentracija inhibitora (antibiotika) pri kojoj je inhibirano 50% biološke aktivnosti
- IEX** – ionsko izmjenjivačka kromatografija, engl. *Ion Exchange Chromatography*
- ILA** – kratica za 5'-O-(N-(L-izoleucil)sulfamoil)adenozin u programskom paketu Coot
- Ile-AMP** – izoleucil-adenilat, reakcijski međuprodukt izoleucil-tRNA sintetaza
- 5'-O-Ile-AMS** – 5'-O-(N-(L-izoleucil)sulfamoil)adenozin, nehidrolizabilni analog Ile-AMP-a
- IleRS** – izoleucil-tRNA-sintetaza
- IPTG** – izopropil- β -D-tioglaktopiranozid
- k_{cat} – obrtni broj enzima
- K_I – konstanta inhibicije
- K_I (MUP)_{ATP} – konstanta inhibicije mupirocina mjerena prema adenzin-5'-trifosfatu
- K_I (MUP)_{Ile} – konstanta inhibicije mupirocina mjerena prema izoleucinu
- K_M – Michaelis-Mentičina konstanta
- k_{obs} – opaženi koeficijent brzine reakcije
- LB** – Luria-Bertani medij, bogati mikrobiološki medij
- LB/Mg** – Luria-Bertani medij suplementiran izvorom magnezijevih iona
- m⁷G** – 7-metilgvanozin, modificirana baza RNA
- MD** – simulacije molekulske dinamike
- mRNA** – glasnička ribonukleinska kiselina
- Ni-NTA** – nitrilotrioctena kiselina komplčeksirana nikal(II) ionima
- OD₆₀₀** – optička gustoća mikrobioloških kultura mjerena spektrofotometrijski pri $\lambda = 600$ nm
- PAGE** – elektroforeza na poliakrilamidnom gelu
- PCR** – lančana reakcija polimerazom
- PDB** – proteinska banka podataka (engl. *Protein Data Bank*)
- PEG_n** – polietilenglikol s molekulskom masom *n*
- P_i** – ortofosfatni ion, PO₄³⁻
- PmIleRS1** – izoleucil-tRNA-sintetaza tipa 1 iz bakterije *Priestia megaterium*
- PmIleRS2** – izoleucil-tRNA-sintetaza tipa 2 iz bakterije *Priestia megaterium*

PMSF – fenilmetilsulfonil-fluorid, ireverzibilni inhibitor serinskih proteaza

PPG_n – polipropilenglikol s molekulskom masom **n**

PP_i – pirofosfatni ion, P₂O₇⁴⁻

RCSB – Israživačka platforma za strukturnu bioinformatiku (engl. *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics*)

RNA – ribonukleinska kiselina

RPC – tekućinska kromatografija s obrnutim fazama, engl. *Reversed Phase Chromatography*

s⁴U – 4-tiouridin, modificirana baza RNA

SaIleRS1 – izoleucil-tRNA-sintetaza tipa 1 iz bakterije *Staphylococcus aureus*

ScIleRS2 – izoleucil-tRNA-sintetaza tipa 2 iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

SD – poddomena, engl. *Subdomain*

SDS-PAGE – elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u prisutstvu matrijeva dodecil-sulfata

SgIleRS2 – izoleucil-tRNA-sintetaza tipa 2. iz bakterije *Streptomyces griseus*

SV – engl. *Software Version*, inačica programske opreme

t⁶A – N6-treonilkarbmoiladenozin, modificirana baza RNA

TEMED – *N, N, N', N'*-tetrametiletildiamin

TLC – tankoslojna kromatografija

TRIS – trisaminometan, pufer

tRNA – prijenosna ribonukleinska kiselina

tRNA^{Ile}_{GAU} – izoleucinski tRNA izoakceptor s GAU antikodonom

TtIleRS2 – izoleucil-tRNA-sintetaza tipa 2 iz bakterije *Thermus thermophilus*

5'-O-Val-AMS – 5'-O-(N-(L-valil)sulfamoil)adenozin, nehidrolizabilni analog Val-AMP-a

ValRS – valil-tRNA-sintetaza

wt – divlji tip, engl. *wild type*

ψ – pseudouridin, modificirana baza tRNA

6.2. Popis kanonskih proteinogenih aminokiselina

alanin, Ala (A)

arginin, Arg (R)

asparagin, Asn (N)

asparaginska kiselina, Asp (D)

cistein, Cys (C)

glutamin, Gln (Q)

glutamat, Glu (E)

glicin, Gly (G)

histidin, His (H)

izoleucin, Ile (I)

leucin, Leu (L)

lizin, Lys (K)

metionin, Met (M)

fenilalanin, Phe (F)

pirolizin, Pyl (O)

prolin, Pro (P)

selenocistein, Sec (U)

serin, Ser (S)

treonin, Thr (T)

triptofan, Trp (W)

tirozin, Tyr (Y)

valin (V)

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. J. Davies, D. G. Wright, *Trends Microbiol.* **5** (1997) 234–40
2. K. Kannan, A. S. Markin, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1241** (2011) 33–47
3. R. Nikolay *et al.*, *Antibiotics* **5** (2016) 18–35
4. S. A. Cochrane, C. T. Lohans, *Eur. J. Med. Chem.* **194** (2020) 112262
5. M. Meng *et al.*, *Antibiotics* **11** (2022) 525–39
6. G. Mancuso *et al.*, *Pathogens* **10** (2021) 1310–24
7. D. B. Cookson, *J. Antimicrob. Chemother.* **41** (1998) 11–8
8. H. Nikaido, *Annu. Rev. Biochem.* **78** (2009) 119–46
9. J. J. Perona, I. Gruic Sovulj, *Top. Curr. Chem.* **344** (2014) 1–41
10. M. Ibba, D. Soll, *Annu. Rev. Biochem.* **69** (2000) 617–650
11. M. A. R. Gomez, M. Ibba, *RNA* **26** (2020) 910–36
12. N. Cveticic *et al.*, *J. Biol. Chem.* **291** (2016) 8618–31
13. T. Nakama *et al.*, *J. Biol. Chem.* **276** (2001) 47387–93
14. J. Hughes, G. Mellows, *Biochem. J.* **191** (1980) 209–19
15. J. A. Pope *et al.*, *J. Biol. Chem.* **273** (1998) 31691–701
16. E. Glasfeld *et al.*, *Biochemistry* **35** (1996) 4139–45
17. R. Sutherland *et al.*, *Agents Chemother.* **27** (1985) 495–8
18. W. M. Casewell, R. L. R. Hill, *J. Antimicrobial Chemother.* **15** (1985) 523–31
19. S. S. Gao *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **136** (2014) 5501–7
20. U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Bactorban NDA 50-746 Approval Letter, Dec. 1996, preuzeto: 28.06.2024., https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/97/50746_BACTROBAN%20CREAM_MEDR.PDF
21. HALMED, Betrion SmPC, HR-H-844295955, Lip. 1998, preuzeto: 28.08.2024., https://www.halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/SPC_UP-I-530-09-14-02-512.pdf
22. HALMED, Mirobact SmPC, HR-H-251328870, Tra. 2008, preuzeto: 28.08.2024., http://www.halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/SPC_UP-I-530-09-17-02-311.pdf
23. HALMED, Mupiron SmPC, HR-H-200819991, Lip. 2010, preuzeto: 28.08.2024., http://www.halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/UP-I-530-09-14-02-385_.pdf

24. J. M. Conly, B. L. Johnston, *Can. J. Infect. Dis.* **13** (2002) 157–9
25. O. Marion *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **17** (2009) 1006–17
26. F. L. Silvian *et al.*, Insights into editing from an Ile-tRNA synthetase structure with tRNA^{Ile} and mupirocin, 1999, DOI: <https://doi.org/10.2210/pdb1QU2/pdb>
27. F. L. Silvian *et al.*, Insights into editing from an Ile-tRNA synthetase structure with tRNA^{Ile} and mupirocin, 1999, DOI: <https://doi.org/10.2210/pdb1QU3/pdb>
28. F. L. Silvian *et al.*, Insights into editing from an Ile-tRNA synthetase structure with tRNA^{Ile} and mupirocin, 2000, DOI: <https://doi.org/10.2210/pdb1FFY/pdb>
29. T. Nakama *et al.*, Structural basis for the recognition of isoleucyl-adenylate and an antibiotic, mupirocin, by isoleucyl-tRNA synthetase, 2001, DOI: <https://doi.org/10.2210/pdb1JZQ/pdb>
30. T. Nakama *et al.*, Structural basis for the recognition of isoleucyl-adenylate and an antibiotic, mupirocin, by isoleucyl-tRNA synthetase, 2001, DOI: <https://doi.org/10.2210/pdb1JZS/pdb>
31. S. Chung *et al.*, Isoleucyl-tRNA synthetase from *Candida albicans* complexed with a isoleucyl-adenylate, 2020, <https://doi.org/10.2210/pdb6LDK/pdb>
32. X. Chen *et al.*, Crystal structure of *H. pylori* isoleucyl-tRNA synthetase (*HpIleRS*) in *apo* form, 2024, DOI: <https://doi.org/10.2210/pdb8WNF/pdb>
33. X. Chen *et al.*, Crystal structure of *H. pylori* isoleucyl-tRNA synthetase (*HpIleRS*) in complex with Ile-AMP, 2024, <https://doi.org/10.2210/pdb8WNI/pdb>
34. X. Chen *et al.*, Crystal structure of *H. pylori* isoleucyl-tRNA synthetase (*HpIleRS*) in complex with Val-AMP, <https://doi.org/10.2210/pdb8WO2/pdb>
35. X. Chen *et al.*, Crystal structure of *H. pylori* isoleucyl-tRNA synthetase (*HpIleRS*) in complex with Ile, <https://doi.org/10.2210/pdb8WNG/pdb>
36. X. Chen *et al.*, Crystal structure of *H. pylori* isoleucyl-tRNA synthetase (*HpIleRS*) in complex with Val, <https://doi.org/10.2210/pdb8WNI/pdb>
37. X. Chen *et al.*, Crystal structure of *H. pylori* isoleucyl-tRNA synthetase (*HpIleRS*) in complex with mupirocin, <https://doi.org/10.2210/pdb8WO3/pdb>
38. B. Chen *et al.*, The mechanism of discriminative aminoacylation by isoleucyl-tRNA synthetase based on wobble nucleotide recognition, DOI: <https://doi.org/10.2210/pdb8WND/pdb>

39. B. Chen *et al.*, The mechanism of discriminative aminoacylation by isoleucyl-tRNA synthetase based on wobble nucleotide recognition, DOI: <https://doi.org/10.2210/pdb8Z1P/pdb>
40. V. Zanki, *et al.*, *Protein Sci.* **31** (2022) e4418
41. V. Zanki, Različite uloge dviju izoleucil-tRNA-sintetaza iz bakterije *Bacillus megaterium* u staničnom odgovoru na stres, Doktorska disertacija, 2022, Prirodoslovno-matematički fakultet, 1–127
42. T. Yanagisawa, M. Kawakami, *J. Biol. Chem.* **278** (2003) 25887–94
43. F. Crick, *Nature* **227** (1970) 561–3
44. D. F. Browning, S. J. W. Busby, *Nature Rev. Microbiol.* **2** (2004) 57–65
45. R. M. Sacker, *J. Mol Biol.* **412** (2011) 754–71
46. I. Jonkers, J. T. Lis, *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* **16** (2015) 167–77
47. J. F. Gout *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **110** (2013) 18584–9
48. N. Komissarova, M. Kashlev, *J. Biol. Chem.* **272** (1997) 15329–38
49. M. Imashimizu *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **41** (2013) 9090–104
50. R. Landick, *Biochem. Soc. Trans.* **34** (2004) 1062–6
51. R. Landick *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82** (1985) 4663–7
52. E. Nudler, *Cell* **149** (2012) 1438–45
53. D. Dutta *et al.*, *Cell* **146** (2011) 533–43
54. J. P. Farnham, T. Platt, *Nucleic Acid. Res.* **9** (1981) 563–77
55. V. Molodtsov *et al.*, *Nature* **614** (2023) 367–74
56. M. A. Marahiel *et al.*, *Chem. Rev.* **97** (1997) 2651–74
57. G. C. Kurland, *J. Mol. Biol.* **2** (1960) 83–91
58. N. Ban *et al.*, *Science* **289** (2000) 905–20
59. P. Nissen *et al.*, *Science* **289** (2000) 920–30
60. G. E. Palade, *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1** (1955) 59–68
61. J. Shine, L. Dalgarno, *Nature* **254** (1975) 34–8
62. S. Grill *et al.*, *EMBO J.* **19** (2000) 4101–10
63. C. Grigoriadou *et al.*, *J Mol Biol.* **373** (2007) 562–72
64. S. G. Allen *et al.*, *Cell* **121** (2005) 703–12
65. K. Forchhammer *et al.*, *Nature* **342** (1989) 453–6
66. V. M. Rodnina *et al.*, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **372** (2017) 20160182

67. K. J. Noel, C. P. Whitford, *Nat. Commun.* **7** (2016) 13314
68. G. Wallin, J. Aqvist, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107** (2010) 1888–93
69. S. Y. Polikanov *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21** (2014) 787–93
70. S. Ude *et al.*, *Science* **339** (2013) 82–5
71. M. V. Rodnina, *Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.* **10** (2018) a032664
72. H. Jin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107** (2010) 8593–8
73. S. K. Koutmou *et al.*, *RNA* **20** (2013) 609–20
74. N. Gao *et al.*, *Mol. Cell.* **18** (2005) 663–74
75. M. Schwartz, T. Pan, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **52** (2017) 205–19
76. A. D. Drummond, O. C. Wilke, *Nature Rev. Genet.* **10** (2009) 715–24
77. A. Rozov *et al.*, *Nat. commun.* **6** (2015) 7251
78. A. Rozov *et al.*, *Nucleic Acid Res.* **44** (2016) 6434–41
79. N. Ellis, J. Gallant, *Mol. Gen. Genet.* **182** (1982) 169–72
80. N. Netzer *et al.*, *Nature* **462** (2009) 522–6
81. B. Javid *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111** (2014) 1132–7
82. H. M. Schwartz, T. Pan, *Nucleic Acids Res.* **44** (2016) 294–303
83. O. Vargas-Rodrigues *et al.*, *Nat. Acad. Sci. USA* **118** (2021) e2110797118
84. M. Schmutzer, A. Wagner, *Mol. Biol. Evol.* **40** (2023) msad136
85. M. Pranjic *et al.*, *Int. J. Biol. Macromol.* **262** (2024) 130068
86. P. A. Carter *et al.*, *Nature* **407** (2000) 340–8
87. I. H. Maxwell, *Biochim. Biophys. Acta* **138** (1967) 337–46
88. K. M. Bhattacharjee, Antibiotics That Inhibit Nucleic Acid Synthesis. In: *Chemistry of Antibiotics and Related Drugs*, Springer, 2016, 109–128
89. E. K. Schroeder *et al.*, *Curr. Pharm. Biotechnol.* **3** (2002) 197–225
90. B. Hajian *et al.*, *Cell Chem. Biol.* **26** (2019) 781–91
91. R. Mackieth *et al.*, *Antibiotics* **12** (2023) 650–75
92. B. Weisblum, *Antimicrob. Agents Chemother.* **39** (1995) 577–85
93. J. B. Williams, *Br. J. Biomed. Sci.* **53** (1996) 290–3
94. R. C. Woese *et al.*, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64** (2000) 202–36
95. S. G. Park *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105** (2008) 11043–9
96. T. Mukai *et al.*, *Front. Genet.* **12** (2021) 794509
97. W. Wan *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta.* **1844** (2014) 1059–70

98. J. E. Wimmer, *et al.*, *Front. Microbiol.* **12** (2021) 759359
99. G. Eriani *et al.*, *Nature* **347** (1990) 203–6
100. L. Ribas DePouplana, P. Schimmel, *Cell* **104** (2001) 191–3
101. I. Gruic-Sovulj *et al.*, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **57** (2022) 1–15
102. O. Nureki *et al.*, *Science* **280** (1998) 578–82
103. P. Brick *et al.*, *J. Mol. Biol.* **208** (1989) 83–98
104. M. Y. Rybak *et al.*, *Nucleic Acid Res.* **47** (2019) 9777–88
105. F. Jühling *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **37** (2009) D159–D162
106. C. H. F. Crick, *Symp. Soc. Exp. Biol.* **12** (1958) 138–63
107. M. B. Hoagland *et al.*, *J. Biol. Chem.* **231** (1958) 241–57
108. R. W. Holley *et al.*, *J. Biol. Chem.* **240** (1965) 2122–8
109. M. Singer, *Science* **162** (1968) 433–6
110. D. J. Robertus *et al.*, *Nature* **250** (1974) 546–51
111. M. Y. Yared *et al.*, *Genes* **15** (2024) 374
112. B. El Yacoubi *et al.*, *Annu. Rev. Genet.* **46** (2012) 69–95
113. J. P. Beuning, K. Musier-Forsyth, *Biopolymers* **52** (1999) 1–28
114. J. J. Perona, M. Y. Hou, *Biochemistry* **46** (2007) 10419–32
115. L. L. Kisselev, *Nucleic Acid Res.* **32** (1985) 237–66
116. M. D. Crothers *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **69** (1972) 3063–7
117. J. Normanly *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **89** (1992) 5680–4
118. M. I. Valencia-Sánchez *et al.*, *J. Biol. Chem.* **291** (2016) 14430–46
119. S. Bilokapic *et al.*, *EBMO J.* **25** (2006) 2498–509
120. Y. Yeremchuk *et al.*, *J. Mol. Biol.* **309** (2001) 989–1002
121. G. H. Pearson, *J. Am. Chem. Soc.* **85** (1963) 3533–9
122. K. J. Newberry *et al.*, *EMBO J.* **21** (2002) 2778–87
123. M. Bilus *et al.*, *J. Mol. Biol.* **431** (2019) 1284–97
124. R. B. Loftfield, D. Vanderjagt, *Biochem. J.* **128** (1972) 1353–6
125. M. Dulic *et al.*, *J. Biol. Chem.* **285** (2010) 23799–809
126. H Roy *et al.*, *EMBO J.* **23** (2004) 4639–48
127. T. Crepin *et al.*, *Structure* **14** (2006) 1511–25
128. Ahel *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **100** (2003) 15422–7
129. P. O'Donoghue, Z. Luthey-Schulten, *Microbiol. Mol. Rev.* **67** (2003) 550–73

130. D. Hoepfner *et al.*, *Cell. Host. Microb.* **11** (2012) 654–63
131. P. Fang *et al.*, *Chem. Biol.* **22** (2015) 734–44
132. M. Sajish, P. Schimmel, *Nature* **519** (2015) 370–3
133. D. Tworowski *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **112** (2015) 3967–72
134. L. F. Rock *et al.*, *Science* **316** (2007) 1759–61
135. T. L. Keller, *Nat. Chem. Biol.* **8** (2012) 311–7
136. A. Brkic *et al.*, *Nat. commun.* **14** (2023) 5498
137. Y. X. Yu *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **9** (1999) 375–80
138. K. Severinov, S. K. Nair, *Future Microbiol.* **7** (2012) 281–9
139. B. Cheng *et al.*, *J. Med. Chem.* **65** (2022) 15840–55
140. J. Berger *et al.*, *Arc. Biochem.* **22** (1949) 476–8
141. Y. M. Gao *et al.*, *J. Agric. Food Chem.* **60** (2012) 9874–81
142. K. Otoguru *et al.*, *J. Antibiot.* **56** (2003) 727–9
143. T. Wakabayashi *et al.*, *J. Antibiot.* **50** (1997) 671–6
144. L. Dickinson *et al.*, *Nature* **206** (1985) 265–8
145. P. Fang *et al.*, *Nat. Commun.* **6** (2015) 6402
146. O. Shittu *et al.*, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **12** (2022) 860163
147. A. Chen *et al.*, IleRS in complex with a tRNA site inhibitor, 2021, DOI: <https://doi.org/10.2210/pdb7D5C/pdb>
148. S. Chung *et al.*, *Cells* **43** (2020) 350–9
149. B. Chen *et al.*, *Nat. commun.* **12** (2021) 1616
150. T. Yangisawa *et al.*, *J. Biol. Chem.* **269** (1994) 24304–9
151. M. Dulic *et al.*, *Biochemistry* **53** (2014) 6189–98
152. X. Chen *et al.*, *FEBS Lett.* **598** (2024) 521–36
153. E. Schmidt, P. Schimmel, *Science* **264** (2004) 265–7
154. I. Zivkovic *et al.*, *Nucleic Acid Res.* **50** (2022) 4029–41
155. A. Soma *et al.*, *Mol. cell* **12** (2023) 689–98
156. N. Cvetešić, Kloniranje, prekomjerna ekspresija te pročišćavanje molekula tRNA^{lle} i tRNA^{Val} iz bakterije *Escherichia coli*, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2010, 1–93
157. H. Shiozawa *et al.*, *J. Antibiot.* **46** (1993) 1834–42
158. R. O. Nicholas *et al.*, *J. Antimicrob. Chemother.* **43** (1999) 579–92

159. F. L. Silvan *et al.*, *Science* **285** (1999) 1074–7
160. J. Gilbert *et al.*, *Antimicrob. Agents. Chemother.* **37** (1993) 32–8
161. J. Gisby, J. Bryant, *Antimicrob. Agents. Chemother.* **44** (2000) 255–60
162. The UniProt Consortium, *Nucleic Acids Res.* **51** (2023) D523–D531
163. F. S. Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* **215** (1990) 403–10
164. C. S. Potter, *Nucleic Acids Res.* **46** (2018) W200–4
165. S. Mistry *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **49** (2020) D412–19
166. L. Fu *et al.*, *Bioinformatics* **28** (2012) 3150–2
167. K. Katoh *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **30** (2022) 3059–66
168. S. Capella-Gutiérrez *et al.*, *Bioinformatics* **25** (2009) 1972–3
169. N. M. Price *et al.*, *Mol. Biol. Evol.* **26** (2009) 1641–50
170. I. Letunic, P. Bork, *Nucleic Acids Res.* **49** (2021) W293–6
171. J. F. Sambrook, D. W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, 1–34
172. A. Novick, *Annu. Rev. Microbiol.* **9** (1955) 97–110
173. H. Inoue *et al.*, *Gene* **96** (1990) 23–8
174. M. R. Green, J. Sambrook, *Cold. Spring. Harb. Protoc.* **4** (2017) 3450–9
175. B. Matlock, Assessment of Nucleic Acid Purity, Technical Note 52646, *Thermo Fisher Scientific*, Wilmington, MA, USA, 1–3
176. W. W. Wilfinger *et al.*, *BioTechniques* **22** (1997) 474–81
177. K. Kadri, Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. *IntechOpen* (2020), DOI: 10.5772/intechopen.86491.
178. C. W. Dieffenbach *et al.*, General Concepts for PCR Primer Design u PCR Primer, A Laboratory Manual, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York, 1995, 133–155
179. W. A. Kibbe, *Nucleic Acids Res.* **35** (2007) W43–6
180. A. Pingoud, A. Jeltsch, *Nucleic Acid. Res.* **29** (2001) 3705–27
181. R. L. Olsen *et al.*, *Comp. Biochem. Physiol.* **99B** (1991) 755–61
182. A. H. Lund, M. Duch, *Nucleic Acids Res.* **24** (1996) 800–1
183. A. J. Wells *et al.*, *Gene* **34** (1985) 315–23
184. T. Oshima *et al.*, *Int. J. Syst. Bacteriol.* **24** (1974) 102–12
185. A. Thorat *et al.*, *Control. Release* **23** (2020) 591–9
186. E. Cao *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.* **82** (2003) 684–90

187. Thermo Fisher Scientific, T042-TECHNICAL BULLETIN, NanoDrop Spectrophotometers, Rev 3/09, 1–26
188. I. R. Krauss *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.* **14** (2013) 11643–91
189. T. Bergfors, *J. Struct. Biol.* **142** (2003) 66–76
190. E. K. Yan *et al.*, *RSC Adv.* **5** (2015) 26163–74
191. H Babich *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* **36** (1978) 906–14
192. H. P. Sorensen *et al.*, *J. Biotechnol.* **115** (2005) 113–28
193. D. J. Klein, *RNA* **10** (2004) 1366–79
194. R. Movy *et al.*, *InNovations* **12** (2001) 1–3
195. R. Novy *et al.*, *InNovations* **13** (2001) 1–3
196. J. M. Walker, *The Protein Protocols Handbook*. Third Edition, 2009, New York, Springer-Verlag New York LLC, 1–1172.
197. R. Fukunaga *et al.*, *J. Biol. Chem.* **279** (2004) 8396–402
198. L. Vera *et al.*, *Cryst. Growth Des.* **11** (2011) 2755–62
199. W. Wang *et al.*, *Int. J. Pharm.* **390** (2010) 89–99
200. J. T. Borgford *et al.*, *Biochemistry* **26** (1987) 7246–50
201. J. R. Leatherbarrow *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82** (1985) 7840–4
202. M. Dulić, Oprečne katalitičke aktivnosti unutar sintetskoga mjesta izoleucil-tRNA-sintetaze iz bakterije *Escherichia coli*, Doktorska disertacija, 2012, Prirodoslovno-matematički fakultet, 1–150
203. N. D. Clarke *et al.*, *Science* **240** (1988) 521–3
204. R. A. Fersht, *Biochemistry* **26** (1987) 8031–7
205. C. G. Darwin, *Lond. Edinb. Dublin Philos. Mag. J. Sci.* **6** (2009) 800–29
206. N. M. Scarborough *et al.*, *J. Synchrotron Rad.* **24** (2017) 188–95
207. W. Kabsch, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66** (2010) 125–32
208. G. M. Rossmann, *Acta Crystallogr.* **D57** (2001) 1360–6
209. A. J. McCoy *et al.*, *J. Appl. Cryst.* **40** (2007) 658–74
210. J. Agirre *et al.*, *Acta. Cryst.* **D79** (2023) 449–61
211. wwPDB consortium, *Nucleic Acids Res.* **47** (2019) D520–8
212. A. Brkić *et al.*, *Priestia megaterium* mupirocin-sensitive isoleucyl-tRNA synthetase 1 complexed with an isoleucyl-adenylate analogue, 2023, DOI: <https://doi.org/10.2210/pdb8C9E/pdb>

213. A. Brkic *et al.*, *Priestia megaterium* mupirocin-resistant isoleucyl-tRNA synthetase 2 complexed with mupirocin, 2023, DOI: <https://doi.org/10.2210/pdb8C8U/pdb>
214. A. Brkic *et al.*, *Priestia megaterium* mupirocin hyper-resistant HIGH motif mutant of type 2 isoleucyl-tRNA synthetase complexed with an isoleucyl-adenylate analogue, 2023, DOI: <https://doi.org/10.2210/pdb8C8W/pdb>
215. P. Emsley *et al.*, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66** (2010) 486–501.
216. D. Liebschner, *Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol.* **75** (2019) 861–77
217. M. D. Winn, *Acta Crystallogr. D Biol.* **57** (2001) 122–33
218. J. Painter, E. A. Merritt, *Acta Cryst.* **D62** (2006) 439–50
219. J. Painter, E. A. Merritt, *J. Appl. Cryst.* **39** (2006) 109–11
220. O. Carugo, *BMC Bioinformatics* **19** (2018) 1–9
221. J. Jumper *et al.*, *Nature* **596** (2021) 583–9
222. E. A. Merritt, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **68** (2012) 486–77
223. A. Mateja *et al.*, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **58** (2002) 1983–91
224. S. M. Garrard *et al.*, *Prot. Expr. Purif.* **21** (2001) 412–6
225. S. Munshi *et al.*, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **59** (2003) 1725–30
226. B. Chen *et al.*, *Nat. Commun.* **15** (2024) 10817
227. T. Kobayashi *et al.*, *J. Mol. Biol.* **346** (2005) 105–7
228. D. E. Otzen, *Biophysics J.* **83** (2002) 2219–30
229. U. Derewenda *et al.*, *Structure* **12** (2004) 301–6
230. R. A. Fersht *et al.*, *Nature* **314** (1985) 235–8
231. R. A. Fersht, *Trends Biochem. Sci.* **12** (1987) 301–4
232. C. Setoyama *et al.*, *J. Biochem.* **131** (2002) 59–69
233. H. Huang *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **130** (2008) 6080–1
234. H. R. Lee *et al.*, *J. Biol. Chem.* **283** (2008) 14411–6
235. D. Bradley *et al.*, *Cell Rep.* **34** (2021) 108602
236. I. F. Trope *et al.*, *Biophys. Comput. Biol.* **104** (2007) 8821–6
237. E. D. Koshland, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **44** (1958) 98–104
238. B. Ma *et al.*, *Protein Eng.* **12** (1999) 713–20
239. F. Paul, T. Weikl, *PLoS Comput. Biol.* **12** (2016) e1005067
240. T. M. Schmeing, *Nature* **438** (2004) 520–4
241. B. Moscato *et al.*, *Biochemistry* **55** (2016) 382–95

-
242. F. Krieger *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2005) 3346–52
243. A. Chikunova, M. Ubbink, *Protein Sci.* **31** (2022) e4328
244. A. Heras *et al.*, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **61** (2005) 1173–80
245. Q. Huang *et al.*, *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.* **72** (2016) 152–9
246. B. Heras *et al.*, *Structure* **11** (2003) 139–45
247. R. W. Mauer, *Biophys. Chem.* **156** (2011) 72–8

§ 8. ŽIVOTOPIS

Datum i mjesto rođenja:

3. studenog 1995., Zenica, Bosna i Hercegovina

Obrazovanje:

- 2010.–2014.** Srednjoškolsko gimnazijsko obrazovanje, Franjevačka klasična gimnazija, Visoko, Bosna i Hercegovina
- 2014.–2017.** Sveučilišni preddiplomski studij kemije, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Republika Hrvatska
- 2017.–2019.** Sveučilišni diplomski studij kemije, smjerovi: analitička kemija i biokemija, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Republika Hrvatska
- 2019.–** Sveučilišni poslijediplomski doktorski studij kemije, smjer: biokemija, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Republika Hrvatska

Nagrade i priznanja:

- 2017.** Završetak preddiplomskog sveučilišnog studija *Magna cum laude*
- 2019.** Prijevremeni završetak diplomskog sveučilišnog studija *Summa cum laude*
- 2019.** Medalja kemijskog odsjeka za akademsku izvrsnost
- 2019.** Nagrada fakulteta za najboljeg studenta diplomskih studija za akademsku godinu 2018./2019.

Ocjenski radovi:

- 2017.** Završni rad: Aminoacil-tRNA-sintetaze kao mete antibiotika, mentorica: prof. dr. sc. Ita Gruić Sovulj
- 2019.** Diplomski rad: Utjecaj mistranslacije na stabilnost modelnih proteina u staničnom ekstraktu, mentori: prof. dr. sc. Ita Gruić Sovulj, doc. dr. sc. Marko Močibob

Sudjelovanje na projektima:

2019.–2022. Investigation of substrate and editing specificity of aminoacyl-tRNA synthetases and the mechanism of antibiotic action, IZHRO 180567, HRZZ / SNSF, nositelji: prof. dr. sc. Ita Gruić Sovulj, prof. dr. sc. Nenad Ban

Stručna usavršavanja:

02.–04.2021., Usavršavanje u polju proteinske kristalografije i rendgenske difrakcije na
09.–11.2020., makromolekulskim monokristalima u grupi profesora Nenada Bana, ETH
02.–03.2021. Zürich, Zürich, Švicarska.

Zaposlenje:

2019.–2022. Asistent, Zavod za biokemiju, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
2022.–2023. Servisni i aplikativni inženjer, KemoLab d.o.o.
2023.– Servisni inženjer, Analysis Adria d.o.o.

Popis znanstvenih publikacija:

1. **A. Brkić**, M. Leibundgut, J. Jablonska, V. Zanki, Z. Car, V. Petrovic-Perokovic, A. Marsavelski, N. Ban, I. Gruic-Sovulj, Antibiotic hyper-resistance in a class I aminoacyl-tRNA synthetase with altered active site signature motif, *Nat. Commun.* **14** (2023) 5498

Popis posterskih priopćenja:

1. **A. Brkić**, B. Božić, M. Leibundgut, N. Ban, I. Gruić Sovulj, Structure of a bacterial full-length type 2 IleRS reveals the C-terminal tRNA-binding domain insertion dispensable for aminoacylation, *45th FEBS Congress, Molecules of Life: Towards New Horizons*, 3. - 8. 7.2021., FEBS Open Bio, Ljubljana, Slovenia
2. **A. Brkić**, M. Leibundgut, N. Ban, I. Gruić Sovulj, Structure of a bacterial full-length type 2 isoleucyl-tRNA synthetase reveals the C-terminal tRNA-binding domain, *Virtual symposium celebrating the 50th anniversary of the Protein Data Bank*, Protein Data Bank, 4.–5. 5. 2021., Virtualno, Sjedinjene Američke Države

3. A. Brkić, M. Leibundgut, N. Ban, I. Gruić Sovulj, Novel insights into structural basis of antibiotic resistance in type II isoleucyl-tRNA synthetases, *Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a*,: Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 24.–25. 4. 2021, Zagreb, Republika Hrvatska
4. A. Brkić, M. Leibundgut, N. Ban, I. Gruić Sovulj, A new insight into mupirocin resistance of bacterial isoleucyl-tRNA synthetases, *5th Mini Symposium of Section of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*, Sekcija za medicinsku i farmaceutsku kemiju HKD-a, 30.11.2021., Zagreb, Republika Hrvatska
5. P. Kozulić, A. Brkić, M. Leibundgut, N. Ban, I. Gruić Sovulj, Unique recognition of tRNA^{Ile} by isoleucyl-tRNA synthetase type 2 in *Priestia megaterium*, *FEBS3+ Meeting: Exploring molecular frontiers, HDBMB*, 25.–28.09.2024., Pula, Republika Hrvatska
6. P. Kozulić, A. Brkić, M. Leibundgut, N. Ban, I. Gruić Sovulj, Crucial residues for *in vitro* and *in vivo* function of *Priestia megaterium* isoleucyl-tRNA synthetase type 2, *8th Mini Symposium of Section of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*, 19.11. 2024, Sekcija za medicinsku i farmaceutsku kemiju HKD-a ,Zagreb, Republika Hrvatska
7. P. Kozulić, A. Brkić, M. Leibundgut, N. Ban, I. Gruić Sovulj, Molecular recognition of tRNA^{Ile} by the *Priestia megaterium* isoleucyl-tRNA synthetase type 2, *Summer Conference of Croatian Chemical Society Rijeka*, Hrvatsko kemijsko društvo Rijeka, 5.–6.9. 2024., Pula, Republika Hrvatska