

Kloniranje, prekomjerna ekspresija te pročišćavanje molekula tRNA^{Le} i tRNA^{Val} iz bakterije *Escherichia coli*

Cvetešić, Nevena

Master's thesis / Diplomski rad

2010

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:382704>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-14**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Nevena Cvetešić

**Kloniranje, prekomjerna ekspresija te proučavanje
molekula tRNA^{Ile} i tRNA^{Val} iz bakterije Escherichia coli**

Diplomski rad

Zagreb, 2010. godina

Ovaj rad, izrađen na Zavodu za biokemiju Kemiskog odsjeka pod neposrednim vodstvom i mentorstvom doc. dr. sc. Ite Grui -Sovulj, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

ZAHVALE

Puno vremena i truda uloženo je u eksperimentalni dio ovog diplomskog rada...

Nešto „malo“ manje vremena uloženo je u njegovo pisanje...

No, ništa ne bi bilo moguće bez podrške koja mi je pružena tijekom cjelokupne izrade rada...

Najiskrenije hvala:

Mojoj mentorici Iti...kad bih nabrojala sve načine sam joj zahvalna, zasigurno bih udvostručila broj stranica ovog rada...stoga...hvala za najvažniju pouku – da je svaki rad prazan...ako nema ljubavi...

Morani...uz koju sam napravila prve eksperimentalne korake...i koja je još uvijek tu kad se spotaknem...

Svim lanoima Zavoda za biokemiju - na znanstvenom, ali i neznanstvenom odgoju, brojnim savjetima, ugodnoj atmosferi u kojoj su imati prilike uživati još nekoliko godina i na uvijek prisutnoj podršci – pogotovo kad eksperimenti jednostavno nisu išli...

A to su:

Jelena, Marko, Jasmina, Nina i Mirela - s „naše“ strane hodnika...

Ana, Mario, Vlatka i Sonja - s „one druge“ strane hodnika...

Željka - bez koje bi eksperimentalni život bio znatno teži...

Vedranu...jer je uvijek tu...ili dva kata niže...

Tati...koji podržava i razumije moje izbjivanje iz svakodnevnog života...

Mami...

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveu ilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matemati ki fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

**Kloniranje, prekomjerna ekspresija te pro iš avanje
molekula tRNA^{Ile} i tRNA^{Val} iz bakterije Escherichia coli**

Nevena Cveteši

Biološki odsjek, Prirodoslovno-matemati ki fakultet, Sveu ilište u Zagrebu,
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

Aminoacil-tRNA-sintetaze su enzimi koji kataliziraju nastajanje kovalentne veze izme u pripadnog para aminokiseline i molekule transfer tRNA (tRNA). Budu i da je to nast aminoaciliranja temeljni preduvjet za vjeran prijenos geneti ke informacije, ti enzimi su razvili mehanizme popravka kako bi uklonili pogreške nastale prilikom aktivacije nepripadne aminokiseline (popravak prije prijenosa), odnosno prijenosa pogrešne aminokiseline na tRNA (popravak poslije prijenosa). tRNA vrlo esto poti e popravak prije prijenosa aminokiseline ali mehanizam tog procesa još nije poznat. U nekim slu ajevim tRNA (npr. tRNA^{Ile}) mora sadržavati potranskripcijske modifikacije kako bi mogla poticati reakciju popravka.

Velike koli ine biološki aktivne tRNA potrebne su za istraživanja mehanizma tRNA-ovisnog popravka izoleucil- i valil-tRNA-sintetaze. Prije eni su rekombinantni plazmidi za prekomjernu ekspresiju tRNA^{Ile} i tRNA^{Val} pod kontrolom jakog T7 promotora. Optimiran je sustav za preparativnu proizvodnju molekula tRNA *in vivo* i razvijena je brza i efikasna metoda pro iš avanja posttranskripcijski modificirane tRNA kromatografijom obrnutih faza. Metodama enzimske kinetike istražena su svojstva pripravljenih tRNA.

Rad sadrži: XII + 78 stranica, 31 sliku, 7 tablica, 75 literurnih navoda, jezik izvornika: hrvatski

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Klju ne rije i: tRNA, aminoacil-tRNA-sintetaze, mehanizmi popravka pogreške, kromatografija obrnutih faza, posttranskripcijske modifikacije

Voditelj: Dr. sc. Ita Grui -Sovulj, doc.

Ocenitelji: Dr. sc. Ita Grui -Sovulj, doc.
Dr. sc. Kristian Vlahovi ek, izv. prof.
Dr. sc. Željka Vidakovi -Cifrek, doc.

Rad

prihvá en:

27.

09.

2010.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Cloning, overexpression and purification of Escherichia coli tRNA^{Ile} and tRNA^{Val}

Nevena Cveteši

Department of Biology, Faculty of Science, University of Zagreb,
Roosevelt square 6, 10000 Zagreb

Aminoacyl-tRNA synthetases (aaRS) are enzymes that covalently join amino acids with their cognate transfer RNAs (tRNAs). As highly accurate aminoacyl-tRNA synthesis is a prerequisite for the precise transmission of genetic information, some aaRSs have developed editing mechanisms to correct initial errors in amino acid activation (pre-transfer) or aminoacyl-tRNA formation (post-transfer). tRNA often stimulates pre-transfer editing by a yet unknown mechanism. In some cases, tRNA has to be posttranscriptionally modified (tRNA^{Ile} for example) in order to stimulate editing.

Large amounts of biologically active tRNAs are needed to conduct detailed kinetic studies of tRNA-dependent editing by isoleucyl- and valyl-tRNA synthetases. Recombinant plasmids for *in vivo* overexpression of tRNA^{Ile} and tRNA^{Val} under control of T7 strong promotor have been produced. The overexpression has been optimized for preparative purposes and an efficient purification method by reverse phase chromatography has been developed for purification of posttranscriptionally modified tRNAs. The properties of obtained tRNAs were assessed by enzyme kinetics.

The thesis has XII + 78 pages, including 31 figures, 7 tables, 75 references, original in Croatian

Thesis deposited in the Central biological library

Key words: tRNA, aminoacyl-tRNA synthetases, editing mechanisms, reverse phase chromatography, posttranscriptional modifications

Supervisor: Dr. sc. Ita Grui -Sovulj, Asst. Prof.

Reviewers: Dr. sc. Ita Grui -Sovulj, Asst. Prof.
Dr. sc. Kristian Vlahovićek, Assoc. Prof.
Dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, Asst. Prof.

Thesis

accepted:

27.

09.

2010.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Aminoacil-tRNA-sintetaze.....	1
1.1.1. Reakcija aminoaciliranja.....	2
1.2. Transfer RNA.....	4
1.2.1. Elementi identiteta	7
1.2.2. Posttranskripcjska dorada tRNA.....	7
1.2.2.1. Dorada 5'-kraja tRNA	8
1.2.2.2. Dorada 3'-kraja tRNA	9
1.2.2.3. Modifikacije nukleozida tRNA	11
1.2.3. tRNA ^{Ile} iz bakterije <i>Escherichia coli</i>	12
1.2.4. tRNA ^{Val} iz bakterije <i>Escherichia coli</i>	15
1.3. Mehanizmi popravka pogreške	17
1.4. Metode proizvodnje i pro iš avanja tRNA	19
1.4.1. Metode proizvodnje tRNA.....	19
1.4.2. Metode pro iš avanja tRNA.....	20
1.5. Cilj rada	23
2. MATERIJALI I METODE.....	25
2.1. Materijali	25
2.1.1. Standardne kemikalije.....	25
2.1.2. Aminokiseline i nukleotidi.....	25
2.1.3. Boje	25
2.1.4. Enzimi, proteini i nukleinske kiseline.....	26
2.1.5. Komercijalni kompleti za pro iš avanje DNA	26
2.1.6. Hranjive podloge i medij za uzgoj bakterije <i>E. coli</i>	26
2.1.7. Sojevi i plazmidi <i>E. coli</i>	26
2.1.8. Kromatografske kolone, punila i ostali kromatografski materijali	30
2.2. Metode.....	30
2.2.1. Metode rada s DNA	30

2.2.1.1.	Konstrukcija i kloniranje sintetskih gena za tRNA	30
2.2.1.2.	Kloniranje gena za <i>E. coli</i> ValRS	31
2.2.1.3.	Agarozna gel-elektroforeza	33
2.2.1.4.	Izolacija plazmidne DNA	33
2.2.1.5.	Restrikcijska analiza plazmidne DNA	34
2.2.1.6.	Određivanje nukleotidnog slijeda DNA – sekvenciranje	35
2.2.1.7.	Transformacija stanica <i>E. coli</i> elektroporacijom	35
2.2.2.	Metode rada s proteinima.....	36
2.2.2.1.	Prekomjerna ekspresija proteina i priprema proteinskih ekstrakata	36
2.2.2.2.	Protišavanje proteina afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarazi	37
2.2.2.3.	Denaturirajuća poliakrilamidna gel-elektroforeza u prisutnosti natrijevog dodecilsulfata (SDS-PAGE)	38
2.2.2.4.	Bojanje SDS-poliakrilamidnih gelova bojom <i>Coomassie Brilliant Blue</i>	39
2.2.2.5.	Ugušivanje proteina ultrafiltracijom	39
2.2.2.6.	Određivanje koncentracije proteina	39
2.2.3.	Metode rada s tRNA	40
2.2.3.1.	Transkripcija molekula tRNA <i>in vitro</i>	40
2.2.3.2.	Protisiavanje transkriptata ionskom izmjenom na stupcu DEAE-celuloze	40
2.2.3.3.	Poliakrilamidna gel-elektroforeza u denaturirajućim uvjetima	41
2.2.3.4.	Bojanje poliakrilamidnih gelova toluidinom	41
2.2.3.5.	Određivanje koncentracije nukleinskih kiselina	42
2.2.3.6.	Prekomjerna ekspresija molekula tRNA <i>in vivo</i>	42
2.2.3.7.	Izolacija ukupne tRNA	43
2.2.3.8.	Razdvajanje molekula tRNA kromatografijom obrnutih faza	44
2.2.3.9.	Reakcija aminoaciliranja	45
2.2.3.10.	Reakcija popravka pogreške: test utroška ATP-a	46
3.	REZULTATI.....	48
3.1.	Konstrukcija rekombinantnog plazmida za ekspresiju ValRS iz <i>E. coli</i>	48
3.2.	Protisiavanje enzima ValRS iz bakterije <i>E. coli</i>	50
3.3.	Proizvodnja tRNA transkripcijom <i>in vitro</i> i protisiavanje na stupcu DEAE-celuloze .	53

3.4. Konstrukcija rekombinantnih plazmida za ekspresiju molekula tRNA ^{Ile} i tRNA ^{Val} <i>in vivo</i>	54
3.5. Prekomjerna ekspresija tRNA i određivanje udjela molekula tRNA ^{Ile} ili tRNA ^{Val}	56
3.6. Analiza ukupne tRNA s prekomjerno eksprimiranom tRNA ^{Ile} kromatografijom obrnutih faza	58
3.7. Preparativno pravljanje molekula tRNA ^{Ile} kromatografijom obrnutih faza	59
3.8. Kinetička karakterizacija frakcija.....	61
4. RASPRAVA.....	65
5. ZAKLJUČAK	70
6. LITERATURA.....	71
7. ŽIVOTOPIS	XI

POPIS KRATICA I SIMBOLA

Popis aminokiselina

simbol	aminokiselina
Ala (A)	<i>alanin</i>
Cys (C)	<i>cistein</i>
Asp (D)	<i>asparaginska kiselina</i>
Glu (E)	<i>glutaminska kiselina</i>
Phe (F)	<i>fenilalanin</i>
Gly (G)	<i>glicin</i>
His (H)	<i>histidin</i>
Ile (I)	<i>izoleucin</i>
Lys (K)	<i>lizin</i>
Leu (L)	<i>leucin</i>
Met (M)	<i>metionin</i>
Asn (N)	<i>asparagin</i>
Pro (P)	<i>prolin</i>
Gln (Q)	<i>glutamin</i>
Arg (R)	<i>arginin</i>
Ser (S)	<i>serin</i>
Thr (T)	<i>treonin</i>
Val (V)	<i>valin</i>
Trp (W)	<i>tryptofan</i>
Tyr (Y)	<i>tirozin</i>

Popis kratica

aaRS: aminoacil-tRNA-sintetaza

aa-AMP: aminoacil-adenilat

AMP: adenozin-5'-monofosfat

ATP: adenozin-5'-trifosfat

BSA: albumin gove eg seruma, eng. *bovine serum albumine*

CP1: *connective peptide I*

cpm: broj udaraca u minuti, eng. *counts per minute*

DEAE-celuloza: dietilaminoetil-celuloza

DTT: ditiotreitol

EDTA: etilendiamintetraoctena kiselina

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

IPTG: izopropil- -tiogalaktozid

L: lizidin

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

Ni-NTA: nikal-nitrilotrioceta kiselina

PCR: lan ana reakcija polimeraze, eng. *polymerase chain reaction*

PEG 8000: polietilenglikol 8000

PMSF: fenilmetsulfonil-fluorid

SDS: natrijev dodecilsulfat

SDS-PAGE: elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecilsulfata

tRNA: transfer RNA

t⁶A₃₇: treonilkarbamoil-adenozin

TCA: trikloroctena kiselina

Tris: Tris(hidroksimetil)-aminometan

1. UVOD

1.1. Aminoacil-tRNA-sintetaze

Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) su enzimi koji kataliziraju esterifikaciju tRNA pripadnom aminokiselinom (Ibba i Söll 2001). Zbog strukturnih i mehanističkih razloga grupiraju se u dva razreda po deset lanova (Eriani i sur. 1990). Svaka aaRS može se svrstati u jedan od dva razreda, a jedina do sada poznata iznimka je lizil-tRNA-sintetaza (LysRS) koja temeljno pripada razredu II, ali kod većine arheja i nekih bakterija svrstava se u razred I (Ibba i sur. 1997, Ambrogelly i sur. 2002). AaRS razreda I uglavnom su monomeri (izuzetak su TyrRS i TrpRS), dok su aaRS razreda II uglavnom homo- ili heterodimeri (tablica 1.1.).

Tablica 1.1. Podjela aminoacil-tRNA-sintetaza na dva razreda.

Razred I Kvaterna struktura	Razred II Kvaterna struktura
Glu	Gly 2 2
Gln	Ala 4
Arg	Pro 2
Cys 2	Ser 2
Met 2	Thr 2
Val	His 2
Ile	Asp 2
Leu	Asn 2
Tyr 2	Lys 2
Trp 2	Phe 2 2

Aktivno mjesto aaRS razreda I sastavljeno je od dva slijedna uzastopna motiva - - koji čine šesterolan anu paralelnu strukturu poznatu kao Rossmann-ova struktura. U njihovom aktivnom mjestu očuvana su dva aminokiselinska slijeda: motivi KMSKS i HIGH. Strukturna specifičnost aminoacil-tRNA-sintetaza razreda II nije tri izrazito očuvana motiva. Motiv 1 tvori površinu dodira podjedinica dimera, a motivi 2 i 3 su dijelovi aktivnog mjesta. Njihovo aktivno mjesto organizirano je kao šesterolan ana antiparalelna -ploča, čime ena s tri zavojnica (Eriani i sur. 1990).

Prema hipotezi adaptora, ve ina stanica trebala bi imati dvadeset aaRS, pri emu je pojedina specifi na samo za jednu aminokiselinu i jednu ili više pripadnih izoakceptorskih tRNA. Hipoteza je poduprta ranim istraživanjima na bakteriji *Escherichia coli*, no ubrzo je primije eno da pojedini predstavnici bakterijskog carstva ne posjeduju svih dvadeset aaRS (Ibba i sur. 2000). Naime, bakterijama i arhejama vrlo esto nedostaju GlnRS, AsnRS ili obje sintetaze, a Gln-tRNA^{Gln} i Asn-tRNA^{Asn} nastaju putem indirektne biosinteze (Rogers i Söll 1995, Curnow i sur. 1996). Pritom nediskriminiraju e GluRS i AspRS pogrešno aminoaciliraju, odnosno misaciliraju tRNA^{Gln} i tRNA^{Asn}, a nastaju Glu-tRNA^{Gln} i Asp-tRNA^{Asn}. Završni korak kataliziraju odgovaraju e amidotransferaze i dobivaju se ispravno aminoacilirane Gln-tRNA^{Gln} i Asn-tRNA^{Asn}. Zanimljiv izuzetak od pravila jedna aaRS za jednu aminokiselinu je i sintetaza s dvostrukom aminoacilacijskom aktivnoš u. Takozvana Pro-CysRS prona ena je kod nekih arheja i eukariota, a sposobna je aminoacilirati tRNA^{Pro} i tRNA^{Cys} s pripadnim aminokisinama (Stathopoulos i sur. 2000, Yarus i sur. 2000).

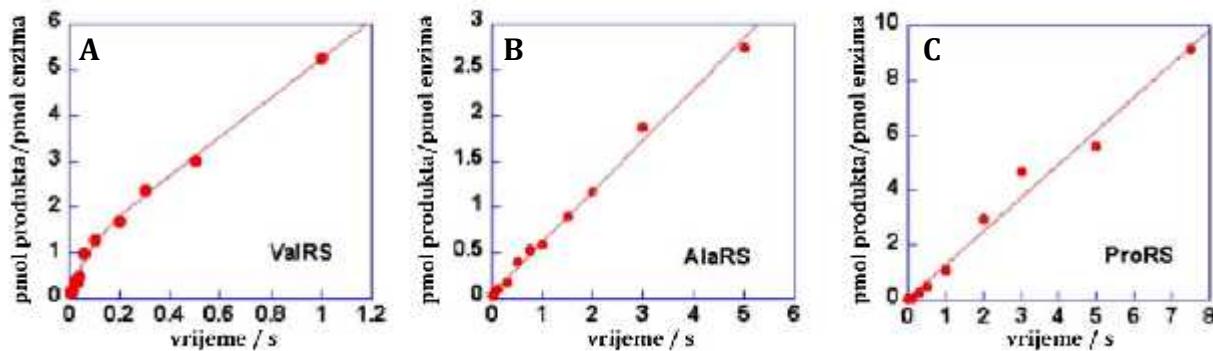
1.1.1. Reakcija aminoaciliranja

Aminoaciliranje je reakcija koja se odvija u dva stupnja. U prvom stupnju odvija se aktivacija aminokiseline - preciznim pozicioniranjem ATP-a i aminokiseline u aktivnom mjestu, omogu en je nukleofilni napad -karboksilne skupine aminokiseline na -atom fosfora ATP-a. Pritom nastaje miješani anhidrid aminoacil-adenilat (aa-AMP) uz osloba anje pirofosfata. Reakcija aktivacije kod svih aaRS, osim arginil-, glutamil-, glutaminil- i lizil-tRNA-sintetaze razreda I, može se odvijati u odsutnosti pripadne tRNA. Drugi stupanj podrazumijeva prijenos acilne skupine s aminoacil-adenilata na tRNA te obuhva a nukleofilni napad kisika iz 2' - ili 3' - OH skupine riboze krajnjeg adenozina 3'-kraja, na atom ugljika aminoacil-adenilata. Produkti reakcije aminoaciliranja su tRNA esterificirana na 3'-kraju aminokiselom i AMP kao izlazna skupina. Reakciju termodinamski povoljnom ini hidroliza pirofosfata oslobo enog prilikom aktivacije aminokiseline, koju katalizirana anorganska pirofosfataza.



Razlike izme u sintetaza razreda I i razreda II o ituju se u mehanisti kim detaljima reakcije aminoaciliranja. Naime, aaRS razreda I pozicioniraju 2'-OH skupinu krajnje riboze u neposrednu

blizinu karbonilnog ugljikovog atoma aminoacil-adenilata, stoga se aminokiselina veže na 2'-OH skupinu riboze, dok aaRS razreda II kataliziraju nastajanje 3'-estera aminokiseline i tRNA. Jedini izuzetak od tog pravila je PheRS koja, iako pripada razredu II, veže fenilalanin na 2'-OH skupinu riboze (Moras 1992). Nadalje, sintetaze razreda I vežu ATP u izduženoj konformaciji, dok sintetaze razreda II vežu ATP u savijenoj konformaciji, i to tako da je -fosfat ATP-a savijen prema adeninskoj bazi. Postoje razlike i u načinu vezanja tRNA - aaRS razreda I prilaze pripadnoj tRNA sa strane malog utora, a aaRS razreda II prilaze pripadnoj tRNA sa strane velikog utora (Arnez i Moras 1997). Dva razreda sintetaza razlikuju se i u kinetičkim detaljima reakcije aminoaciliranja. Za sintetaze razreda I specifična je takozvana kinetika „burst“-a, koja podrazumijeva akumulaciju produkta u aktivnom mjestu enzima. Vremenski tijek, odnosno krivulja nastanka produkta u vremenu specifična za kinetiku „burst-a“, sastoji se od eksponencijalnog i linearног dijela. Eksponencijalni dio odgovara prvom krugu katalize, dok linearni dio krivulje predstavlja višestruke obrtaje enzima i zapravo odgovara stacionarnom stanju. Koeficijent brzine dobiven iz nagiba linearног dijela trebao bi se podudarati s obrtnim brojem (k_{cat}) iz Michaelis-Menten kinetike stacionarnog stanja (Fersht 1999). „Burst“ produkta kod aaRS razreda I (vidi sliku 1.1. A) ukazuje na sporu disocijaciju aminoacilirane tRNA, koja zapravo ograničava brzinu regeneracije enzima i time određuje uje brzinu aminoaciliranja mjerenu u stacionarnom stanju, odnosno u uvjetima višestrukih obrtaja enzima (Zhang i sur. 2006).



Slika 1.1. Kinetika „burst“-a. A) *E. coli* ValRS. B) *E. coli* AlaRS. C) *Deinococcus radiodurans* ProRS. Preuzeto iz: Zhang C.M., Perona J.J., Ryu K., Francklyn C., Hou Y.M. (2006): Distinct kinetic mechanisms of the two classes of aminoacyl-tRNA synthetases. *J Mol Biol* 361: 300-311.

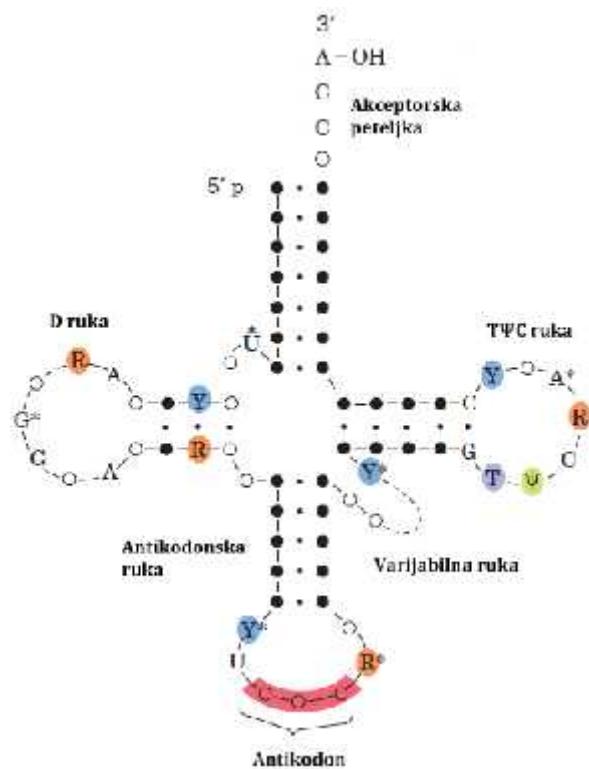
Zhang i sur. (2006) utvrdili su konstante disocijacije (K_d) za tRNA, odnosno aminoaciliranu tRNA te pokazali da je K_d za aminoacilirani produkt ak deset puta manji u odnosu na K_d za pripadni tRNA supstrat (K_d za binarni kompleks *E. coli* CysRS·Cys-tRNA^{Cys} je $0,3 \mu\text{mol dm}^{-3}$, dok je K_d za CysRS·tRNA^{Cys} $3,2 \mu\text{mol dm}^{-3}$). Time je potvrđeno da aaRS razreda I imaju visok afinitet prema produktu te da je disocijacija aminoacilirane tRNA najsporiji korak u mehanizmu aminoaciliranja. Za sintetaze razreda II utvrđeno je da ne pokazuju kinetiku „burst“-a (vidi sliku 1.1. B i C) te da je nasporiji korak koji uvjetuje brzinu aminoaciliranja u stacionarnom stanju, zapravo aktivacija aminokiseline, odnosno nastajanje aminoacil-adenilata (Zhang i sur. 2006).

1.2. Transfer RNA

Nakon otkrija molekule DNA kao nositelja genetičke upute, postavljene su brojne hipoteze kojima se nastojao objasniti prijenos informacija sadržanih u redoslijedu baza u redoslijed aminokiselina. Francis Crick je 1955. godine predložio teoriju o postojanju 20 adaptora (po 1 za svaku aminokiselinu) i 20 specijalnih enzima koji bi katalizirali sparivanje odgovarajućih aminokiselina i adaptora. Molekule RNA prepoznao je kao idealne posrednike između DNA svijeta i svijeta proteina zbog mogućnosti komplementarnog sparivanja duši u baza. Zatim su Paul Zamecnick i Mahlon Hoagland pokazali da se tijekom translacije radioaktivno obilježena aminokiselina ($[^{14}\text{C}]$ -leucin) veže za RNA niske molekulske mase i ubrzano ugrađuje u protein (Voet i Voet 2004). Njihovi rezultati pokrenuli su niz istraživanja kojima je dokazano da su male molekule RNA, danas poznate kao tRNA, zaista Crickovi adaptori u prijenosu genetičke informacije.

Zbog degeneriranosti genetičkog koda, za svaku aminokiselinu postoji skupina takozvanih izoakceptorskih tRNA u stanici. Pojedini izoakceptor tRNA antikodonom je komplementaran jednom ili više kodona aminokiseline za koju je specifičan. Većina tRNA sadrži 76 nukleotida, no taj broj varira od 54 pa sve do 100 nukleotida. U primarnoj strukturi svih do sada sekvenciranih tRNA postoji 15 nevarijabilnih položaja (uvijek sadrže istu bazu) i 8 poluvarijabilnih položaja (uvijek sadrže baze istog tipa, purine ili pirimidine) koji se većinom nalaze u području petlji (Voet i Voet, 2004). Sekundarna struktura oblika lista djeteline karakteristična je za sve tRNA molekule, a opisao ju je Robert Holley još 1965. godine prilikom istraživanja tRNA specifične za alanin (tRNA^{Ala}, *Saccharomyces cerevisiae*). U sekundarnoj strukturi svih tRNA postoje akceptorska petljka, D, antikodonska i T-C ruka te varijabilna

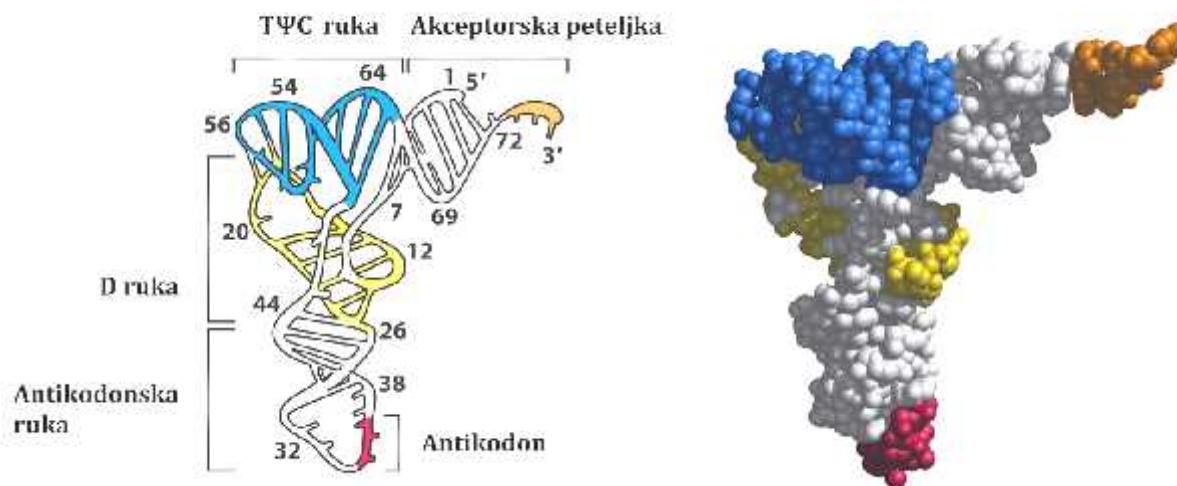
om a (slika 1.2.). Akceptorska peteljka sastoji se od 7 parova baza te sadrži 5'- i 3'-kraj tRNA. Na 3'-kraju nalazi se CCA slijed koji je u potpunosti o uvan kod svih tRNA. D ruku ine D peteljka sastavljena od 3 ili 4 para baza te om a u kojoj se pojavljuje modificirana baza dihidrouridin. Antikodonska ruka sastavljena je od peteljke duge 5 parova baza i om e koja sadrži triplet baza komplementaran kodonu. T C ruku gradi 5 parova baza duga peteljka sa završetkom u om i s T C slijedom, pri emu ozna ava pseudouridin. Varijabilna om a je mjesto najve e raznolikosti me u poznatim molekulama tRNA. Može sadržavati od 3 do 21 nukleotida te posjedovati peteljku dužine do 7 parova baza. Tako er, u peteljkama se esto pojavljuju neuobi ajeni parovi baza poput G·U, U·U, A·A, C·C, C·U ili G·A. Opisana sekundarna struktura toliko je o uvana da se može smatrati standardnom za sve tRNA (Schimmel i sur. 1979).



Slika 1.2. Sekundarna struktura tRNA. Puni krugovi povezani to kama predstavljaju Watson-Crickove parove baza, dok prazni krugovi predstavljaju baze koje sudjeluju u ostvarivanju neuobi ajenih interakcija. R i Y predstavljaju purinske i pirimidinske baze koje se nalaze na tim položajima unutar primarne strukture svih do sada poznatih molekula tRNA. Zvjezdicom su ozna ene baze koje su naj eš e modificirane. Preuzeto iz: Voet D., Voet J. G. (2004): Translation. In Voet D., Voet J.G. (eds): Biochemistry. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1285-1371.

Na temelju veli ine varijabilne ruke, molekule tRNA svrstavaju se u dva tipa. Tip 1 sa injavaju tRNA s kratkom varijabilnom rukom (4 ili 5 nukleotida), a tip 2 molekule tRNA s dugom varijabilnom rukom (13 do 21 nukleotid; Cavarelli i Moras 1993). Tipi ni predstavnici tRNA tipa 2 su tRNA^{Ser} i tRNA^{Leu}, dok kod nekih tRNA pripadnost pojedinom razredu ovisi o ishodišnom organizmu (npr. tRNA^{Tyr} iz *E. coli* pripada tipu 2, a kvaš eva tRNA^{Tyr} tipu 1).

Strukturno raznolikosti tRNA doprinose posttranskripcijske modifikacije baza - do danas ih je poznato više od osamdeset. Me utim, uloga svake pojedina ne modifikacije nije sasvim razjašnjena (Dunin-Horkawicz i sur. 2006). Poznato je da modifikacije pogoduju kompaktnosti nativne trodimenzionalne strukture, ali i da mogu imati ulogu u specifi nom prepoznavanju aaRS i pripadne tRNA (detaljnije o modifikacijama u poglavlju 1.2.2.3.). Usporedbom rješenih kristalnih struktura tRNA uo ena je o uvanost i tercijarne strukture. Molekula tRNA zauzima oblik L konformacije u kojoj jedan kraj ine akceptorska i T peteljka, a drugi D i antikodonska peteljka (slika 1.3.). U takvoj konformaciji CCA kraj i antikodon nalaze se na suprotnim krajevima molekule. Stabilnost tercijarne strukture osiguravaju vertikalne hidrofobne interakcije (eng. *base stacking*) koje se ostvaruju izme u baza te sparivanje baza vodikovim vezama.



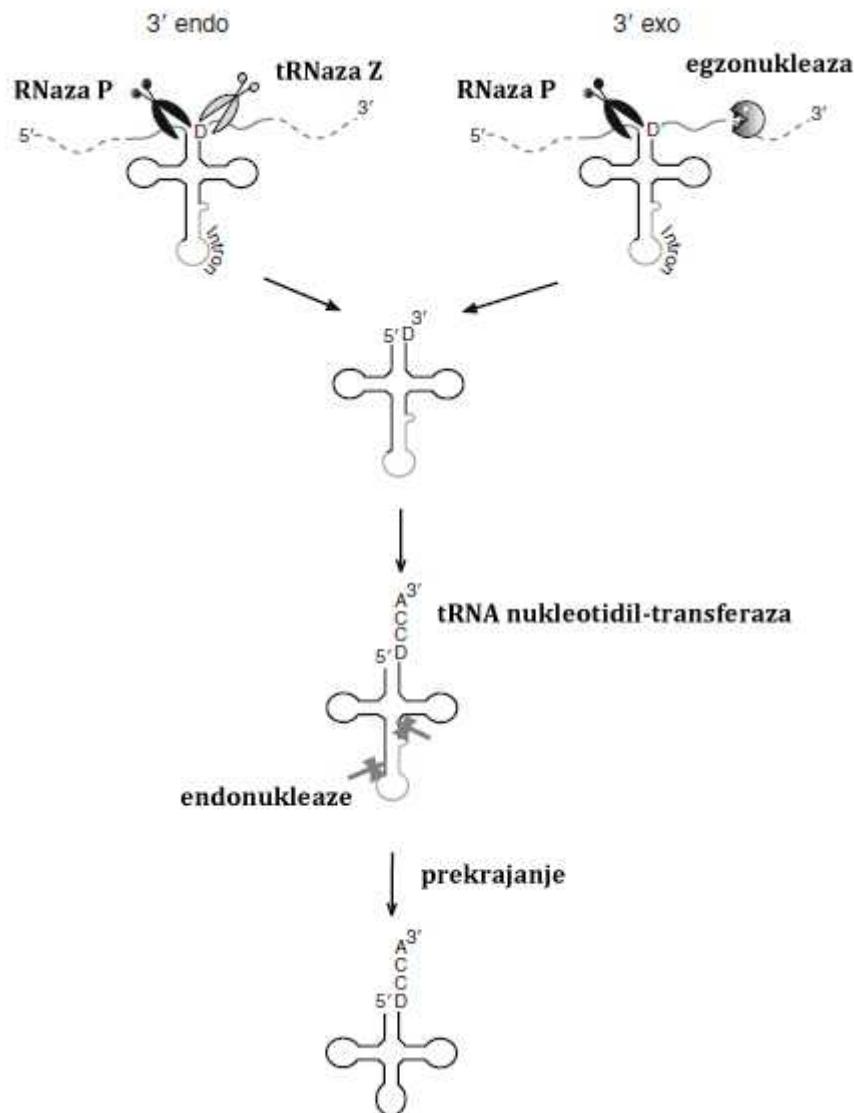
Slika 1.3. Tercijarna struktura tRNA^{Phe}. Preuzeto iz: Nelson D.L., Cox M.M. (2005): Protein metabolism: In Nelson D.L., Cox M.M. (eds.): Lehninger Principles of Biochemistry. New York, Freeman and Company, 1034-1075.

1.2.1. Elementi identiteta

Reakcija aminoaciliranja pripadne tRNA, rezultat je specifičnog prepoznavanja aaRS i odgovarajućeg tRNA. Skupine strukturnih elemenata koji omogućavaju prepoznavanje nazivaju se pozitivnim elementima identiteta tRNA (Cavarelli i Moras 1993). Osim pozitivnih odrednica postoje negativni elementi identiteta koji djeluju s ciljem sprjeavanja aminoacilacije pogrešnih, nepripadnih tRNA (Pallanck i Schulman 1992). Položaji pozitivnih i negativnih elemenata identiteta tRNA mogu se podudarati ukoliko dvije aaRS prepozna iste položaje na molekuli tRNA. U tom slučaju, isti nukleotid može biti pozitivan element za pripadnu sintetazu, a istovremeno negativni element za nepripadnu sintetazu koja za produktivnu interakciju s pripadnom tRNA na tom mjestu zahtjeva drugi nukleotid (Schulman 1991). Kod većine tRNA, za prepoznavanje s pripadnom aaRS značajni su nukleotidi antikodona – pokazano je da kod 17 od 20 skupina izoakceptora tRNA iz *E. coli*, najmanje jedan nukleotid antikodona spada u element identiteta (Saks i sur. 1994). No, elementi identiteta nisu ograničeni samo na antikodon, već se nalaze i u akceptorskoj petljki, varijabilnoj omjeru ili na poziciji 73 primarne strukture (diskriminacijski nukleotid, D). Takođe, i posttranskripcijske modifikacije tRNA mogu predstavljati elemente identiteta (Muramatsu i sur. 1988).

1.2.2. Posttranskripcijska dorada tRNA

Biogeneza tRNA uključuje sintezu po etnog transkripta, tzv. pretečeg tRNA, doradu 5'-i 3'-krajeva i po potrebi dodatak CCA kraja, izrezivanje introna ukoliko su prisutni, modifikaciju pojedinih nukleozida te u slučaju eukariotskih stanica, usmjereni prijenos tRNA iz jekre u citoplazmu gdje mogu sudjelovati u procesu translacije (Phizicky i Hopper 2010, slika 1.4.). Budući da su introni u estaliji kod eukariotskih ili arhealnih pretečeg tRNA, a u ovom radu su korištene molekule tRNA i enzimi iz *E. coli*, u sljedećim poglavljima, detaljnije će biti opisani procesi specifični za doradu eubakterijskih tRNA.



Slika 1.4. Posttranskripcijska dorada tRNA. Doradu 5'-kraja katalizira RNaza P, a u doradi 3'-kraja sudjeluju endonukleaza tRNaza Z ili egzonukleaze. Nakon procesiranja krajeva, tRNA nukleotidil-transferaza, po potrebi dodaje CCA triplet. Introne iz prete a tRNA uklanjaju specifi ne endonukleaze. D ozna ava diskriminacijski nukleotid. Preuzeto iz: Hartmann R.K., Gossringer M, Spath B., Fischer S., Marchfelder A. (2009): The making of tRNAs and more – RNase P and tRNase Z. Z Prog Mol Biol Transl Sci 85: 319-368.

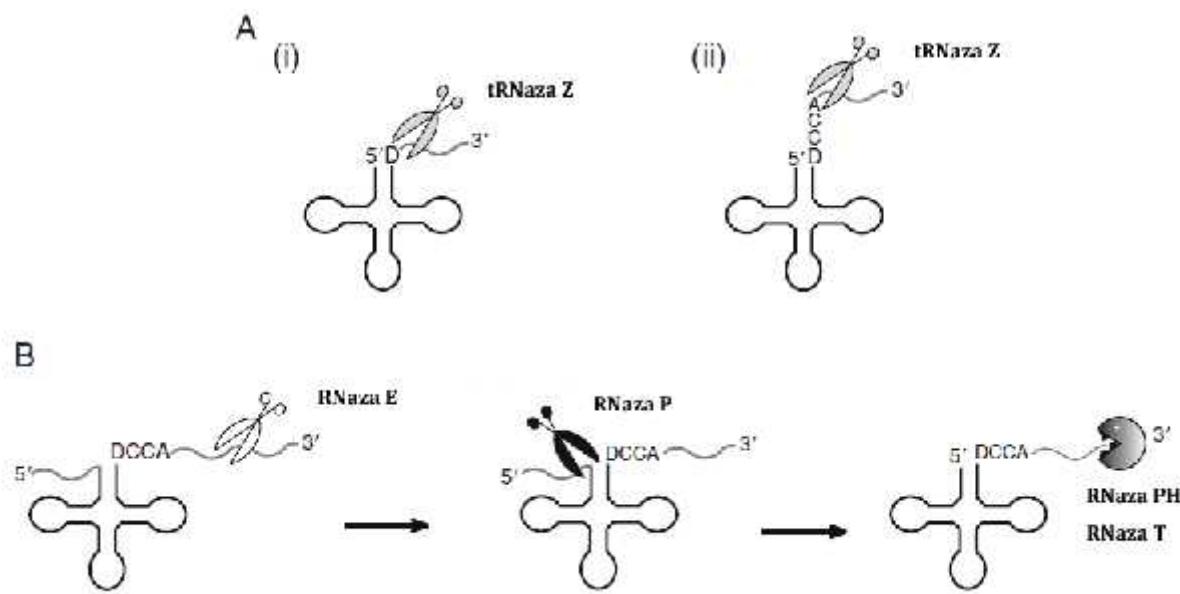
1.2.2.1. Dorada 5'-kraja tRNA

Sveop e prihva ena dogma dorade tRNA uklju uje obavezan nastanak prete a tRNA s 5'-uvodnim slijedom. Od 80.-ih godina poznato je da navedeni slijed uklanja endonukleaza RNaza P te da je molekula RNA odgovorna za njenu kataliti ku aktivnost (Phizicky i Hopper

2010). Kroz sva tri carstva razlikuje se broj i sastav podjedinica RNaze P - kod bakterija je sastavljena od jedne molekule RNA i jednog proteina, kod arheja od jedne molekule RNA i ak pet proteina, dok eukariotski organizmi imaju RNazu P sastavljenu od ak 9 ili 10 proteinskih podjedinica te nekoliko molekula RNA. Iako op enito vrijedi da je RNaza P ribonukleoprotein, do sada je utvr en itav niz iznimaka. Naime, mehanizam katalize cijepanja fosfodiesterske veze putem eukariotske RNaze P, dugo je bio nepoznat. Istraživanjima na eukariotu *Giardia lamblia*, pokazano je da RNA sudjeluje u katalizi, iako s niskom efikasnoš u. Navedeno je ukazivalo na sudjelovanje proteinskih podjedinica u stimulaciji katalize, što je dokazano elegantnim pokusom rekonstitucije arhealne RNaze P. U sastavu sa svim proteinskim podjedinicama, RNaza P je imala 4000 puta ve u aktivnost u odnosu na samu kataliti ku RNA (Tsai i sur. 2006). U itavom nizu dokaza da je molekula RNA uvijek kataliti ka sastavnica RNaze P, zanimljivo iznena enje bilo je otkri e da ljudska mitohondrijska RNaza P uop e ne posjeduje molekule RNA. Pokazano je da se ljudski mitohondrijski enzim sastoji od tri polipeptidna lanca, te da nakon rekonstitucije *in vitro* triju zasebno eksprimiranih i pro iš enih podjedinica, enzim posjeduje normalnu aktivnost (Holzmann i sur. 2008). Najzanimljivija iznimka od uobi ajenog procesiranja 5'-kraja su molekule tRNA iz arheje *Nanoarchaeum equitans* koje se prepisuju kao prete e tRNA bez 5'-uvodnog slijeda (Randau i sur. 2008). Takve tRNA na 5'-kraju posjeduju trifosfatnu skupinu i vrlo esto dodatni purin na -1 položaju, no unato neobi nim 5'-krajevima, pokazano je da su funkcionalne u reakciji aminoaciliranja *in vitro*.

1.2.2.2. Dorada 3'-kraja tRNA

Precizna dorada 3'-kraja klju na je za aminoacilacijsku aktivnost molekula tRNA. Razlikuju se dva reakcijska puta dorade 3'-krajeva molekula tRNA: put I - endonukleoliti ko cijepanje u jednom koraku i put II - dorada 3'-kraja u više koraka (slika 1.5.). Kriterij zastupljenosti pojedinog reakcijskog puta je prisutnost CCA kraja kod prete e tRNA. Ukoliko gen za tRNA ne kodira CCA kraj, uklanjanje 3'-završnog slijeda katalizira tRNaza Z (put I). Pritom se fosfodiesterska veza cjepa odmah nakon diskriminacijskog nukleotida (D), a tRNA nukleotidil-transferaza nadodaje CCA kraj. Ukoliko prete a tRNA sadrži CCA motiv, 3'-kraj uklanja se u nekoliko koraka u kojima sudjeluju endonukleaza RNaza E i egzonukleaze (put II).



Slika 1.5. Dorada 3'-kraja tRNA kod prokariota. Zastupljena su dva mehanizma: A) (i) Mehanizam I – procesiranje 3'-kraja u 1 koraku – endonukleaza tRNaza Z cjepa direktno na 3'-kraju uz diskriminacijski nukleotid (D). (ii) iznimka pravilu cjepanja prekursora tRNA bez CCA kraja je *Thermotoga maritima* (tako er mehanizam I) B) Mehanizam II uklju uje više koraka - cjepanje endonukleazom RNaza E, a zatom uklanjanje 3'-kraja pomo u egzonukleaza (glavne egzonukleaze su RNaza PH i RNaza T). Preuzeto iz: Hartmann R.K., Gossringer M, Spath B., Fischer S., Marchfelder A. (2009): The making of tRNAs and more – RNase P and tRNase Z. Z Prog Mol Biol Transl Sci 85: 319-368.

U principu, u eukariotskim genima za tRNA nije zapisan CCA kraj, dok kod arheja i bakterija ne postoji jedinstveno pravilo. Primjerice, u svim genima za tRNA kod *E. coli* zapisan je CCA kraj, dok kod bakterije *Borrelia burgdorferi* i arheje *Aeoropyrum pernix*, molekulama tRNA CCA kraj dodaje se isklju ivo pomo u tRNA-nukleotidil-transferaza. (Hartmann i sur. 2009). Drugi kriterij koji odre uje reakcijski put dorade 3'-kraja je duljina 3'-završnog slijeda koja ovisi o organizaciji gena za tRNA. Kod arheja gdje su geni za tRNA organizirani u pojedina ne transkripcijske jedinice, tRNA 3'-krajevi uobi ajeno su kratki te ih je lako ukloniti egzonukleazama. S druge strane, bakterije imaju pojedina ne tRNA gene koji se prepisuju kao prekursori tRNA s 3' ukosnicama koje je nužno ukloniti endonukleoliti kim cjepanjem na 5' kraju. Tako er, i u slu aju multicistronskih transkripata, nužna je dorada endonukleazama. Me utim, endonukleaza može cjepati direktno na 3'-kraju uz diskriminacijski nukleotid (D, mehanizam I) ili bliže 3' kraju (mehanizam II).

1.2.2.3. Modifikacije nukleozida tRNA

Jedno od zapanjuju ih svojstava molekula tRNA iz svih organizama je veliki broj posttranskripcijskih modifikacija nukleozida – utvrene su za 11,9 % nukleozida kod ukupno 561 sekvencirane tRNA, dok u prosjeku svaka tRNA sadrži 8 modifikacija (Phizicky i Alfonzo 2010). Posttranskripcijske modifikacije nukleozida tRNA mogu se podijeliti u dvije kategorije: modifikacije sa strukturnom ulogom koje stabiliziraju tercijarnu strukturu i pozicionirane su uglavnom u centralnoj regiji tRNA (D i T/C regija) te modifikacije koje djeluju na funkciju tRNA, odnosno služe kao elementi identiteta, utje u na kodon-antikodon prepoznavanje ili interakciju s ribosomom, a pozicionirane su u području antikodona (Nakanishi i Nureki 2005). Iako samo četiri osnovne jedinice (A, U, G, C) predodre enih interakcija (Watson-Crick parovi baza) izgrađuju tRNA, primarni nukleotidni slijed ne određuje posve jedinstvenu sekundarnu i tercijarnu strukturu. Navedeni problem poznatiji je u literaturi kao problem smatanja RNA, jer jedan nukleotidni slijed obuhva širok konformacijski prostor (Uhlenbeck 1995, Helm 2006). Smatra se da je uloga posttranskripcijskih modifikacija upravo stabilizacija pojedinih funkcionalnih konformacija tRNA i time smanjenje dostupnog konformacijskog prostora. Brojni dokazi u prilog tome slijede iz istraživanja nemodificiranih molekula tRNA proizvedenih transkripcijom *in vitro*. Usporedbom transkripta kvaševe tRNA^{Phe} s modificiranom tRNA^{Phe} proizvedenom *in vivo*, pokazano je da modifikacije doprinose konformacijskoj i termičkoj stabilnosti, ali i da modificirana tRNA ima znatno bolje aminoacilacijske parametre, iako modificirani nukleozidi nisu elementi identiteta (Hall i sur. 1989). Slično je pokazano i kod drugih tRNA – *E. coli* tRNA^{Val}, tRNA^{Phe}, tRNA^{Gln} te kvaševe tRNA^{Asp} (Nakanishi i Nureki 2005). Međutim, u istraživanjima *in vitro*, ukoliko posttranskripcijske modifikacije nemaju funkcionalnu ulogu, rutinski se koriste nemodificirani transkripti proizvedeni transkripcijom pomoću T7-RNA-polimeraze. Uloga strukturne stabilizacije posttranskripcijskim modifikacijama može se nadomjestiti magnezijevim ionima – nemodificirani transkripti u prisustvu magnezija ponašaju se približno kao nativne modificirane tRNA (Hall i sur. 1989). Posljedica navedenog je da se u većini kinetičkih pokusa, poput aminoaciliranja *in vitro*, koriste koncentracije magnezija barem 10 puta veće od fiziološke vrijednosti.

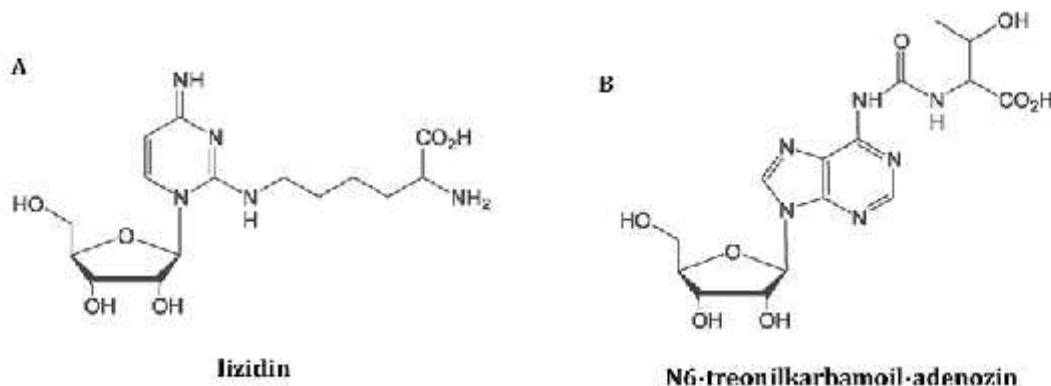
Predloženi mehanizmi stabilizacije strukture uslijed modifikacija ovise o vrsti pojedine modifikacije. Primjerice, za pseudouridin se smatra da je stabilizacija posljedica pojedinog nekovalentnog slaganja baza (eng. *base stacking*), a slično je predloženo i za metilirane

nukleozide poput m^5C – 5-metilcitidin i m^1 – 1-metilpseudouridin, gdje je slaganje baza poboljšano zbog poja ane hidrofobnosti. Metilacije 2'-OH skupine pogoduju 3'endo konformaciji riboze, sprje avaju interakcije s OH skupinama i mijenjaju hidrataciju sferu kisika (Helm 2006). Izrazito važnu ulogu imaju hipermodifikacije nukleozida na položajima 34 i 37, budući da je poznata njihova uloga u aminoaciliranju, prepoznavanju kodona ili sprjeavanju pomaka okvira itanja (Giege i sur. 1998). Neki od primjera transkriptata koji pokazuju znatno smanjenu aminoacilacijsku aktivnost uslijed nedostatka ključne modifikacije, su *E. coli* tRNA^{Lys}, tRNA^{Ile} (nedostatak k^2C_{34} – lizidin ili t^6A_{37} - treonilkarbamoil-adenozin) te kvaševe tRNA^{Phe} i tRNA^{Tyr} (nedostatak i^6A_{37} - N^6 -izopenteniladenozin) (Agris 1996).

Detaljan popis i prikaz svih modifikacija RNA, dostupan je u bazi podataka RNA modifikacija (eng. *RNA Modification Database*, <http://biochem.ncsu.edu/RNAmods>, Dunin-Horkawicz i sur. 2006, Czerwoniec i sur. 2009).

1.2.3. tRNA^{Ile} iz bakterije *Escherichia coli*

Tri kodona genetički koda dodijeljena su izoleucinu – AUU, AUA te AUC. Kod prokariota i eukariota postoje dva izoakceptora tRNA^{Ile} koji su svojim antikodonima komplementarni gore navedenim kodonima. Dva tRNA^{Ile} izoakceptora iz *E. coli* identificirani su u 68 % nukleotidnog slijeda, a glavne razlike nalaze se u akceptorskoj petljci te antikodonskoj ruci. Glavni izoakceptor tRNA^{Ile} (antikodon GAT, odnosno GAU), prepoznae kodone AUU i AUC, dok drugi, sporedni izoakceptor tRNA^{Ile} s antikodonom CAT, odnosno CAU prepoznae kodon AUA (Nordin i Schimmel 2005). Kod izoakceptora tRNA^{Ile}_{CAT} otkrivena je do tada nepoznata posttranskripcionalna modifikacija u području antikodona (Kuchino i sur. 1980). Utvrđeno je da se modificirani nukleozid zapravo sastoji od citidina modificiranog s lizinom vezanim putem -amino skupine na C-2 položaj pirimidinskog prstena (slika 1.6. A), zbog čega je nazvan lizidin (L). Citozin u antikodonu djeluje kao negativan element identiteta za pripadni IleRS, a pozitivan element identiteta za nepripadni MetRS. Naime, nemodificirani antikodon CAT, odnosno CAU zapravo je komplementaran kodonu AUG koji kodira za metionin, dok modificirani LAU mogu avati prepoznavanje kodona AUA koji kodira za izoleucin.

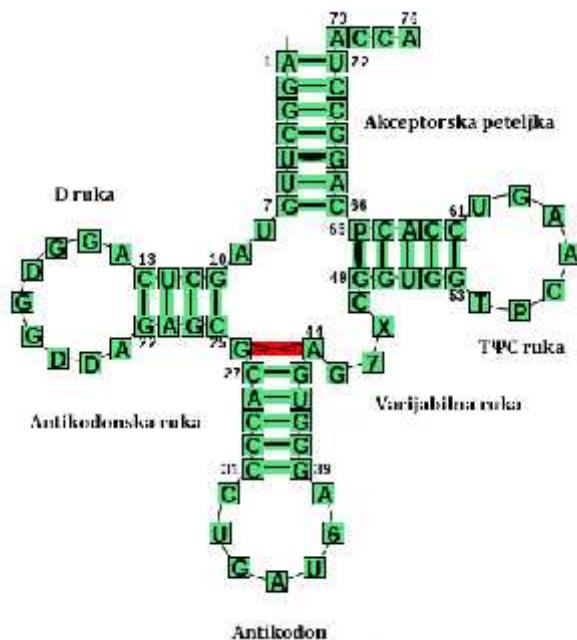


Slika 1.6. Modificirani nukleozidi važni za prepoznavanje tRNA^{Ile}. A) lizidin, prisutan samo kod sporednog izoakceptora tRNA^{Ile}_{CAT} B) N⁶-treonilkarbamoil-adenozin, prisutan kod oba izoakceptora tRNA^{Ile}.

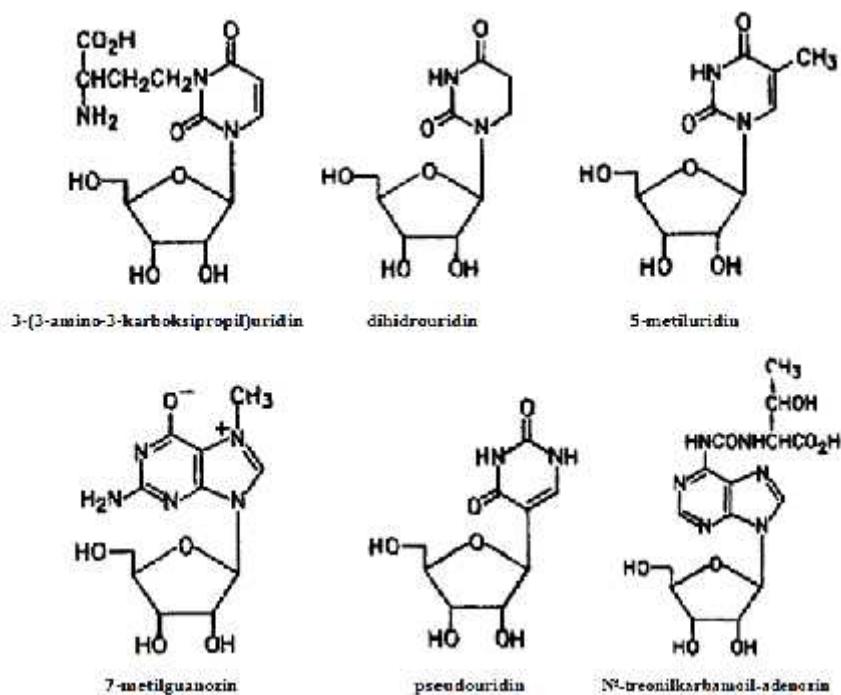
Yokoyama i suradnici proveli su detaljnu analizu elemenata identiteta tRNA^{Ile}_{GAT} (Nureki i sur. 1994). Za razliku od većine tRNA, tRNA^{Ile} transkripti pokazuju znatno manju aktivnost u aminoaciliranju u odnosu na modificiranu tRNA. Smatra se da je značajno smanjenje aktivnosti posljedica nedostatka treonilkarbamoila vezanog za N⁶ atom nukleozida A₃₇ (modifikacija t⁶A₃₇, slika 1.6. B). Pokazano je da su glavni elementi identiteta očuvani kod oba tRNA^{Ile} izoakceptora i obuhvaćaju područje antikodona (G₃₄-A₃₈). Nadalje, značajni elementi identiteta su diskriminatorska baza A₇₃ te tri nukleotidna para: C₄-G₆₉ u akceptorskoj, U₁₂-A₂₃ u D₁ te C₂₉-G₄₂ u antikodonskoj peteljci.

Poznati su neki od enzima koji sudjeluju u navedenim ključnim posttranskripcijskim modifikacijama tRNA^{Ile}. Suzuki i suradnici otkrili su gen koji kodira enzim odgovoran za stvaranje lizidina kod bakterija *Bacillus subtilis* i *E. coli* (Soma i sur. 2003). Gen je nazvan *tils*, budući da određuje enzim tRNA^{Ile}-lizidin-sintetazu. Mehanizam studijama otkriven je da enzim specifično prepozna tRNA^{Ile}_{CAT} te da uz pomoć ATP-a i lizinu modificira citidin u lizidin. Pokazano je da je djelomično modificirana tRNA^{Ile}_{LAT} bolji supstrat za IleRS u odnosu na nemodificirani transkript (Salowe i sur. 2009).

Budući da je u ovom radu korišten glavni izoakceptor tRNA^{Ile}_{GAT}, na slikama su prikazane njegove posttranskripcijske modifikacije (vidi slike 1.7. i 1.8.).



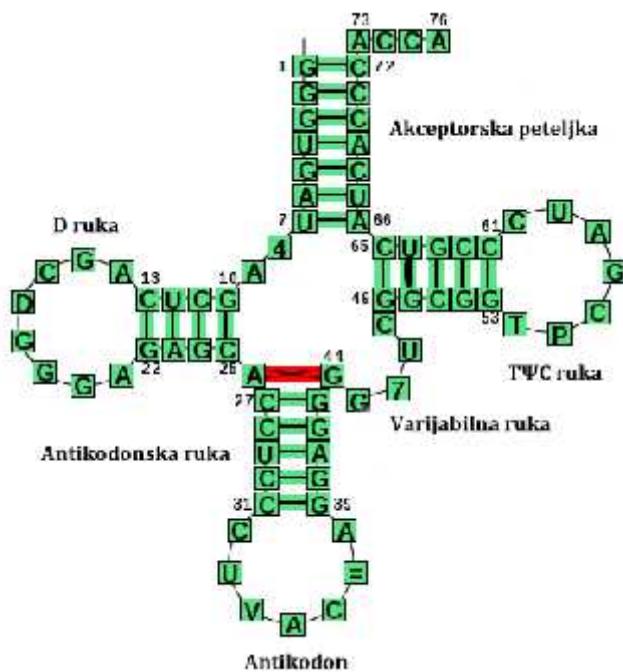
Slika 1.7. Nukleotidni slijed i sekundarna struktura izoakceptora tRNA^{Ile}_{GAT} iz *E. coli*. U strukturi su posttranskripcijske modifikacije prikazane sljedećim oznakama: **D** - dihidrouridin, **6** - N⁶-treonilkarbamoiladenozin, **7** - 7-metilguanozin, **X** - 3-(3-amino-3-karboksipropil)uridin, **T** - 5-metiluridin, **P** - pseudouridin. Preuzeto iz *tRNADB Transfer RNA database* (<http://trnadb.bioinf.uni-leipzig.de>).



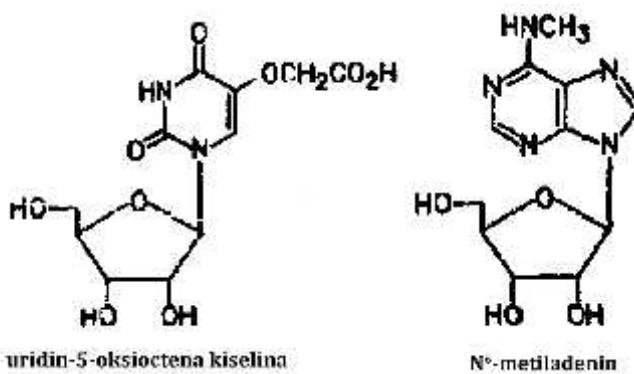
Slika 1.8. Struktura modificiranih nukleozida prisutnih kod tRNA^{Ile}_{GAT} izoakceptora iz *E. coli*.

1.2.4. tRNA^{Val} iz bakterije *Escherichia coli*

Otkrivanje elemenata identiteta tRNA^{Val} zapravo je u grupi dr. Jacka Horowitza mapiranjem dijelova tRNA koji su zaštičeni od enzimatske razgradnje nukleazama u ValRS-tRNA^{Val} kompleksu. Pokazano je da su nukleazama nedostupni antikodonski om, 3'-kraj heliksa sastavljenog od T i C i akceptorske petljke, te 5'-kraj antikodonske petljke (Horowitz i sur. 1999). Budući da nemodificirani transkript tRNA^{Val} proizveden *in vitro* pokazuje gotovo jednake aminoacilacijske parametre kao i posttranskripcijski modificirana tRNA^{Val} proizvedena *in vivo* (Chu i Horowitz 1989, vidi slike 1.9. i 1.10.), elementi identiteta detaljnije su istraženi pomoću mutiranih tRNA^{Val} transkriptata. Mutacije su uvedene u sve dijelove tRNA^{Val} transkripta, a narođito je ispitana utjecaj mutacija na kinetiku aminoaciliranja u dijelovima tRNA za koje je ustaljeno da su u direktnom kontaktu s ValRS-om, odnosno da ih ValRS štiti od razgradnje nukleazama. Takva detaljna studija ukazala je na relativno niz elemenata identiteta (Horowitz i suradnici 1999).



Slika 1.9. Nukleotidni slijed i sekundarna struktura izoakceptora tRNA^{Val}_{TAC} iz *E. coli*. U strukturi su posttranskripcijske modifikacije prikazane sljedećim oznakama: **D** - dihidrouridin, **V** - uridin-5-oksioctena kiselina (cmo⁵U), **=** - N⁶-metiladenin, **7** - 7-metilguanozin, **T** - 5-metiluridin, **P** - pseudouridin. Preuzeto iz *tRNADB Transfer RNA database* (<http://trnadb.bioinf.uni-leipzig.de>).



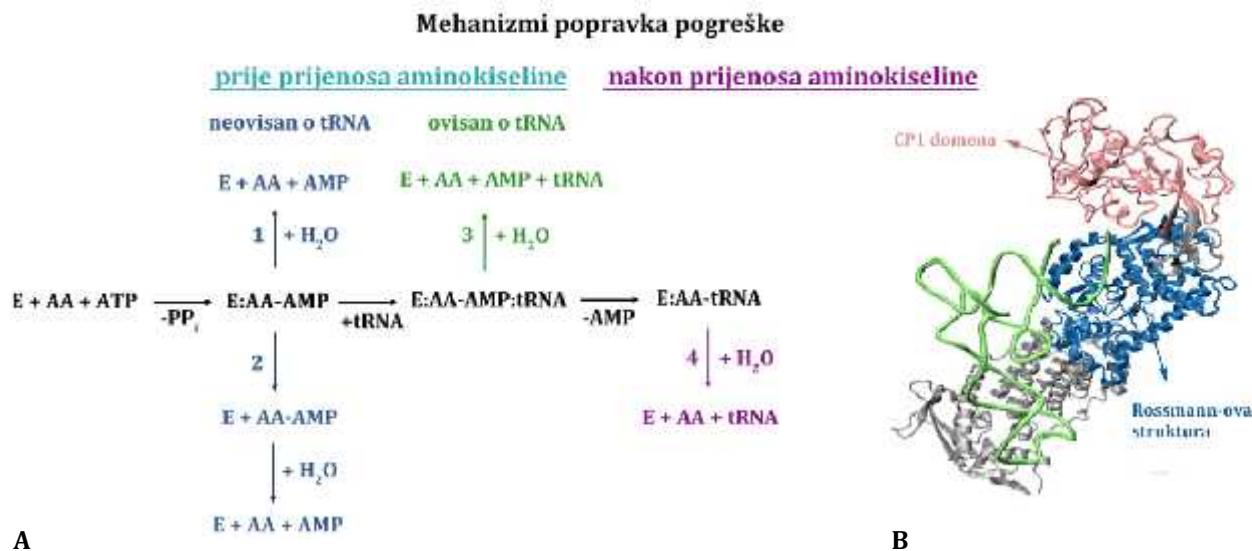
Slika 1.10. Struktura modificiranih nukleozida prisutnih kod tRNA^{Val}_{TAC} izoakceptora iz *E. coli*. Prikazani su samo nukleozidi koji nisu prisutni kod tRNA^{Ile}_{GAT}, strukture ostalih modifikacija prikazane su u poglavljju 1.2.3.

Pokazano je da su A₃₅ i C₃₆ koji su pozicionirani u antikodonu zapravo glavni elementi identiteta za prepoznavanje pripadne tRNA^{Val} (položaj navedenih nukleotida vidljiv je u prikazu sekundarne strukture na slici 1.9.). Mutanti u položaju 35 aminoacilirani su 10⁵ puta manje efikasno, dok su mutanti u položaju 36 aminoacilirani 2 do 3 reda veli ine slabije od divljeg tipa tRNA (Horowitz i sur. 1999). Pokazano je i da je 5'-kraj antikodonske peteljke u direktnom kontaktu s ValRS-om. Zna ajan utjecaj na u inkovitost aminoaciliranja imala je zamjena nukleotidnog para U₂₉·A₄₁ u C₂₉·G₄₁. U inkovitost aminoaciliranja smanjena je ak 45 puta uslijed smanjene fleksibilnosti antikodonske petlje, budu i da je nakon uvo enja zamjene, antikodonska petlja sadržavala 5 uzastopnih G·C parova baza. Specifi ni elementi identiteta nisu utvr eni u akceptorskoj petljci. Pokazano je da je za prepoznavanje tRNA^{Val} važno jedino održavanje geometrije akceptorske petljke kao heliksa RNA tipa A (Liu i sur. 1997). Supstitucija diskriminacijskog nukleotida A₇₃ u G₇₃ rezultirala je smanjenjem u inkovitosti aminoaciliranja za 40 puta. S obzirom da su varijante izmijenjene u C₇₃ ili U₇₃ svega 2-3 puta manje aktivne od divljeg tipa tRNA, smatra se da G na položaju 73 djeluje kao negativni element identiteta za ValRS. Tako er, negativan u inak na aminoaciliranje ima supstitucija krajnjeg A₇₆ na 3'-kraju u G₇₆, dok tRNA^{Val} koje završavaju sa C₇₆ ili U₇₆ pokazuju sli nu aminoacilacijsku aktivnost kao divlji tip tRNA. Pokazano je da kao elementi identiteta, iako nešto manje zna ajni u odnosu na elemente identiteta u podru ju antikodona, djeluju i G₂₀ u podru ju D-om e te G₄₅ u podru ju varijabilne ruke.

1.3. Mehanizmi popravka pogreške

Specifično i to no aminoaciliranje tRNA, temeljni je preduvjet za ispravan prijenos genetičke informacije. Aminoacil-tRNA-sintetaze razvile su brojne strategije koje im omogućavaju prepoznavanje supstrata u stani nom okruženju. Sintetazama daleko veći problem predstavlja prepoznavanje pripadne aminokiseline. Naime, tRNA je znatno veća molekula s kojom aaRS ostvaruju niz interakcija (pozitivni i negativni elementi prepoznavanja, poglavljje 1.2.1.), dok pojedine aminokiseline, poput valina i izoleucina, esto nemaju dovoljno izražene strukturne razlike da bi ih sintetaze mogle jednostavno razlikovati. Primjerice, aktivacija valina katalizirana enzimom IleRS, svega 200 puta je manje uinkovita od aktivacije pripadnog izoleucina (Fersht 1977). Aminoacil-tRNA-sintetaze sklonije pogreškama, razvile su mehanizme popravka kako bi ukupna razina pogreške u biosintezi proteina ostala na razini koja je stanici prihvatljiva (1 na 1000-10000, Ling i sur. 2009). Mehanizmi popravka pogreške omogućavaju hidrolizu pogrešno aktivirane aminokiseline ili pogrešno aminoacilirane tRNA (misacilirane tRNA; slika 1.11.). Za IleRS, ValRS i LeuRS razreda I specifično je postojanje dodatne tzv. CP1 domene (CP1 prema eng. *connective peptide I*) umetnute u Rossmann-ovu strukturu. Biokemijskim studijama izdvojene CP1 domene utvrđeno je da je aktivno mjesto za popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline, odnosno za hidrolizu misacilirane tRNA, smješteno unutar CP1 domene i udaljeno 30 Å od aktivnog sintetskog mjesta (Lin i sur. 1996). Prema rješenoj strukturi IleRS:tRNA^{Ile} kompleksa, predložen je model popravka pogreške nakon prijenosa, po kojem translokacija 3'- kraja misacilirane tRNA donosi pogrešnu aminokiselinu iz sintetskog mjesta u mjesto popravka u CP1 domeni, dok ostatak tRNA ostaje vezan za enzim (Silvian i sur. 1999). Za mehanizam popravka pogreške prije prijenosa aminokiseline, postavljena su tri modela: 1) aaRS selektivno otpuštaju nepripadni aa-AMP koji se u otopini neenzimatski hidrolizira; 2) hidroliza nepripadnog aa-AMP je enzimatska i odvija se u sintetskom aktivnom mjestu; 3) hidroliza nepripadnog aa-AMP je enzimatska i odvija se u CP1 domeni gdje se događa i popravak nakon prijenosa aminokiseline (Ling i sur. 2009, slika 1.11.). Posljednji navedeni model poznatiji je u literaturi kao model translokacije, budući da se aa-AMP prenosi iz sintetskog aktivnog mjestu u CP1 domenu gdje se odvija hidroliza nepripadnog aa-AMP. Preduvjet translokaciji je jedan krug popravka pogreške nakon prijenosa. Naime, smatra se da nakon deacilacije u CP1 domeni, enzim ostaje zarobljen u konformaciji koja omogućava translokaciju nepripadnih adenilata iz sintetskog aktivnog mjestu u CP1 domenu udaljenu 30 Å.

(Bishop i sur. 2002). Međutim, problemi translokacijskog modela su sljedeći: kanal kroz koji bi se odvijala translokacija nepripadnih adenilata nije vidljiv u rješenoj kristalnoj strukturi i nije jasno kako aa-AMP na putu od sintetskog mesta do mesta popravka u CP1 domeni ostaje vezan za enzim; pripadni adenilati nakon provjere u CP1 domeni moraju se vratiti u aktivno mjesto kako bi se dogodio prijenos aminokiseline na tRNA; sposobnost hidrolize nepripadnih aa-AMP zasebno eksprimirane CP1 domene nikada nije pokazana.



Slika 1.11. Shematski prikaz mehanizama popravka pogreške. A) Popravak pogreške prije prijenosa aminokiseline odvija se potpomognutom disocijacijom nepripadnog adenilata (2) ili enzimatskom hidrolizom nepripadnog adenilata u aktivnom mjestu (1, 3) koja može biti neovisna o tRNA (1) ili ovisna o tRNA (3). Misacilirana tRNA hidrolizira se putem mehanizma popravka nakon prijenosa aminokiseline (4). Središnji dio sheme odnosi se na pripadnu aminokiselinu, dok se ostatak sheme odnosi na reakcije s nepripadnom aminokiselom. B) Kristalna struktura IleRS iz *Staphylococcus aureus* prikazana u kompleksu s tRNA (PDB ID: 1QU2; Silvian i sur. 1999). tRNA je prikazana zelenom, CP1 domena rozom, Rossmann-ova struktura plavom bojom, a ostatak proteina prikazan je obojan u sivo.

Nedavno su istraživanja u našem laboratoriju pružila dodatne dokaze protiv translokacijskog modela popravka pogreške prije prijenosa i postavljen je novi model koji hidrolizu nepripadnih adenilata smješta u aktivno mjesto (Dulic i sur. 2010). Pokazano je da mutanti enzima IleRS i ValRS unatoč inaktivaciji CP1 domene, odnosno popravka pogreške

nakon prijenosa aminokiseline, i dalje imaju aktivan tRNA neovisan, a IleRS i tRNA-ovisan popravak pogreške prije prijenosa aminokiseline. Navedeno direktno opovrgava nužnost deacilacije kao preduvjeta mehanizma popravka prije prijenosa, i sugerira da se popravak prije prijenosa aminokiseline zapravo događa u aktivnom mjestu. Međutim, to na lokacija i mehanizam hidrolize u aktivnom mjestu te uloga tRNA u poticanju popravka pogreške prije prijenosa još uvijek su nepoznati te predstavljaju vrlo zanimljivo i atraktivno područje istraživanja.

1.4. Metode proizvodnje i proizvodnja tRNA

1.4.1. Metode proizvodnje tRNA

Budući da su velike količine tRNA potrebne su za njenu biokemijsku karakterizaciju, kristalizaciju ili proučavanje proteina kojiima je tRNA supstrat ili ligand, bilo je potrebno razviti metode za dobivanje velike količine tRNA zadovoljavajuće istočice. Osamdesetih godina razvijen je sustav transkripcije molekula tRNA *in vitro* pomoći u RNA-polimeraza izoliranih iz SP6, T7 ili T3 bakteriofaga. Navedene polimeraze imaju visoku aktivnost transkripcije, i to na superzavijenim, ali i na linearnim kalupima (Milligan i Uhlenbeck 1989). Uobičajeni pristup uključuje kloniranje gena za tRNA pod promotor T7-RNA-polimeraze u plazmid, te linearizaciju rekombinantnog plazmida restrikcijskim enzimom s ciljem definiranja ispravnog 5'- kraja kalupa, odnosno završetka transkripcije (Sampson i Uhlenbeck 1988). Glavna prednost metode je dobivanje većine količine određene tRNA bez popratnog problema proučavanja od ostalih molekula transfer RNA kao prilikom proučavanja iz nekog organizma. Time je znatno unaprijedeno proučavanje povezanosti strukture i funkcije zbog lakšeg uvođenja mutacija te proučavanja mutirane tRNA. Veliki nedostatak *in vitro* proizvedene tRNA, u odnosu na onu proizvedenu *in vivo*, jest nepostojanje posttranskripcijskih modifikacija. Ako nemodificirana tRNA nije aktivna, transkripcija *in vitro* neupotrebljiva je za njenu proizvodnju. Također, metoda je poprilično skupa zbog velike količine nukleotida koji idu u reakcijsku smjesu. I samim time u transkripciji tRNA ima svojih nesavršenosti, naime, T7-RNA-polimeraza, iako dosta precizna u inicijaciji i terminaciji transkripcije, ipak grijehi. U transkripcijskoj smjesi, esto je prisutno nekoliko produkata bliske veličine, te kraji oligonukleotidi koji odgovaraju abortivnim inicijacijskim produktima. T7-RNA-polimeraza naginje prernom završetku transkripcije

neposredno prije pravog mjesta terminacije ili pak proizvoljno dodaje 1 ili 2 nukleotida na 3'-kraj, neovisno o kalupu. U slučaju nekih molekula transfer RNA, problematična je sinteza transkriptata s homogenim 5'-krajevima, zbog čega nastaju skraćeni ili produljeni produkti (Pleiss i sur. 1998). Uočeno je da heterogenost 5'-kraja ovisi o slijedu po etnog dijelu tRNA te da je prilikom sinteze pojedinih sljedova povećan udio pogrešnih produkata (Helm i sur. 1999). Za poboljšanje proizvodnje ispravnog transkripta, koriste se dvije strategije. Prva se odnosi na povećanje njegovog udjela u transkripcijskoj smjesi raznim modifikacijama kalupa kojima se nastoji sprječiti nastajanje alternativnih nefunkcionalnih produkata (Sherlin i sur. 2001), dok se druga strategija odnosi se na poboljšanje procesa avanja ispravnog transkripta.

Alternativna metoda pripreme tRNA *in vitro* je kemijska sinteza polovica molekula tRNA s prekidom u području antikodona te ligacija polovica pomoći u T4-RNA-ligaze. Takvim načinom pripreme izbjegava se heterogenost krajeva, a može se napraviti i posttranskripcijski modificirana tRNA, budući da se modificirani nukleozidi također mogu kemijski sintetizirati. U inkovitost ligacije ovisi o području prekida u molekuli tRNA, te o samom nukleotidnom slijedu, zbog čega je nužno provesti avanje ligiranih molekula na poliakrilamidnom gelu (Francklyn i sur. 2008).

Ova korištena strategija proizvodnje molekula tRNA je prekomjerna ekspresija tRNA *in vivo*. Gen za tRNA uklonira se u plazmid pod kontrolu jakog promotora, rekombinantnim plazmidom transformiraju se stanice, potakne ekspresiju, te nakon nekog vremena, izolira se ukupna tRNA standardnom ekstrakcijom fenolom i kloroformom. Ovisno o razini ekspresije i homogenosti uzorka, željena tRNA izdvaja se provesti avanjem na poliakrilamidnom gelu ili pomoći u raznih kromatografskih tehniki (Francklyn i sur. 2008). Glavna prednost proizvodnje tRNA *in vivo* je dobivanje posttranskripcijski modificirane tRNA, što je za aktivnost nekih tRNA esencijalno.

1.4.2. Metode za provesti avanje tRNA

Odabir odgovarajuće metode za provesti avanje tRNA ovisi o metodi proizvodnje tRNA, odnosno materijalu iz kojeg se ona provodi. Za provesti avanje tRNA iz transkripcijske smjesi (*in vitro*) standardno se koriste denaturirajući poliakrilamidni gelovi i to najčešće 6 % (w/v) akrilamidni gelovi (akrilamid/bisakrilamid u omjeru 19:1) sa 8 mol dm⁻³ urejom (Gruijter i Sovulj, 2007). Ovisno o udjelu prekomjerno eksprimirane tRNA u uzorku ukupne izolirane tRNA, za izdvajanje željene tRNA također se može koristiti provesti avanje na poliakrilamidnom gelu.

Metoda je osobito prikladna za izdvajanje molekula tRNA tipa 2, koje zbog duže varijabilne ruke, odnosno veće mase, putuju sporije od ostalih i u stanici zastupljenijih molekula tRNA tipa 1. Variranjem koncentracija akrilamida i ureje može se optimirati razlučivost metode. Najveći nedostaci tog pristupa su vremenska zahtjevnost i nedovoljna istočnost a proširenje tRNA zbog poteškoća u izolacije transkripta ispravne duljine (Kholod i sur. 1998), odnosno izdvajanja prekomjerno eksprimirane tRNA od ostatka staninice tRNA bliske duljine (Francklyn i sur. 2008).

Nešto brže i jednostavnije rješenje su proširenje avanja kromatografskim tehnikama. Kao stacionarna faza koriste se DEAE-celuloza te DEAE-Sephadex, anionski izmjenjivači u blagih svojstava (Tanner 1989). Na njih se molekule tRNA vežu kroz ionske interakcije negativno nabijene fosfodiesterske okosnice s pozitivno nabijenim DEAE-skupinama. Zato se tRNA standardno nanosi u puferu niske ionske jakosti, a eluira porastom ionske jakosti. Nedostatak je ostvarivanje vodikovih i hidrofobnih interakcija DEAE-celuloze te DEAE-Sephadexa s nukleinskim kiselinama što se nastoji ukloniti nanošenjem te elucijom uzorka u prisutnosti denaturirajućeg sredstva (etilen-glikol, formamid, ureja). Modifikacija te metode je jedna od korištenijih metoda za proširenje avanja molekula tRNA je odjeljivanje na stupcu benzoilirane DEAE-celuloze (BD-celuloza). Pritom se hidroksilne skupine DEAE-celuloze esterificiraju benzoilom što uzrokuje povećani afinitet za hidrofobne, a pogotovo aromatske spojeve. Proširenje određene vrste tRNA temelji se na sposobnosti ostvarivanja hidrofobnih interakcija. Transfer RNA, ukoliko nema prirodno izraženu hidrofobnost, može se napraviti hidrofobnjom pomoći u kemijskih modifikacija što znatno povećava iskoristivost metode. Tako pripremljena tRNA, jače se veže za stupac BD-celuloze te eluira visokom ionskom jakosti u uzbrudu nekog organskog otapala (Gillam i Tener 1971). Prva je na taj način proširena molekula tRNA^{Phe}, koja ne zahtjeva dodatne modifikacije jer već posjeduje prirodni hidrofobni karakter. Dodatna hidrofobnost može se postići i aminoacilacijom tRNA pripadnom aminokiselini. Tirozin i triptofan posjeduju hidrofobni bojni ogranci, a ostale aminokiseline, zahvaljujući reaktivnosti -aminoskupine, mogu se derivatizirati aromatskim reagensom i time napraviti hidrofobnjima. Usto se koristi N-hidroksisukcinimid-2(2-naftoksi)acetat nakon čega se dobije 2-naftoksiacetilaminoacil-tRNA koja se nakon proširenja jednostavno deacilira. Budući da se željena tRNA specifično aminoacilira pomoći u odgovarajućim aaRS i aminokiseline, metoda je prikladna za proširenje aktivnih transkriptata, ali i prekomjerno eksprimirane tRNA.

iz uzorka ukupne tRNA. Međutim, zbog potencijalne inaktivacije tRNA, kemijske modifikacije se ipak nastoje izbjegi.

U prošavju tRNA koriste se i afinitetne kromatografije. Nedavno su Kieft i Batey (2006) razvili zanimljivu metodu za brzu proizvodnju i prošavjanje RNA u natičnim, nedenaturiraju im uvjetima. Metoda obuhvaća klasičnu transkripciju *in vitro* pomoći u T7-RNA-polimeraze s kalupom rekombinantnog plazmida koji uz gen za tRNA pod kontrolom jakog promotora sadrži i dva dodatna elementa za lakše prošavanje – ribozim hepatitis delta virusa, te RNA ukosnicu koja je dio estice za prepoznavanje signala (eng. *signal recognition particle*). Transkript tRNA se preko ukosnice RNA specifično veže za proteinski dio estice za prepoznavanje signala koji je immobiliziran na kromatografskoj smoli i time se izdvaja od ostalih nepotpunih transkriptata. Elucija se postiže dodatkom imidazola koji aktivira ribozim hepatitis delta virusa i oslobađa se ciljna tRNA.

Kromatografska tehnika koja omogućava izdvajanje aminoacilacijski aktivne tRNA bez obzira na in vitro ili in vivo je afinitetna kromatografija pomoći u prokariotskog elongacijskog faktora Tu (EF-Tu). Metoda se temelji na razlici u konstantama disocijacije za ternarni kompleks EF-Tu·GTP·aa-tRNA ($K_d = 10^{-10} - 10^{-9}$ mol dm $^{-3}$) i EF-Tu·GTP·tRNA ($K_d > 10^{-4}$ mol dm $^{-3}$) koja je iskoristiva za specifičnu izolaciju aminoacilirane tRNA (Ribeiro i sur. 1995). Elongacijski faktor uobičajeno se preko His privjeska veže za Ni-NTA agarozu, a zatim se propušta uzorak s aminoaciliranom tRNA koju želimo proistititi. U određenim kromatografskim uvjetima, za elongacijski faktor veže se jedino aminoacilirana tRNA, koja se napoljetku eluira dodatkom GDP-a ili porastom ionske jakosti. Prednost metode temelji se na mogućnosti specifičnog prošavanja funkcionalnih aminoacilacijski aktivnih tRNA. Međutim, njen glavni nedostatak je vremenska zahtjevnost, budući da je nužno proizvesti i proistititi odgovarajuću aminoacil-tRNA-sintetazu, elongacijski faktor, zatim aktivirati elongacijski faktor iz GDP u GTP vezani oblik u kojem veže aminoaciliranu tRNA, te na kraju aminoacilirati željenu tRNA prethodno samom kromatografskom prošavanju. Također, metoda je teško prilagodiva za dobivanje miligramskih količina tRNA nužnih za detaljne kinetičke analize.

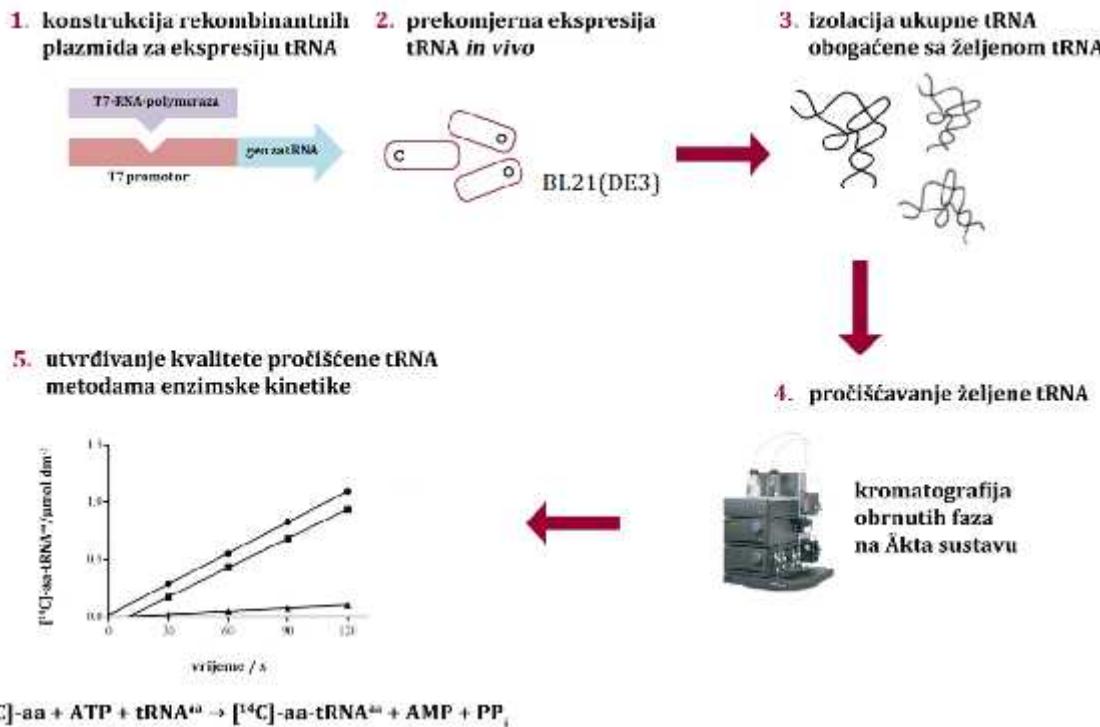
Nakon prilagođavanja na kromatografske sustave visoke inkovitosti, kromatografija obrnutih faza postala je jednom od najmodernejših metoda za prošavanje nukleinskih kiselina

male molekulske mase. Razdvajanje se temelji na razlici u stupnju interakcije pojedinih molekula s hidrofobnom matricom. Naime u kromatografiji obrnutih faza molekule neprekidno prelaze iz stacionarne u mobilnu fazu, a stupanj razdjeljenja za pojedinu molekulu ovisi o njenoj hidrofobnosti te sastavu mobilne faze. Uzorak se uobi ajeno nanosi u puferu koji omogu ava što uspješniju adsorpciju molekula na stacionarnu fazu, a elucija, odnosno desorpcija, postiže se uz dodatak organskog otapala. Pritom se hidrofobnije molekule usporavaju uslijed interakcija sa stacionarnom fazom, dok se hidrofilnije molekule ranije eluiraju, odnosno, silaze s kolone u puferu s nižim udjelom organskog otapala (Meyer 2010). Kromatografija obrnutih faza esto se koristi kao jedna od nekoliko kromatografskih tehniki potrebnih za dobivanje iste tRNA (Cayama i sur. 2000) ili za dobivanje iste tRNA u jednom koraku uz kemijsku modifikaciju amino skupine aminoacilirane tRNA s ciljem poveanja hidrofobnosti (Kothe i sur. 2006). Međutim, s obzirom na prirodu kromatografije obrnutih faza, optimalno prošavanje zapravo ovisi o ciljnoj molekuli zbog čega je nužno razviti metodu prošavanja imajući na umu svojstva ciljne molekule, te polazni uzorak.

1.5. Cilj rada

Cilj ovog rada bio je razviti efikasnu metodu za dobivanje velike količine biološki aktivne tRNA visokog stupnja čistote, koja je neophodna za istraživanja mehanizama tRNA-ovisnog popravka pogreške kod aminoacil-tRNA-sintetaza. Naglasak je bio na pripremi tRNA^{Ile} i tRNA^{Val} radi detaljne kinetičke analize enzima IleRS i ValRS - tipičnih predstavnika sintetaza razreda I koji posjeduju mehanizme tRNA-ovisnog popravka. Iz literature je poznato da tRNA^{Ile} proizvedena transkripcijom *in vitro* pomoću T7-RNA-polimeraze, nije aminoacilacijski aktivna zbog nedostatka ključnih posttranskripcijskih modifikacija koje djeluju kao elementi identiteta za IleRS. Zbog navedenog, za detaljne kinetičke studije mehanizma popravaka enzima IleRS, nužna je proizvodnja homogene, posttranskripcijski modificirane biološki aktivne tRNA^{Ile}. Specifični ciljevi obuhvataju dizajn i optimiranje sustava za prekomjernu ekspresiju molekula tRNA *in vivo*, razvoj metode za prošavanje željene tRNA iz staničnog ekstrakta te dobivanje homogenih posttranskripcijski modificiranih i biološki aktivnih tRNA u preparativnim količinama. Kvaliteta pripravljenih tRNA^{Ile} i tRNA^{Val} te njihova sposobnost da stimuliraju popravak pogreške enzima IleRS i ValRS, bit će utvrđena metodama enzimske kinetike, poput

aminoaciliranja i stimulacije proizvodnje AMP-a u uvjetima *in vitro* (slika 1.12.). Tako er, u sklopu ovog rada, gen za ValRS biti e ukloniran u pET28b vektor, rekombinantni ValRS prekomjerno eksprimiran i pro iš en afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarazi pomo u His-privjeska na N-kraju.



Slika 1.12. Shematski prikaz osnovnih eksperimentalnih koraka u proizvodnji tRNA *in vivo*.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Materijali

2.1.1. Standardne kemikalije

agar (*Sigma*), agarosa (*Sigma*), akrilamid (*Sigma*), amonijev acetat (*Kemika*), amonijev klorid (*Kemika*), amonijev peroksodisulfat (APS) (*Serva*), amonijev sulfat (*Kemika*), dimetilsulfoksid (DMSO) (*Sigma*), ditiotreitol, DTT (*Sigma*), etanol, (*Kemika*), etilendiamintetraoctena kiselina, EDTA (*Sigma*), fenilmethylsulfonil-fluorid (PMSF) (*Sigma*), fenol (*Kemika*), glicerol (*Kemika*), glicin (*USB Corporation*), N-(2-hidroksietil)piperazin-N'-2-etansulfonska kiselina (Hepes) (*USB Corporation*), imidazol (*Sigma*), izopropil- -tiogalaktozid (IPTG) (*Sigma*), izopropanol (*Kemika*), kalcijev klorid (*Kemika*), kanamicin (*Sigma*), kloridna kiselina (*Kemika*), kloroform (*Kemika*), kvaš ev ekstrakt (*Difco*), magnezijev acetat (*Sigma*), magnezijev klorid (*Fluka*), magnezijev sulfat (*Kemika*), -merkaptoetanol (*Serva*), N,N'-metilenbisakrilamid (*Merck*), natrijev acetat (*Kemika*), natrijev dodecilsulfat (SDS) (*Merck*), natrijev hidroksid (*Kemika*), natrijev klorid (*Kemika*), octena kiselina (*Kemika*), polietilenglikol 8000 (PEG 8000) (*Sigma*), 1,4-bis(2-(4-metil-5-fenil)oksazolil)benzen (POPOP) (*Kemika*), 2,5-difeniloskazol (PPO) (*Kemika*), spermidin (*Sigma*), N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (TEMED) (*Serva*), toluen (*Kemika*), trikloroctena kiselina (TCA) (*Kemika*), tripton (*Sigma*), Tris(hidroksimetil)-aminometan (Tris) (*Sigma*), urea (*Kemika*).

2.1.2. Aminokiseline i nukleotidi

ATP (*Sigma*), CTP (*Sigma*), dNTP (smjesa dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (*Sigma*), GTP (*Sigma*), izoleucin (*Sigma*), [^{14}C]-izoleucin (*Amersham biosciences*), valin (*Sigma*), [^{14}C]-valin (*Amersham biosciences*), UTP (*Sigma*).

2.1.3. Boje

bromfenol plavo (*Serva*), Coomassie Brilliant Blue R-250 (*Merck*), Coomassie Brilliant Blue G-250 (*Merck*), etidij-bromid (*Boehringer Mannheim*), ksilencijanol fluorofosfat (XCF) (*Serva*), toluidinsko modrilo (*Sigma*).

2.1.4. Enzimi, proteini i nukleinske kiseline

Albumin iz gove eg seruma (eng. *bovine serum albumin*; BSA) (NEB), DNaza I s pripadnim puferom (*Sigma*), DNaza I (oslobo ena od RNaza) (NEB), *Pfu* DNA-polimeraza (*Fermentas*), restriktivne endonukleaze s pripadnim puferima (NEB), ribonukleaza A iz gove e guštera e (USB Corporation), Rnasin (Promega), *Taq* DNA-polimeraza (*Fermentas*), T4-DNA-ligaza (*Fermentas*) T4-polinukletid-kinaza (NEB), T7-RNA-polimeraza (*Sigma*), termostabilna anorganska pirofosfataza (TIPP) (NEB).

Transkript tRNA^{lle} iz bakterije *E. coli* proizveden *in vitro* pripremila je Morana Duli , dipl. ing.

Oligonukleotidi (*Invitrogen* ili *Sigma*) korišteni kao po etnice u lan anoj reakciji polimeraze ili sintetski geni za željenu molekulu tRNA, sintetizirani su prema potrebi.

2.1.5. Komercijalni kompleti za pro iš avanje DNA

QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) za izolaciju plazmidne DNA, *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) za pro iš avanje DNA iz reakcijskih smjesa lan ane reakcije polimeraze, *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) za izolaciju DNA iz agaroznih gelova.

2.1.6. Hranjive podloge i medij za uzgoj bakterije *E. coli*

Teku a hranjiva podloga Luria-Bertani (LB):

5 g dm⁻³ kvaš ev ekstrakt, 10 g dm⁻³ tripton, 10 g dm⁻³ NaCl.

LB plo e:

5 g dm⁻³ kvaš ev ekstrakt, 10 g dm⁻³ tripton, 10 g dm⁻³ NaCl, 15 g dm⁻³ agar.

Antibiotici kanamicin ili ampicilin dodaju se po potrebi do kona ne koncentracije 0,030 mg ml⁻¹, odnosno 0,100 mg ml⁻¹.

2.1.7. Sojevi i plazmidi *E. coli*

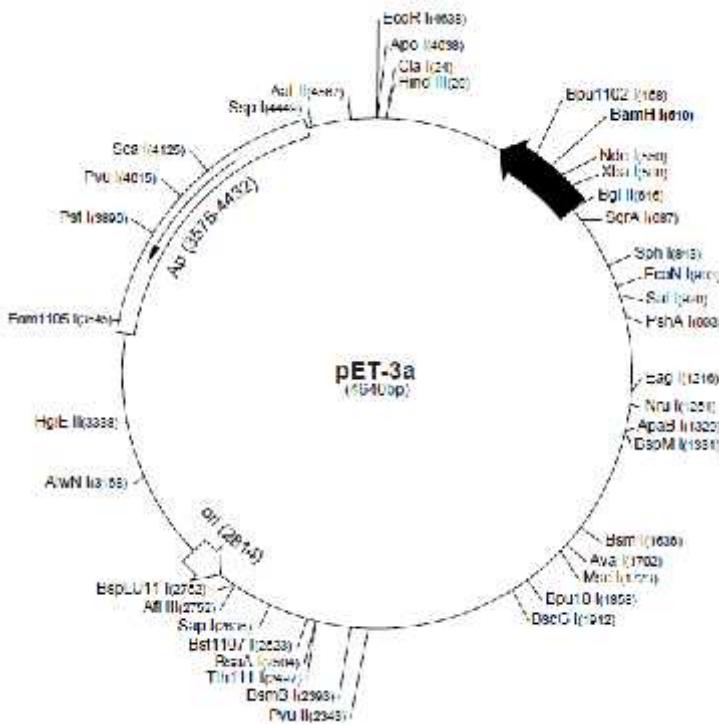
Sojevi *E. coli*

BL21 (DE3) (F⁻ *ompT* *hsdS_B* (*r_B* *m_B*) ga dcm (DE3); Novagen): soj korišten za prekomjernu ekspresiju gena ukloniranih u vektore iz pET serije. Soj sadrži gen za T7 polimerazu integriran u bakterijski kromosom pod kontrolom inducibilnog promotora *lacUV5*, a deficijentan je i za proteaze *lon* i *ompT*.

DH5 ((*supE44 lacU169 (80 lacZ) M15 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi1 relA1*): soj rutinski korišten za umnožavanje plazmidne DNA te za kloniranje. Pogodan je zbog delecije *endA1* gena (kodira za endonukleazu I) ime se izbjegava nespecifi na razgradnja DNA te zbog mogu nosti -komplementacije s plazmidima iz pUC serije.

Plazmidi za ekspresiju proteina u E. coli

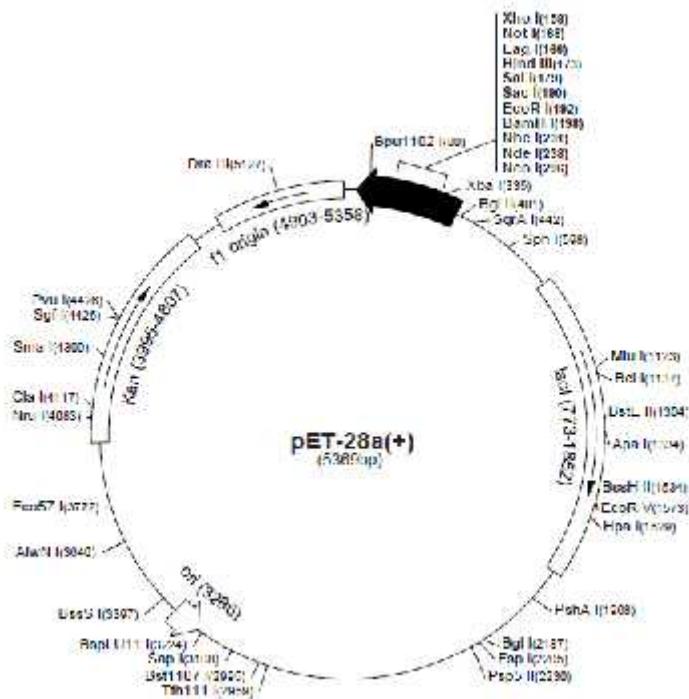
pET3a – derivat pET3a plazmida iz pET serije vektora za prekomjernu ekspresiju proteina pod kontrolom inducibilnog promotora. Omoguava ekspresiju rekombinantnih proteina s T7 privjeskom na N-kraju s ciljem imunoafinitetnog pranja avanja na agarozni koju su vezana monoklonska antitijela za T7 privjesak. Plazmid je niskog broja kopija i nosi gen za rezistenciju na ampicilin. U ovom radu korišten je za prekomjernu ekspresiju molekula tRNA (slika 2.1.).



Slika 2.1. Plazmidni vektor pET3a. pET3a se razlikuje od pET3a vektora po tome što ima samo jedno EcoRV restriktičko mjesto, dok pET3a ima dva. Budući da je izbačen kratki odsječak pET3a vektora koji se nalazio između dva EcoRV mjesta, pET3a je za 191 pb krać i od pET3a.

pET28b - plazmid iz pET serije vektora, rutinski korišten za prekomjernu ekspresiju proteina pod kontrolom inducibilnog promotora *T7lac*. Omoguava ekspresiju rekombinantnih

proteina s histidinskim privjeskom (skra eno: His-privjesak) na N- ili C-kraju s ciljem prošavanja afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozni. Plazmid je niskog broja kopija i nosi gen za rezistenciju na kanamicin (slika 2.2.).



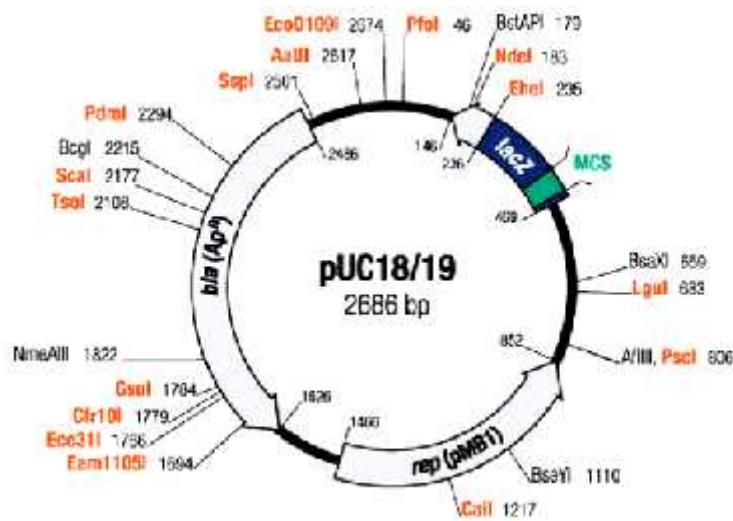
Slika 2.2. Plazmidni vektor pET28.

pETIleRS - derivat plazmida iz serije pET vektora s ukloniranim genom za IleRS iz *E. coli*. Nosi rezistenciju na ampicilin. Rekombinantni plazmid je poklon prof. Ya-Ming Hou (Thomas Jefferson University, Philadelphia, USA).

pXVal17 – rekombinantni plazmid s ugra enim genom za ValRS iz *E. coli*. U radu je korišten kao kalup za umnažanje gena za ValRS i kloniranje u pET28b vektor u svrhu dobivanja rekombinantnog ValRS proteina s His-privjeskom. Konstrukcija rekombinantnog plazmida pXVal17 opisana je u radu Brevet i sur. (1989).

pUC18 - plazmid visokog broja kopija, esto upotrebljavan za kloniranje ili sekvenciranje. Njegove osnovne značajke su gen za rezistenciju na ampicilin, zatim *lac* regija u

kojoj se nalazi višestruko mjesto za kloniranje (eng. *multiple cloning site*, MCS) te po etak replikacije *ori* iz plazmida pBR322. Ugradnja željenog inserta u višestruko mjesto za kloniranje inaktivira gen za -galaktozidazu što omoguava selekciju rekombinantnih plazmida na temelju plave ili bijele boje kolonija na podlozi koja sadrži 5-bromo-4-kloro-3-indolil-D-galaktozidu (X-gal; slika 2.3.).



Slika 2.3. Plazmidni vektor pUC18/19.

pUC18tRNA^{Ile}_{GAT}* – derivat plazmida pUC18 s ukloniranim genom za tRNA^{Ile}_{GAT} izoakceptor pod kontrolom promotora za T7-RNA-polimerazu. Gen je ukloniran kao *Eco*RI-*Bam*HI kazeta. Rekombinantni plazmid korišten je za transkripciju tRNA^{Ile}_{GAT} izoakceptora *in vitro*.

pUC18tRNA^{Val}_{TAC}† – derivat plazmida pUC18 s ukloniranim genom za tRNA^{Val}_{TAC} izoakceptor pod kontrolom promotora za T7-RNA-polimerazu. Gen je ukloniran kao *Eco*RI-

* rekombinantni plazmid pUC18tRNA^{Ile}_{GAT} napravila je Morana Dulić, dipl. ing.

† rekombinantni plazmid pUC18tRNA^{Val}_{TAC} napravila je Morana Dulić, dipl. ing.

*Bam*HI kazeta. Rekombinantni plazmid korišten je za transkripciju tRNA^{Val}_{TAC} izoakceptora *in vitro*.

2.1.8. Kromatografske kolone, punila i ostali kromatografski materijali

Symmetry 300TM C4 5 µm MVKIT 3,9 x 150 mm (*Waters*), PROTEIN C4 5 µm 4,6 x 250 mm (*Grace Vydac*), DEAE-celuloza DE-52 (*Whatman*), Ni-NTA agarosa (*Qiagen*), polietilenimin-celuloza plo ice za tankoslojnu kromatografiju (PEI) (*Fluka*).

2.2. Metode

2.2.1. Metode rada s DNA

2.2.1.1. Konstrukcija i kloniranje sintetskih gena za tRNA

Za transkripciju tRNA molekula, konstruirani su sintetski oligonukleotidi koji sadrže nukleotidni slijed promotora T7-RNA-polimeraze te gen za željenu molekulu tRNA (slika 2.4.). Na krajevima oligonukleotida nalaze se restriktivna mjesta za *Eco*RI, *Sal*I te *Bam*HI. Restriktivna mjesta za *Eco*RI te *Bam*HI odgovaraju stršem nukleotidnom slijedu koji preostaje nakon razgradnje vektora s odgovarajućim enzimima tako da za kloniranje *Eco*RI-*Bam*HI kazete nije potrebna razgradnja inserta restriktivnim enzimima. U konstrukt je uključeno i restriktivno mjesto za *Bst*NI koji omogućava dobivanje pravilnog 3'-CCA kraja molekule tRNA prilikom transkripcije *in vitro*. Takav raspored restriktivnih mjesto napravljen je za kloniranje *Eco*RI-*Bam*HI kazete u pUC18 vektor (slika 2.3.) za transkripciju *in vitro* ili *Sal*I-*Bam*HI kazete u pET3a vektor za transkripciju *in vivo*. Važno je napomenuti da je prvi nukleotidni par *E. coli* tRNA^{Ile}_{GAT} A₁·U₇₂, no u sintetskom genu izmijenjen je u G₁·C₇₂. Zamjena je uvedena imajući na umu da je transkripcija T7-RNA-polimerazom znatno uinkovitija ukoliko je prvi nukleotid G, te da prvi nukleotidni par nije element identiteta za IleRS (Nureki i sur. 1994). Kloniranje sintetskih gena molekula tRNA zahtjeva nekoliko koraka. Oligonukleotidi su najprije otopljeni u redestiliranoj vodi do željene koncentracije, a budući da su defosforilirani, bilo ih je potrebno fosforilirati T4-polinukleotid-kinazom. Reakcijska smjesa od 20 µl sadržavala je 2 µmol dm⁻³ oligonukleotida, 1 x pufer za T4-polinukleotid-kinazu (70 mmol dm⁻³ Tris-HCl, 10 mmol dm⁻³ MgCl₂ 5 mmol dm⁻³ DTT, pH = 7,6), 1 mmol dm⁻³ ATP (pH = 7,5), 10 mmol dm⁻³ DTT te 0,5 µl T4 polinukleotid kinaze (10 U µl⁻¹). Reakcija se odvijala 1 h na 37 °C nakon čega

je T4-polinukleotid-kinaza inaktivirana inkubacijom reakcijske smjese 10 min na 65 °C. Fosforilirani oligonukleotidi denaturirani su 3 min na 95 °C i polagano hla eni do sobne temperature. Takav postupak omogu ava sparivanje komplementarnih oligonukleotida. Pripremljeni konstrukti tRNA^{Ile}_{GAT} i tRNA^{Val}_{TAC} gena razgra eni su *Sal*II enzimom prema uputama proizvo a a te pro iš eni *QIAquick PCR Purification Kit*-om (tako er prema uputama proizvo a a). pET3a vektor pripremljen je za ligaciju tako da je razgra en najprije restriktivnim enzimom *Sal*II i pro iš en *QIAquick Gel Extraction Kit* (*Qiagen*), a zatim razgra en s *Bam*HI i pro iš en iz agaroznog gela *QIAquick Gel Extraction Kit* (*Qiagen*). Ligacijske smjese ukupnog volumena 15 µl sadržavale su 100 ng razgra enog pET3a vektora, insert DNA (tRNA konstrukt) u množinskom omjeru 5:1, 10:1 ili 20:1 u odnosu na vektor, 1 x pufer za T4-DNA-ligazu (40 mmol dm⁻³ Tris-HCl, 10 mmol dm⁻³ MgCl₂, 10 mmol dm⁻³ DTT, 0,5 mmol dm⁻³ ATP, pH = 7,8) te 0,75 µl T4-DNA-ligaze (400 U µl⁻¹). Ligacijske reakcije inkubirane su 1 h na sobnoj temperaturi nakon ega je T4-DNA-ligaza inaktivirana inkubacijom 10 min na 65 °C.

tRNA^{Ile}_{GAT}

5' - **AATTC GTCGAC TAATACGACTCACTATA**GGGCTTGTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAG
GTCGGTGGTTCAAGTCCACTCAGGCCAC**CCA**G-3'

5' - **GATCCTGGTGGCCTGAGTGGACTTGAACCACCGACCTCACCCCTATCAGGGTGCGCTAACCACCTGAGCT**
ACAAGGCC**TATAGTGAGTCGTATTA****GTCGAC**G-3'

tRNA^{Val}_{TAC}

5' - **AATTC GTCGAC TAATACGACTCACTATA**GGGTGATTAGCTCAGCTGGAGAGCACCTCCCTAACAGGAGGGGG
TCGGCGGTTCGATCCCGTCATCAC**CCAG**-3'

5' - **GATCCTGGTGGGTGATGACGGGATCGAACCGCCGACCCCTCCTGTAAGGGAGGTGCTCTCCAGCTGAGCTA**
ATCAC**CCCTATAGTGAGTCGTATTA****GTCGAC**G-3'

*Eco*RI - **G AATTC**, *Sal*II - **G TCGAC**, *Bam*HI - **G GATCC**, *Bst*NI - **CC AGG**

Slika 2.4. Nukleotidni slijed sintetskih oligonukleotida korištenih za kloniranje gena za tRNA^{Ile}_{GAT} ili tRNA^{Val}_{TAC}. Promotor za T7-RNA-polimerazu ozna en je podebljanim slovima, dok su restriktivna mjesta, odnosno odgovaraju i strše i krajevi, istaknuti podebljanim slovima u kurzivu te obojani:

2.2.1.2. Kloniranje gena za *E. coli* ValRS

Lan ana reakcija polimeraze (eng. *polymerase chain reaction*, PCR) korištena je u ovom radu za umnažanje gena za ValRS iz *E. coli* ugra enog u plazmidni vektor pXVal17 (vidi

poglavlje 2.1.7.). Preparativna reakcija PCR ukupnog volumena 100 µl sadržavala je 60 ng pXVal17 vektora (kalup), 1,6 µmol dm⁻³ po etnica, 1 x pufer za *Pfu* polimerazu (20 mmol dm⁻³ Tris-HCl (pH = 8,8), 10 mmol dm⁻³ (NH₄)₂SO₄, 10 mmol dm⁻³ KCl, 0,1 mg ml⁻¹ BSA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 2 mmol dm⁻³ MgSO₄), 0,2 mmol dm⁻³ dNTP-a (svakog) te 2 µl *Pfu* polimeraze (2,5 U µl⁻¹). Nukleotidni slijed korištenih po etnica prikazan je na slici 2.5., a uvjeti PCR-a prikazani su u tablici 2.1.

5' -CTA**GCTAGC**ATGGAAAAGACATATAACCC-3'

5' -GAA**GAATT**C TTACAGCGCGCGATAACAGC-3'

NheI - **G CTAGC**, *EcoRI* - **G AATTC**

Slika 2.5. Po etnice korištene u PCR-u. Dio po etnica komplementaran genu za ValRS istaknut je podebljanim slovima, dok su restriktivska mjesta istaknuta podebljanim slovima u kurzivu te obojana:

Tablica 2.1. Uvjeti reakcije PCR.

	temperatura / °C	trajanje ciklusa / min	broj ciklusa
po etna denaturacija	94	5	1
denaturacija	94	0.5	30
sparivanje po etnica	56	0.5	30
produljenje	72	2	30
završno produljenje	72	8	1

Produkti PCR-a razdvojeni su na agaroznom gelu, a produkt odgovarajuće veličine, izrezan je iz gela i postavljen pomoći u *QIAquick Gel Extraction Kit*-a. Glavni produkt PCR-a i pET28b vektor razgradi se na restriktivskim enzimom *NheI* nakon čega se postavlja u *QIAquick PCR Purification Kit*-om, odnosno *QIAquick Gel Extraction Kit*-om. Prostori su podvrsgnuti razgradnji s *EcoRI* i ponovno prostiraju se na veće opisane u instrukciji. Razgradnje restriktivskim enzimima te prostiraju se na komercijalnim kompletim napravljena su prema uputama proizvođača. Koncentracija je određena pomoći u spektrofotometra NanoDrop 1000 pri valnoj duljini λ = 260 nm.

Ligacijske smjese ukupnog volumena 20 μl sadržavale su 100 ng razgra enog pET28b vektora, insert (razgra eni glavni produkt PCR-a, koji sadrži gen za ValRS) u množinskom omjeru 3:1 u odnosu na vektor, 1 x pufer za T4-DNA-ligazu te 1 μl T4-DNA-ligaze ($400 \text{ U } \mu\text{l}^{-1}$). Reakcije ligacije inkubirane su preko no i na 16 °C, nakon ega je T4-DNA-ligaza inaktivirana 10 min na 65 °C.

2.2.1.3. Agarozna gel-elektoforeza

Agarozni gelovi (1 % w/v agarosa) pripremljeni su otapanjem 1 g agaroze u 100 ml pufera 1 x TAE (40 mmol dm^{-3} Tris, 1 mmol dm^{-3} EDTA titrirana octenom kiselinom do pH 8,0 i $0,5 \text{ mg dm}^{-3}$ etidijev bromid) i grijanjem u mikrovalnoj pe nici nekoliko minuta. Prije nanašanja uzorka na gel, dodano im je 1/10 volumena agarozne boje ($25 \text{ mg ksilencijanolfluorofosfata}$ i $25 \text{ mg bromfenol plavo otopljenih u 7 ml } 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ EDTA (pH = 8,0) te 3 ml glicerola). Elektroforeza je provo ena u elektroforetskom puferu 1 x TAE pri 120 V na sobnoj temperaturi u aparaturi za horizontalnu elektroforezu. Tijekom elektroforeze etidijev bromid interkalira se u nukleinske kiseline i pritom mu se pove a intenzitet fluorescencije za 20 puta, što omogu ava jasnu detekciju DNA fragmenata pod UV svjetlom transiluminatora ($\lambda = 312 \text{ nm}$).

2.2.1.4. Izolacija plazmidne DNA

U ovom radu, korištena su dva na ina izolacije plazmidne DNA: komercijalni *QIAprep Spin Miniprep Kit* (*Qiagen*) (izolacija prema uputama proizvo a a) te metoda alkalne lize. Postupak izolacije plazmidne DNA metodom alkalne lize zasniva se na selektivnom taloženju genomske DNA i stani nih proteina. Stanice su lizirane u lužnatim uvjetima uz dodatak SDS-a, pri emu se nukleinske kiseline i proteini denaturiraju. Neutralizacijom smjese pomo u kalijevog acetata, genomska DNA i proteini precipitiraju, a plazmidi se renaturiraju i ostaju u otopini.

2 ml LB medija s antibiotikom dodanim po potrebi, inokulirano je kolonijom bakterije *E. coli* naraslom na LB plo i. Bakterijska kultura inkubirana je preko no i na 37 °C uz potresanje pri 200 rpm. No na kultura oborenja je centrifugiranjem 1 min na 12000 rpm, nakon ega je supernatant uklonjen aspiracijom pomo u vakuum sisaljke, a talog resuspendiran u 100 μl hladne otopine P1 (50 mM glukoza, 25 mM Tris-HCl (pH = 8,0), 10 mM EDTA (pH = 8,0)). Suspenzija je inkubirana 5 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim je dodano 200 μl hladne otopine P2 (0,2 mol dm^{-3} NaOH, 10 g dm^{-3} SDS). Nakon pažljivog miješanja okretanjem 4-6 puta, suspenzija je

inkubirana na ledu 5 min, a zatim neutralizirana dodatkom 150 µl hladne otopine P3 (kalijev acetat 3 mol dm⁻³, titriran octenom kiselinom do pH 5,5) te ponovno inkubirana 5 min na ledu. Talog je oboren centrifugiranjem 10 minuta na 12000 g, a supernatant gdje se nalazi plazmidna DNA ekstrahiran s jednakim volumenom fenol-kloroforma. Iz vodenog sloja, plazmidna DNA istaložena je nakon dodatka jednakog volumena izopropanola-centrifugiranjem 30 min na 12000 rpm. Talog plazmidne DNA ispran je sa 70 % etanolom i centrifugiran 15 min na 12000 rpm. Supernatant je uklonjen, a talog posušen u SpeedVac ure aju i otopljen u 50 µl redestilirane vode.

2.2.1.5. Restrikcijska analiza plazmidne DNA

Restrikcijska analiza korištena je u svrhe provjere ugradnje željenog gena u plazmidni vektor. Budući da je poznat nukleotidni slijed rekombinantnih plazmida, razgradnjom s odabranim restrikcijskim enzimima dobivaju se fragmenti DNA poznate veličine. Navedeno nam omoguava prepoznavanje željenog rekombinantnog plazmida s pravilno ugrađenim insertom.

Za provjeru rekombinantnih plazmida pET28b koji bi trebali sadržavati gen za ValRS, korišteni su sljedeći restrikcijski enzimi:

- 1) *NheI* i *EcoRI* dvostruka razgradnja – otkrivana duljina fragmenata je 2,9 kb i 5,4 kb (izbacuje se insert iz rekombinantnog plazmida). Prazan pET28b vektor navedenom dvostrukom razgradnjom, bitiće razgradi na fragmente veličine 5,4 kb i 38 bp (fragment 38 bp nije vidljiv na 1 % agaroznom gelu).
- 2) *BamHI* - otkuje se lineariziran rekombinantni vektor veličine 8,3 kb (u rekombinantnom plazmidu izbačeno je *BamHI* restrikcijsko mjesto koje je prisutno u pET28b vektoru, no gen za ValRS ima restrikcijsko mjesto za *BamHI* zbog čega se rekombinantni plazmid linearizira). Prazan pET28b takođe bitiće lineariziran, no na agaroznom gelu bitiće vidljiv fragment veličine 5,4 kb.

Za provjeru rekombinantnih plazmida pET3a koji bi trebali sadržavati gen za tRNA^{Ile}_{GAT} ili tRNA^{Val}_{TAC} korišteni su sljedeći restrikcijski enzimi:

- 1) *AvaI* i *BamHI* dvostruka razgradnja – otkrivana duljina fragmenata je 3,2 kb i 0,9 kb. Prazan pET3a vektor bitiće razgradi na fragmente veličine 4 kb i 0,4 kb.

- 2) *SalI* – o ekivana duljina lineariziranog rekombinantnog plazmida je 4,1 kb. Prazan pET3a takođe je biti lineariziran, no na agaroznom gelu je biti vidljiv kao fragment veličine 4,4 kb.
- 3) *BamHI* – o ekuje se lineariziran rekombinantni vektor veličine 4,1 kb. Prazan pET3a takođe je biti lineariziran, no o ekuje se veličina 4,4 kb.
- 4) *SalI* i *BamHI* dvostruka razgradnja – o ekivana duljina fragmenata je 4,0 kb i 0,1 kb (izbacuje se insert iz rekombinantnog plazmida). Prazan pET3a vektor, navedenom dvostrukom razgradnjom, biti će razgralen na fragmente veličine 4,0 kb i 0,4 kb.

Razgralenje je 200 – 500 ng izoliranih plazmida u ukupnom reakcijskom volumenu 20 µl. Reakcijska smjesa sadržavala je odgovarajuće restriktivne enzime i pufere prema uputama proizvođača, a inkubirana je 4 h na 37 °C. Fragmenti nastali razgradnjom analizirani su agaroznom gel-elekforezom.

2.2.1.6. Određivanje nukleotidnog slijeda DNA – sekvenciranje

Rekombinantni plazmidi za koje je restriktivnom analizom pokazano da vrlo vjerojatno posjeduju pravilno ugrađeni insert, izolirani su išom metodom izolacije plazmidne DNA, odnosno pomoću komercijalnog kompleta *QIAprep Spin Miniprep Kit*. Za konfirmaciju uspješnog kloniranja, rekombinantni plazmidi sekvencirani su u DNA-servisu Instituta Ruđer Bošković na etverokapilarnom sekvenatoru ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*). Uobičajeno je pripremljeno 500 ng plazmida u ukupnom volumenu od 13 µl i dodan 1 µl polietilenice za sekvenciranje koncentracije 3,2 µmol dm⁻³ (tablica 2.2.).

Tablica 2.2. Polietilenice korištene za sekvenciranje rekombinantnih plazmida.

Naziv	Oligonukleotid
T7_F	5' - TAATACGACTCACTATAGGG - 3'
T7_R	5' - GCTAGTTATTGCTCAGCGG - 3'

2.2.1.7. Transformacija stanica *E. coli* elektroporacijom

Elektroporacija je jedna od metoda unosa strane DNA u bakterijske stanice, a zasniva se na kratkotrajnom povraćanju propusnosti bakterijske stanicne stijenke uslijed izlaganja bakteriji električnom pulsu. Za elektroporaciju je korišten uređaj *BIORAD, Gene Pulser™* na kojem su

postavljeni sljede i parametri: otpor u iznosu od 200 , kapacitativnost od 25 μF i napon 2,5 kV. U 40 μl elektrokompetentnih bakterija dodano je 50-100 ng plazmidne DNA. Primijenjen je puls od 2,5 kV cm^{-1} u trajanju od 4,5 ms, nakon ega su bakterije resuspendirane u 1 ml teku eg LB medija i inkubirane 1 h na 37 °C. Odgovaraju i alikvoti naneseni su na selektivne hranjive podloge, koje su zatim inkubirane preko no i na 37 °C. Budu i da plazmidi sadrže gen za rezistenciju na odre eni antibiotik, preživljavaju samo transformirane bakterije.

2.2.2. Metode rada s proteinima

2.2.2.1. Prekomjerna ekspresija proteina i priprema proteinskih ekstrakata

Optimacija prekomjerne ekspresije

Prilikom po etka rada sa svakim novim proteinom, poželjno je optimirati njegovu ekspresiju. Naj eš i parametri koji se optimiraju su koli ina IPTG-a s kojim se inducira ekspresija, vrijeme ekspresije te temperatura uzgoja bakterija nakon indukcije, odnosno tijekom ekspresije proteina. Promjenom temperature pri kojoj se odvija ekspresija može se utjecati na topljivost proizvedenih proteina, što dakako utje e na uspješnost pro iš avanja, odnosno prinos pro iš enog proteina. Iz tih razloga testirana je ekspresija proteina ValRS s rekombinantnog plazmida pET28bValRS u sljede im uvjetima: indukcija s 0,25, 0,5 ili 1 mmol dm⁻³ IPTG-om te vrijeme trajanja ekspresije dva ili pet sati. Najprije je pripremljena no na pretkultura - bakterijske stanice *E. coli* BL21DE3 transformirane s pET28bValRS plazmidom, nasa ene su u 1 ml LB medija (u medij je dodan kanamicin u kona noj koncentraciji 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Stanice su rasle 16 sati na 37 °C. Zatim je 1 ml LB medija (s dodanim kanamicinom) inokuliran sa 100 μl no ne pretkulture i inkubiran na 37 °C uz potresanje pri 200 rpm, sve dok bakterijska suspenzija nije dosegla vrijednost OD₆₀₀ (opti ka gusto a bakterijske suspenzije mjerena pri =600 nm) 0,5 – 0,8. Prekomjerna ekspresija enzima ValRS inducirana je dodatkom IPTG-a kona ne koncentracije 0,25, 0,5 ili 1 mmol dm⁻³. Bakterijska suspenzija inkubirana je na 37 °C u induciraju im uvjetima dva ili pet sati nakon ega su uzeti alikvoti od 50 μl iz kojih su stanice oborene centrifugiranjem 15 min, pri 5000 g na 4 °C. Supernatant je uklonjen aspiracijom vakuum sisaljkom, a talog otopljen u 15 μl redestilirane vode. Priprema uzorka za SDS-PAGE analizu opisana je u poglavljju 2.2.2.4.

Preparativna prekomjerna ekspresija i liza bakterijskih stanica

Za pro iš avanje proteina ValRS u preparativnim koli inama, pripremljeno je 5 ml no ne pretkulture (5 ml LB medija s kanamicinom inokulirano je stanicama *E. coli* BL21DE3 transformiranim plazmidom pET28bValRS). LB medij (0,5 l) u koji je prethodno dodan antibiotik kanamicin ($30 \mu\text{g ml}^{-1}$) inokuliran je s 5 ml no ne pretkulture (omjer 1:100). Bakterijska kultura uzgajana je u tresilici na 37°C dok vrijednost OD₆₀₀ nije dosegla 0,5 – 0,8, a zatim je prekomjerna ekspresija enzima ValRS inducirana dodatkom IPTG-a ($0,25 \text{ mmol dm}^{-3}$). Bakterije su rasle u induciraju im uvjetima 2 sata na 37°C , a zatim su oborene centrifugiranjem 15 min pri 5000 g i 4°C .

Supernatant je uklonjen, a talog resuspendiran u 5 ml pufera A za afinitetno pro iš avanje na Ni-NTA agarazi (20 mmol dm^{-3} Hepes 7,0, 500 mmol dm^{-3} NaCl, 5 mmol dm^{-3} MgCl₂, 10 mmol dm^{-3} imidazol, 10 mmol dm^{-3} -merkaptoetanol). Za lizu bakterijskih stanica i osloboanje proteina u otopinu korištena je sonikacija. Metoda se temelji na stvaranju i odašiljanju ultrazvu nih valova putem sonde koja se uroni u bakterijsku suspenziju i koji pritom razbijaju bakterijske stijenke i membrane. Prethodno sonikaciji, bakterijskoj suspenziji dodani su PMSF – inhibitor serinskih proteaza ($0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$), lizozim ($0,06 \%$) i DNaza I (12 U ml^{-1}). Stanice su razbijane sonikacijom 6 puta po 1 minutu u razmacima od 1 minute (suspenzija stanica je tijekom sonikacije inkubirana na ledu). Lizat je odmah centrifugiran 1 h pri 10000 g na 4°C , a dobiveni supernatant (proteinski ekstrakt) profiltriran protiskivanjem kroz sterilni filter te podvrgnut pro iš avanju na Ni-NTA agarazi (opisano u sljedećem poglavljju).

2.2.2.2. Pro iš avanje proteina afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarazi

Plazmidi pETIleRS i pET28bValRS sadrže gene za rekombinantne proteine IleRS odnosno ValRS sa His-privjeskom na N-kraju, što omogujava afinitetno pro iš avanje proteina na Ni-NTA agarazi. Specifične reverzibilne interakcije između His-privjeska i liganda vezanog na kromatografsku matricu mogu dovesti do izdvajanja proteina s His-privjeskom od ostatka proteinskog ekstrakta afinitetnom kromatografijom. Budući da je His-privjesak neutralan pri fiziološkom pH te uglavnom ne utječe na strukturu i funkciju rekombinantnih proteina, izrazito je koristan za vezanje proteina na metal-kelatnim površinama kao što je Ni-NTA. Nitrilotrioceta kiselina (NTA) je tetradentatni ligand koji zauzima četiri koordinacijska mjesta Ni²⁺ iona, dok dva koordinacijska mjesta ostaju slobodna za interakciju s imidazolnim prstenovima dvaju susjednih histidina sadržanih u polihistidinskom privjesku. Kao punilo za

kolone koristi se Ni-NTA agaroza koja se sastoji od Sepharose CL-6B na koju je vezana Ni-NTA. Kapacitet smole je 5-10 mg proteina po mililitru.

Svi puferi korišteni u pro iš avanju imaju temeljno jednak sastav - 20 mmol dm⁻³ Hepes 7,0, 500 mmol dm⁻³ NaCl, 5 mmol dm⁻³ MgCl₂ i 10 mmol dm⁻³ -merkaptoetanol. Puferi A-D razlikuju se po kona noj koncentraciji imidazola - redom 10, 20, 30 ili 200 mmol dm⁻³ imidazola. Kromatografska kolona naprije je napunjena je s 1 ml Ni-NTA, a zatim isprana s redestiliranom vodom (10 ml) i uravnatožena u puferu A (10 ml). Radi postizanja u inkovitijeg vezanja proteina s His-privjeskom, proteinski ekstrakt tri puta je propušten kroz kolonu. Kako bi se uklonili nevezani proteini, kolona je isprana puferom A (30 ml), a zatim i puferima B (10 ml) i C (10 ml) za uklanjanje slabo vezanih proteina. Protein je s kolone eluiran puferom C (6 ml), a uspješnost pro iš avanja i pojedina ne frakcije eluiranog proteina (1 ml) provjerene su SDS poliakrilamidnom gel-elektroforezom (opisano u sljede em poglavlju). Postupak pro iš avanja proteina proveden je u ledenici na 4 °C.

2.2.2.3. Denaturiraju a poliakrilamidna gel-elektroforeza u prisutnosti natrijevog dodecilsulfata (SDS-PAGE)

U svrhu analize proteinskih frakcija dobivenih nakon afinitetne kromatografije korištena je metoda denaturiraju e poliakrilamidne gel-elektroforeze. To je metoda u kojoj se denaturirani proteini razdvajaju na poliakrilamidnom gelu pod utjecajem elektri nog polja. Budu i da svi denaturirani proteini zbog nastalog kompleksa sa SDS-om imaju jednak oblik te omjer naboja i mase, razdvajanje pojedinih proteina rezultat je isklju ivo razlike u molekulskoj masi. Za izlijevanje SDS-poliakrilamidnih gelova i elektroforezu uzoraka korištena je aparatura za elektroforezu Mini PROTEAN TETRA (Biorad). SDS-gel sastojao se od dva dijela: gel za razdvajanje (9 % akrilamid-bisakrilamid (29:1), 0,375 mol dm⁻³ Tris-HCl (pH 8,8), 0,1 % (w/v) SDS) i gel za sabijanje (4 % akrilamid-bisakrilamid (29:1), 0,125 mol dm⁻³ Tris-HCl (pH 6,8), 0,1 % (v/w) SDS). Prije nanošenja na gel, uzorcima je dodan pufer za denaturaciju i nanošenje na gel (62,5 mmol dm⁻³ Tris-HCl (pH 6,8), 12,5 mmol dm⁻³ -merkaptoetanol, 6,25 % (v/v) glicerol, 1,25 % (w/v) SDS, 0,002 % bromfenol plavo), a denaturirani su inkubacijom 5 min u kipu oj vodi. Elektroforeza je provo ena 15 min pri 120 V, a zatim 45 min pri 180 V na sobnoj temepraturi u puferu sljede eg sastava: 14,4 g dm⁻³ glicin, 3,03 g dm⁻³ Tris baza, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,3.

2.2.2.4. Bojanje SDS-poliakrilamidnih gelova bojom Coomassie Brilliant Blue

Za vizualizaciju vrpcí proteina, gelovi su bojani uz potreskivanje 15 min u otopini sastava: 2,5 g dm⁻³ Coomassie Brilliant Blue R-250, 45 % (v/v) metanol i 10 % (v/v) octena kiselina. Gelovi su odbojavani u destiliranoj kipu oj vodi do pojave jasnih vrpcí proteina (10 min).

2.2.2.5. Uguš ivanje proteina ultrafiltracijom

Nakon provjere frakcija afinitetnog pro iš avanja na Ni-NTA agarozi, spojene su i uguš ene frakcije sa zna ajnom koli inom istog proteina metodom ultrafiltracije. Pritom je prema uputama proizvo a a korišten *Centricon®-centrifugal filter device (Milipore)* s porama koje propuštaju estice manje od 30 kDa. Pro iš en i uguš en protein dijaliziran je prema puferu za dijalizu (20 mmol dm⁻³ Tris-HCl, (pH = 7,5), 50 mmol dm⁻³ NaCl, 5 mmol dm⁻³ - merkaptoetanol, 10 % (v/v) glicerol) te pohranjen na -20 °C nakon što mu je koncentracija odre ena metodom po Bradfordu ili spektrofotometrijski pomo u ure aja NanoDrop 1000 (opisano u sljede em poglavljju).

2.2.2.6. Odre ivanje koncentracije proteina

Metoda po Bradfordu

Ova metoda temelji se na reakciji proteina i boje Coomassie Brilliant Blue G-250 pri emu se apsorpcijski maksimum boje pomi e s 465 nm na 595 nm (Bradford 1976). Apsorbancija smjese je pri valnoj duljini od 595 nm u odre enom rasponu linearno proporcionalna koncentraciji proteina u uzorku. Da bi se mogla odrediti koncentracija proteina, nužno je napraviti baždarni pravac s poznatim koncentracijama proteinskog standarda (npr. albumina gove eg seruma, eng. *bovine serume albumine*, BSA) u rasponu unutar kojeg se o ekuje koncentracija proteina od interesa. Pomo u dobivene jednadžbe pravca, odredi se koncentracija ispitivanog proteina. Rutinski su svi uzorci razrje eni u destiliranoj vodi do kona nog volumena 100 µl i dodano im je po 1 ml Bradfordovog reagensa (0,1 g dm⁻³ Coomassie Brilliant Blue G-250, 5 % (v/v) etanola, 8,5 % fosfatne kiseline). Apsorbancija pri valnoj duljini od 595 nm mjerena je 15-20 min kasnije.

Mjerenje koncentracije proteina na spektrofotometru NanoDrop 1000

U svrhu mjerenja koncentracije proteina spektrofotometrom NanoDrop 1000, potrebno je nanijeti 2 µl uzorka na postolje instrumenta te unijeti u program spektrofotometra ekstinkcijski

koeficijent i molekulsku masu ispitivanog proteina. Kao slijepa proba za nuliranje instrumenta, koristi se pufer u kojem se protein nalazi. Rezultati mjerjenja su apsorpcijski spektar i koncentracija uzorka proteina izražena u mg ml^{-1} , izra unata pomo u apsorbancije pri valnoj duljini od 280 nm. Mjerno podru je instrumenta za mjerjenje koncentracije proteina je 0,10 – 100 mg ml^{-1} .

2.2.3. Metode rada s tRNA

2.2.3.1. Transkripcija molekula tRNA *in vitro*

Transkripcijska smjesa sadržavala je: 0,1 $\mu\text{g }\mu\text{l}^{-1}$ kalupa DNA (plazmid pUC18tRNA^{Val}_{TAC}) razgra en s *Bst*NI enzimom prema uputama proizvo a a), pufer 1 x TXN (40 mmol dm^{-3} Tris-HCl (pH = 8,0), 20 mmol dm^{-3} MgCl₂, 2 mmol dm^{-3} spermidin), 4 mmol dm^{-3} smjesa NTP-ova (svih), 5 mmol dm^{-3} DTT, 0,05 mg ml^{-1} BSA, 0,05 U ml^{-1} RNasin, 8 mU ml^{-1} pirofosfataze, 0,1 mg ml^{-1} T7-RNA-polimeraze. Reakcija se odvijala 4 h na 37 °C nakon ega je kalup DNA razgra en dodatkom 60 U DNaze I (oslobo ene od RNaza) uz dodatak odgovaraju eg reakcijskog pufera prema uputama proizvo a a. Nakon 2,5 sata inkubacije na 37 °C, DNaza I deaktivirana je inkubacijom 10 min na 65 °C. Transkripcijska smjesa prethodno pro iš avanju na stupcu DEAE-celuloze, dijalizirana je prema 1 x TXN puferu (bez spermidina) kojem je dodan natrij klorid do koncentracije 0,2 mol dm^{-3} .

2.2.3.2. Pro iš avanje transkripata ionskom izmjenom na stupcu DEAE-celuloze

Za pro iš avanje molekula tRNA^{Val} proizvedenih *in vitro* korištena je ionska izmjena na stupcu DEAE-celuloze koja pripada skupini slabih ionskih izmjenjiva a. Svi puferi upotrebljeni prilikom pro iš avanja su 1 x TXN puferi (40 mmol dm^{-3} Tris-HCl (pH = 8,0), 20 mmol dm^{-3} MgCl₂), ali s razli itim koncentracijama NaCl. Najprije je kolona za kromatografiju napunjena DEAE-celulozom bubrengom preko no i u 1 x TXN pufer uz dodatak NaCl do koncentracije 0,2 mol dm^{-3} . Volumen spakirane kolone iznosio je 4 ml. Važno je napomenuti i kapacitet smole, odnosno da 1 g DEAE-celuloze veže otprilike 4 mg tRNA. Kolona je uravnotežena TXN puferom uz dodatak NaCl do koncentracije 0,2 mol dm^{-3} (12 ml), a zatim je transkripcijska smjesa propuštena kroz kolonu. Nevezane molekule isprane su s kolone s 8 ml 1 x TXN pufera uz dodatak NaCl do koncentracije 0,25 mol dm^{-3} . Molekule tRNA eluirane su postepenim pove avanjem koncentracije soli – propušteno je 8 ml 1 x TXN pufera uz dodatak NaCl do koncentracije 0,4 mol dm^{-3} i 8 ml 1 x TXN pufera uz dodatak NaCl do koncentracije 0,6

mol dm⁻³. Sakupljene frakcije (po 1 ml) analizirane su poliakrilamidnom gel-elektroforezom u denaturiraju im uvjetima (opisano u sljede em poglavlju). Spojene su frakcije koje su sadržavale zna ajnije koli ine tRNA^{Val} i taložene preko no i na -20 °C uz dodatak natrijevog acetata (pH = 4,5) kona ne koncentracije 0,3 mol dm⁻³ i tri volumena hladnog 96 % etanola. Nakon centrifugiranja 1 h, pri 10000 g, supernatant je uklonjen, a talog otopljen te dijaliziran prema redestiliranoj vodi. istoj tRNA odre ena je koncentracija spektrofotometrijski (vidi poglavlje 2.2.3.5.).

2.2.3.3. Poliakrilamidna gel-elektroforeza u denaturiraju im uvjetima

U svrhu analize molekula tRNA dobivenih transkripcijom *in vitro* ili *in vivo*, korištena je poliakrilamidna gel-elektroforeza u prisustvu denaturiraju eg sredstva – ureje. Nukleinske kiseline se u tim uvjetima razdvajaju na gelu prema njihovoj masi. Pripremljeni poliakrilamidni gelovi bili su sljede eg sastava: akrilamid:bisakrilamid 19:1 (6 % (w/v)), 8 mol dm⁻³ ureja, 90 mmol dm⁻³ Tris, 90 mmol dm⁻³ borna kiselina, 2 mmol dm⁻³ EDTA (pH = 8,0). Polimerizacija gela potaknuta je dodatkom amonijevog peroksodisulfata (APS) do kona ne koncentracije 0,7 µg ml⁻¹ i N, N, N', N'-tetrametiletilentiamina (TEMED) do kona nog volumnog udjela 0,05 %. Nakon polimerizacije gela, jažice su isprane elektroforetskim puferom 1 x TBE (90 mmol dm⁻³ Tris, 90 mmol dm⁻³ borna kiselina, 2 mmol dm⁻³ EDTA (pH = 8,0)) zbog nataložene ureje, a zatim je gel spojen na izvor istosmjerne struje napona 80 V kako bi se uklonio APS (tzv. *pre-run* elektroforeza u trajanju od 30 min). Prije nanošenja na gel, uzorci su denaturirani 5 min na 70 °C uz dodatak jednakog volumena pufera za nanošenje uzorka (8 mol dm⁻³ ureja, 2 mg ml⁻¹ bromfenol plavo, 2 mg ml⁻¹ ksilencijanolfluorofosfat, 10 mmol dm⁻³ EDTA (pH = 8,0)). Elektroforeza se provodila 1 h pri 120 V.

2.2.3.4. Bojanje poliakrilamidnih gelova toluidinom

Vizualizacija nukleinskih kiselina u denaturiraju em poliakrilamidnom gelu ostvarena je potreskivanjem gela 15-20 min u otopini toluidinskog modrila (40 µg ml⁻¹ toluidinsko modrilo, 50 % (v/v) etanol, 0,1 % octena kiselina). Gelovi su odbojavani u vru oj destiliranoj vodi do pojave jasnih vrpcu. Ovom metodom bojanja mogu se vizualizirati vrpce koje sadrže minimalno 0,2 µg nukleinskih kiselina.

2.2.3.5. Određivanje koncentracije nukleinskih kiselina

Koncentracije DNA ili RNA određene su spektrofotometrijski, mjerjenjem apsorbancije na uređaju NanoDrop 1000. Rezultati mjerjenja su apsorpcijski spektri i koncentracija uzorka nukleinske kiseline izražena u mg ml^{-1} , a izračunata pomoću apsorbancije pri valnoj duljini od 260 nm i odnosa u kojem $A_{260} = 1$ odgovara 50 μg iste DNA, odnosno 40 μg iste RNA. Mjerno područje instrumenta za mjerjenje koncentracije nukleinskih kiselina je 2 – 3700 ng μl^{-1} .

2.2.3.6. Prekomjerna ekspresija molekula tRNA *in vivo*

Optimacija prekomjerne ekspresije tRNA *in vivo*

Budući da su geni za tRNA uklonirani u plazmidni vektor pET3a pod kontrolom T7 promotora, njihova transkripcija inducira se dodatkom IPTG-a. Za jednostavnije provođenje, poželjno je postići što veću koncentraciju želenog produkta u staničnom ekstraktu, u ovom slučaju ciljne molekule tRNA.

Testirani uvjeti transkripcije molekula tRNA *in vivo* s rekombinantnih pET3a vektora su sljedeći: indukcija s IPTG-om koncentracije 1 ili 3 mmol dm^{-3} i uzgoj bakterija u induksijskim uvjetima 3 h ili 15 h. Najprije je pripremljena noćna pretkultura - bakterijske stanice *E. coli* BL21DE3 transformirane s pET3atRNA^{Ile}_{GAT} ili pET3atRNA^{Val}_{TAC} plazmidom, nasađene su u 1 ml LB medija u koji je dodan ampicilin u koncentraciji 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Stanice su inkubirane u tresilici 16 sati na 37 °C. Zatim je 20 ml LB medija (s dodanim ampicilinom) inokulirano s 0,2 ml noćne pretkulture i inkubirano na 37 °C uz potresanje pri 200 rpm. Kada je bakterijska suspenzija dosegla vrijednost OD₆₀₀ = 0,5, dodatkom IPTG-a koncentracije 1 ili 3 mmol dm^{-3} , inducirana je prekomjerna ekspresija molekula tRNA. Bakterijska suspenzija inkubirana je na 30 °C u inducirajućim uvjetima 3 ili 15 sati. Stanice su oborene centrifugiranjem 15 min na 5000 g i tRNA izolirana prema postupku opisanom u poglavljju 2.2.3.7.

Preparativna prekomjerna ekspresija tRNA *in vivo*

Za provođenje avanja molekula tRNA eksprimiranih *in vivo* u preparativnim kolima inama, 5 ml noćne pretkulture nasađene su u 0,5 l LB medija s ampicilinom. Kada je bakterijska suspenzija dosegla OD₆₀₀ = 0,5, inducirana je ekspresija molekula tRNA dodatkom 1 mmol dm^{-3} IPTG-a. Bakterije su užgajane 15 h na 30 °C u inducirajućim uvjetima, nakon čega su stanice

oborene centrifugiranjem 15 min na 5000 g. Ukupna tRNA izolirana je prema postupku opisanom u poglavlju (2.2.3.7.).

2.2.3.7. Izolacija ukupne tRNA

Izolacija ukupne tRNA u analiti ke svrhe

Talog bakterijskih stanica iz 20 ml bakterijske suspenzije, resuspendiran je u 0,8 ml pufera za izolaciju tRNA (10 mmol dm^{-3} Tris-HCl (pH = 8,0), 10 mmol dm^{-3} magnezijev acetat). Dodan je jednak volumen fenola zasi enog vodom, a zatim je suspenzija povremeno vorteksirana tijekom 5 minuta te kona no centrifugirana 10 minuta na 10000 g. Gornji vodeni sloj preba en je u istu epruvetu i istaložen tijekom no i na -20°C dodatkom natrijevog acetata pH = 4,5 (kona na koncentracija $0,3 \text{ mol dm}^{-3}$) i tri volumena hladnog 96 % etanola. Nakon centrifugiranja 1 h na 10000 g, supernatant je uklonjen, a talog sušen 5-10 min u SpeedVac ure aju. Zatim je uzorak tRNA podvrgnut deacilaciji u lužnatim uvjetima, budu i da je izolirana tRNA vjerojatno aminoacilirana. Talog je otopljen u $0,125 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris-HCl (pH = 8,5) i inkubiran 1,5 h na 37°C jer je poznato da se molekule tRNA^{Ile} i tRNA^{Val} teže deaciliraju (Köhrer i RajBhandary 2008). Reakcija deacilacije zaustavljena je zakiseljavanjem, odnosno dodatkom octene kiseline (kona ni pH je približno 5) i uzorak je dijalizom pri 4°C preveden u redestiliranu vodu. Koncentracija izolirane tRNA odre ena je spektrofotometrijski (vidi poglavlje 2.2.3.5.).

Izolacija ukupne tRNA u preparativne svrhe

Postupak izolacije ukupne tRNA u preparativne svrhe temeljno je jednak izolaciji u analiti ke svrhe. Talog dobiven iz 0,5 l bakterijske suspenzije resuspendiran je u 15 ml pufera za izolaciju tRNA, nakon ega je dodan 1 volumen fenola zasi enog vodom. Smjesa je vorteksirana 6 puta po 30 sekundi s pauzama od 30 sekundi inkubacije na ledu, nakon ega su slojevi odvojeni centrifugiranjem 15 min, 10000 g. Gornji vodeni sloj ekstrahiran je jednakim volumenom fenol-kloroforma (smjesa fenola zasi enog vodom i kloroforma u volumnom omjeru 1:1) i nakon 10 min laganog miješanja, slojevi su razdvojeni centrifugiranjem. Za pove anje prinosa ukupne izolirane tRNA, donji fenolni i fenol-kloroformni sloj ponovno su ekstrahirani puferom za izolaciju tRNA. Kako bi se iz ukupne tRNA uklonile nukleinske kiseline visokih molekulskih masa (DNA, mRNA i rRNA), u ekstrakt su dodani PEG 8000 u kona nom w/v udjelu od 8 % i NaCl kona ne koncentracije $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$. Smjesa je inkubirana 10 min na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugirana 15 min pri 10000 g. Ukupna tRNA istaložena je

standardnim postupkom – preko no i na -20 °C uz dodatak natrijevog acetata i etanola nakon ega je podvrgnuta ve opisanom postupku deacilacije u lužnatim uvjetima.

2.2.3.8. Razdvajanje molekula tRNA kromatografijom obrnutih faza

Mehanizam razdvajanja molekula kromatografijom obrnutih faza, temelji se na razlici u pokretljivosti uslijed hidrofobnih interakcija molekula u pokretnoj fazi i imobiliziranih hidrofobnih liganada u stacionarnoj fazi. U ovom radu, kromatografija obrnutih faza korištena je u analiti ke i preparativne svrhe.

Analiza uzoraka ukupne tRNA oboga ene tRNA^{Ile}_{GAT} eksprimiranom in vivo

Sve kromatografije obrnutih faza sprovedene su na kromatografskom sustavu *Äcta Purifier 10* (GE Healthcare). Za analiti ke kromatografije korištena je kolona Symmetry 300™ C4 5 µm MVKIT 3,9 x 150 mm (Waters). Volumen navedene kolone je 1,79 ml i nadalje e u tekstu koli ina upotrebljenog pufera biti izražena preko volumena kolone. Puferi korišteni za kromatografiju obrnutih faza su pufer A (20 mmol dm⁻³ amonijev acetat, 10 mmol dm⁻³ magnezijev acetat, 400 mmol dm⁻³ natrijev klorid) i pufer B (jednakog sastava kao i pufer A uz dodatak etanola kona nog volumnog udjela od 30 %). Puferi su prije korištenja profiltrirani (filtracijski sustav *Corning® bottle-top vacuum filter system*, 0,22 µm celuloza acetat) i degazirani 15 min pomo u sonikacijske kupelji. Kolona je najprije uravnotežena s puferom A (15 volumena kolone, brzina protoka 1,5 ml min⁻¹), nakon ega je naneseno 50 µl 1 mg ml⁻¹ djelomi no pro iš ene ukupne tRNA oboga ene s tRNA^{Ile}_{GAT} (brzinom protoka 1 ml min⁻¹). Nevezane molekule uklonjene su ispiranjem s 2,5 volumena kolone pufera A, a vezane molekule eluirane su gradijentom od 0 do 10,5 % volumnog udjela etanola kroz 20 volumena kolone.

Preparativno pro iš avanje tRNA^{Ile}_{GAT} eksprimirane in vivo

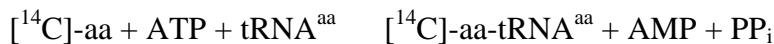
Za preparativna pro iš avanja kromatografijom obrnutih faza, korištena je kolona PROTEIN C4 5 µm 4,6 x 250 mm (*Grace Vydac*) volumena 4,15 ml. Korišteni su puferi istog sastava kao u analiti kim kromatografijama. Kolona je uravnotežena s 15 volumena kolone pufera A pri brzini protoka 2 ml min⁻¹. Naneseno je 60 µl 50 mg ml⁻¹ djelomi no pro iš ene ukupne tRNA oboga ene s tRNA^{Ile}_{GAT} (brzina protoka 1,5 ml min⁻¹). Nevezane molekule isprane su s 2,5 volumena kolone pufera A pri brzini protoka 1,5 ml min⁻¹, a vezane eluirane linearnim gradijentom etanola promjenjivog nagiba:

1. dio: 0-0,9 % volumni udio EtOH kroz 2,5 volumena kolone.
2. dio: 0,9-1,8 % volumni udio EtOH kroz 10 volumena kolone.
3. dio: 1,8-3 % volumni udio EtOH kroz 3 volumena kolone.
4. dio: 3-10,5 % volumni udio EtOH kroz 5 volumena kolone.

Tijekom elucije korištena je brzina protoka $1,25 \text{ ml min}^{-1}$ i skupljane su frakcije od 1,5 ml. Prisutnost tRNA^{Ile} u frakcijama testirana je aminoaciliranjem (opisano u sljedećem poglavljju).

2.2.3.9. Reakcija aminoaciliranja

Ova metoda korištena je za određivanje udjela molekula tRNA^{Ile} ili tRNA^{Val} u ukupnoj tRNA obogatenoj s tRNA^{Ile}, odnosno tRNA^{Val}, zatim za testiranje prisutnosti tRNA^{Ile} u frakcijama kromatografije obrnutih faza, te za određivanje akceptorske aktivnosti proteinih tRNA. Mjerena je količina radioaktiviteta ugrađenog iz $[^{14}\text{C}]$ -aminokiseline u aminoacil-tRNA ($[^{14}\text{C}]$ -aa-tRNA) pri sljedećoj reakciji:



Broj udaraca u minuti izmjerjen uz pomoć scintilacijskog broja a , proporcionalan je količini nastale $[^{14}\text{C}]$ -aa-tRNA^{aa}. Kako bi se mogla odrediti akceptorska aktivnost tRNA, potrebno je znati specifičnu radioaktivnost aminokiseline koja se koristi u aminoacilacijskom testu, tj. broj udaraca u minuti po određenoj količini aminokiseline. S ciljem određivanja specifične radioaktivnosti, na diskove Whatman 3MM naneseni su različiti alikvoti aminokiseline korištene u aminoaciliranju (smjesa radioaktivne i neradioaktivne), tako da odgovaraju sljedećim količinama aminokiseline: 0, 3,75, 7,5, 11,25, 15 i 18,75 pmol. Diski i se posušte, stave u staklene boce s 2,5 ml scintilacijske otopine (5 g dm^{-3} 2,5-difenilovog oksazola i $0,3 \text{ g dm}^{-3}$ 1,4-bis(2-(4-metil-5-fenil)oksazolil)benzena u toluenu) te se u scintilacijskom broju u izmjeri radioaktivnost. Na kraju se konstruira baždarni pravac ovisnosti ukupne količine aminokiseline o izmjerenim udarcima u minuti (eng. *counts per minute*, cpm), a iz nagiba pravca odredi se specifična radioaktivnost aminokiseline – tj. koliko pmol aminokiseline odgovara 1 cpm.

Standardna reakcija aminoaciliranja

Reakcijska smjesa sadržavala je: 20 mmol dm^{-3} Hepes, 150 mmol dm^{-3} amonijev klorid, $0,01 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ BSA, $0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ EDTA (pH = 8,0), 10 mmol dm^{-3} magnezijev klorid, 10 mmol

dm⁻³ ATP, 20 nmol dm⁻³ IleRS, 8 µmol dm⁻³ tRNA^{Ile} i 30 µmol dm⁻³ [¹⁴C]-izoleucin (specifične aktivnosti 100 Ci mol⁻¹). Nakon inkubacije reakcijske smjese bez enzima 1 min na 37 °C, reakcija aminoaciliranja započinje dodatkom enzima. Nakon 0,5, 1, 1,5 i 2 min uzeti su alikvoti od 9 µl i odmah naneseni na papirnate diskove Whatman 3MM, te uronjeni u hladnu 10 % (v/v) trikloroctenu kiselinu. Ima je zaustavljena reakcija aminoacilacije uslijed denaturacije enzima, a dolazi i do taloženja aminoacilirane tRNA. Papirnati diskovi i ispirani su od nespecifično vezanog radioaktivnog izoleucina 10 min u 10 % (v/v) TCA, 2 puta po 5 min u 5 % (v/v) TCA te na kraju nekoliko minuta u 96 % etanolu. Diskovi su sušeni 30 min na 75 °C, a zatim stavljeni u staklene boice s 2,5 ml scintilacijske otopine. Radioaktivnost pojedinog uzorka izmjerena je u scintilacijskom broju.

Određivanje akceptorske aktivnosti tRNA

Određivanje akceptorske aktivnosti tRNA odnosi se na određivanje postotka aktivnih molekula tRNA u uzorku, odnosno koliki postotak molekula je moguće aminoacilirati. U te svrhe, modificirana je standardna reakcija aminoaciliranja na tRNAs u aminoacilacijsku smjesu dodano znatno više enzima kako bi se sva prisutna tRNA aminoacilirala. Korišten je već navedeni reakcijski puffer te uobičajeno 0,5 ili 1 µmol dm⁻³ tRNA i 5 µmol dm⁻³ IleRS. Alikvoti su uglavnom uzimani 25 i 40 min nakon pokretanja reakcije.

Preparativno aminoaciliranje tRNA^{Ile}

Sastav reakcijske smjese u aminoaciliranju bio je sljedeći: 10 µmol dm⁻³ tRNA^{Ile}, 20 mmol dm⁻³ Hepes (pH 7,0), 150 mmol dm⁻³ amonijev klorid, 0,01 µg µl⁻¹ BSA, 0,1 mmol dm⁻³ EDTA (pH = 8,0), 10 mmol dm⁻³ magnezijev klorid, 10 mmol dm⁻³ ATP, 0,1 mmol dm⁻³ izoleucin i 5 µmol dm⁻³ IleRS. Reakcijska smjesa inkubirana je 1 h na 37 °C, zatim prošena ekstrakcijom fenol-vodom i kloroformom. Aminoacilirana tRNA^{Ile} taložena je preko noć na -20 °C, nakon dodatka 2,5 volumena 96 % etanola i natrijevog acetata pH 4,5 (konačne koncentracije 0,3 mol dm⁻³). Talog dobiven centrifugiranjem na 10 000 g, 45 min pri 4 °C, otopljen je u 20 mmol dm⁻³ amonijevom acetatu (pH = 5,0) i dijaliziran prema istom.

2.2.3.10. Reakcija popravka pogreške: test utroška ATP-a

Reakcija popravka pogreške (prije ili poslije prijenosa aminokiseline) može se pratiti korištenjem radioaktivno obilježenog ATP-a. Upotreba [³²P]ATP-a omogućava direktno proučenje nastanka i nestanka aminoacil-adenilata (aa-AMP) te AMP-a koji nastaje hidrolizom aa-

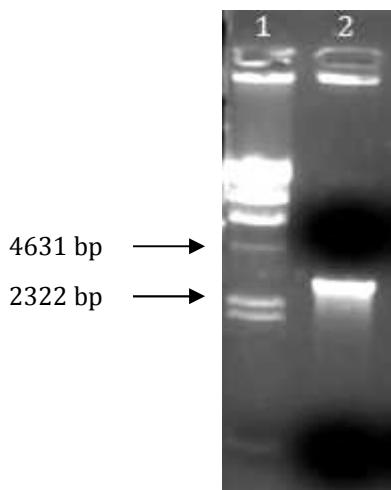
AMP-a ili uslijed prijenosa aminokiseline s aa-AMP-a na tRNA. Produkti i supstrati reakcije utroška ATP-a (aa-AMP, AMP i ATP) mogu se razdvojiti tankoslojnom kromatografijom i zasebno kvantificirati (Gruic-Sovulj i sur. 2005, Dulic i sur. 2010). Budući da je za sintezu pripadnog aa-AMP-a, odnosno pripadne aa-tRNA potreban samo jedan ATP, povećani utrošak ATP-a, odnosno nastanak AMP-a u prisustvu nepripadne aminokiseline u odnosu na reakciju u prisustvu pripadne aminokiseline, predstavlja indikator popravka pogreške. Reakcijska smjesa sadržavala je 50 mmol dm⁻³ Hepes (pH = 7,5), 20 mmol dm⁻³ MgCl₂, 5 mmol dm⁻³ DTT, 0,1 mg ml⁻¹ BSA, 0,004 U µl⁻¹ anorganska pirofosfataza, 0,5 mmol dm⁻³ [³²P]ATP (0,01 – 0,1 mCi ml⁻¹), 50 mmol dm⁻³ valin ili 2,5 mmol dm⁻³ izoleucin, 8 µmol dm⁻³ tRNA^{Ile} i 50 nmol dm⁻³ IleRS. Nakon inkubacije reakcijske smjese bez aminokiseline 1 min na 37 °C, reakcija utroška ATP započinje dodatkom aminokiseline. Nakon 2, 4, 6, 8, 10, i 12 min, uzeti su alikvoti reakcijske smjese od 1,5 µl i reakcija je zaustavljena u 3 µl 1,5 mol dm⁻³ mravlje kiseline. 1,5 µl nastale smjese naneseno je na PEI ploču za tankoslojnu kromatografiju koje su prethodno predrazvijene u redestiliranoj vodi. Razdvajanje aa-[³²P]AMP, [³²P]AMP i [³²P]ATP tankoslojnom kromatografijom, postignuto je u razvijaču sljedećeg sastava: 0,1 mol dm⁻³ amonijev acetat i 5 % (v/v) octena kiselina. Nakon izlaganja razvijenih pločica, zaslon sa uskladištenim fosforom (eng. *storage phosphor screen*) snimljen je na uređaju Typhoon 9410 (GE Healthcare Life Sciences), a kvantifikacija je napravljena pomoću pripadnog programa ImageQuant.

3. REZULTATI

3.1. Konstrukcija rekombinantnog plazmida za ekspresiju ValRS iz *E. coli*

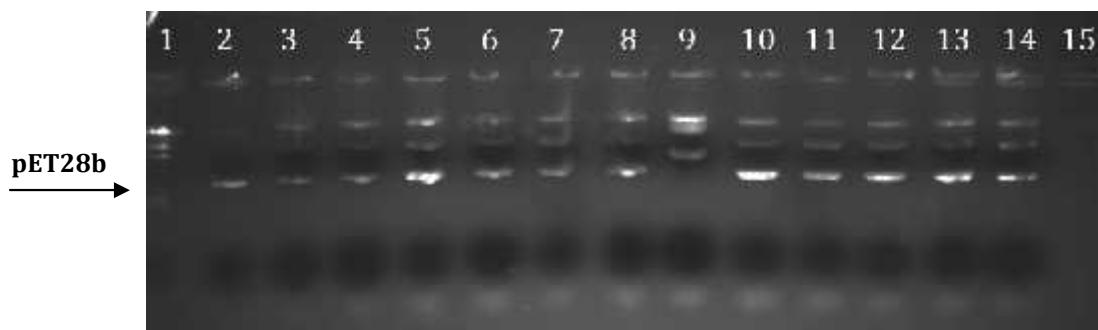
Gen za ValRS iz *E. coli* dobiven je kao poklon u sklopu rekombinantnog plazmida pXVal17 (opisan u poglavlju 2.1.7.). Budući da ukloniranim ValRS-u nije pridodan nikakav standardni afinitetni privjesak, postupak prošavanja uključavao bi tri kromatografske metode za postizanje zadovoljavajuće istočne afinitetu kromatografiju na agaroza-heksil-adenozin-5-fosfatu (AMP) immobiliziran na agarozu preko C₈ atoma adenina i razmaknica od 6 C atoma - heksan), gel filtraciju te ionsku izmjenu (Brevet i sur. 1989). S obzirom na zahtjevnost prošavanja ValRS-a prekomjerno eksprimiranog u sklopu navedenog konstrukta i budući da se svakim korakom u prošavanju gubi barem 15-20 % dragocjenog ciljnog proteina, konstruiran je rekombinantni plazmid za prekomjernu ekspresiju ValRS-a s N-terminalnim His-privjeskom.

Gen za ValRS umnožen je lan'anom reakcijom polimeraze na kalupu pXVal17 vektora (opisano u poglavlju 2.2.1.2.). Elektroforezom na 1 % agaroznom gelu provjerena je uspješnost PCR reakcije te procjenjena veličina produkta u usporedbi s markerom – DNA faga pocjepana restriktijskim enzimom *Hind*III (DNA-*Hind*III, slika 3.1.).



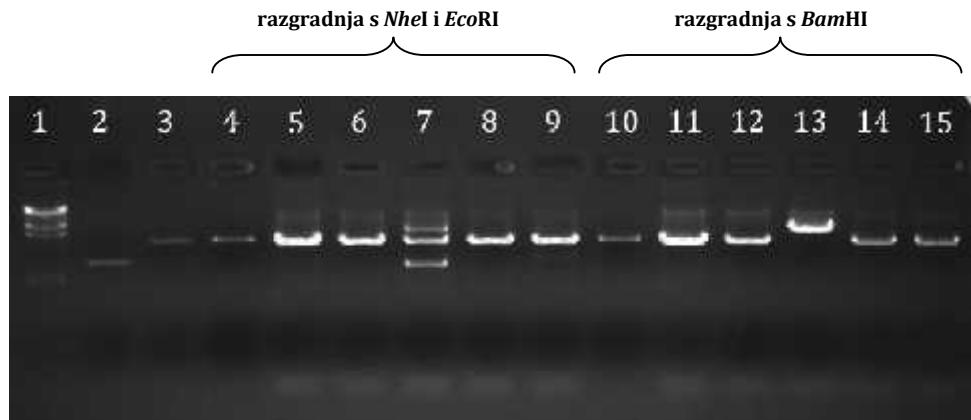
Slika 3.1. Elektroforeza produkta PCR-a na 1 % agaroznom gelu. 1 – marker, 2 – PCR produkt tj. ValRS gen umnožen po etnicama prikazanim u na slici 2.5.

Iz agarognog gela procjenjena duljina PCR-produkta odgovara o ekivanoj veli ini umnoženog gena za ValRS – 2,86 kb. Umnoženi fragment pro iš en je i razgra en istim restriktijskim enzimima kao i vektor pET28b te je postavljena reakcija ligacije prema protokolu opisanom u poglavlju 2.2.1.2. Bakterije *E. coli* soja DH5 transformirane su ligacijskom smjesom, a rast samo transformiranih bakterija, budu i da je vektor pET28b nositelj gena za rezistenciju na kanamicin, osiguran je dodatkom kanamicina u hranjive podloge. Nasumi no je odabrano 12 bakterijskih kolonija koje su uzgojene u teku em LB mediju s ciljem izolacije plazmidne DNA i provjere potencijalnih rekombinantnih plazmida (slika 3.2.).



Slika 3.2. Elektroforeza plazmidne DNA izolirane metodom alkalne lize. 1 – marker (DNA-*HindIII*), 2 – prazan pET28b, 3-14 plazmidna DNA izolirana iz bakterijskih kolonija naraslih na selektivnoj podlozi s kanamicinom. 15 – uzorak bez plazmidne DNA, negativna kontrola.

Strelicom je na gelu ozna en superzavijeni oblik izoliranih plazmida. Budu i da je pokretljivost plazmida u liniji 9 znatno manja i odgovara pokretljivosti vektora s ugra enim insertom (8,19 kb) u odnosu na prazan pET28b (5,37 kb, linija 2), uzorak tog plazmida, ali i plazmida u linijama 5, 7 i 12, podvrgnut je restriktijskoj analizi kao što je opisano u poglavlju 2.2.1.5. Nastali fragmenti DNA provjereni su elektroforezom na 1 % agaroznom gelu (slika 3.3.).



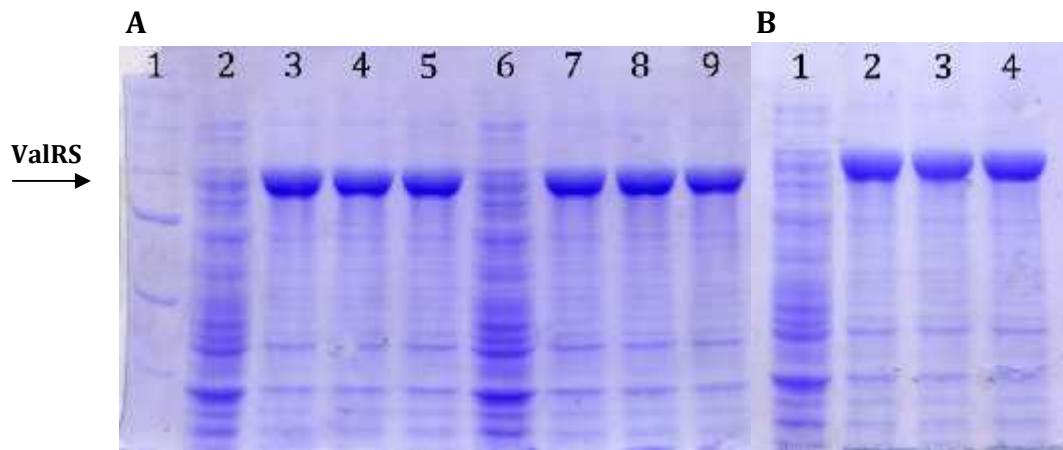
Slika 3.3. Restriktička analiza 4 odabrana plazmida. 1 - marker (DNA-*HindIII*), 2 - pET28b, 3 - pET28b razgrađen s *NheI* i *EcoRI* (vektor korišten u ligaciji), 4 – 9: dvostruki razgradnji s *NheI* i *EcoRI* (4: pET28b - kontrola uspješnosti razgradnje, 5-9: odabrani izolirani plazmidi), 10-15: razgradnji s *BamHI* (10: pET28b - kontrola uspješnosti razgradnje, 11-15: 5 odabranih izoliranih plazmida).

Od pet plazmida podvrgnutih restriktičkoj analizi, jedan plazmid razgrađen je na fragmente o ekivane veličine (uzorak plazmida u liniji 7 i 13). U reakciji dvostruki razgradnji s *NheI* i *EcoRI*, o ekivane veličine fragmenata u slučaju razgradnje rekombinantnog plazmida su 2,86 kb (veličina inserta) i 5,33 kb (ostatak vektora), a kod razgradnje s *BamHI* otkriva se lineariziran rekombinantni vektor veličine 8,19 kb. Za konfirmaciju potvrdu da je plazmid korišten kao uzorak za razgradnju u linijama 7 i 13 zaista rekombinantni pET28b vektor s ugrađenim genom za ValRS, nakon ponovne izolacije koristeći *QIAprep Spin Miniprep Kit*, poslan je na sekvenciranje (vidi poglavljje 2.2.1.6.). Pritom su korištene po etnici T7_F i T7_R (nukleotidni sljedovi prikazani su u tablici 2.2.).

3.2. Prošavanje enzima ValRS iz bakterije *E. coli*

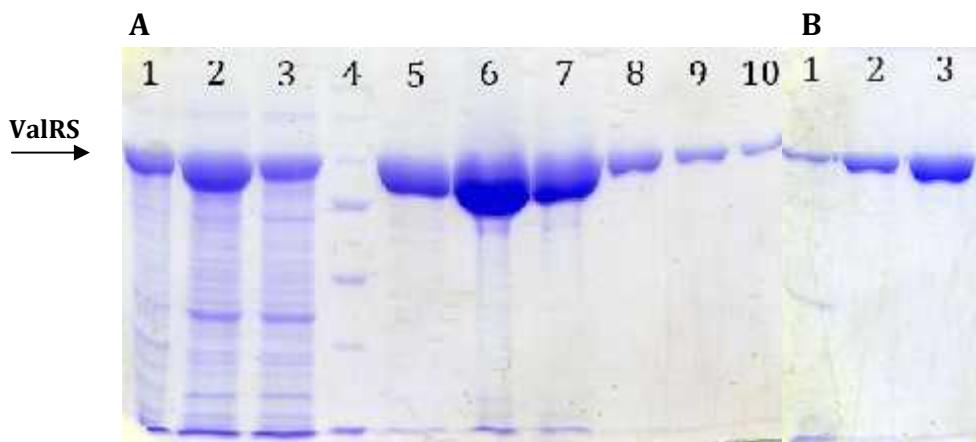
Kao što je opisano u prethodnom poglavljju, kako bi se postigla prekomjerna ekspresija, gen za ValRS ugrađen je u plazmidni vektor pET28b pod kontrolom T7 promotora. Rekombinantnim plazmidom transformirane su stanice *E. coli* soja BL21(DE3) (Novagen) gdje je T7-RNA-polimeraza integrirana u bakterijski genom pod kontrolom lacUV5 promotora. Dodatkom IPTG-a, inducirana je ekspresija T7-RNA-polimeraze koja zatim prepisuje ciljni gen pod kontrolom T7 promotora.

Prije preparativnog prošavanja enzima ValRS, optimirana je njegova ekspresija. Testirani uvjeti obuhvačaju koncentraciju IPTG-a korištenu u indukciji, vrijeme ekspresije te tri različita domena, odnosno nasumično odabrane transformirane bakterijske kolonije (poglavlje 2.2.2.1.). Uzorci su analizirani na SDS-poliakrilamidnom gelu, a budući da se nije razlikovala razina ekspresije nakon 2 h ili 5 h, prikazana je analiza ekspresije nakon 2 h kao reprezentativni gel (slika 3.4.).



Slika 3.4. Analiza probnih ekspresija ValRS na SDS-poliakrilamidnom gelu. A) 1 – marker, 2 – 5: kolonija br. 1 transformirana s pET28bValRS ; proteinski ekstrakt prije indukcije (2), indukcija s $0,25 \text{ mmol dm}^{-3}$ IPTG-om (3), indukcija s $0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ IPTG-om (4), indukcija s 1 mmol dm^{-3} IPTG-om (5) , 6 – 9: kolonija br. 2 transformirana s pET28bValRS; proteinski ekstrakt prije indukcije (6), indukcija s $0,25 \text{ mmol dm}^{-3}$ IPTG-om (7), indukcija s $0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ IPTG-om (8), indukcija s 1 mmol dm^{-3} IPTG-om (9). B) jednak raspored uzoraka kao kod uzoraka 2-5 na slici A), ali prikazana je kolonija br. 3.

Provjera ekspresije pokazala je približno jednaku količinu ValRS-a nakon indukcije u svim testiranim uvjetima, stoga su za preparativni uzgoj izabrani uvjeti ekspresije s $0,25 \text{ mmol dm}^{-3}$ IPTG-om i 2 sata uzgoja u inducirajućim uvjetima. Proteinski ekstrakt pripremljen je kao što je opisano u poglavlju 2.2.2.1. i podvrgnut prošavanju afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarazi prema protokolu opisanom u poglavlju 2.2.2.2. Frakcije prikupljene u pojedinim koracima prošavanja, analizirane su SDS-poliakrilamidnom elektroforezom (slika 3.5., postupak je opisan u poglavljima 2.2.2.3. i 2.2.2.4.)

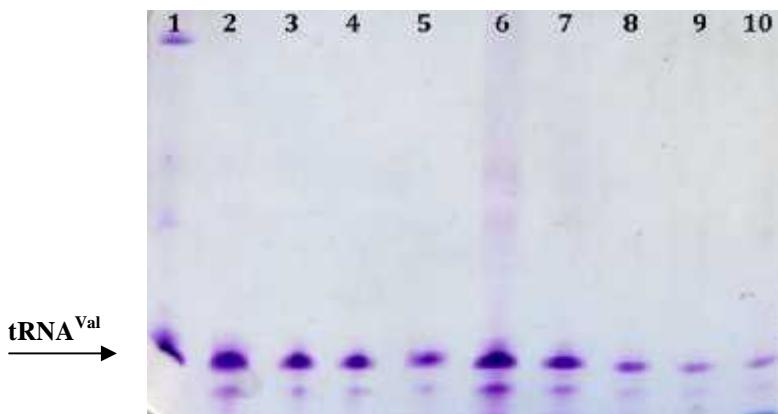


Slika 3.5. Provjera uspješnosti pro iš avanja proteina ValRS. A) 1 - provjera indukcije, 2 – proteinski ekstrakt nakon sonikacije (topiva citosolna frakcija), 3 – proteinski ekstrakt nakon vezanja za Ni-NTA kolonu, 4 – marker, 5 – 10: 1 ml frakcije skupljene prilikom eluiranja s imidazolom koncentracije 200 mmol dm^{-3} . B) 1 - ispiranje puferom s 10 mmol dm^{-3} imidazola , 2 - ispiranje puferom s 20 mmol dm^{-3} imidazola, 3 - ispiranje puferom s 30 mmol dm^{-3} imidazola.

Iz SDS-gela (slika 3.5.) vidljivo je da smo uspjeli posti i pro iš avanje proteina ValRS na Ni-NTA kromatografskoj koloni. Liza stanica sonikacijom tako er je bila efikasna, budu i da je ValRS prisutan u citosolnoj frakciji u velikoj koli ini (linija 2, ValRS je ozna en na gelu strelicom). Specifi ne interakcije His-privjeska s Ni-NTA agarozom, omogu ile su vezanje ValRS-a na kolonu i time uklanjanje ostalih proteina ispiranjem puferima s razli itim koncentracijama imidazola ($10, 20$ i 30 mmol dm^{-3} – linije 1-3, slika 3.5. B). U linijama 1-3 (slika 3.5. B) vidljiva je i mala koli ina proteina ValRS, no budu i da je eluiran s kolone pri niskim koncentracijama imidazola, vjerojatno su uklonjeni nepravilno strukturirani oblici ValRS-a, kojima je His-privjesak slabije dostupan za interakciju s Ni-NTA agarozom. Ispiranjem s puferom koji sadrži visoku koncentraciju imidazola (200 mmol dm^{-3}), eluiran je ValRS s Ni-NTA agaroze (linije 5-10, slika 3.5. A). Frakcije najbogatije ValRS-om (linije 5-7), spojene su, ukoncentrirane i dijalizirane prema postupku opisanom u poglavlju 2.2.2.5. istom proteinu odre ena je koncentracija metodom po Bradfordu ili spektrofotometrijski (vidi poglavlje 2.2.2.6.). Iz taloga bakterijskih stanica dobivenog uzgojem u $0,25 \text{ l LB medija}$, pro iš eno je $5,2 \text{ mg ValRS proteina}$ isto e ve e od 90% (procjenjeno iz analize pro iš enog proteina na SDS-gelu).

3.3. Proizvodnja tRNA transkripcijom in vitro i prošavanje na stupcu DEAE-celuloze

Naru eni su sintetski geni za tRNA^{Ile}_{GAT} i tRNA^{Val}_{TAC} s odgovaraju im restriktionskim mjestima koja omoguavaju kloniranje gena u pUC18 vektor za transkripciju *in vitro*, te pET3a vektor za transkripciju *in vivo* (nukleotidni slijed prikazan je u poglavljju 2.2.1.1, slika 2.4.). Rekombinantne plazmide pUC18tRNA^{Ile}_{GAT} i pUC18tRNA^{Val}_{TAC} te transkript tRNA^{Ile}_{GAT} napravila je i ustupila Morana Duli, dipl. ing. U ovom radu proizvedena je tRNA^{Val} metodom transkripcije *in vitro* i prošvana je na stupcu DEAE-celuloze prema kromatografskom postupku razvijenom u okviru izrade rada za Rektorovu nagradu (Cvetesic i Majsec 2008). DEAE-celuloza je anionski izmjenjiva koji se esto koristi za prošavanje bioloških makromolekula. Vrlo je korisna za prošavanje nukleinskih kiselina koje kao nosioci negativnog naboja ostvaruju jačine interakcije s DEAE-celulozom i eluiraju se visokom ionskom jakosti u, dok većina proteina izađe s kolone u puferima niske ionske jakosti. Prije prošavanja tRNA^{Val} proizvedene *in vitro* iz transkripcijske smjese, kalup DNA uklonjen je pomoću DNaze I (u transkripcijsku smjesu ukupnog volumena 1500 µl, dodano je 30 µl DNaze I, odnosno 30 jedinica enzima). Nakon 1,5 h inkubacije na 37 °C, DNaza I deaktivirana je 10 min na 65 °C i reakcijska smjesa podvrgнутa je dijalizi prema puferu u kojem je uravnotežena DEAE-celuloza (TXN pufer - 40 mmol dm⁻³ Tris-HCl (pH = 8,0), 20 mmol dm⁻³ MgCl₂, uz dodatak NaCl koncentracije 0,2 mol dm⁻³). Nakon nanošenja uzorka, kolona je isprana s 8 ml (2 volumena kolone) TXN pufera uz dodatak NaCl koncentracije 0,25 mol dm⁻³ kako bi se eluirale one molekule koje se pri navedenoj ionskoj jakosti ne vežu ili slabo vežu za DEAE-celulozu. Elucija vezanih molekula provedena je puferima različitih ionskih jakosti (po 8 ml TXN pufera s NaCl koncentracije 0,4 mol dm⁻³ i 0,6 mol dm⁻³). Eluat je skupljan u frakcijama od 1 ml koje su analizirane na poliakrilamidnom gelu s urejom (slika 3.6.). Budući da je većina tRNA^{Val} izašla s kolone prilikom elucije s TXN puferom uz dodatak NaCl koncentracije 0,4 mol dm⁻³, zbog jednostavnosti prikazan je samo poliakrilamidni gel gdje su analizirane upravo te frakcije.



Slika 3.6. Analiza frakcija na poliakrilamidnom gelu. 1 - nepro iš ena transkripcijska smjesa, 2 – frakcija skupljena prilikom ispiranja s TXN puferom uz dodatak NaCl koncentracije $0,25 \text{ mol dm}^{-3}$, 3-10 – frakcije skupljene tijekom elucije s TXN puferom uz dodatak NaCl koncentracije $0,4 \text{ mol dm}^{-3}$.

Spojene su eluirane frakcije najbogatije s tRNA^{Val} (linije 3-7), dobiveni uzorak je istaložen standardnim postupkom, nakon čega je talog je otopljen i dijaliziran prema redestiliranoj vodi. Koncentracija pro iš enog tRNA^{Val} transkripta određena je spektrofotometrijski (vidi poglavlje 2.2.3.5.). Transkript tRNA^{Val} kinetički je okarakteriziran* – pokazana je normalna aktivnost u reakciji aminoaciliranja, no suprotno literurnim podacima (Tardiff i Horowitz 2002), transkript nije bio funkcionalan u testu utroška ATP-a koji odražava stimulaciju tRNA-ovisnog popravka pogreške (reakcija aminoaciliranja detaljno je opisana u poglavlju Materijala i metoda 2.2.3.9., a test utroška ATP-a u poglavlju 2.2.3.10.).

3.4. Konstrukcija rekombinantnih plazmida za ekspresiju molekula tRNA^{Ile} i tRNA^{Val} in vivo

U našem laboratoriju, izoakceptor $\text{tRNA}^{\text{Ile}}_{\text{GAT}}$ najprije je pripremljen kao transkript T7-RNA-polimeraze *in vitro*. Potvrđeno† je da nemodificirani transkript nije aktivran u reakciji aminoaciliranja, ne stimulira tRNA-ovisne mehanizme popravka pogreške te da je za kinetička istraživanja enzima IleRS nužna modificirana tRNA^{Ile} proizvedena *in vivo*. Budući da ni transkript tRNA^{Val} nije stimulirao popravak pogreške u prisustvu nepripadne aminokiseline, konstruirani su rekombinantni plazmidi za ekspresiju molekula tRNA^{Ile} i tRNA^{Val} *in vivo*. Za kloniranje u pET3a vektor, sintetski geni razgrani su sa *Sal*I enzimom (budući da su oligonukleotidi narušeni sa *Eco*RI i *Bam*HI strše im krajevima), a pET3a vektor sa *Sal*I i

* Kinetičke pokuse s transkriptom tRNA^{Val} napravila je doc. dr. sc. Ita Grui-Sovulj.

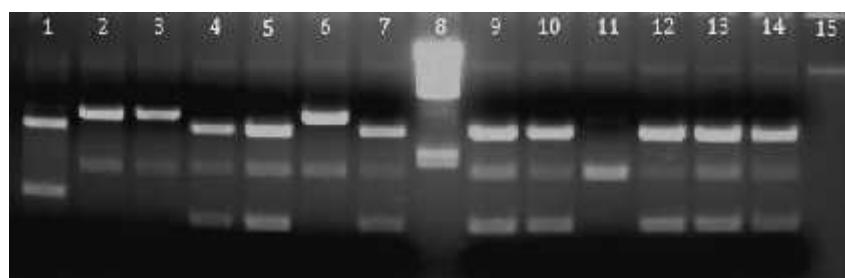
† Kinetičke pokuse s transkriptom tRNA^{Ile} napravila je Morana Dulić, dipl. ing.

*Bam*HI prema uputama proizvo a a. Sastav ligacijskih smjesa opisan je u poglavlju 2.2.1.1. Budu i da su pET3a vektori nositelji gena za ekspresiju -laktamaze, bakterije *E. coli* soja DH5 transformirane ligacijskom smjesom, nasa ene su na selektivne podloge s ampicilinom. Nasumi no je odabранo 12 bakterijskih kolonija za izolaciju plazmidne DNA i restrikcijsku analizu s ciljem provjere ugradnje željenog inserta. Izolirana plazmidna DNA provjerena je na 1 % agaroznom gelu (slika 3.7.). Zbog jednostavnosti, prikazani su samo agarozni gelovi povezani s kloniranjem tRNA^{Val}_{TAC} gena.



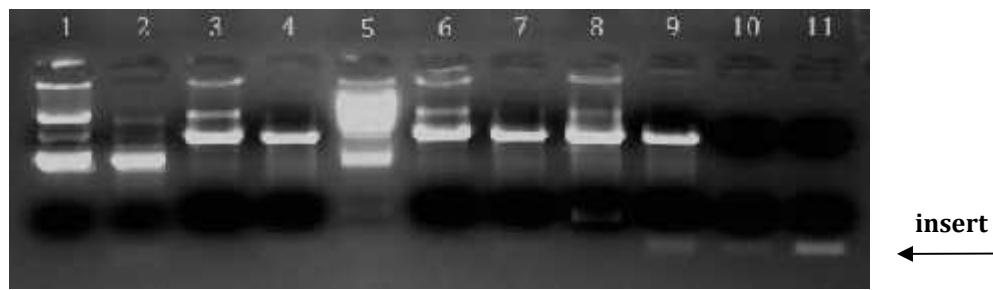
Slika 3.7. Elektroforeza plazmidne DNA izolirane metodom alkalne lize. 1 – prazan vektor pET3a, 2-7 i 9-14 plazmidi izolirani iz bakterijskih kolonija naraslih na selektivnoj podlozi s ampicilinom, 8 - marker (DNA-*Hind*III), 15 –uzorak bez plazmidne DNA – negativna kontrola.

Iz slike 3.7 vidljiva je uspješna izolacija svih dvanaest plazmida. Jedanaest od dvanaest izoliranih plazmida, odgovara po veličini praznom pET3a vektoru, odnosno rekombinantnom plazmidu. U liniji 11 je uzorak plazmida koji ne odgovara po pokretljivosti niti praznom, niti rekombinantnom plazmidu. Naime, za rekombinantni vektor nije otkrivana uočljiva razlika u pokretljivosti u usporedbi s praznim vektorom, budući da je insert veličine svega 0,1 kb. Nadalje, napravljena je restrikcijska analiza izoliranih plazmida prema postupku opisanom u poglavlju 2.2.1.5., i analizirana na 1 % agaroznom gelu (slika 3.8.).



Slika 3.8. Restrikcijska analiza 12 odabranih plazmida (dvostruka razgradnja s *Av*AI i *Bam*HI). 1 – razgranjen prazan pET3a, 2-7 i 9-14 razgranjeni izolirani plazmidi, 8 - marker (DNA-*Hind*III), 15 – prazna linija (uzorak bez plazmidne DNA) – negativna kontrola.

Budući da je o ekivana duljina fragmenata rekombinantnog plazmida razgrana enog s *Ava*I i *Bam*HI enzimima (dvostruka razgradnja) 3,26 kb i 0,87 kb, osam od dvanaest analiziranih plazmida dalo je fragmente odgovarajuće veličine (linije 4, 5, 7, 9, 10 i 12-14). Plazmid u liniji 5 ponovno je izoliran, no ovaj put komercijalnim *QIAprep Spin Miniprep Kit*-om (*Qiagen*) s ciljem dobivanja iščekane preparacije, i podvrgnut daljnjoj restrikcijskoj analizi (slika 3.9.).



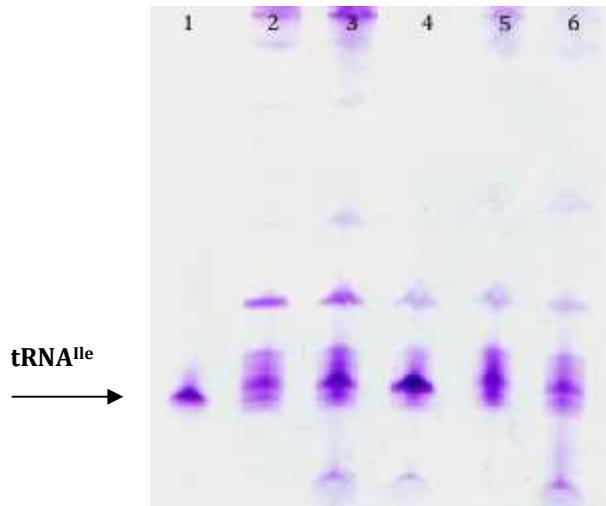
Slika 3.9. Restrikcijska analiza (razgradnja s *Bam*HI, *Sal*I ili oba enzima). 1 – nerazgrađen prazan pET3a, 2 – nerazgrađen rekombinantni pET3a, 3 i 4: pET3a i rekombinantni pET3a razgrađeni s *Bam*HI, 5 - marker (DNA-*Hind*III), 6 i 7: pET3a i rekombinantni pET3a razgrađeni sa *Sal*I, 8 i 9: pET3a i rekombinantni pET3a razgrađeni s *Bam*HI i *Sal*I, 10 i 11: 20 i 80 ng sintetskog gena za tRNA^{Val}.

Restrikcijskom analizom potvrđeno je da je izolirani plazmid zaista rekombinantni, odnosno posjeduje ugrađen gen za tRNA. Iz gela je vidljivo da je dvostrukom razgradnjom rekombinantnog plazmida (linija 9, slika 3.9.) uspješno izbađen insert koji po pokretljivosti odgovara sintetskim oligonukleotidima, odnosno genu za tRNA^{Val} (linije 10 i 11, slika 3.9.). Kao konačna potvrda ispravne ugradnje tRNA gena, te provjera nukleotidnog slijeda, rekombinantni plazmidi pET3atRNA^{Ile}_{GAT} i pET3atRNA^{Val}_{TAC} poslani su na sekvenciranje (poglavlje 2.2.1.6.).

3.5. Prekomjerna ekspresija tRNA i određivanje udjela molekula tRNA^{Ile} ili tRNA^{Val}

Budući da se geni za tRNA^{Ile} ili tRNA^{Val} nalaze pod kontrolom T7 promotora, njihova ekspresija, odnosno transkripcija *in vivo*, potaknuta je dodatkom IPTG-a. Najprije su optimirani uvjeti ekspresije molekula tRNA^{Ile} i tRNA^{Val}. Zbog jednostavnosti i preglednosti, biti će prikazani rezultati samo za prekomjernu ekspresiju tRNA^{Ile} (korišteni su isti uvjeti i postignuti slični rezultati). Ukupna tRNA izolirana je nakon 3 i 15 sati uzgoja u inducijskim uvjetima (1 mmol dm⁻³ ili 3 mmol dm⁻³ IPTG, pri temperaturi 30 °C) prema protokolu opisanom u poglavlju

2.2.3.6, te analizirana na denaturiraju em poliakrilamidnom gelu s dodatkom ureje (poglavlje 2.2.3.3.). Prikazani su rezultati indukcije s IPTG-om kona ne koncentracije 1 mmol dm^{-3} , budu i da se rezultati indukcije IPTG-om koncentracije 1 ili 3 mmol dm^{-3} podudaraju.



Slika 3.10. Analiza ukupne tRNA s prekomjerno eksprimirano tRNA^{Ile} na denaturiraju em poliakrilamidnom gelu s urejom. 1 - tRNA^{Ile} transkribirana *in vitro*, 2-4: ukupna tRNA izolirana iz stanica transformiranih pET3atRNA^{Ile}_{GAT} plazmidom nakon 3 h uzgoja bez dodatka IPTG-a (2), 3 h uzgoja uz dodatak 1 mmol dm^{-3} IPTG-a (3) 15 sati uzgoja uz dodatak 1 mmol dm^{-3} IPTG-a (4), 5 i 6: ukupna tRNA izolirana iz stanica transformiranih pET3a vektorom nakon 3 h uzgoja s 1 mmol dm^{-3} IPTG-om (5) ili 15 sati uzgoja s 1 mmol dm^{-3} IPTG-a (6).

Jednake koli ine pojedinog uzorka (masa izoliranih nukleinskih kiselina) nanesene su u svaku liniju, stoga koli ine tRNA (ozna ena strelicom na slici 3.10.) mogu nagovjestiti prisutnost prekomjerne ekspresije. Budu i da je lako uo ljiva razlika u koli ini tRNA izoliranoj iz bakterijske kulture gdje je kroz 3 sata inducirana ekspresija tRNA (linija 3) u odnosu na neinduciranu bakterijsku kulturu (linija 2), te gdje je trajanje indukcije 15 sati u odnosu na 3 sata (linija 4 u usporedbi s linijom 3), analiza ukazuje na ekspresiju molekula tRNA *in vivo*. Dodatna kontrola je i ekspresija potaknuta s praznog pET3a vektora (linije 5 i 6) gdje poja anje vrpce u usporedbi inducirane (linija 6) i neinducirane bakterijske kulture (linija 5) nije uo ljivo. Ovakva analiza, iako potvr uje transkripciju *in vivo*, ne ukazuje na funkcionalnost molekula tRNA u uzorku izolirane ukupne tRNA. S ciljem odre ena akceptorska aktivnost (objašnjeno u poglavlju 2.2.3.9.). Dobivene akceptorske aktivnosti (tablica 3.1.) potvrdile su prekomjernu ekspresiju molekula tRNA^{Ile} *in vivo*. Budu i da je najve i prinos tRNA^{Ile} dobiven nakon 15 sati ekspresije potaknute s IPTG-om

kona ne koncentracije 1 mmol dm⁻³ pri 30 °C, isti indukcijski uvjeti korišteni su u preparativne svrhe.

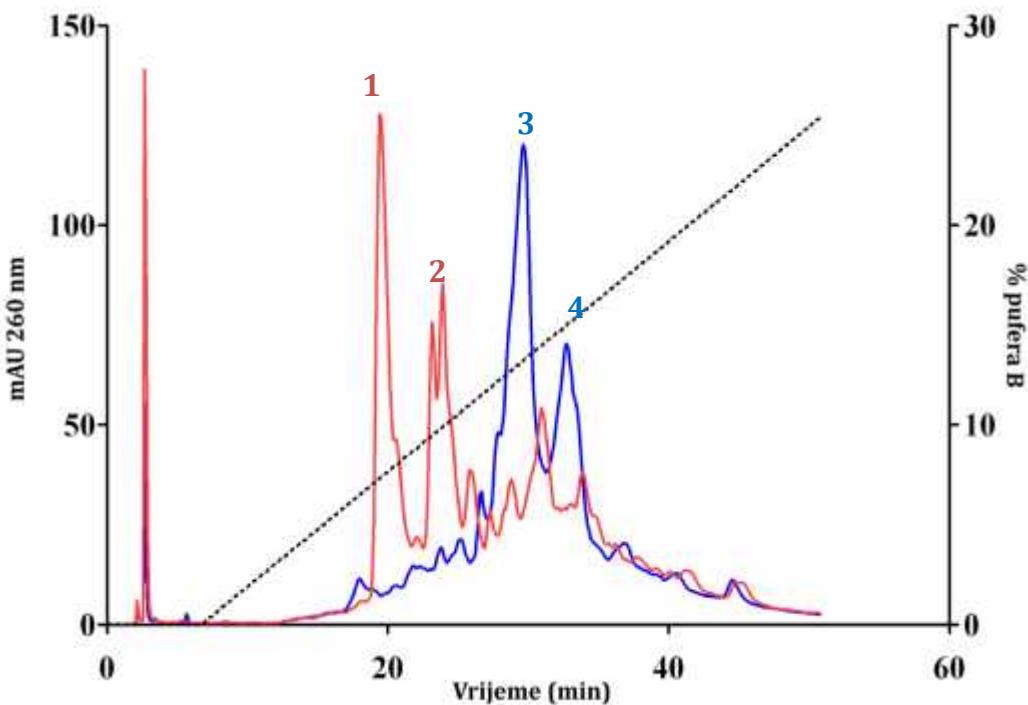
Tablica 3.1. Akceptorske aktivnosti za izoleucin.

	pET3atRNA ^{Ile} _{GAT} - IPTG, 3 h	pET3atRNA ^{Ile} _{GAT} + IPTG, 3 h	pET3atRNA ^{Ile} _{GAT} + IPTG, 15 h	pET3a - IPTG, 15 h	pET3a + IPTG, 15 h
% aktivne tRNA	3,74	19,63	55,89	3,66	2,48

Prilikom izolacije ukupne tRNA u preparativnim koli inama, uveden je korak taloženja nukleinskih kiselina velike molekulske mase pomo u PEG-a 8000 za dodatno pro iš avanje tRNA (vidi poglavlje 2.2.3.7.). Budu i da je akceptorska aktivnost izolirane tRNA^{Val} prekomjerno eksprimirane *in vivo* bila oko 85 %, nisu bila potrebna dodatna pro iš avanja za kineti ke pokuse. Me utim, akceptorska aktivnost tRNA^{Ile} bila je u prosjeku manja od 60 %, zbog ega je razvijena metoda pro iš avanja kromatografijom obrnutih faza (poglavlje 2.2.3.8.).

3.6. Analiza ukupne tRNA s prekomjerno eksprimiranom tRNA^{Ile} kromatografijom obrnutih faza

U svrhe ispitivanja uvjeta pro iš avanja prekomjerno eksprimirane tRNA^{Ile} od ukupne tRNA kromatografijom obrnutih faza, uspore eni su analiti ki kromatogrami uzorka ukupne tRNA te uzorka tRNA podvrgnutog preparativnom aminoaciliranju izoleucinom (vidi poglavlje 2.2.3.9.). Budu i da se razdvajanje u kromatografiji obrnutih faza temelji na razlici u pokretljivosti molekula kroz kromatografsku kolonu uslijed hidrofobnih interakcija s punilom kolone, o ekivana je promjena u pokretljivosti Ile-tRNA^{Ile} u odnosu na tRNA^{Ile} zbog djelovanja izoleucina kao hidrofobnog privjeska. Usporedbom prekloppljenih kromatograma (slika 3.11.), utvr eno je da vrhovi 1 i 2 odgovaraju tRNA^{Ile} jer se nakon aminoaciliranja eluiraju pri ve em udjelu etanola, što je i o ekivano s obzirom na hidrofobni karakter izoleucina. Iz slike je vidljivo da se tRNA eluira pri niskom udjelu pufera B (otprilike 5 %, odnosno 1,5 % v/v etanola), što ukazuje na njeno slabo vezanje. Postojanje dvaju kromatografskih vrhova sli nih površina upu uje na podjednaku zastupljenost dviju molekulskih vrsta tRNA^{Ile}.



Slika 3.11. Preklopljeni kromatogrami uzorka ukupne tRNA (kromatogram prikazan crvenom bojom) i ukupne tRNA podvrgnute izoleucilaciji (kromatogram prikazan plavom bojom).

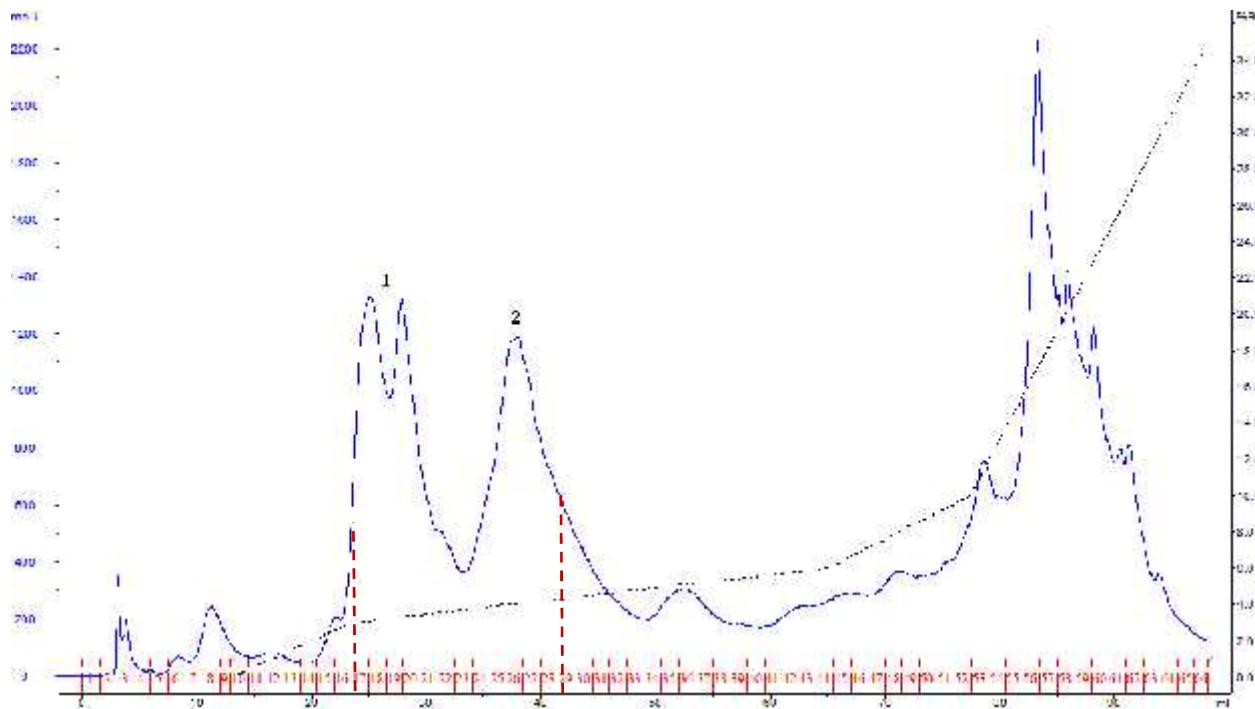
3.7. Preparativno pro iš avanje molekula tRNA^{Ile} kromatografijom obrnutih faza

Analiti kim kromatografijama utvr eni su uvjeti izolacije tRNA^{Ile} iz ukupne tRNA, ali i razdvajanja dviju molekulskih vrsta tRNA^{Ile} kromatografijom obrnutih faza. Me utim, unato optimalnim uvjetima u analiti kim kromatografijama, prijelaz na preparativno pro iš avanje na kolonu ve ih dimenzija (semi-preparativna C4 kolona) nije izravan i posve jednostavan. Naime, bilo je potrebno testirati kapacitet kolone za vezanje tRNA, odnosno koliku koli inu uzorka ukupne tRNA je mogu e nanijeti te pri kojem optimalnom volumenu, a da se pritom zadrži razdvajanje postignuto u analiti kim kromatografijama. Isprobano je nanošenje 1 mg ukupne tRNA u volumenu od 50 ili 500 μ l i utvr eno je da su kromatografski vrhovi uži i razdvajanje bolje ukoliko se uzorak nanosi u što manjem volumenu. Nadalje, na kolonu su injektirane i ve e koli ine ukupne tRNA (3-5 mg) i uo en je gubitak razlu ivosti pri injektiranju koli ina ve ih od 3 mg. Tako er, optimirani su i uvjeti elucije, odnosno ublažen je gradijent pufera B koji sadrži etanol kao eluens s ciljem boljeg razdvajanja kromatografskih vrhova 1 i 2. U kona nici je

preparativno pro iš avanje tRNA^{Ile} provedeno kromatografskim razdvajanjem 3 mg uzorka ukupne tRNA s prekomjerno eksprimiranim tRNA^{Ile}. Nevezane molekule isprane su s 2,5 volumena kolone pufera A, a vezane eluirane linearnim gradijentom promjenjivog nagiba:

1. dio: 0-0,9 % volumni udio EtOH kroz 2,5 volumena kolone.
2. dio: 0,9-1,8 % volumni udio EtOH kroz 10 volumena kolone.
3. dio: 1,8-3 % volumni udio EtOH kroz 3 volumena kolone.
4. dio: 3-10,5 % volumni udio EtOH kroz 5 volumena kolone.

Skupljane su frakcije po 1,5 ml u kojima je koncentracija prisutne tRNA odre ena koriste i spektrofotometar NanoDrop 1000. U frakcijama kromatografskih vrhova 1 i 2 s dovoljno visokom koncentracijom tRNA (slika 3.12, ozna eno s crvenom iscrtkanom linijom), odre ena je akceptorska aktivnost za izoleucin koja odražava udio aktivne tRNA^{Ile} (postupak odre ivanja akceptorske aktivnosti detaljno je opisan u poglavlju 2.2.3.9.; rezultati su opisani u idu em poglavlju).



Slika 3.12. Reprezentativni kromatogram preparativnog pro iš avanja tRNA^{Ile} kromatografijom obrnutih faza. **1** označava molekulsku vrstu tRNA^{Ile} kraćeg vremena zadržavanja (vrh 1), a **2** molekulsku vrstu tRNA^{Ile} dužeg

vremena zadržavanja na C4 koloni (vrh 2). Isertkana crna linija označava udio pufera B korišten tijekom kromatografije (desna y-os).

3.8. Kinetička karakterizacija frakcija

Nakon određivanja akceptorske aktivnosti (tablica 3.2.), spajanjem odgovarajućih frakcija napravljeni su uzorci tRNA^{Ile} različitog stupnja istočnosti, odnosno akceptorske aktivnosti. Frakcije 17 i 18 spojene su u uzorak tRNA^{Ile} I, frakcija 19 izdvojena je u uzorak tRNA^{Ile} II, a frakcije 27 i 28 spojene su u uzorak tRNA^{Ile} III. Uzorci tRNA^{Ile} I i II (frakcije 17 i 18, te 19) pripadaju kromatografskom vrhu 1, dok uzorak tRNA^{Ile} III (frakcije 27 i 28) pripada kromatografskom vrhu 2 (vidi sliku 3.12.). Sva tri uzorka tRNA pretaložena su standardnim postupkom, dijalizirana prema redestiliranoj vodi i ukoncentrirana na SpeedVac uređaju do koncentracije 1-2 mg ml⁻¹.

Tablica 3.2. Analiza frakcija prikupljenih prilikom preparativnog provođenja tRNA^{Ile} kromatografijom obrnutih faza. Akceptorska aktivnost izražena je kao udio aktivnih molekula, odnosno omjer pmol izoleucil-tRNA^{Ile} i pmol ukupne tRNA u uzorku.

frakcije	akceptorska aktivnost / %
17	90
18	98
19	74
20	51
25	52
26	25
27	59
28	55

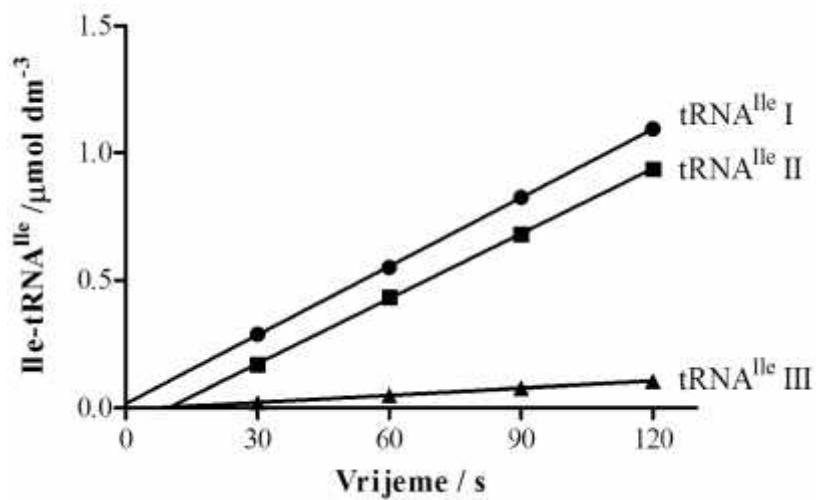
Uzorci tRNA^{Ile} I-III kinetički su okarakterizirani – za svaki uzorak određena je konačna akceptorska aktivnost te koeficijent brzine aminoacilacije (k_{obs} , tablica 3.3.) pomoći u standardne reakcije aminoaciliranja (detalji uvjeta reakcije opisani su u poglavljiju 2.2.3.9.). U reakciji aminoaciliranja korišteni su ATP i izoleucin u suvišku, dok je tRNA testirana pri koncentraciji 8 μmol dm⁻³, što odgovara otprilike 4 K_m vrijednosti (publicirana K_m vrijednost za tRNA^{Ile} je 2,1

$\mu\text{mol dm}^{-3}$, Zhou i Rosevear 1995), odnosno 2-4 K_m vrijednosti ukoliko se rauna koncentracija aktivne tRNA u reakciji s obzirom na akceptorsku aktivnost.

Tablica 3.3. Aminoaciliranje uzoraka tRNA^{Ile} I-III.

uzorci	akceptorska aktivnost / %	$k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1} \dagger$
tRNA ^{Ile} I	94	0,450
tRNA ^{Ile} II	74	0,430
tRNA ^{Ile} III	57	0,045

Uoeno je da se u jednakim aminoacilacijskim uvjetima, uzorak tRNA^{Ile} III (kromatografski vrh 2) ak 10 puta sporije aminoacilira (tablica 3.3., slika 3.13.) u odnosu na uzorce tRNA^{Ile} I ili II (kromatografski vrh 1).



Slika 3.13. Aminoacilacijska aktivnost uzoraka tRNA^{Ile} I (●), II (■) i III (▲).

Uzorci tRNA^{Ile} testirani su i u reakciji popravka pogreške, odnosno testom utroška ATP-a (vidi poglavlje Materijala i metoda 2.2.3.10) kako bi se utvrdilo da li prošena tRNA^{Ile} stimulira popravak pogreške kao što je to u literaturi poznato (Fersht 1977), odnosno da li je tRNA^{Ile}

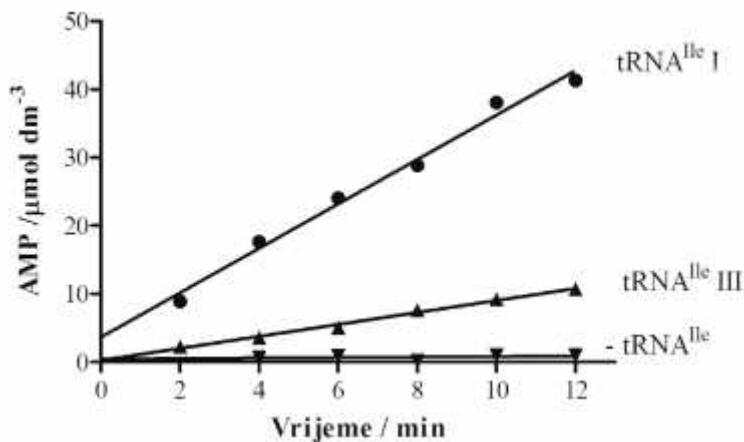
[†]u standardnoj reakciji aminoaciliranja, korištena je $8 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ukupna koncentracija uzorka tRNA^{Ile}

pripremljena *in vivo* i prošena metodama razvijenim u ovom radu, odgovaraju i supstrat za detaljne kinetičke studije mehanizma popravaka pogreške. Budući da uzorci tRNA^{Ile} I i II pokazuju jednaku aminoacilacijsku aktivnost (k_{obs} za tRNA^{Ile} I iznosi $0,45 \text{ s}^{-1}$, a k_{obs} za tRNA^{Ile} II iznosi $0,43 \text{ s}^{-1}$) te oba uzorka pripadaju kromatografskom vrhu I, samo su uzorci tRNA^{Ile} I i III korišteni u testu utroška ATP-a (tablica 3.4., slika 3.14.).

Tablica 3.4. Aktivnosti uzorka tRNA^{Ile} I i III u popravku pogreške.

uzorci	k_{obs} / s^{-1}
tRNA ^{Ile} I	1,09
tRNA ^{Ile} III	0,29
- tRNA	0,01

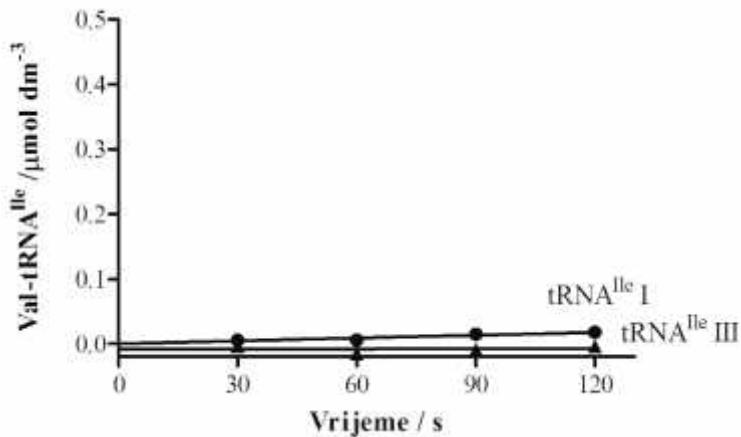
Dijagnostički test za popravak pogreške je gomilanje AMP-a koje se ne može objasniti kao posljedica aminoaciliranja, budući da koncentracija nastalog AMP-a uobičajeno značajno premašuje koncentraciju tRNA (vidi sliku 3.14., uzorak tRNA^{Ile} I).



Slika 3.14. Popravak pogreške u odsustvu tRNA (△), prisustvu uzorka tRNA^{Ile} I (●) ili tRNA^{Ile} III (▲).

Kako u slučaju uzorka tRNA^{Ile} III, konačna koncentracija AMP-a postignuta u promatranom vremenskom razdoblju dostiže okvirno koncentraciju tRNA korištene u reakciji, usporedba k_{obs} koji je oko sedam puta veći u reakciji utroška ATP-a ($0,29 \text{ s}^{-1}$, tablica 3.4.), u odnosu na k_{obs} za aminoaciliranje uzorka tRNA^{Ile} III ($0,045 \text{ s}^{-1}$, tablica 3.3.), govori u prilog nastanka AMP-a uslijed popravka pogreške. Kao dodatna potvrda da uzorci tRNA^{Ile} I i III zaista stimuliraju popravak pogreške, napravljena je standardna reakcija aminoacilacije u prisustvu nepripadnog

[¹⁴C]-valina koncentracije $100 \mu\text{mol dm}^{-3}$, IleRS konačne koncentracije $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ i tRNA koncentracije $8 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (slika 3.15.).



Slika 3.15. Misacilacijska aktivnost uzoraka tRNA^{Ile} I (●) i tRNA^{Ile} III (○).

Reakcijom aminoaciliranja u prisustvu nepripadnog valina, pokazano je da se uzorci tRNA^{Ile} I i III ne misaciliraju, što ukazuje da zaista stimuliraju popravak pogreške.

4. RASPRAVA

U ovom radu dizajniran je sustav za prekomjernu ekspresiju molekula tRNA *in vivo* s ciljem pripreme supstrata za detaljna kineti ka istraživanja mehanizama popravka pogreške. U literaturi je poznato da je nemodificirana tRNA^{Ile} znatno slabije aktivna u reakciji aminoaciliranja - k_{cat} za nemodificiranu tRNA^{Ile}_{GAT} iznosi $0,003\text{ s}^{-1}$; dok za modificiranu tRNA^{Ile}_{GAT} proizvedenu *in vivo* iznosi $1,6\text{ s}^{-1}$ (Nureki i sur. 1994). Uzrok 500 puta slabijoj aktivnosti je nedostatak treonilkarbamoila na N-6 atomu nukleozida A₃₇ pozicioniranog na 3'-kraju uz antikodon (modifikacija t⁶A37, poglavlje 1.2.31.2.3., slika 1.6. B). U našem laboratoriju, izoakceptor tRNA^{Ile}_{GAT} najprije je pripremljen kao transkript T7-RNA-polimeraze *in vitro*. Potvrđeno je da nemodificirani transkript nije aminoacilacijski aktivni i ne stimulira mehanizam popravka pogreške prije prijenosa, odnosno da je za kineti ka istraživanja enzima IleRS nužna modificirana tRNA^{Ile} proizvedena *in vivo*. Glavni problem kod takvog načina proizvodnje tRNA je njeno prošavanje iz staničnog ekstrakta, odnosno izdvajanje od ostalih staničnih molekula tRNA. Vrlo jesto kod prekomjerne ekspresije molekula tRNA *in vivo*, postižu se visoki stanični udjeli željene tRNA (oko 60 %), a dodatnim prošavanjem, primjerice ionskom izmjenom (Perona i sur. 1988) ili taloženjem nukleinskih kiselina velike molekulske mase pomoći u PEG-a (postupak korišten u ovom diplomskom radu), dobivaju se akceptorske aktivnosti ak iznad 80 %, što je dovoljno dobro za rutinske kinetičke pokuse. Situacija je nešto drugačija kod prekomjerne ekspresije i prošavanja molekula tRNA koje posjeduju posttranskripcijske modifikacije ključne za funkciju. Naime, enzimi koji sudjeluju u posttranskripcijskim modifikacijama svakako ne mogu modificirati svu novonastalu prekomjerno eksprimiranu tRNA i za očekivati je da nastaju i nemodificirane ili djelomično modificirane tRNA koje su istovremeno i plijen mehanizma razgradnje (Alexandrov i sur. 2006). Prošavanje željene funkcionalne modificirane tRNA iz takvog staničnog ekstrakta znatno otežava prisutnost bliskih djelomično modificiranih molekulske vrsta. Jedna od jednostavnijih i izravnijih metoda prošavanja funkcionalnih tRNA je afinitetna kromatografija pomoći u prokariotskog elongacijskog faktora Tu (EF-Tu). Metoda se zasniva na razlici u konstantama disocijacije za terna komplekse EF-Tu·GTP·tRNA^{aa} ($>10^{-4}\text{ mol dm}^{-3}$) EF-Tu·GTP·aa-tRNA^{aa} ($10^{-10}\text{--}10^{-9}\text{ mol dm}^{-3}$, Ribeiro i sur. 1995). Postupak prošavanja uključuje vezanje binarnog kompleksa EF-Tu·GTP za kromatografsku matricu, a zatim slijedi propuštanje ekstrakta ukupne tRNA u kojem je tRNA koju želimo izolirati prethodno aminoacilirana *in vitro*. U određenim kromatografskim

uvjetima, za binarni kompleks vezati je se jedino aminoacilirana tRNA, koja se eluira ili porastom ionske jakosti ili dodatkom GDP-a. U istraživanjima koja su prethodila ovom radu (Cvetesic i Majsec 2008), optimirani su uvjeti vezanja transkripta Ser-tRNA^{Ser} za binarni kompleks EF-Tu·GTP metodom gel-retardacijske elektroforeze. Isti uvjeti isprobani su za prošavje tRNA^{Ser} iz transkripcijske smjese pomoću EF-Tu imobiliziranog na Ni-NTA smolu, međutim iz nepoznatih razloga, nije postignuto uspješno vezanje Ser-tRNA^{Ser} za EF-Tu·GTP, zbog čega nije bilo moguće prošavje aktivnih transkriptata ovom metodom. Budući da je tada korišten transkript tRNA iz metanogene arheje (*Methanosarcina barkeri*), isti eksperimenti ponovljeni su sa *E. coli* ukupnom tRNA obogaćenom sa tRNA^{Ile} prekomjerno ekspresiranom *in vivo*, no vezanje takođe nije bilo uspješno te ovu metodu nismo mogli koristiti za prošavje funkcionalnih tRNA^{Ile} proizvedenih *in vivo*. Druga metoda je bila korištena za prošavje molekula tRNA je kromatografija obrnutih faza (Cayama i sur. 2000). Razdvajanje kromatografijom obrnutih faza zasniva na različitoj pokretljivosti molekula uslijed jačih ili slabijih hidrofobnih interakcija molekula iz pokretne faze sa stacionarnom fazom, budući da je hidrofobne interakcije usporavanju kretanja molekula duž kromatografske kolone. Vrlo je bila korištena strategija pri prošavju tRNA je povećanje hidrofobnosti ciljne molekule tRNA, kako bi se značajnije izdvojila po pokretljivosti od ostatka tRNA. Dodatna hidrofobnost može se postići i aminoaciliranjem pripadnom aminokiselinom, što je u slučaju tRNA^{Tyr} ili tRNA^{Trp} dovoljno za postizanje visoke aktivnosti u samo jednom koraku prošavja zbog jakog hidrofobnog karaktera tirozina, odnosno triptofana. U slučaju ostalih tRNA, aminoacilirana tRNA je bila derivatizirana aromatskim reagensom zahvaljujući reaktivnosti -aminoskupine (Kothe i sur. 2006). Međutim, uvijek postoji mogućnost da se prilikom kemijske modifikacije aminoacilirane tRNA, osim aminokiseline modificiraju i pojedinačni nukleozidi tRNA, što može dovesti do njene inaktivacije. Opasnost od ovakve sporedne reakcije pogotovo je izražena kod tRNA proizvedene *in vivo* zbog postojanja posttranskripcijskih modifikacija. U slučaju tRNA^{Ile}, potencijalno mjesto sporedne reakcije sa aromatskim reagensom je upravo modifikacija ključne za njenu aktivnost -t⁶A₃₇ (slika 1.6. B). Kako mehanizam kemijske modifikacije najčešće iskorištava nukleofilnost -aminoskupine aminokiseline, slobodna karboksilna skupina treonina posttranskripcijski modificiranog nukleozida t⁶A₃₇, mogla bi poslužiti kao nukleofil umjesto -aminoskupine. Takva kemijska modifikacija vjerojatno bi inaktivirala tRNA, budući da je upravo t⁶A₃₇ ključan za aktivnost. Zbog svega navedenog, u ovom radu optimirana je metoda

pro iš avanja tRNA^{Ile} kromatografijom obrnutih faza bez uvo enja dodatnih kemijskih modifikacija. Prednost ovakve metode u odnosu na afinitetno pro iš avanje aminoacilirane ciljne tRNA, temelji se na mogu nosti razdvajanja molekulske vrste tRNA koje se razlikuju po broju posttranskripcijskih modifikacija, odnosno razdvajanje potpuno modificirane od hipomodificirane tRNA. Iz rezultata analiti kog razdvajanja uzorka kromatografijom obrnutih faza (poglavlje 3.6., slika 3.11.) vidljivo je postojanje dvaju kromatografskih vrhova tRNA^{Ile} koji se razlikuju u vremenu zadržavanja na koloni zbog razlike u hidrofobnom karakteru. Navedeno upu uje upravo na postojanje dvaju molekulske vrste tRNA^{Ile} – u potpunosti posttranskripcijski modificirane te hipomodificirane tRNA^{Ile}, što nije neo ekivano budu i da koli ina prekomjerno eksprimirane tRNA zasigurno premašuje kapacitete enzimskog sustava odgovornog za posttranskripcijske modifikacije. Pro iš ena tRNA^{Ile} izdvojena je u tri uzorka - tRNA^{Ile} I i II odgovaraju prvom kromatografskom vrhu, kra eg vremena zadržavanja na koloni, a tRNA^{Ile} III drugom kromatografskom vrhu koji se dulje zadržava na koloni i time odgovara hidrofobnijoj tRNA. Uzorcima je odre ena akceptorska aktivnost (vidi poglavje 3.8., tablica 3.3.) koja odražava udio molekula tRNA koje je mogu e aminoacilirati, zbog ega možemo pratiti stupanj pro iš enosti željene tRNA. U skladu s time, za uzorak tRNA^{Ile} I moglo bi se re i da je najviše isto e (94 %), dok uzorci II i III sadrže znatno više one iš enja (redom 74 % i 57 %). Kako bi istražili da li aminoacilacijska aktivnost ovisi o prisutnosti posttranskripcijskih modifikacija, standardnim aminoacilacijskim testom utvr eni su koeficijenti brzine aminoaciliranja uzorka tRNA^{Ile} I-III (poglavlje 3.8., tablica 3.3. i slika 3.13.) prema postupku detaljno opisanom u poglavlju 2.2.3.9. Pokazano je da uzorci I i II imaju jednaku aminoacilacijsku aktivnost (približno $0,4\text{ s}^{-1}$), dok se uzorak III ak deset puta sporije aminoacilira. Najlogi nije objašnjenje je da uzorak tRNA^{Ile} I odgovara potpuno modificiranoj tRNA, a da uzorku tRNA^{Ile} III zapravo nedostaje t^6A_{37} modifikacija. Iako je publicirana razlika u aminoacilacijskoj aktivnosti modificirane i nemodificirane tRNA^{Ile} zapravo 500 puta, valja imati na umu da je uzorak tRNA^{Ile} III zapravo hipomodificirana tRNA te da svaka modifikacija doprinosi stabilizaciji nativne konformacije, zbog ega razlika u aktivnosti uzorka tRNA^{Ile} I i III možda bolje isti e utjecaj t^6A_{37} na aktivnost (Motorin i Helm 2010). Za detaljnju karakterizaciju dviju molekulske vrste tRNA^{Ile} i utvr ivanje broja i tipa posttranskripcijskih modifikacija, biti e potrebne analize pojedina nih nukleozida tRNA metodom spektrometrije mase.

Prilikom konstrukcije sintetskih gena za tRNA^{Val}, kao i za tRNA^{Ile}, uvedena su restričijska mjesta koja omogu avaju upotrebu oba sustava transkripcije – *in vitro* i *in vivo*. tRNA^{Val} proizvedena je *in vitro* i pro iš ena ionskom izmjenom prema postupcima opisanim u poglavljima 2.2.3.1. i 2.2.3.2. Transkript je analiziran aminoacilacijskim testom i opažena brzina prilikom aminoaciliranja u uvjetima zasi enja, podudarala se s publiciranim vrijednostima ($1,7 \text{ s}^{-1}$, Hountondji i sur. 2002), što je u skladu s prethodno objavljenim podacima gdje se navodi da posttranskripcijske modifikacije tRNA^{Val} nisu nužne za prepoznavanje i aminoacilacijsku aktivnost ValRS enzima (Tardif i Horowitz 2002). Me utim, u literaturi je poznato i da nemodificirana tRNA^{Val} stimulira popravak pogreške (Tardif i Horowitz 2002). U našim eksperimentalnim uvjetima tRNA^{Val} transkribirana *in vitro* nije pokazivala aktivnost u mehanizmima popravka pogreške, iako je aminoacilacijski aktivna. Tardif i Horowitz (2002) su prilikom istraživanja elemenata identiteta tRNA^{Val} pokazali da je transkript koji sadrži pirimidin na 3'-kraju (C ili U) aminoacilacijski u potpunosti aktivan, no ne stimulira mehanizme popravka pogreške. U detaljnoj studiji elemenata identiteta, pokazali su da je navedeno jedini slu aj u kojem element identiteta za popravak pogreške nije ujedno i element identiteta u reakciji aminoaciliranja. Stoga, scenarij kojim bi se moglo objasniti ponašanje transkripta tRNA^{Val} proizvedenog u ovom radu, obuhva a nastanak transkripta s izmijenjenim CCA krajem, odnosno pirimidinom na 3'-kraju. Me utim, iako je T7-RNA-polimerazi problemati na sinteza homogenih 5'- i 3'- krajeva (Pleiss i sur. 1998), nije poznat slu aj u kojem ona sustavno ugra uje pogrešni krajnji nukleotid i to neovisno o kalupu. Uobi ajena pogreška T7-RNA-polimeraze je proizvodnja transkripata kra ih za 1-2 nukleotida zbog preranog završetka transkripcije ili duljih zbog ugradnje nekoliko dodatnih nukleotida, neovisno o kalupu. Takvi transkripti tRNA svakako ne bi bili aminoacilacijski aktivni, zbog ega nesavršenost metode transkripcije *in vitro* zasigurno nije uzrok nefunkcionalnosti tRNA^{Val} u stimulaciji popravka pogreške. Usپored bom konformacijskih stanja tRNA^{Val} proizvedene *in vitro* s konformacijskim stanjima tRNA^{Val} proizvedene *in vivo*, Derrick i Horowitz (1993) pokazali su da je kod transkripta tRNA^{Val} djelomi no narušena tercijarna struktura uslijed smanjene stabilnosti peteljki i oslabljenih interakcija D i T om i. Navedeni efekti bili su najizraženiji pri niskim koncentracijama magnezijevih iona. Budu i da su dobili i zna ajno niži T_m za transkript u odnosu na tRNA proizvedenu *in vivo* pri svim testiranim koncentracijama magnezijevih iona, zaklju ili su da posttranskripcijske modifikacije zna ajno doprinose ure enju i stabilizaciji biološki aktivnog

konformacijskog stanja tRNA^{Val}. S obzirom na navedeno, moguće je zamisliti postojanje konformacijskog stanja tRNA^{Val} koje je aminoacilacijski aktivno, ali ne potiče popravak pogreške u prisustvu nepripadne aminokiseline. Budući da je u drugim laboratorijima pokazano da je transkript tRNA^{Val} funkcionalan u obje reakcije, optimiranjem uvjeta transkripcije i razvojem renaturacijskog protokola potencijalno bi se dobio u potpunosti aktivni transkript. Unatoč razvijenom sustavu za ekspresiju *in vivo*, sustav transkripcije molekula tRNA *in vitro* svakako ne treba odbaciti. Vrijednost funkcionalnog sustava za proizvodnju transkriptata tRNA *in vitro* zasniva se na jednostavnom uvođenju mutacija u tRNA, pri čemu transkripcijom nastaje isključivo željena mutirana varijanta. Iako je prekomjerna ekspresija *in vivo* izvrstan sustav za brzo i jeftino dobivanje velike količine biološki aktivne tRNA, izdvajanje prekomjerno eksprimiranih mutiranih varijanti od divljeg tipa iste tRNA prisutne u domaćini, bilo bi gotovo nemoguće.

5. ZAKLJU AK

- ❖ Prekomjerna ekspresija tRNA *in vivo* pod kontrolom jakog T7 promotora, brz je i jeftin na in za dobivanje velike koli ine biološki aktivne tRNA.
- ❖ U ovom radu, razvijena je brza, jeftina i efikasna metoda pro iš avanja prekomjerno eksprimirane tRNA^{Ile} u jednom koraku. Kromatografijom obrnutih faza mogu se izolirati specifi ne tRNA u preparativnim koli inama, bez potrebe za dodatnim kemijskim modifikacijama tRNA.
- ❖ Izoleucil-tRNA-sintetaza ne aminoacilira nemodificiranu tRNA^{Ile} proizvedenu transkripcijom *in vitro*, no vrlo u inkovito aminoacilira posttranskripcijski modificiranu tRNA^{Ile} proizvedenu prekomjernom ekspresijom *in vivo*. Navedeno potvr uje važnost posttranskripcijskih modifikacija kao elemenata identiteta.
- ❖ tRNA^{Ile} proizvedena prekomjernom ekspresijom *in vivo* stimulira popravak pogreške, odnosno hidrolizu nepripadnih valil-adenilata i valil-tRNA^{Ile}.
- ❖ Valil-tRNA-sintetaza vrlo u inkovito aminoacilira nemodificirane i posttranskripcijski modificirane molekule tRNA^{Val} proizvedene transkripcijom *in vitro*, odnosno *in vivo*.
- ❖ tRNA^{Val} proizvedena transkripcijom *in vitro* u našim eksperimentalnim uvjetima ne stimulira popravak pogreške, dok tRNA^{Val} proizvedena prekomjernom ekspresijom *in vivo*, stimulira popravak pogreške i odgovaraju i je supstrat za kineti ka istraživanja.

6. LITERATURA

Agris P.F. (1996): The importance of being modified: roles of modified nucleosides and Mg²⁺ in RNA structure and function. In Cohn W.E., Moldave K. (eds.): Progress in nucleic acid research and molecular biology **53**. Academic Press, Inc. San Diego, California, 81-124.

Alexandrov A., Chernyakov I., Weifeng G., Hiley S.L., Hughes T.R., Grayhack E.J., Phizicky E.M. (2006): Rapid tRNA decay can result from lack of nonessential modifications. Mol Cell **21**: 87-96.

Ambrogelly A., Korencic D., Ibba M. (2002): Functional annotation of class I lysyl-tRNA synthetase phylogeny indicates a limited role for gene transfer. J Bacteriol **184**: 4594-4600.

Arnez J.G., Moras D. (1997): Structural and functional considerations of the aminoacylation reaction. Trends Biochem Sci **22**: 211-216.

Bishop A.C., Nomanbhoy T.K., Schimmel P. (2002): Blocking site-to-site translocation of a misactivated amino acid by mutation of a class I tRNA synthetase. Proc Natl Acad Sci USA **99**: 585-590.

Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive assay for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem **72**: 248-254.

Brevet A., Chen J., Leveque F., Plateau P., Blanquet S. (1989): In vivo synthesis of adenylated bis(5'-nucleosidyl) tetraphophates (Ap₄N) by Escherichia coli aminoacyl-tRNA synthetases. Proc Natl Acad Sci USA **86**: 8275-8279.

Cavarelli J. i Moras D. (1993): Recognition of tRNAs by aminoacyl-tRNA synthetases. The FASEB Journal **7**: 79-86.

Cayama E., Yépez A., Rotondo F., Bandeira E., Ferreras A.C., Triana-Alonso F.J. (2000): New chromatographic and biochemical strategies for quick preparative isolation of tRNA. Nucleic Acids Res

Chu W.C., Horowitz J. (1989): 19F NMR of 5-fluorouracil substituted transfer RNA transcribed *in vitro*: resonance assignment of fluorouracil-guanine base pairs. *Nucleic Acids Res* **17**: 7241-7252.

Curnow A.W., Ibba M., Söll D. (1996): tRNA-dependent asparagine formation. *Nature* **382**: 589-590.

Cvetesic N., Majsec K. (2008): Izolacija iste tRNA iz transkripcijске smjese kromatografijom na ionskom izmjenjiva u jednom danu. Rad za Rektorovu nagradu.

Czerwoniec A., Dunin-Horkawicz S., Purta E., Kaminska K.H., Kasprzak J.M., Bujnicki J.M., Grosjean H., Rother K. (2009): MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2008 update. *Nucleic Acids Res* **37**: D118-121.

Dulic M., Cvetesic N., Perona J.J., Gruic-Sovulj I. (2010): Partitioning of tRNA-dependent editing between pre- and post-transfer pathways in class I aminoacyl-tRNA synthetases. *J Biol Chem* **285**: 23799-23809.

Dunin-Horkawicz S., Czerwoniec A., Gajda M.J., Feder M., Grosjean H., Bujnicki J.M. (2006): MODOMICS: a database od RNA modification pathways. *Nucleic Acids Res* **34**: D145-D149.

Eriani G., Delarue M., Poch O., Gangloff J., Moras D. (1990): Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature* **347**: 203-206.

Fersht A.R. (1977): Editing mechanisms in protein synthesis. Rejection of valine by isoleucyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* **16**: 1025-1030.

Fersht A.R. (1999): Measurement and magnitude of individual rate constants. In Ferst A. (eds): Structure and mechanism in protein science. W.H. Freeman and Company, New York, 132-158.

Francklyn C.S., First E.A., Perona J.J., Hou Y.M. (2008): Methods for kinetic and thermodynamic analysis of aminoacyl-tRNA syntetases. *Methods* **44**: 100-118.

Giege R., Sissler M., Florentz C. (1998): Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity. Nucleic Acids Res **26**: 5017-5035.

Gillam I.C., Tenner G.M. (1971): The use of BD-cellulose in separating transfer RNA's. In Moldave K., Grossman L. (eds): Methods in Enzymology **20**, Part C. Academic Press, 55-70.

Grui -Sovulj I. (2007): Sinteza tRNA *in vitro*. U Ambriovi Ristov, A. (ur): Metode u molekularnoj biologiji. Institut Ru er Boškovi , 271-277.

Gruic-Sovulj I., Uter N., Bullock T., Perona J.J. (2005): tRNA-dependent aminoacyl-adenylate hydrolysis by a nonediting class I aminoacyl-tRNA synthetase. J Biol Chem **280**: 23978-23986.

Hall K.B., Sampson J.R., Uhlenbeck O.C., Redfield A.G. (1989): Structure of an unmodified tRNA molecule. Biochemistry **28**: 5794-5801.

Hartmann R.K., Gossringer M, Spath B., Fischer S., Marchfelder A. (2009): The making of tRNAs and more – RNase P and tRNase Z. Z Prog Mol Biol Transl Sci **85**: 319-368.

Helm M. (2006): Post-transcriptional nucleotide modification and alternative folding of RNA. Nucleic Acids Res **34**: 721-733.

Helm, M., Brule, H., Geige, R., Florentz, C. (1999): More mistakes by T7 RNA polymerase at the 5' ends of *in vitro*- transcribed RNAs. RNA **5**: 618-621.

Holzmann J., Frank P., Loffler E., Bennet K.L.,Gerner C., Rossmanith W. (2008): RNase P without RNA: identification and functional reconstitution of the human mitochondrial tRNA processing enzyme. Cell **135**: 462-474.

Horowitz J., Chu W.C., Derrick W.B., Liu J.C., Liu M., Yue D. (1999): Synthetase recognition determinants of E.coli valine transfer RNA. Biochemistry **38**: 7737-7746.

Hountondji C., Lazennec C., Beauvallet C., Dessen P., Pernollet J.C., Plateau P., Blanquet S. (2002): Crucial role of conserved lysine 277 in the fidelity of tRNA aminoacylation by Escherichia coli valyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* **41**: 14856-14865.

Ibba M., Becker H.D., Stathopoulos C., Tumbula D.L., Söll D. (2000): The adaptor hypothesis revisited. *Trends Biochem Sci* **7**: 311-316.

Ibba M., Morgan S., Curnow A.W., Pridmore D.R., Vothknecht U.C., Gardner W., Lin W., Woese C.R., Söll D. (1997): A euryarcheal lysyl-tRNA synthetase: resemblance to class I synthetases. *Science* **278**: 1119-1122.

Ibba M., Söll D. (2001): The renaissance of aminoacyl-tRNA synthesis. *EMBO reports* **2**: 382-387.

Kholod N., Vassilenko K., Shlyapnikov M., Ksenzenko V., Kisseelev L. (1998): Preparation of active tRNA gene transcripts devoid of 3'-extended products and dimers. *Nucleic Acids Res* **26**: 2500-2501.

Kieft J.S.; Batey R.T. (2006): A general method for rapid and nondenaturing purification of RNAs. *RNA* **10**: 988-995.

Köhrer C, RajBhandary U.L. (2007): The many applications of acid urea polyacrylamide gel electrophoresis to studies of tRNAs and aminoacyl-tRNA synthetases. *Methods* **44**: 129-138.

Kothe U., Paleskava A., Konevega A.L., Rodnina M.V. (2006): Single-step purification of specific tRNAs by hydrophobic tagging. *Anal Biochem* **356**: 148-150.

Kuchino Y, Wanatabe S., Harada F, Nishimura S. (1980): Primary structure of AUA-specific isoleucine transfer ribonucleic acid from Escherichia coli. *Biochemistry* **19**: 2085-2090.

Lin L., Hale S.P., Schimmel P. (1996): Aminoacylation error correction. *Nature* **384**: 33-34.

Ling J., Reynolds N., Ibba M. (2009): Aminoacyl-tRNA synthesis and translational quality control. *Annu Rev Microbiol* **63**: 61-78.

Liu M., Chu W.C., Liu J.C., Horowitz J. (1997): Role of acceptor stem conformation in tRNA^{Val} recognition by its cognate synthetase. *Nucleic Acids Res* **25**: 4883-4890.

Meyer V.R. (2010): Reversed-phase chromatography. In Meyer V.R. (eds): Practical high-performance liquid chromatography. John Wiley and Sons, 173-191.

Milligan J.F., Uhlenbeck O.C. (1989): Synthesis of small RNAs using T7 RNA polymerase. In Dalberg J.E., Grossman L. (eds): RNA Processing Part A: General Methods, Methods in Enzymology **180**. Academic Press, 51-62.

Moras D. (1992): Structural and functional relationships between aminoacyl-tRNA synthetases. *Trends Biochem Sci* **17**: 159-164.

Motorin Y., Helm M. (2010): tRNA stabilization by modified nucleotides. *Biochemistry* **49**:4934-4944.

Muramatsu T., Nishikawa K., Nemoto F., Kuchino Y., Nishimura S., Miyazawa T., Yokoyama S. (1988): Codon and amino-acid specificities of a transfer RNA are both converted by a single post-transcriptional modification. *Nature* **336**: 179-181.

Nakanishi K., Nureki O. (2005): Recent progress of structural biology of tRNA processing and modification. *Mol Cells* **19**: 157-166.

Nelson D.L., Cox M.M.(2005): Protein metabolism. In Nelson D.L., Cox M.M. (eds.): Lehninger Principles of Biochemistry. New York, Freeman and Company, 1034-1075.

Nordin B.E., Schimmel P. (2005): Isoleucyl-tRNA synthetases. In Ibba M., Francklyn C.S., Cusack S. (eds.): The aminoacyl-tRNA synthetases. Landes Bioscience/Eurekah.com, Georgetown, Texas, 24-35.

Nureki O., Niimi T., Muramatsu T., Kanno H., Kohno T., Florentz C., Giegé R., Yokoyama S. (1994): Molecular recognition of the identity-determinant set of isoleucine transfer RNA from Escherichia coli. *J Mol Biol* **236**: 710-724.

Pallanck L., Schulman L.H. (1992): tRNA discrimination in aminoacylation. In Hatfield D.L., Lee B.J., Pirtle R. (eds.): Transfer RNA in protein synthesis. CRC Press, Boca Raton, FL, 279-318.

Perona J.J., Swanson R., Steitz T.A., Söll D. (1988): Overproduction and purification of Escherichia coli tRNA(2Gln) and its use in crystallization of the glutaminyl-tRNA synthetase-tRNA(Gln) complex. *J Mol Biol* **202**: 121-126.

Phizicky E.M., Alfonso J.D. (2010): Do all modifications benefit all tRNAs? *FEBS Lett* **584**: 265-271.

Phizicky E.M., Hopper A.K. (2010): tRNA biology charges to front. *Genes Dev* **17**: 1832-1860.

Pleiss, J.A., Derrick, M.L., Uhlenbeck, O.C. (1998): T7 RNA polymerase produces 5' ends and heterogeneity during transcription from certain templates. *RNA* **4**: 1313-1317.

Randau L., Schroder I., Söll D. (2008): Life without RNase P. *Nature* **453**: 120-123.

Ribeiro S., Nock S., Sprinzl M. (1995): Purification of aminoacyl-tRNA by affinity chromatography on immobilized *Thermus thermophilus* EF-Tu GTP. *Anal Biochem* **228**: 330-335.

Rogers K.C., Söll D. (1995): Divergence of glutamate and glutamine aminoacylation pathways: providing the evolutionary rationale for mischarging. *J Mol Evol* **40**: 476-481.

Sampson J.R., Uhlenbeck O.C. (1988): Biochemical and physical characterisation of an unmodified phenylalanine transfer RNA transcribed *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 1033-1037.

Salowe S.P., Wiltsie J., Hawkins J.C., Sonatore L.M. (2009): The catalytic flexibility of tRNA^{Ile}-lysidine synthetase can generate alternative tRNA substrates for isoleucyl-tRNA synthetase. *J Biol Chem* **284**: 9656-9662.

Saks M.E., Sampson J.R., Abelson J.N. (1994): The transfer RNA identity problem: a search for rules. *Science* **263**: 191-197.

Schimmel P.R., Söll D., Abelson J.N. (1979): Appendix I: Proposed numbering system of nucleotides in tRNA based on yeast tRNA^{Phe}. In Schimmel P.R., Söll D., Abelson J.N. (eds.): Transfer RNA: Structure, properties and recognition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 518-519.

Schulman L.H. (1991): Recognition of tRNAs by aminoacyl-tRNA synthetases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **41**: 23-87.

Sherlin L.D., Bullock T.L., Nissan, T.A., Perona, J.J., Lariviere, F.J., Uhlenbeck, O.C., Scaringe, S.A. (2001): Chemical and enzymatic synthesis of tRNAs for high-throughput crystallization. *RNA* **7**: 1671-1678.

Silvian L.F., Wang J., Steitz T.A. (1999): Insights into editing from an ile-tRNA synthetase structure with tRNAile and mupirocin. *Science* **285**: 1074-1077.

Soma A., Ikeuchi Y., Kanemasa S., Kobayashi K., Ogasawara N., Ote T., Kato J., Wanatabe K., Sekine Y., Suzuki T. (2003): An RNA-modifying enzyme that governs both the codon and amino acid specificities of isoleucine tRNA. *Mol Cell* **12**: 689-698.

Stathopoulos C., Li T., Longman R., Vothknecht U.C., Becker H.D., Ibba M., Söll D. (2000): One polypeptide with two aminoacyl-tRNA synthetase activities. *Science* **287**: 479-482.

Tanner N.K. (1989): Purifying RNA by column chromatography. In Dalberg J.E., Grossman L. (eds): *Methods in Enzymology* **180**, Part A. Academic Press 25-41.

Tardif K.D., Horowitz J. (2002): Transfer RNA determinants for translational editing by *Escherichia coli* valyl-tRNA synthetase. *Nucleic Acids Res* **30**: 2538-2545.

Tsai H.Y., Pulukkunat D.K., Woznick W.K., GopalanV. (2006): Functional reconstitution and characterization of *Pyrococcus furiosus* RNase P. *Proc Natl Acad Sci* **103**: 16147-16152.

Uhlenbeck, O. C. (1995): Keeping RNA happy. *RNA* **1**: 4-6.

Voet D., Voet J. G. (2004): Translation. In Voet D., Voet J.G.(eds): Biochemistry. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1285-1371.

Yarus M. (2000): Perspectives: protein synthesis. Unraveling the riddle of ProCys tRNA synthetase. *Science* **287**: 440-441.

Zhang C.M., Perona J.J., Ryu K., Francklyn C., Hou Y.M. (2006): Distinct kinetic mechanisms of the two classes of aminoacyl-tRNA synthetases. *J Mol Biol* **361**: 300-311.

Zhou L., Rosevear P.R. (1995): Mutation of the carboxy terminal zinc finger of *E. coli* isoleucyl-tRNA-synthetase alters zinc binding and aminoacylation activity. *Biochem Biophys Res Commun* **216**: 648-654.

7. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 23. srpnja 1987. godine u Zagrebu, gdje sam završila Osnovnu školu "Pavlek Miškina" i XV. gimnaziju. 2005. godine upisala sam Preddiplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Preddiplomski studij završila sam 2008. godine sa seminarском radnjom "Mehanizam konformacijske promjene proteina G prilikom prijenosa signala" pod mentorstvom doc. dr. sc. Ite Gruic-Sovulj. Iste godine upisala sam Diplomski studij molekularne biologije.

Znanstvene publikacije

1. Dulic M., Cvetesic N., Perona J.J., Gruic-Sovulj I. (2010): Partitioning of tRNA-dependent editing between pre- and post-transfer pathways in class I aminoacyl-tRNA synthetases. *J Biol Chem* **285**: 23799-23809.
2. Steffen W., Gemperli A.C., Cvetesic N., Steuber J. (2010): Organelle-specific expression of subunit ND5 of human complex I (NADH dehydrogenase) alters cation homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **10**: 648-659.
3. Gruic-Sovulj I., Dulic M., Jaric J., Cvetesic N., Majsec K., Weygand-Durasevic I. (2010): Efficiently activated serine analogue is not transferred to yeast tRNA^{Ser}. *Croat Chem Acta* **83**: 163-169.

Posterska priopćenja

1. EMBO Practical Course: Protein expression, purification and crystallization, EMBL Hamburg, Njemačka, 2010.
Cvetesic N., Dulic M., Perona J.J., Gruic-Sovulj I.: Editing mechanisms in class I aminoacyl-tRNA synthetases.
2. 23rd tRNA Workshop: From origin of life to biomedicine, Aveiro, Portugal: Universidade de Aveiro, 2010.
Dulic M., Cvetesic N., Perona J.J., Gruic-Sovulj I.: tRNA-independent proofreading by class I aminoacyl-tRNA synthetases (koautor).

3. The 3rd Adriatic Meeting on Computational Solutions in the Life Sciences, Primošten, 2009.
Cvetesic N., Dulic M., Perona J.J., Gruic-Sovulj I.: Mechanism of hydrolytic proofreading in amino acid selection for protein biosynthesis.
4. 10th Croatian Biological Congress with international participation, Osijek, 2009.
Peharec P., Balen B., Cvetesic N., Krsnik-Rasol M.: Developmentally specific extracellular protein and glycoprotein patterns in horse-radish Armoracia lapathifolia gilib. tissue culture (koautor).

Sudjelovanje na konferencijama i te ajevima

1. EMBO Practical Course: Protein Expression, Purification and Crystallisation (EMBL Hamburg, Njema ka 2010).
2. RNA Structure and Function (ICGEB, Trst, Italija 2010).
3. The 3rd Adriatic Meeting on Computational Solutions in the Life Sciences, Primošten, Hrvatska 2009
4. EMBO Young Scientists Forum (Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, Hrvatska 2009)
5. 50 godina molekularne biologije u Hrvatskoj (Zagreb, Hrvatska, 2008).
6. International Biology Undergraduate Summer School (University of Zürich, Zürich, Švicarska, 2008).

Nagrade i stipendije

- ❖ 2010: Top stipendija za top studente
- ❖ 2007-2010: Stipendija Grada Zagreba
- ❖ 2008: Rektorova nagrada za rad: "Dobivanje iste tRNA iz transkripcijske smjese kromatografijom na ionskom-izmjenjiva u jednom danu"
- ❖ 2006: Državna stipendija