Kloniranje, prekomjerna ekspresija te pročišćavanje molekula tRNAIle i tRNAVal 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: **2024-03-29**

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 pročišćavanje molekula $tRNA^{Ile}$ i $tRNA^{Val}$ iz bakterije *Escherichia coli*

Diplomski rad

Zagreb, 2010. godina

Ovaj rad, izrađen na Zavodu za biokemiju Kemijskog odsjeka pod neposrednim vodstvom i mentorstvom doc. dr. sc. Ite Gruić-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 na čemu 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 članovima Zavoda za biokemiju - na znanstvenom, ali i neznanstvenom odgoju, brojnim savjetima, ugodnoj atmosferi u kojoj ću 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 izbivanje iz svakodnevnog života...

Mami...

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

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

Nevena Cvetešić

Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu,
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

Aminoacil-tRNA-sintetaze su enzimi koji kataliziraju nastajanje kovalentne veze između pripadnog para aminokiseline i molekule transfer tRNA (tRNA). Budući da je točnost aminoaciliranja temeljni preduvjet za vjeran prijenos genetičke 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 često potiče popravak prije prijenosa aminokiseline ali mehanizam tog procesa još nije poznat. U nekim slučajevim tRNA (npr. tRNA^{Ile}) mora sadržavati postranskripcijske modifikacije kako bi mogla poticati reakciju popravka.

Velike količine biološki aktivne tRNA potrebne su za istraživanja mehanizma tRNA-ovisnog popravka izoleucil- i valil-tRNA-sintetaze. Priređeni 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 pročišćavanja posttranskripcijski modificirane tRNA kromatografijom obrnutih faza. Metodama enzimske kinetike istražena su svojstva pripravljenih tRNA.

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

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: tRNA, aminoacil-tRNA-sintetaze, mehanizmi popravka pogreške, kromatografija obrnutih faza, posttranskripcijske modifikacije

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

Ocjenitelji: Dr. sc. Ita Gruić-Sovulj, doc.
Dr. sc. Kristian Vlahoviček, izv. prof.
Dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, doc.

Rad prihvaćen: 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 Cvetešić

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 assesed 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, posttrancriptional modifications

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

Reviewers: Dr. sc. Ita Gruić-Sovulj, Asst. Prof.
Dr. sc. Kristian Vlahoviček, 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. Posttranskripcijska 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 *Escherichia coli* 12
1.2.4. $tRNA^{Val}$ iz bakterije *Escherichia coli* 15
1.3. Mehanizmi popravka pogreške 17
1.4. Metode proizvodnje i pročišćavanja tRNA 19
1.4.1. Metode proizvodnje tRNA 19
1.4.2. Metode pročišćavanja 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 pročišćavanje DNA 26
2.1.6. Hranjive podloge i medij za uzgoj bakterije *E. coli* 26
2.1.7. Sojevi i plazmidi *E. coli* 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 *E. coli* 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 *E. coli* 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. Pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozi 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 *Coomassie Brilliant Blue* 39
2.2.2.5. Ugušćivanje 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 *in vitro* 40
2.2.3.2. Pročišćavanje transkripata 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 *in vivo* 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 *E. coli* 48
3.2. Pročišćavanje enzima ValRS iz bakterije *E. coli* 50
3.3. Proizvodnja tRNA transkripcijom *in vitro* i pročišćavanje na stupcu DEAE-celuloze . 53

3.4. Konstrukcija rekombinantnih plazmida za ekspresiju molekula $tRNA^{Ile}$ i $tRNA^{Val}$ *in vivo* 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 pročišćavanje 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)	*alanin*
Cys (C)	*cistein*
Asp (D)	*asparaginska kiselina*
Glu (E)	*glutaminska kiselina*
Phe (F)	*fenilalanin*
Gly (G)	*glicin*
His (H)	*histidin*
Ile (I)	*izoleucin*
Lys (K)	*lizin*
Leu (L)	*leucin*
Met (M)	*metionin*
Asn (N)	*asparagin*
Pro (P)	*prolin*
Gln (Q)	*glutamin*
Arg (R)	*arginin*
Ser (S)	*serin*
Thr (T)	*treonin*
Val (V)	*valin*
Trp (W)	*triptofan*
Tyr (Y)	*tirozin*

Popis kratica

aaRS: aminoacil-tRNA-sintetaza

aa-AMP: aminoacil-adenilat

AMP: adenozin-5'-monofosfat

ATP: adenozin-5'-trifosfat

BSA: albumin goveđeg seruma, eng. *bovine serume 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-β-tiogalaktozid

L: lizidin

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

Ni-NTA: nikal-nitrilotrioctena kiselina

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

PEG 8000: polietilenglikol 8000

PMSF: fenilmetilsulfonil-fluorid

SDS: natrijev dodecilsulfat

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

tRNA: transfer RNA

t^6A_{37}: 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 članova (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	α	Gly	$\alpha_2\beta_2$
Gln	α	Ala	α_4
Arg	α	Pro	α_2
Cys	α_2	Ser	α_2
Met	α_2	Thr	α_2
Val	α	His	α_2
Ile	α	Asp	α_2
Leu	α	Asn	α_2
Tyr	α_2	Lys	α_2
Trp	α_2	Phe	$\alpha_2\beta_2$

Aktivno mjesto aaRS razreda I sastavljeno je od dva slična uzastopna motiva β-α-β koji čine šesterolančanu paralelnu β strukturu poznatu kao Rossmann-ova struktura. U njihovom aktivnom mjestu očuvana su dva aminokiselinska slijeda: motivi KMSKS i HIGH. Strukturnu specifičnost aminoacil-tRNA-sintetaza razreda II čine 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 šesterolančana antiparalelna β-ploča, omeđena s tri α zavojnice (Eriani i sur. 1990).

Prema hipotezi adaptora, većina stanica trebala bi imati dvadeset aaRS, pri čemu je pojedina specifična samo za jednu aminokiselinu i jednu ili više pripadnih izoakceptorskih tRNA. Hipoteza je poduprta ranim istraživanjima na bakteriji *Escherichia coli*, no ubrzo je primijećeno da pojedini predstavnici bakterijskog carstva ne posjeduju svih dvadeset aaRS (Ibba i sur. 2000). Naime, bakterijama i arhejama vrlo često 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 nediskriminirajuće GluRS i AspRS pogrešno aminoaciliraju, odnosno misaciliraju tRNA^{Gln} i tRNA^{Asn}, a nastaju Glu-tRNA^{Gln} i Asp-tRNA^{Asn}. Završni korak kataliziraju odgovarajuće 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 aktivnošću. Takozvana Pro-CysRS pronađena je kod nekih arheja i eukariota, a sposobna je aminoacilirati tRNA^{Pro} i tRNA^{Cys} s pripadnim aminokiselinama (Stathopoulos i sur. 2000, Yarus i sur. 2000).

1.1.1. Reakcija aminoaciliranja

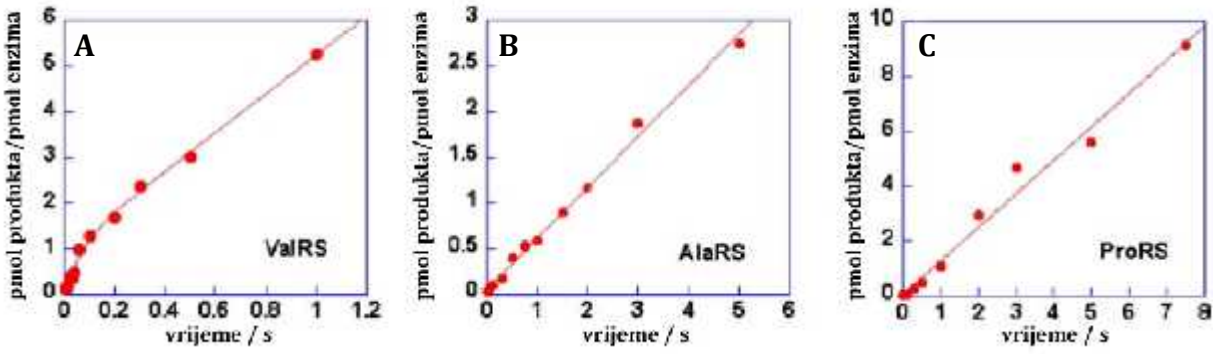
Aminoaciliranje je reakcija koja se odvija u dva stupnja. U prvom stupnju odvija se aktivacija aminokiseline - preciznim pozicioniranjem ATP-a i aminokiseline u aktivnom mjestu, omogućen je nukleofilni napad α-karboksilne skupine aminokiseline na α-atom fosfora ATP-a. Pritom nastaje miješani anhidrid aminoacil-adenilat (aa-AMP) uz oslobađanje 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 obuhvaća 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 aminokiselinom i AMP kao izlazna skupina. Reakciju termodinamski povoljnom čini hidroliza pirofosfata oslobođenog prilikom aktivacije aminokiseline, koju katalizirana anorganska pirofosfataza.

$$\text{aaRS} + \text{aminokiselina} + \text{ATP} \overset{Mg^{2+}}{\rightleftharpoons} \text{aaRS} : \text{aminoacil-AMP} + PP_i \quad (1)$$

$$\text{aaRS} : \text{aminoacil-AMP} + \text{tRNA} \rightleftharpoons \text{aaRS} + \text{aminoacil-tRNA} + \text{AMP} \quad (2)$$

Razlike između sintetaza razreda I i razreda II očituju se u mehanističkim 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 γ-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 linearnog 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 linearnog 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 slika 1.1. A) ukazuje na sporu disocijaciju aminoacilirane tRNA, koja zapravo ograničava brzinu regeneracije enzima i time određuje 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.

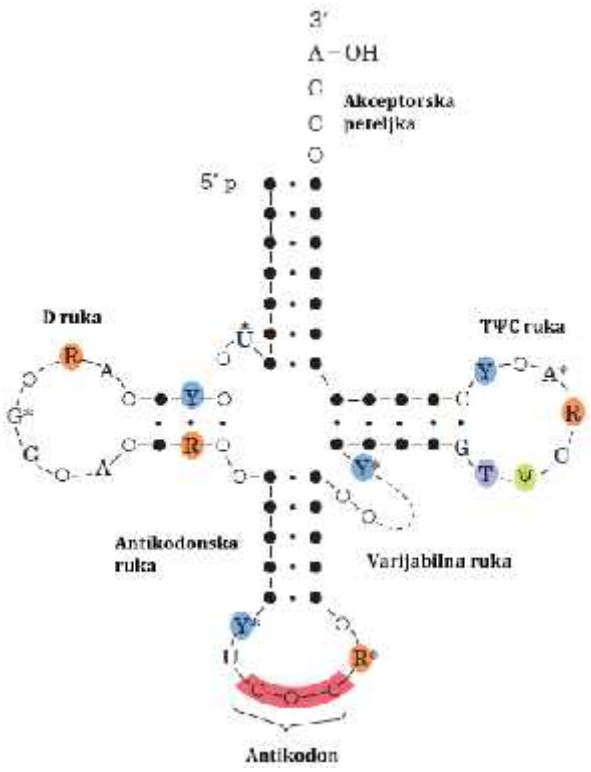
Zhang i sur. (2006) utvrdili su konstante disocijacije (K_d) za tRNA, odnosno aminoaciliranu tRNA te pokazali da je K_d za aminoacilirani produkt čak deset puta manji u odnosu na K_d za pripadni tRNA supstrat (K_d za binarni kompleks *E. coli* CysRS·Cys-tRNA^{Cys} je 0,3 μmol dm^{-3}, dok je K_d za CysRS·tRNA^{Cys} 3,2 μmol 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 slika 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 otkrića 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 dušičnih baza. Zatim su Paul Zamecnick i Mahlon Hoagland pokazali da se tijekom translacije radioaktivno obilježena aminokiselina ([^{14}C]–leucin) veže za RNA niske molekulske mase i ubrzo 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 peteljka, D, antikodonska i TΨC ruka te varijabilna

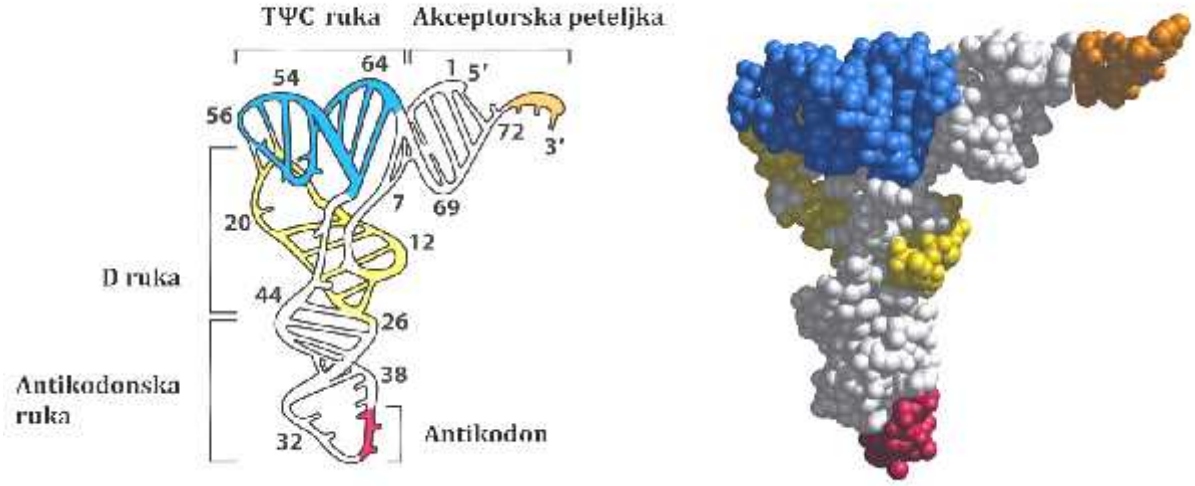
omča (slika 1.2.). Akceptorska peteljka sastoji se od 7 parova baza te sadrži 5'- i 3'-kraj tRNA. Na 3'-kraju nalazi se CCA slijed koji je u potpunosti očuvan kod svih tRNA. D ruku čine D peteljka sastavljena od 3 ili 4 para baza te omča u kojoj se pojavljuje modificirana baza dihidrouridin. Antikodonska ruka sastavljena je od peteljke duge 5 parova baza i omče koja sadrži triplet baza komplementaran kodonu. TΨC ruku gradi 5 parova baza duga peteljka sa završetkom u omči s TΨC slijedom, pri čemu Ψ označava pseudouridin. Varijabilna omča je mjesto najveće raznolikosti među poznatim molekulama tRNA. Može sadržavati od 3 do 21 nukleotida te posjedovati peteljku dužine do 7 parova baza. Također, u peteljkama se često pojavljuju neuobičajeni parovi baza poput G·U, U·U, A·A, C·C, C·U ili G·A. Opisana sekundarna struktura toliko je očuvana da se može smatrati standardnom za sve tRNA (Schimmel i sur. 1979).



Slika 1.2. Sekundarna struktura tRNA. Puni krugovi povezani točkama predstavljaju Watson-Crickove parove baza, dok prazni krugovi predstavljaju baze koje sudjeluju u ostvarivanju neuobičajenih 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 označene baze koje su najčešće 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 veličine varijabilne ruke, molekule tRNA svrstavaju se u dva tipa. Tip 1 sačinjavaju 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). Tipični 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 kvaščeva $tRNA^{Tyr}$ tipu 1).

Strukturnoj raznolikosti tRNA doprinose posttranskripcijske modifikacije baza - do danas ih je poznato više od osamdeset. Međutim, uloga svake pojedinačne 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 specifičnom prepoznavanju aaRS i pripadne tRNA (detaljnije o modifikacijama u poglavlju 1.2.2.3.). Usporedbom rješenih kristalnih struktura tRNA uočena je očuvanost i tercijarne strukture. Molekula tRNA zauzima oblik L konformacije u kojoj jedan kraj čine 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 između baza te sparivanje baza vodikovim vezama.



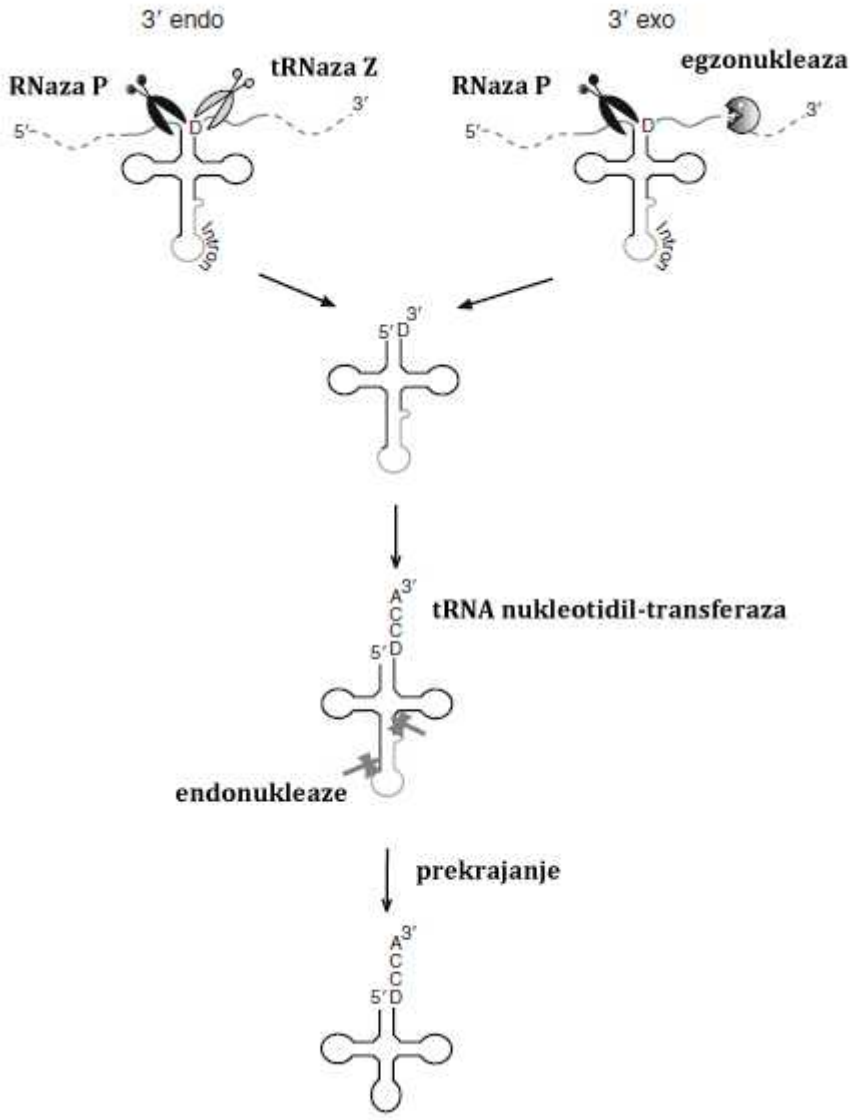
Slika 1.3. Tercijarna struktura $tRNA^{Phe}$. Preuzeto iz: Nelson D.L., Cox M.M. (2005): Protein metabolism: In Nelson D.L., Cox M.M. (eds.): Lehninger Principles of Biochemistry. New York, Freeman and Company, 1034-1075.

1.2.1. Elementi identiteta

Reakcija aminoaciliranja pripadne tRNA, rezultat je specifičnog prepoznavanja aaRS i odgovarajuće 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 sprječavanja aminoacilacije pogrešnih, nepripadnih tRNA (Pallanck i Schulman 1992). Položaji pozitivnih i negativnih elemenata identiteta tRNA mogu se podudarati ukoliko dvije aaRS prepoznaju 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 peteljki, varijabilnoj omči ili na poziciji 73 primarne strukture (diskriminacijski nukleotid, D). Također, i posttranskripcijske modifikacije tRNA mogu predstavljati elemente identiteta (Muramatsu i sur. 1988).

1.2.2. Posttranskripcijska dorada tRNA

Biogeneza tRNA uključuje sintezu početnog transkripta, tzv. preteče 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 jezgre u citoplazmu gdje mogu sudjelovati u procesu translacije (Phizicky i Hopper 2010, slika 1.4.). Budući da su introni učestaliji kod eukariotskih ili arhealnih preteča 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 preteča tRNA uklanjaju specifične endonukleaze. D označava 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.

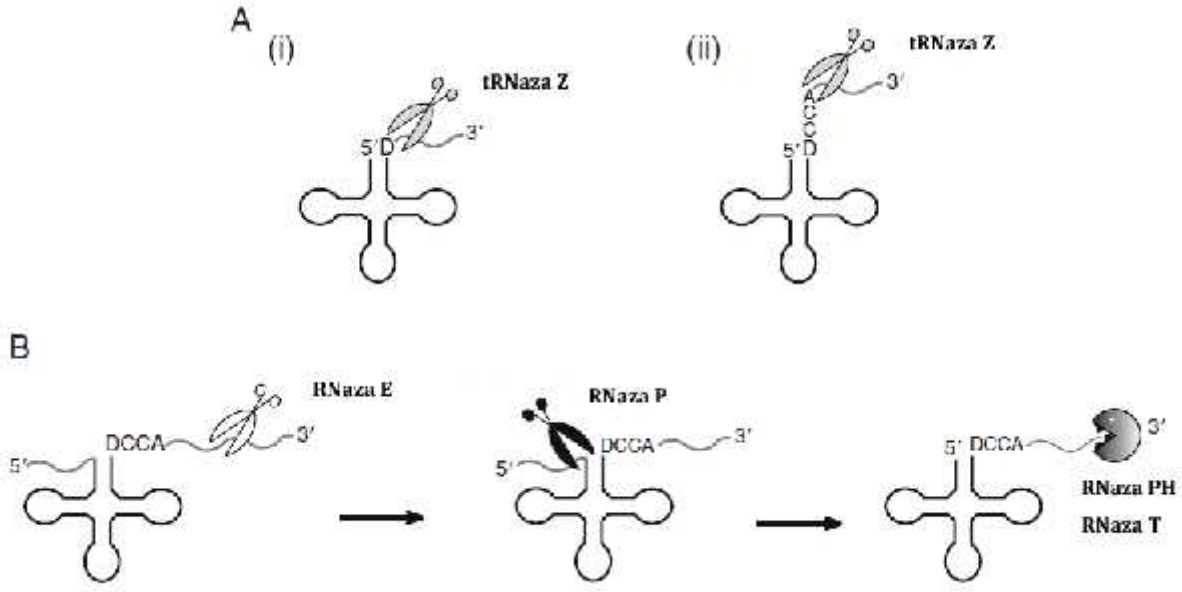
1.2.2.1. Dorada 5'-kraja tRNA

Sveopće prihvaćena dogma dorade tRNA uključuje obavezan nastanak preteča 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 katalitičku 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 čak pet proteina, dok eukariotski organizmi imaju RNazu P sastavljenu od čak 9 ili 10 proteinskih podjedinica te nekoliko molekula RNA. Iako općenito vrijedi da je RNaza P ribonukleoprotein, do sada je utvrđen čitav 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 efikasnošću. 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 veću aktivnost u odnosu na samu katalitičku RNA (Tsai i sur. 2006). U čitavom nizu dokaza da je molekula RNA uvijek katalitička sastavnica RNaze P, zanimljivo iznenađenje bilo je otkriće da ljudska mitohondrijska RNaza P uopće 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 pročišćenih podjedinica, enzim posjeduje normalnu aktivnost (Holzmann i sur. 2008). Najzanimljivija iznimka od uobičajenog procesiranja 5'-kraja su molekule tRNA iz arheje *Nanoarcheum equitans* koje se prepisuju kao preteče tRNA bez 5'-uvodnog slijeda (Randau i sur. 2008). Takve tRNA na 5'-kraju posjeduju trifosfatnu skupinu i vrlo često dodatni purin na -1 položaju, no unatoč neobičnim 5'-krajevima, pokazano je da su funkcionalne u reakciji aminoaciliranja *in vitro.*

1.2.2.2. Dorada 3'-kraja tRNA

Precizna dorada 3'-kraja ključna je za aminoacilacijsku aktivnost molekula tRNA. Razlikuju se dva reakcijska puta dorade 3'-krajeva molekula tRNA: put I - endonukleolitičko cjepanje 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 preteče 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 preteča 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 na3'-kraju uz diskriminacijski nukleotid (D). (ii) iznimka pravilu cjepanja prekursora tRNA bez CCA kraja je *Thermotoga maritima* (također mehanizam I) B) Mehanizam II uključuje više koraka - cjepanje endonukleazom RNaza E, a zatom uklanjanje 3'-kraja pomoću 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 isključivo pomoću tRNA-nukleotidil-transferaza. (Hartmann i sur. 2009). Drugi kriterij koji određuje 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 pojedinačne transkripcijske jedinice, tRNA 3'-krajevi uobičajeno su kratki te ih je lako ukloniti egzonukleazama. S druge strane, bakterije imaju pojedinačne tRNA gene koji se prepisuju kao prekursori tRNA s 3' ukosnicama koje je nužno ukloniti endonukleolitičkim cjepanjem na 5' kraju. Također, i u slučaju multicistronskih transkripata, nužna je dorada endonukleazama. Međutim, 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 zapanjujućih svojstava molekula tRNA iz svih organizama je veliki broj posttranskripcijskih modifikacija nukleozida – utvrđene 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 TΨC regija) te modifikacije koje djeluju na funkciju tRNA, odnosno služe kao elementi identiteta, utječu 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) predodređenih 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 obuhvaća 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 kvaščeve $tRNA^{Phe}$ 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 kvaščeve $tRNA^{Asp}$ (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.

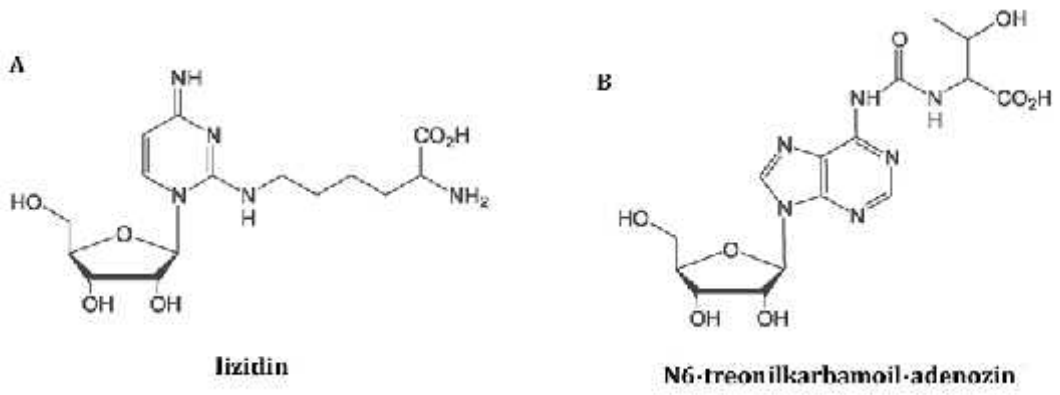
Predloženi mehanizmi stabilizacije strukture uslijed modifikacija ovise o vrsti pojedine modifikacije. Primjerice, za pseudouridin se smatra da je stabilizacija posljedica pojačanog nekovalentnog slaganja baza (eng. *base stacking*), a slično je predloženo i za metilirane

nukleozide poput m^5C – 5-metilcitidin i $m^1\Psi$ – 1-metilpseudouridin, gdje je slaganje baza poboljšano zbog pojačane hidrofobnosti. Metilacije 2'-OH skupine pogoduju 3'endo konformaciji riboze, sprječavaju interakcije s OH skupinama i mijenjaju hidratacijsku 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 sprječavanju pomaka okvira čitanja (Giege i sur. 1998). Neki od primjera transkripata 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 kvaščeve $tRNA^{Phe}$ 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 modikacija (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 genetičkog 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* identična su u 68 % nukleotidnog slijeda, a glavne razlike nalaze se u akceptorskoj peteljci te antikodonskoj ruci. Glavni izoakceptor $tRNA^{Ile}$ (antikodon GAT, odnosno GAU), prepoznaje kodone AUU i AUC, dok drugi, sporedni izoakceptor $tRNA^{Ile}$ s antikodonom CAT, odnosno CAU prepoznaje kodon AUA (Nordin i Schimmel 2005). Kod izoakceptora $tRNA^{Ile}_{CAT}$ otkrivena je do tada nepoznata posttranskripcijska modifikacija u području antikodona (Kuchino i sur. 1980). Utvrđeno je da se modificirani nukleozid zapravo sastoji od citidina modificiranog s lizinom vezanim putem ε-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 omogućava prepoznavanje kodona AUA koji kodira za izoleucin.

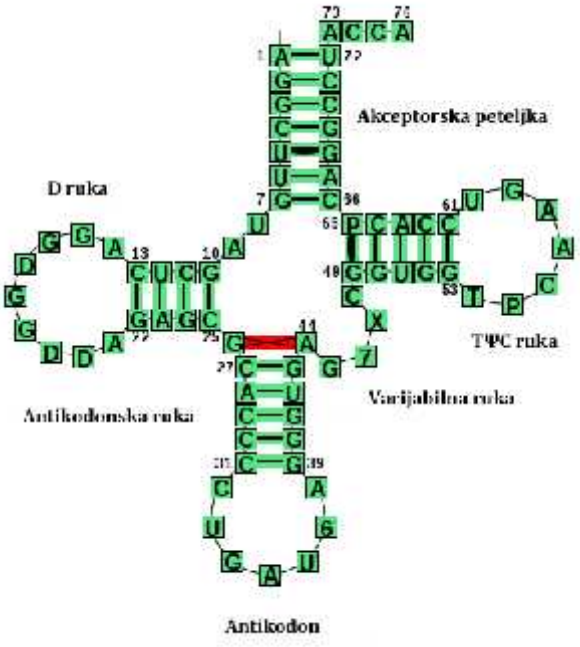


Slika 1.6. Modificirani nukleozidi važni za prepoznavanje $tRNA^{Ile}$. A) lizidin, prisutan samo kod sporednog izoakceptora $tRNA^{Ile}_{CAT}$ B) N^6-treonilkarbamoil-adenozin, prisutan kod oba izoakceptora $tRNA^{Ile}$.

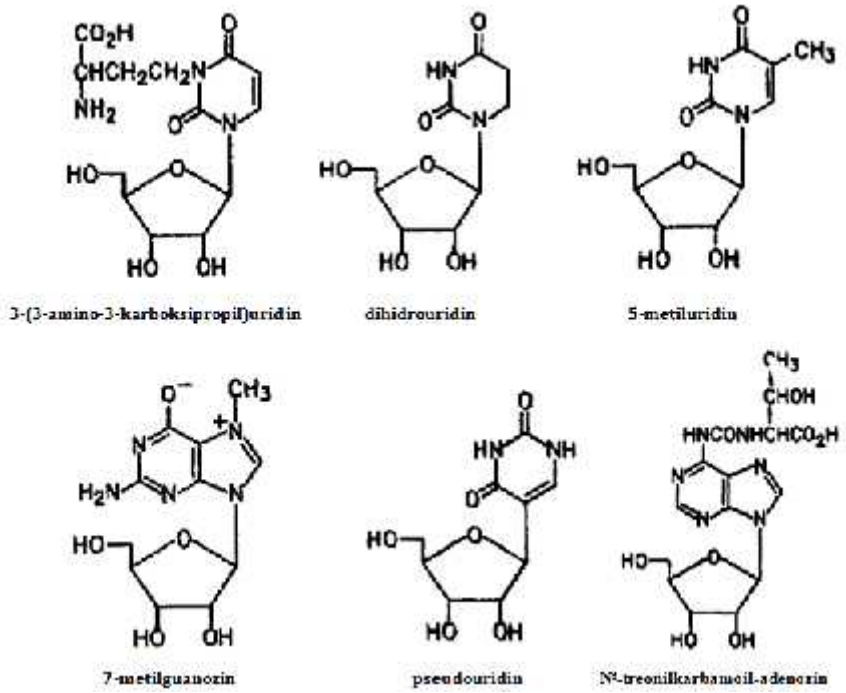
Yokoyama i suradnici proveli su detaljnu analizu elemenata identiteta $tRNA^{Ile}_{GAT}$ (Nureki i sur. 1994). Za razliku od većine tRNA, $tRNA^{Ile}$ transkripti pokazuju znatno manju aktivnost u aminoaciliranju u odnosu na modificiranu tRNA. Smatra se da je značajno smanjenje aktivnosti posljedica nedostatka treonilkarbamoila vezanog za N^6 atom nukleozida A_{37} (modifikacija t^6A_{37}, slika 1.6. B). Pokazano je da su glavni elementi identiteta očuvani kod oba $tRNA^{Ile}$ izoakceptora i obuhvaćaju područje antikodona (G_{34}-A_{38}). Nadalje, značajni elementi identiteta su diskriminatorska baza A_{73} te tri nukleotidna para: $C_4 \cdot G_{69}$ u akceptorskoj, $U_{12} \cdot A_{23}$ u D , te $C_{29} \cdot G_{42}$ 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. Mehanističkim studijama otkriveno je da enzim specifično prepoznaje $tRNA^{Ile}_{CAT}$ te da uz pomoć ATP-a i lizina 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.).



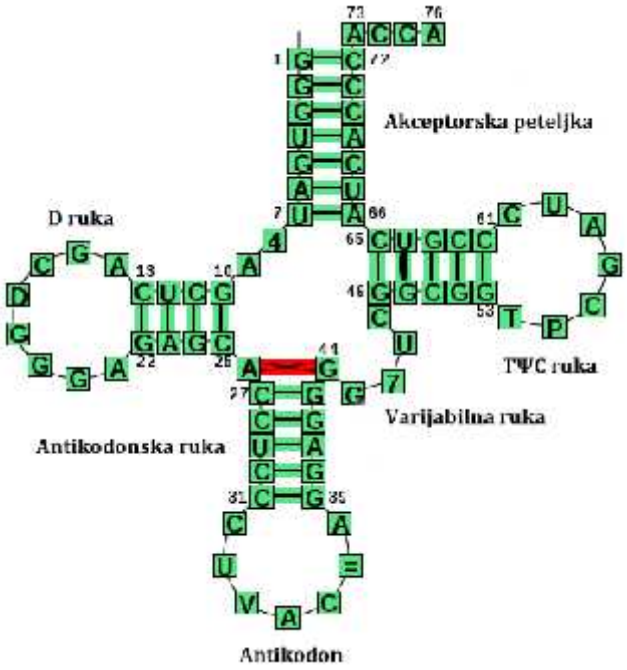
Slika 1.7. Nukleotidni slijed i sekundarna struktura izoakceptora $tRNA^{Ile}_{GAT}$ iz *E. coli*. U strukturi su posttranskripcijske modifikacije prikazane sljedećim oznakama: **D** - dihidrouridin, **6** - N^6-treonilkarbamoil-adenozin, **7** - 7-metilguanozin, **X** - 3-(3-amino-3-karboksipropil)uridin,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



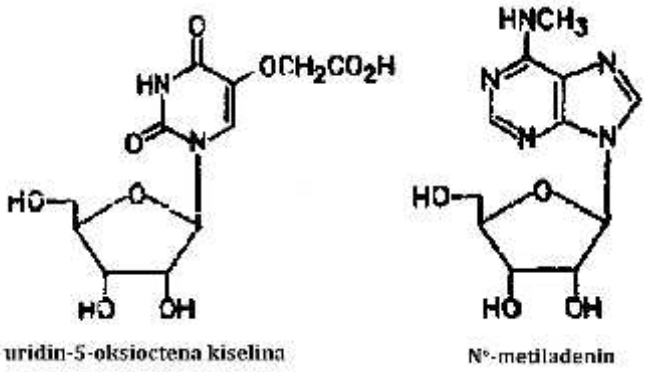
Slika 1.8. Struktura modificiranih nukleozida prisutnih kod $tRNA^{Ile}_{GAT}$ izoakceptora iz *E. coli.*

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

Otkrivanje elemenata identiteta $tRNA^{Val}$ započelo je u grupi dr. Jacka Horowitza mapiranjem dijelova tRNA koji su zaštićeni od enzimatske razgradnje nukleazama u ValRS·$tRNA^{Val}$ kompleksu. Pokazano je da su nukleazama nedostupni antikodonska omča, 3'-kraj heliksa sastavljenog od TΨC i akceptorske peteljke, te 5'-kraj antikodonske peteljke (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 $tRNA^{Val}$ transkripata. Mutacije su uvedene u sve dijelove $tRNA^{Val}$ transkripta, a naročito je ispitan utjecaj mutacija na kinetiku aminoaciliranja u dijelovima tRNA za koje je ustanovljeno da su u direktnom kontaktu s ValRS-om, odnosno da ih ValRS štiti od razgradnje nukleazama. Takva detaljna studija ukazala je na čitav 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 (cmo^5U), **=** - N^6-metiladenin, **7** - 7-metilguanozin, **T** - 5-metiluridin, **P** - pseudouridin. Preuzeto iz *tRNAdb Transfer RNA database* (http://trnadb.bioinf.uni-leipzig.de).



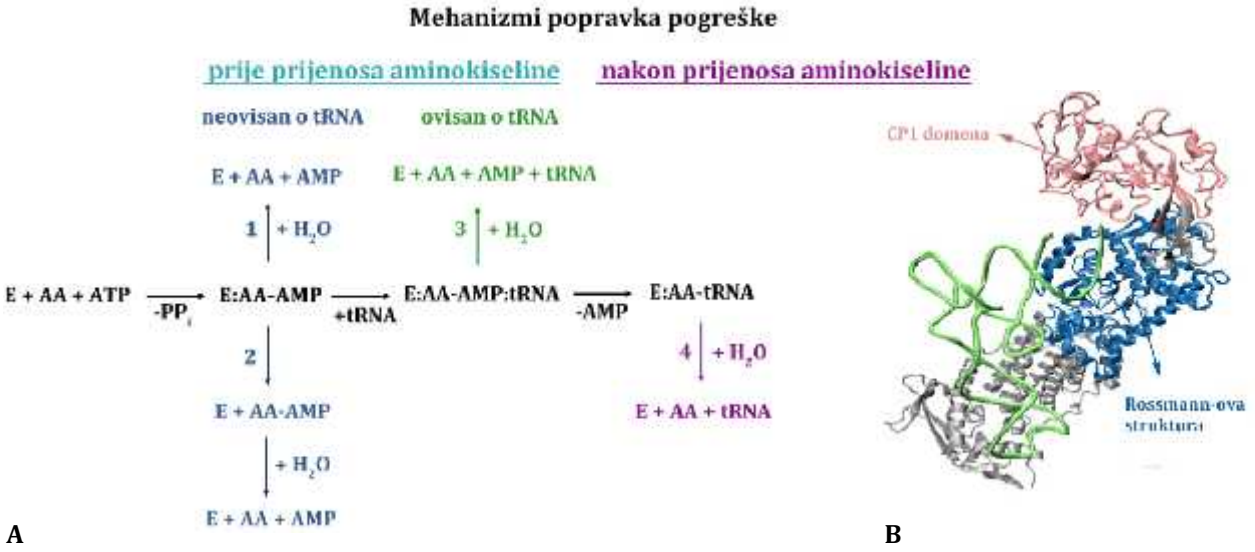
Slika 1.10. Struktura modificiranih nukleozida prisutnih kod $tRNA^{Val}_{TAC}$ izoakceptora iz *E. coli*. Prikazani su samo nukleozidi koji nisu prisutni kod $tRNA^{Ile}_{GAT}$, strukture ostalih modifikacija prikazane su u poglavlju 1.2.3.

Pokazano je da su A_{35} i C_{36} 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 10^5 puta manje efikasno, dok su mutanti u položaju 36 aminoacilirani 2 do 3 reda veličine slabije od divljeg tipa tRNA (Horowitz i sur. 1999). Pokazano je i da je 5'-kraj antikodonske peteljke u direktnom kontaktu s ValRS-om. Značajan utjecaj na učinkovitost aminoaciliranja imala je zamjena nukleotidnog para $U_{29}{\cdot}A_{41}$ u $C_{29}{\cdot}G_{41}$. Učinkovitost aminoaciliranja smanjena je čak 45 puta uslijed smanjene fleksibilnosti antikodonske petlje, budući da je nakon uvođenja zamjene, antikodonska petlja sadržavala 5 uzastopnih G·C parova baza. Specifični elementi identiteta nisu utvrđeni u akceptorskoj peteljci. Pokazano je da je za prepoznavanje $tRNA^{Val}$ važno jedino održavanje geometrije akceptorske peteljke kao heliksa RNA tipa A (Liu i sur. 1997). Supstitucija diskriminacijskog nukleotida A_{73} u G_{73} rezultirala je smanjenjem učinkovitosti aminoaciliranja za 40 puta. S obzirom da su varijante izmijenjene u C_{73} ili U_{73} svega 2-3 puta manje aktivne od divljeg tipa tRNA, smatra se da G na položaju 73 djeluje kao negativni element identiteta za ValRS. Također, negativan učinak na aminoaciliranje ima supstitucija krajnjeg A_{76} na 3'-kraju u G_{76}, dok $tRNA^{Val}$ koje završavaju sa C_{76} ili U_{76} pokazuju sličnu aminoacilacijsku aktivnost kao divlji tip tRNA. Pokazano je da kao elementi identiteta, iako nešto manje značajni u odnosu na elemente identiteta u području antikodona, djeluju i G_{20} u području D-omče te G_{45} u području varijabilne ruke.

1.3. Mehanizmi popravka pogreške

Specifično i točno aminoaciliranje tRNA, temeljni je preduvjet za ispravan prijenos genetičke informacije. Aminoacil-tRNA-sintetaze razvile su brojne strategije koje im omogućavaju prepoznavanje supstrata u staničnom 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, poglavlje 1.2.1.), dok pojedine aminokiseline, poput valina i izoleucina, često nemaju dovoljno izražene strukturne razlike da bi ih sintetaze mogle jednostavno razlikovati. Primjerice, aktivacija valina katalizirana enzimom IleRS, svega 200 puta je manje učinkovita 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 mjesta 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 mjesta 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 mjesta do mjesta 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 aminokiselinom. 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, točna 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 pročišćavanja 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 čistoće. Osamdesetih godina razvijen je sustav transkripcije molekula tRNA *in vitro* pomoću 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 veće količine određene tRNA bez popratnog problema pročišćavanja od ostalih molekula transfer RNA kao prilikom pročišćavanja iz nekog organizma. Time je znatno unaprijeđeno proučavanje povezanosti strukture i funkcije zbog lakšeg uvođenja mutacija te pročišćavanja 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 sam način transkripcije tRNA ima svojih nesavršenosti, naime, T7-RNA-polimeraza, iako dosta precizna u inicijaciji i terminaciji transkripcije, ipak griješi. U transkripcijskoj smjesi često je prisutno nekoliko produkata bliske veličine, te kraći oligonukleotidi koji odgovaraju abortivnim inicijacijskim produktima. T7-RNA-polimeraza naginje preranom 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 transkripata s homogenim 5'-krajevima, zbog čega nastaju skraćeni ili produljeni produkti (Pleiss i sur. 1998). Uočeno je da heterogenost 5'-kraja ovisi o slijedu početnog dijela 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 pročišćavanja ispravnog transkripta.

Alternativna metoda pripreme tRNA *in vitro* je kemijska sinteza polovica molekula tRNA s prekidom u području antikodona te ligacija polovica pomoću 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. Učinkovitost ligacije ovisi o području prekida u molekuli tRNA, te o samom nukleotidnom slijedu, zbog čega je nužno pročišćavanje ligiranih molekula na poliakrilamidnom gelu (Francklyn i sur. 2008).

Često 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 ekspresija, te nakon nekog vremena, izolira se ukupna tRNA standardnom ekstrakcijom fenolom i kloroformom. Ovisno o razini ekspresije i homogenosti uzorka, željena tRNA izdvaja se pročišćavanjem na poliakrilamidnom gelu ili pomoću raznih kromatografskih tehnika (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 pročišćavanja tRNA

Odabir odgovarajuće metode za pročišćavanje tRNA ovisi o metodi proizvodnje tRNA, odnosno materijalu iz kojeg se ona pročišćava. Za pročišćavanje tRNA iz transkripcijske smjese (*in vitro*) standardno se koriste denaturirajući poliakrilamidni gelovi i to najčešće 6 % (w/v) akrilamidni gelovi (akrilamid/bisakrilamid u omjeru 19:1) s 8 mol dm^{-3} urejom (Gruić Sovulj, 2007). Ovisno o udjelu prekomjerno eksprimirane tRNA u uzorku ukupne izolirane tRNA, za izdvajanje željene tRNA također se može koristiti pročišćavanje 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 čistoća pročišćene tRNA zbog poteškoća izolacije transkripta ispravne duljine (Kholod i sur. 1998), odnosno izdvajanja prekomjerno eksprimirane tRNA od ostatka stanične tRNA bliske duljine (Francklyn i sur. 2008).

Nešto brže i jednostavnije rješenje su pročišćavanja kromatografskim tehnikama. Kao stacionarna faza često se koriste DEAE-celuloza te DEAE-Sephadex, anionski izmjenjivači 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 i jedna od korištenijih metoda za pročišćavanje 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. Pročišćavanje određene vrste tRNA temelji se na sposobnosti ostvarivanja hidrofobnih interakcija. Transfer RNA, ukoliko nema prirodno izraženu hidrofobnost, može se napraviti hidrofobnijom pomoću kemijskih modifikacija što znatno povećava iskoristivost metode. Tako pripremljena tRNA, jače se veže za stupac BD-celuloze te eluira visokom ionskom jakošću uz prisutnost nekog organskog otapala (Gillam i Tener 1971). Prva je na taj način pročišćena molekula $tRNA^{Phe}$, koja ne zahtjeva dodatne modifikacije jer već posjeduje prirodni hidrofobni karakter. Dodatna hidrofobnost može se postići i aminoacilacijom tRNA pripadnom aminokiselinom. Tirozin i triptofan posjeduju hidrofobni bočni ogranak, a ostale aminokiseline, zahvaljujući reaktivnosti α-aminoskupine, mogu se derivatizirati aromatskim reagensom i time napraviti hidrofobnijima. Često se koristi N-hidroksisukcinimid-2(2-naftoksi)acetat nakon čega se dobije 2-naftoksiacetilaminoacil-tRNA koja se nakon pročišćavanja jednostavno deacilira. Budući da se željena tRNA specifično aminoacilira pomoću odgovarajuće aaRS i aminokiseline, metoda je prikladna za pročišćavanje aktivnih transkripata, ali i prekomjerno eksprimirane tRNA

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

U pročišćavanju tRNA koriste se i afinitetne kromatografije. Nedavno su Kieft i Batey (2006) razvili zanimljivu metodu za brzu proizvodnju i pročišćavanje RNA u nativnim, nedenaturirajućim uvjetima. Metoda obuhvaća klasičnu transkripciju *in vitro* pomoću T7-RNA-polimeraze s kalupa rekombinantnog plazmida koji uz gen za tRNA pod kontrolom jakog promotora sadrži i dva dodatna elementa za lakše pročišćavanje – ribozim hepatitis delta virusa, te RNA ukosnicu koja je dio čestice za prepoznavanje signala (eng. *signal recognition particle*). Transkript tRNA se preko ukosnice RNA specifično veže za proteinski dio čestice za prepoznavanje signala koji je imobiliziran na kromatografskoj smoli i time se izdvaja od ostalih nepotpunih transkripata. 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 način proizvodnje (*in vitro* ili *in vivo*) je afinitetna kromatografija pomoću 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 pročistiti. U određenim kromatografskim uvjetima, za elongacijski faktor veže se jedino aminoacilirana tRNA, koja se naposlijetku eluira dodatkom GDP-a ili porastom ionske jakosti. Prednost metode temelji se na mogućnosti specifičnog pročišćavanja funkcionalnih aminoacilacijski aktivnih tRNA. Međutim, njen glavni nedostatak je vremenska zahtjevnost, budući da je nužno proizvesti i pročistiti 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 pročišćavanju. Također, metoda je teško prilagodiva za dobivanje miligramskih količina tRNA nužnih za detaljne kinetičke analize.

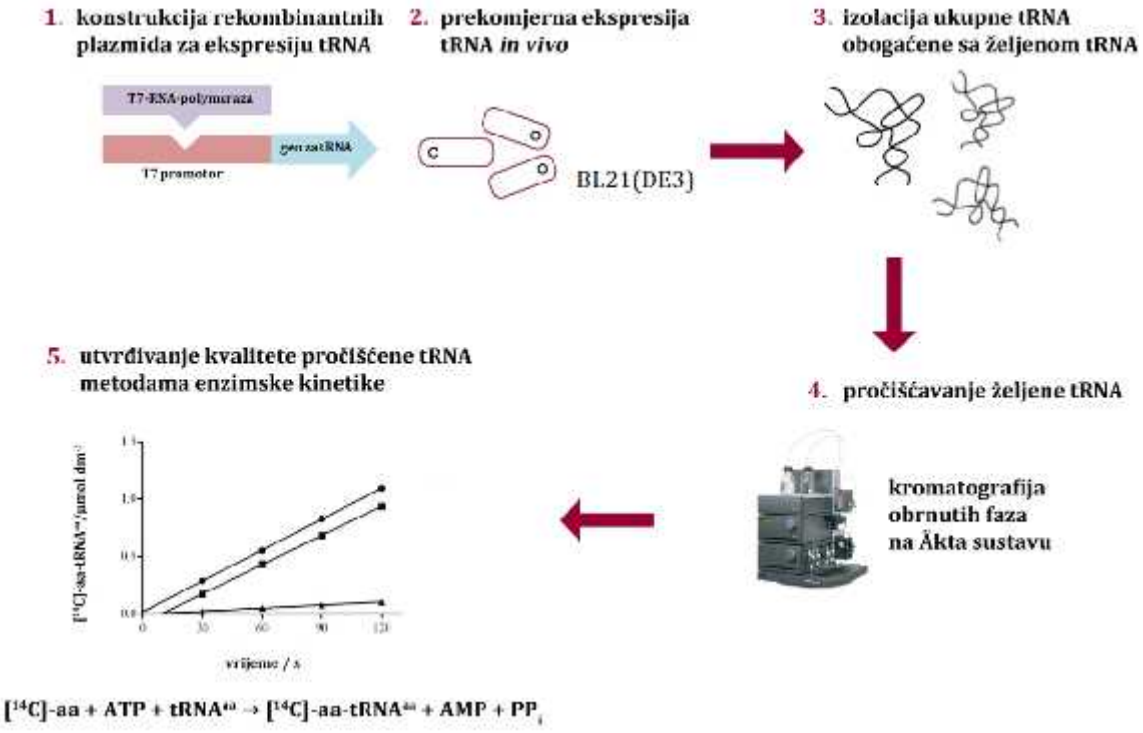
Nakon prilagođavanja na kromatografske sustave visoke učinkovitosti, kromatografija obrnutih faza postala je jednom od najmoćnijih metoda za pročišćavanje nukleinskih kiselina

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 uobičajeno nanosi u puferu koji omogućava 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 često se koristi kao jedna od nekoliko kromatografskih tehnika potrebnih za dobivanje čiste tRNA (Cayama i sur. 2000) ili za dobivanje čiste tRNA u jednom koraku uz kemijsku modifikaciju amino skupine aminoacilirane tRNA s ciljem povećanja hidrofobnosti (Kothe i sur. 2006). Međutim, s obzirom na prirodu kromatografije obrnutih faza, optimalno pročišćavanje zapravo ovisi o ciljnoj molekuli zbog čega je nužno razviti metodu pročišćavanja 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 čistoće, 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 mehanizama popravaka enzima IleRS, nužna je proizvodnja homogene, posttranskripcijski modificirane biološki aktivne $tRNA^{Ile}$. Specifični ciljevi obuhvaćaju dizajn i optimiranje sustava za prekomjernu ekspresiju molekula tRNA *in vivo*, razvoj metode za pročišćavanje 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.). Također, u sklopu ovog rada, gen za ValRS biti će ukloniran u pET28b vektor, rekombinantni ValRS prekomjerno eksprimiran i pročišćen afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozi pomoću 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*), agaroza (*Sigma*), akrilamid (*Sigma*), amonijev acetat (*Kemika*), amonijev klorid (*Kemika*), amonijev peroksodisulfat (APS) (S*erva*), amonijev sulfat (*Kemika*), dimetilsulfoksid (DMSO) (*Sigma*), ditiotreitol, DTT (*Sigma*), etanol, (*Kemika*), etilendiamintetraoctena kiselina, EDTA (*Sigma*), fenilmetilsulfonil-fluorid (PMSF) (*Sigma*), fenol (*Kemika*), glicerol (*Kemika*), glicin (*USB Corporation*), N-(2-hidroksietil)piperazin-N'-2-etansulfonska kiselina (Hepes) (*USB Corporation*), imidazol (*Sigma*), izopropil-β-tiogalaktozid (IPTG) (*Sigma*), izopropanol (*Kemika*), kalcijev klorid (*Kemika*), kanamicin (*Sigma*), kloridna kiselina (*Kemika*), kloroform (*Kemika*), kvaščev ekstrakt (*Difco*), magnezijev acetat (*Sigma*), magnezijev klorid (*Fluka*), magnezijev sulfat (*Kemika*), β-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*), [U-^{14}C]-izoleucin (*Amersham biosciences*), valin (*Sigma*), [U-^{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 (XCFF) (*Serva*), toluidinsko modrilo (*Sigma*).

2.1.4. Enzimi, proteini i nukleinske kiseline

Albumin iz goveđeg seruma (eng. *bovine serum albumin*; BSA) (*NEB*), DNaza I s pripadnim puferom (*Sigma*), DNaza I (oslobođena od RNaza) (*NEB*), *Pfu* DNA-polimeraza (*Fermentas*), restrikcijske endonukleaze s pripadnim puferima (*NEB*), ribonukleaza A iz goveđe gušterače (*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 $tRNA^{Ile}$ iz bakterije *E. coli* proizveden *in vitro* pripremila je Morana Dulić, dipl. ing.

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

2.1.5. Komercijalni kompleti za pročišćavanje DNA

QIAprep Spin Miniprep Kit (*Qiagen*) za izolaciju plazmidne DNA, *QIAquick PCR Purification Kit* (*Qiagen*) za pročišćavanje DNA iz reakcijskih smjesa lančane 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*

Tekuća hranjiva podloga Luria-Bertani (LB):

5 g dm^{-3} kvaščev ekstrakt, 10 g dm^{-3} tripton, 10 g dm^{-3} NaCl.

LB ploče:

5 g dm^{-3} kvaščev 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 konačne koncentracije 0,030 mg ml^{-1}, odnosno 0,100 mg ml^{-1}.

2.1.7. Sojevi i plazmidi *E. coli*

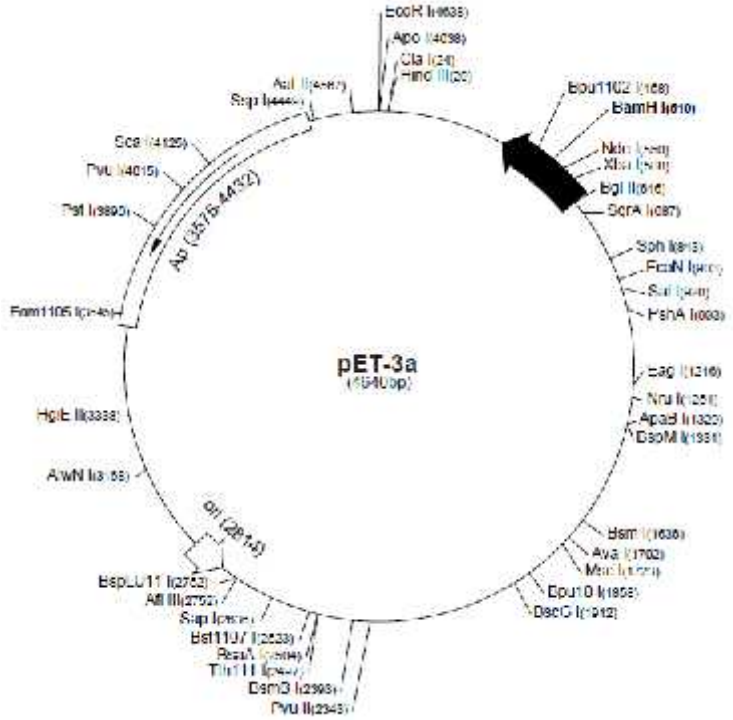
Sojevi E. coli

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* .

DH5α ((*sup*E44 Δ*lac*U169 (Φ80 lacZ) ΔM15) *hsdR*17 *recA*1 *endA*1 *gyrA*96 *thi*1 *relA*1): soj rutinski korišten za umnožavanje plazmidne DNA te za kloniranje. Pogodan je zbog delecije *endA*1 gena (kodira za endonukleazu I) čime se izbjegava nespecifična razgradnja DNA te zbog mogućnosti α-komplementacije s plazmidima iz pUC serije.

Plazmidi za ekspresiju proteina u E. coli

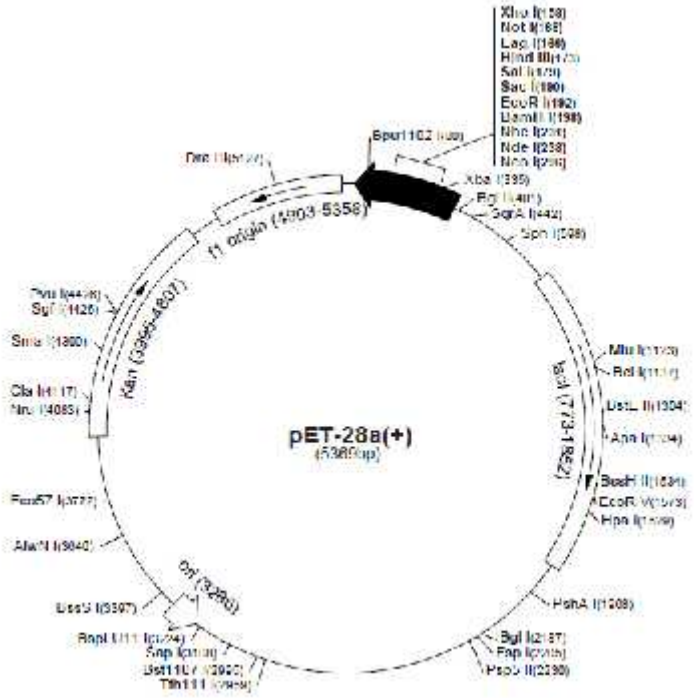
ΔpET3a – derivat pET3a plazmida iz pET serije vektora za prekomjernu ekspresiju proteina pod kontrolom inducibilnog promotora. Omogućava ekpresiju rekombinantnih proteina s T7 privjeskom na N-kraju s ciljem imunoafinitetnog pročišćavanja na agarozi za koju su vezana monoklonska antitijela za T7 privjesak. 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. ΔpET3a se razlikuje od pET3a vektora po tome što ima samo jedno *Eco*RV restrikcijsko mjesto, dok pET3a ima dva. Budući da je izbačen kratki odsječak pET3a vektora koji se nalazio između dva *Eco*RV mjesta, ΔpET3a je za 191 pb kraći od pET3a.

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

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



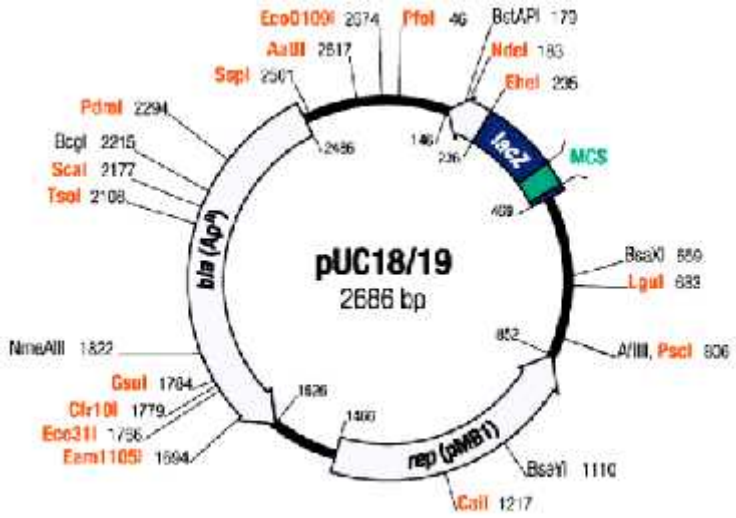
Slika 2.2. Plazmidni vektor pET28.

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 ugrađenim 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, često 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 početak replikacije *ori* iz plazmida pBR322. Ugradnja željenog inserta u višestruko mjesto za kloniranje inaktivira gen za β-galaktozidazu što omogućava selekciju rekombinantnih plazmida na temelju plave ili bijele boje kolonija na podlozi koja sadrži 5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-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 ukloniram 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 300^{TM} 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 agaroza (*Qiagen*), polietilenimin-celuloza pločice 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 restrikcijska mjesta za *Eco*RI, *Sal*I te *Bam*HI. Restrikcijska mjesta za *Eco*RI te *Bam*HI odgovaraju stršećem nukleotidnom slijedu koji preostaje nakon razgradnje vektora s odgovarajućim enzimima tako da za kloniranje *Eco*RI-*Bam*HI kazete nije potrebna razgradnja inserta restrikcijskim enzimima. U konstrukt je uključeno i restrikcijsko mjesto za *Bst*NI koji omogućava dobivanje pravilnog 3'-CCA kraja molekule tRNA prilikom transkripcije *in vitro.* Takav raspored restrikcijskih mjesta 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 ΔpET3a vektor za transkripciju *in vivo*. Važno je napomenuti da je prvi nukleotidni par *E. coli* $tRNA^{Ile}_{GAT}$ $A_1 \cdot U_{72}$, no u sintetskom genu izmijenjen je u $G_1 \cdot C_{72}$. Zamjena je uvedena imajući na umu da je transkripcija T7-RNA-polimerazom znatno učinkovitija 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} $MgCl_2$ 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 hlađeni do sobne temperature. Takav postupak omogućava sparivanje komplementarnih oligonukleotida. Pripremljeni konstrukti $tRNA^{Ile}_{GAT}$ i $tRNA^{Val}_{CAT}$ gena razgrađeni su *Sal*I enzimom prema uputama proizvođača te pročišćeni *QIAquick PCR Purification Kit*-om (također prema uputama proizvođača). ΔpET3a vektor pripremljen je za ligaciju tako da je razgrađen najprije restrikcijskim enzimom *Sal*I i pročišćen *QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)*, a zatim razgrađen s *Bam*HI i pročišćen iz agaroznog gela *QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)*. Ligacijske smjese ukupnog volumena 15 µl sadržavale su 100 ng razgrađenog ΔpET3a 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} $MgCl_2$, 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 čega je T4-DNA-ligaza inaktivirana inkubacijom 10 min na 65 °C.

$tRNA^{Ile}_{GAT}$

5′-***AATTC*****GTCGAC****TAATACGACTCACTATA**GGGCTTGTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAG
GTCGGTGGTTCAAGTCCACTCAGGCCCA***CCAG***-3′

5′–***GATCC****TGG*TGGGCCTGAGTGGACTTGAACCACCGACCTCACCCTTATCAGGGGTGCGCTCTAACCACCTGAGCT
ACAAGCCC**TATAGTGAGTCGTATTA*****GTCGACG***-3′

$tRNA^{Val}_{TAC}$

5′-***AATTC*****GTCGAC****TAATACGACTCACTATA**GGGTGATTAGCTCAGCTGGGAGAGCACCTCCCTTACAAGGAGGGGG
TCGGCGGTTCGATCCCGTCATCACCCA***CCAG***-3′

5′-***GATCC***TGGTGGGTGATGACGGGATCGAACCGCCGACCCCCTCCTTGTAAGGGAGGTGCTCTCCCAGCTGAGCTA
ATCACCC**TATAGTGAGTCGTATTA*****GTCGACG***-3′

*Eco*RI - **G▾AATTC**, *Sal*I - **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 označen je podebljanim slovima, dok su restrikcijska mjesta, odnosno odgovarajući stršeći krajevi, istaknuti podebljanim slovima u kurzivu te obojani:

2.2.1.2. Kloniranje gena za *E. coli* ValRS

Lančana reakcija polimeraze (eng. *polymerase chain reaction*, PCR) korištena je u ovom radu za umnažanje gena za ValRS iz *E. coli* ugrađenog 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} početnica, 1 x pufer za *Pfu* polimerazu (20 mmol dm^{-3} Tris-HCl (pH = 8,8), 10 mmol dm^{-3} $(NH_4)_2SO_4$, 10 mmol dm^{-3} KCl, 0,1 mg ml^{-1} BSA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 2 mmol dm^{-3} $MgSO_4$), 0,2 mmol dm^{-3} dNTP-a (svakog) te 2 µl *Pfu* polimeraze (2,5 U $µl^{-1}$). Nukleotidni slijed korištenih početnica prikazan je na slici 2.5., a uvjeti PCR-a prikazani su u tablici 2.1.

5′-CTA***GCTAGC***ATGGAAAAGACATATAACCCA-3′

5′-GAA***GAATTC***TTACAGCGCGGCGATAACAGC-3′

*Nhe*I - G▾CTAGC, *Eco*RI - G▾AATTC

Slika 2.5. Početnice korištene u PCR-u. Dio početnica komplementaran genu za ValRS istaknut je podebljanim slovima, dok su restrikcijska mjesta istaknuta podebljanim slovima u kurzivu te obojana:

Tablica 2.1. Uvjeti reakcije PCR.

	temperatura / °C	trajanje ciklusa / min	broj ciklusa
početna denaturacija	94	5	1
denaturacija	94	0.5	30
sparivanje početnica	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 pročišćen pomoću *QIAquick Gel Extraction Kit*-a. Glavni produkt PCR-a i pET28b vektor razgrađeni su restrikcijskim enzimom *Nhe*I nakon čega su pročišćeni *QIAquick PCR Purification Kit*-om, odnosno *QIAquick Gel Extraction Kit*-om. Pročišćeni produkti podvrgnuti su razgradnji s *Eco*RI i ponovno pročišćeni na već opisani način. Razgradnje restrikcijskim enzimima te pročišćavanja komercijalnim kompletima napravljena su prema uputama proizvođača. Konačnim razgrađenim produktima, koncentracija je određena pomoću spektrofotometra NanoDrop 1000 pri valnoj duljini λ = 260 nm.

Ligacijske smjese ukupnog volumena 20 µl sadržavale su 100 ng razgrađenog pET28b vektora, insert (razgrađeni 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 U μl^{-1}). Reakcije ligacije inkubirane su preko noći na 16 °C, nakon čega je T4-DNA-ligaza inaktivirana 10 min na 65 °C.

2.2.1.3. Agarozna gel-elektroforeza

Agarozni gelovi (1 % w/v agaroza) 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 mg dm^{-3} etidijev bromid) i grijanjem u mikrovalnoj pećnici nekoliko minuta. Prije nanašanja uzoraka na gel, dodano im je 1/10 volumena agarozne boje (25 mg ksilencijanolfluorofosfata i 25 mg bromfenol plavo otopljenih u 7 ml 0,1 mol dm^{-3} EDTA (pH = 8.0) te 3 ml glicerola). Elektroforeza je provođena 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 poveća intenzitet fluorescencije za 20 puta, što omogućava jasnu detekciju DNA fragmenata pod UV svjetlom transiluminatora (λ = 312 nm).

2.2.1.4. Izolacija plazmidne DNA

U ovom radu, korištena su dva načina izolacije plazmidne DNA: komercijalni *QIAprep Spin Miniprep Kit* (*Qiagen*) (izolacija prema uputama proizvođača) te metoda alkalne lize. Postupak izolacije plazmidne DNA metodom alkalne lize zasniva se na selektivnom taloženju genomske DNA i staničnih proteina. Stanice su lizirane u lužnatim uvjetima uz dodatak SDS-a, pri čemu se nukleinske kiseline i proteini denaturiraju. Neutralizacijom smjese pomoću 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 ploči. Bakterijska kultura inkubirana je preko noći na 37 °C uz potresanje pri 200 rpm. Noćna kultura oborena je centrifugiranjem 1 min na 12000 rpm, nakon čega je supernatant uklonjen aspiracijom pomoću 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 uređaju 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 omogućava 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) *Nhe*I i *Eco*RI dvostruka razgradnja – očekivana duljina fragmenata je 2,9 kb i 5,4 kb (izbacuje se insert iz rekombinantnog plazmida). Prazan pET28b vektor navedenom dvostrukom razgradnjom, biti će razgrađen na fragmente veličine 5,4 kb i 38 bp (fragment 38 bp nije vidljiv na 1 % agaroznom gelu).
2) *Bam*HI - očekuje se lineariziran rekombinantni vektor veličine 8,3 kb (u rekombinantnom plazmidu izbačeno je *Bam*HI restrikcijsko mjesto koje je prisutno u pET28b vektoru, no gen za ValRS ima restrikcijsko mjesto za *Bam*HI zbog čega se rekombinantni plazmid linearizira). Prazan pET28b također će biti lineariziran, no na agaroznom gelu biti će vidljiv fragment veličine 5,4 kb.

Za provjeru rekombinantnih plazmida ΔpET3a koji bi trebali sadržavati gen za $tRNA^{Ile}_{GAT}$ ili $tRNA^{Val}_{TAC}$ korišteni su sljedeći restrikcijski enzimi:

1) *Ava*I i *Bam*HI dvostruka razgradnja – očekivana duljina fragmenata je 3,2 kb i 0,9 kb. Prazan ΔpET3a vektor biti će razgrađen na fragmente veličine 4 kb i 0,4 kb.

2) *Sal*I – očekivana duljina lineariziranog rekombinantnog plazmida je 4,1 kb. Prazan ΔpET3a također će biti lineariziran, no na agaroznom gelu će biti vidljiv kao fragment veličine 4,4 kb.
3) *Bam*HI – očekuje se lineariziran rekombinantni vektor veličine 4,1 kb. Prazan ΔpET3a također će biti lineariziran, no očekuje se veličina 4,4 kb.
4) *Sal*I i *Bam*HI dvostruka razgradnja – očekivana duljina fragmenata je 4,0 kb i 0,1 kb (izbacuje se insert iz rekombinantnog plazmida). Prazan ΔpET3a vektor, navedenom dvostrukom razgradnjom, biti će razgrađen na fragmente veličine 4,0 kb i 0,4 kb.

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

2.2.1.6. Određivanje nukleotidnog slijeda DNA – sekvenciranje

Rekombinantni plazmidi za koje je restrikcijskom analizom pokazano da vrlo vjerojatno posjeduju pravilno ugrađen insert, izolirani su čišćom metodom izolacije plazmidne DNA, odnosno pomoću komercijalnog kompleta *QIAprep Spin Miniprep Kit*. Za konačnu potvrdu uspješnog kloniranja, rekombinantni plazmidi sekvencirani su u DNA-servisu Instituta Ruđer Bošković na četverokapilarnom 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 početnice za sekvenciranje koncentracije 3,2 µmol dm^{-3} (tablica 2.2.).

Tablica 2.2. Početnice 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 povećanju propusnosti bakterijske stanične stijenke uslijed izlaganja bakterija električnom pulsu. Za elektroporaciju je korišten uređaj *BIORAD, Gene Pulser™* na kojem su

postavljeni sljedeći parametri: otpor u iznosu od 200 Ω, 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 čega su bakterije resuspendirane u 1 ml tekućeg LB medija i inkubirane 1 h na 37 °C. Odgovarajući alikvoti naneseni su na selektivne hranjive podloge, koje su zatim inkubirane preko noći na 37 °C. Budući da plazmidi sadrže gen za rezistenciju na određeni 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 početka rada sa svakim novim proteinom, poželjno je optimirati njegovu ekspresiju. Najčešći parametri koji se optimiraju su količina 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 utječe na uspješnost pročišćavanja, odnosno prinos pročišćenog proteina. Iz tih razloga testirana je ekspresija proteina ValRS s rekombinantnog plazmida pET28bValRS u sljedećim 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 noćna pretkultura - bakterijske stanice *E. coli* BL21DE3 transformirane s pET28bValRS plazmidom, nasađene su u 1 ml LB medija (u medij je dodan kanamicin u konačnoj koncentraciji 30 μg ml^{-1}). Stanice su rasle 16 sati na 37 °C. Zatim je 1 ml LB medija (s dodanim kanamicinom) inokuliran sa 100 μl noćne pretkulture i inkubiran na 37 °C uz potresanje pri 200 rpm, sve dok bakterijska suspenzija nije dosegla vrijednost OD_{600} (optička gustoća bakterijske suspenzije mjerena pri λ=600 nm) 0,5 – 0,8. Prekomjerna ekspresija enzima ValRS inducirana je dodatkom IPTG-a konačne koncentracije 0,25, 0,5 ili 1 mmol dm^{-3}. Bakterijska suspenzija inkubirana je na 37 °C u inducirajućim uvjetima dva ili pet sati nakon čega 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 uzoraka za SDS-PAGE analizu opisana je u poglavlju 2.2.2.4.

Preparativna prekomjerna ekspresija i liza bakterijskih stanica

Za pročišćavanje proteina ValRS u preparativnim količinama, pripremljeno je 5 ml noćne 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 μg ml^{-1}) inokuliran je s 5 ml noćne pretkulture (omjer 1:100). Bakterijska kultura uzgajana je u tresilici na 37 °C dok vrijednost OD_{600} nije dosegla 0,5 – 0,8, a zatim je prekomjerna ekspresija enzima ValRS inducirana dodatkom IPTG-a (0,25 mmol dm^{-3}). Bakterije su rasle u inducirajućim uvjetima 2 sata na 37 °C, a zatim su oborene centrifugiranjem 15 min pri 5000 g i 4 ^{o}C.

Supernatant je uklonjen, a talog resuspendiran u 5 ml pufera A za afinitetno pročišćavanje na Ni-NTA agarozi (20 mmol dm^{-3} Hepes 7,0, 500 mmol dm^{-3} NaCl, 5 mmol dm^{-3} $MgCl_2$, 10 mmol dm^{-3} imidazol, 10 mmol dm^{-3} β-merkaptoetanol). Za lizu bakterijskih stanica i oslobađanje proteina u otopinu korištena je sonikacija. Metoda se temelji na stvaranju i odašiljanju ultrazvučnih 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 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 filtar te podvrgnut pročišćavanju na Ni-NTA agarozi (opisano u sljedećem poglavlju).

2.2.2.2. Pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozi

Plazmidi pETIleRS i pET28bValRS sadrže gene za rekombinantne proteine IleRS odnosno ValRS sa His-privjeskom na N-kraju, što omogućava afinitetno pročišćavanje proteina na Ni-NTA agarozi. Specifične reverzibilne interakcije između His-privjeska i liganda vezanog na kromatografsku matricu omogućavaju izdvajanje 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. Nitrilotrioctena kiselina (NTA) je tetradentatni kelirajući adsorbens koji zauzima četiri koordinacijska mjesta Ni^{2+} 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 Sepharoze CL-6B na koju je vezana Ni-NTA. Kapacitet smole je 5-10 mg proteina po mililitru.

Svi puferi korišteni u pročišćavanju imaju temeljno jednak sastav - 20 mmol dm^{-3} Hepes 7,0, 500 mmol dm^{-3} NaCl, 5 mmol dm^{-3} $MgCl_2$ i 10 mmol dm^{-3} β-merkaptoetanol. Puferi A-D razlikuju se po konačnoj 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 uravnotožena u puferu A (10 ml). Radi postizanja učinkovitijeg 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 pročišćavanja i pojedinačne frakcije eluiranog proteina (1 ml) provjerene su SDS poliakrilamidnom gel-elektroforezom (opisano u sljedećem poglavlju). Postupak pročišćavanja proteina proveden je u ledenici na 4 °C.

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

U svrhu analize proteinskih frakcija dobivenih nakon afinitetne kromatografije korištena je metoda denaturirajuće poliakrilamidne gel-elektroforeze. To je metoda u kojoj se denaturirani proteini razdvajaju na poliakrilamidnom gelu pod utjecajem električnog polja. Budući da svi denaturirani proteini zbog nastalog kompleksa sa SDS-om imaju jednak oblik te omjer naboja i mase, razdvajanje pojedinih proteina rezultat je isključivo 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} β-merkaptoetanol, 6,25 % (v/v) glicerol, 1,25 % (w/v) SDS, 0,002 % bromfenol plavo), a denaturirani su inkubacijom 5 min u kipućoj vodi. Elektroforeza je provođena 15 min pri 120 V, a zatim 45 min pri 180 V na sobnoj temepraturi u puferu sljedećeg 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 vrpci 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 kipućoj vodi do pojave jasnih vrpci proteina (10 min).

2.2.2.5. Ugušćivanje proteina ultrafiltracijom

Nakon provjere frakcija afinitetnog pročišćavanja na Ni-NTA agarozi, spojene su i ugušćene frakcije sa značajnom količinom čistog proteina metodom ultrafiltracije. Pritom je prema uputama proizvođača korišten *Centricon®-centrifugal filter device* (*Milipore*) s porama koje propuštaju čestice manje od 30 kDa. Pročišćen i ugušćen 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} β-merkaptoetanol, 10 % (v/v) glicerol) te pohranjen na -20 °C nakon što mu je koncentracija određena metodom po Bradfordu ili spektrofotometrijski pomoću uređaja NanoDrop 1000 (opisano u sljedećem poglavlju).

2.2.2.6. Određivanje koncentracije proteina

Metoda po Bradfordu

Ova metoda temelji se na reakciji proteina i boje Coomassie Brilliant Blue G-250 pri čemu se apsorpcijski maksimum boje pomiče s 465 nm na 595 nm (Bradford 1976). Apsorbancija smjese je pri valnoj duljini od 595 nm u određenom 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 goveđeg seruma, eng. *bovine serume albumine*, BSA) u rasponu unutar kojeg se očekuje koncentracija proteina od interesa. Pomoću dobivene jednadžbe pravca, odredi se koncentracija ispitivanog proteina. Rutinski su svi uzorci razrjeđeni u destiliranoj vodi do konačnog 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 mjerenja su apsorpcijski spektar i koncentracija uzorka proteina izražena u mg ml^{-1}, izračunata pomoću apsorbancije pri valnoj duljini od 280 nm. Mjerno područje instrumenta za mjerenje 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 μg μl^{-1} kalupa DNA (plazmid pUC18tRNA$^{Val}_{TAC}$ razgrađen s *Bst*NI enzimom prema uputama proizvođača), pufer 1 x TXN (40 mmol dm^{-3} Tris-HCl (pH = 8,0), 20 mmol dm^{-3} $MgCl_2$, 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 čega je kalup DNA razgrađen dodatkom 60 U DNaze I (oslobođene od RNaza) uz dodatak odgovarajućeg reakcijskog pufera prema uputama proizvođača. Nakon 2,5 sata inkubacije na 37 °C, DNaza I deaktivirana je inkubacijom 10 min na 65 °C. Transkripcijska smjesa prethodno pročišćavanju 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. Pročišćavanje transkripata ionskom izmjenom na stupcu DEAE-celuloze

Za pročišćavanje molekula tRNA^{Val} proizvedenih *in vitro* korištena je ionska izmjena na stupcu DEAE-celuloze koja pripada skupini slabih ionskih izmjenjivača. Svi puferi upotrebljeni prilikom pročišćavanja su 1 x TXN puferi (40 mmol dm^{-3} Tris-HCl (pH = 8,0), 20 mmol dm^{-3} $MgCl_2$), ali s različitim koncentracijama NaCl. Najprije je kolona za kromatografiju napunjena DEAE-celulozom bubrenom preko noći 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 povećavanjem 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 denaturirajućim uvjetima (opisano u sljedećem poglavlju). Spojene su frakcije koje su sadržavale značajnije količine $tRNA^{Val}$ i taložene preko noći na -20 °C uz dodatak natrijevog acetata (pH = 4,5) konačne 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. Čistoj tRNA određena je koncentracija spektrofotometrijski (vidi poglavlje 2.2.3.5.).

2.2.3.3. Poliakrilamidna gel-elektroforeza u denaturirajućim uvjetima

U svrhu analize molekula tRNA dobivenih transkripcijom *in vitro* ili *in vivo*, korištena je poliakrilamidna gel-elektroforeza u prisustvu denaturirajućeg sredstva – ureje. Nukleinske kiseline se u tim uvjetima razdvajaju na gelu prema njihovoj masi. Pripremljeni poliakrilamidni gelovi bili su sljedećeg 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 konačne koncentracije 0,7 μg ml^{-1} i N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) do konačnog 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 denaturirajućem 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 vrućoj destiliranoj vodi do pojave jasnih vrpci. 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, mjerenjem apsorbancije na uređaju NanoDrop 1000. Rezultati mjerenja 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 čiste DNA, odnosno 40 µg čiste RNA. Mjerno područje instrumenta za mjerenje 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 ΔpET3a pod kontrolom T7 promotora, njihova transkripcija inducira se dodatkom IPTG-a. Za jednostavnije pročišćavanje, poželjno je postići što veću koncentraciju željenog produkta u staničnom ekstraktu, u ovom slučaju ciljne molekule tRNA.

Testirani uvjeti transkripcije molekula tRNA *in vivo* s rekombinantnih ΔpET3a vektora su sljedeći: indukcija s IPTG-om koncentracije 1 ili 3 mmol dm^{-3} i uzgoj bakterija u indukcijskim uvjetima 3 h ili 15 h. Najprije je pripremljena noćna pretkultura - bakterijske stanice *E. coli* BL21DE3 transformirane s ΔpET3atRNA$^{Ile}_{GAT}$ ili ΔpET3atRNA$^{Val}_{TAC}$ plazmidom, nasađene su u 1 ml LB medija u koji je dodan ampicilin u konačnoj koncentraciji 100 µg 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 OD_{600} = 0,5, dodatkom IPTG-a konačne 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 poglavlju 2.2.3.7.

Preparativna prekomjerna ekspresija tRNA in vivo

Za pročišćavanje molekula tRNA eksprimiranih *in vivo* u preparativnim količinama, 5 ml noćne pretkulture nasađeno je u 0,5 l LB medija s ampicilinom. Kada je bakterijska suspenzija dosegla OD_{600} = 0,5, inducirana je ekspresija molekula tRNA dodatkom 1 mmol dm^{-3} IPTG-a. Bakterije su uzgajane 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 analitičke 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 zasićenog vodom, a zatim je suspenzija povremeno vorteksirana tijekom 5 minuta te konačno centrifugirana 10 minuta na 10000 g. Gornji vodeni sloj prebačen je u čistu epruvetu i istaložen tijekom noći na -20 °C dodatkom natrijevog acetata pH = 4,5 (konačna koncentracija 0,3 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 uređaju. Zatim je uzorak tRNA podvrgnut deacilaciji u lužnatim uvjetima, budući da je izolirana tRNA vjerojatno aminoacilirana. Talog je otopljen u 0,125 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 (konačni pH je približno 5) i uzorak je dijalizom pri 4 °C preveden u redestiliranu vodu. Koncentracija izolirane tRNA određena 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 analitičke svrhe. Talog dobiven iz 0,5 l bakterijske suspenzije resuspendiran je u 15 ml pufera za izolaciju tRNA, nakon čega je dodan 1 volumen fenola zasićenog vodom. Smjesa je vorteksirana 6 puta po 30 sekundi s pauzama od 30 sekundi inkubacije na ledu, nakon čega su slojevi odvojeni centrifugiranjem 15 min, 10000 g. Gornji vodeni sloj ekstrahiran je jednakim volumenom fenol-kloroforma (smjesa fenola zasićenog vodom i kloroforma u volumnom omjeru 1:1) i nakon 10 min laganog miješanja, slojevi su razdvojeni centrifugiranjem. Za povećanje 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 konačnom w/v udjelu od 8 % i NaCl konačne koncentracije 0,5 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 noći na -20 °C uz dodatak natrijevog acetata i etanola nakon čega je podvrgnuta već 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 analitičke i preparativne svrhe.

Analiza uzoraka ukupne tRNA obogaćene $tRNA^{Ile}_{GAT}$ eksprimiranom in vivo

Sve kromatografije obrnutih faza sprovedene su na kromatografskom sustavu *Äkta Purifier 10* (*GE Healthcare*). Za analitičke kromatografije korištena je kolona Symmetry 300^{TM} C4 5 µm MVKIT 3,9 x 150 mm (*Waters*). Volumen navedene kolone je 1,79 ml i nadalje će u tekstu količina 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 konačnog 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 pomoću sonikacijske kupelji. Kolona je najprije uravnotežena s puferom A (15 volumena kolone, brzina protoka 1,5 ml min^{-1}), nakon čega je naneseno 50 µl 1 mg ml^{-1} djelomično pročišćene ukupne tRNA obogaćene 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 pročišćavanje $tRNA^{Ile}_{GAT}$ eksprimirane in vivo

Za preparativna pročišćavanja 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 analitičkim 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} djelomično pročišćene ukupne tRNA obogaćene 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 ml min^{-1} i skupljane su frakcije od 1,5 ml. Prisutnost $tRNA^{Ile}$ u frakcijama testirana je aminoaciliranjem (opisano u sljedećem poglavlju).

2.2.3.9. Reakcija aminoaciliranja

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

$$[^{14}C]\text{-aa} + ATP + tRNA^{aa} \rightarrow [^{14}C]\text{-aa-}tRNA^{aa} + AMP + PP_i$$

Broj udaraca u minuti izmjeren uz pomoć scintilacijskog brojača, proporcionalan je količini nastale [^{14}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 diskiće 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. Diskići se posuše, stave u staklene bočice s 2,5 ml scintilacijske otopine (5 g dm^{-3} 2,5-difenilovog oksazola i 0,3 g dm^{-3} 1,4-bis(2-(4-metil-5-fenil)oksazolil)benzena u toluenu) te se u scintilacijskom brojaču 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 μg μl^{-1} BSA, 0,1 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} [^{14}C]-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 diskiće Whatman 3MM, te uronjeni u hladnu 10 % (v/v) trikloroctenu kiselinu čime je zaustavljena reakcija aminoacilacije uslijed denaturacije enzima, a dolazi i do taloženja aminoacilirane tRNA. Papirnati diskići 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. Diskići su sušeni 30 min na 75 °C, a zatim stavljeni u staklene bočice s 2,5 ml scintilacijske otopine. Radioaktivnost pojedinog uzorka izmjerena je u scintilacijskom brojaču.

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 način da je u aminoacilacijsku smjesu dodano znatno više enzima kako bi se sva prisutna tRNA aminoacilirala. Korišten je već navedeni reakcijski pufer 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 amjese 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 ºC, zatim pročišćena ekstrakcijom fenol-vodom i kloroformom. Aminoacilirana $tRNA^{Ile}$ taložena je preko noći 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 ºC, 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 [α-^{32}P]ATP-a omogućava direktno praćenje nastanka i nestanka aminoacil-adenilata (aa-AMP) te AMP-a koji nastaje hidrolizom aa-

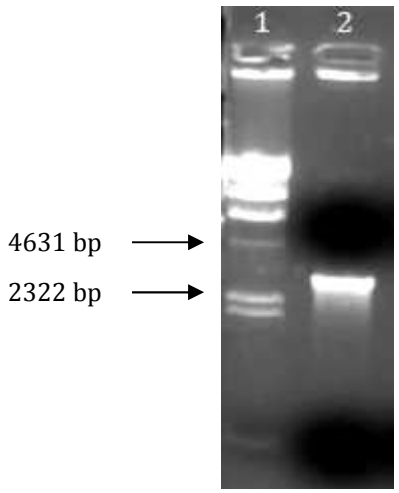
AMP-a ili uslijed prijenosa aminokiseline s aa-AMP-a na tRNA. Produkti i supstrati reakcije utroška ATP-a (aa-AMP, AMP i ATP) mogu se razdvojiti tankoslojnom kromatografijom i zasebno kvantificirati (Gruic-Sovulj i sur. 2005, Dulic i sur. 2010). Budući da je za sintezu pripadnog aa-AMP-a, odnosno pripadne 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} $MgCl_2$, 5 mmol dm^{-3} DTT, 0,1 mg ml^{-1} BSA, 0,004 U μl^{-1} anorganska pirofosfataza, 0,5 mmol dm^{-3} [α-^{32}P]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 pločice za tankoslojnu kromatografiju koje su prethodno predrazvijene u redestiliranoj vodi. Razdvajanje aa-[^{32}P]AMP, [^{32}P]AMP i [^{32}P]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 s 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*

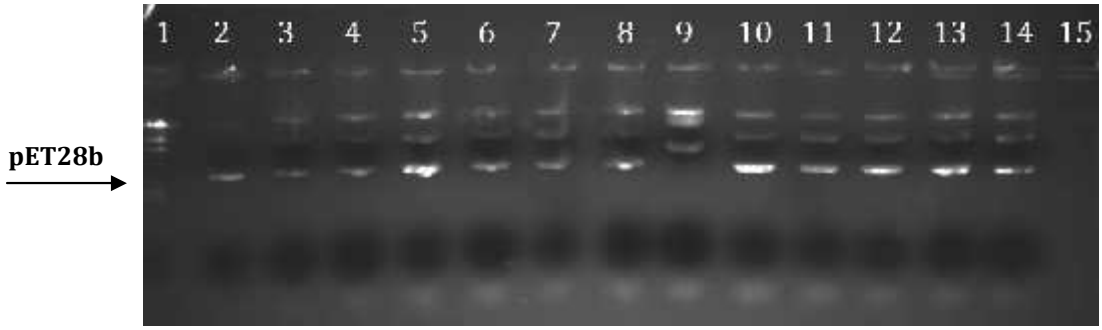
Gen za ValRS iz *E. coli* dobiven je kao poklon u sklopu rekombinantnog plazmida pXVal17 (opisan u poglavlju 2.1.7.). Budući da ukloniranom ValRS-u nije pridodan nikakav standardni afinitetni privjesak, postupak pročišćavanja uključivao bi tri kromatografske metode za postizanje zadovoljavajuće čistoće – afinitetnu kromatografiju na agaroza-heksil-adenozin-5-fosfatu (AMP imobiliziran na agarozu preko C_8 atoma adenina i razmaknice od 6 C atoma - heksan), gel filtraciju te ionsku izmjenu (Brevet i sur. 1989). S obzirom na zahtjevnost pročišćavanja ValRS-a prekomjerno eksprimiranog u sklopu navedenog konstrukta i budući da se svakim korakom u pročišćavanju 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 lančanom 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 λ pocjepana restrikcijskim enzimom *Hind*III (λ DNA-*Hind*III, slika 3.1.).



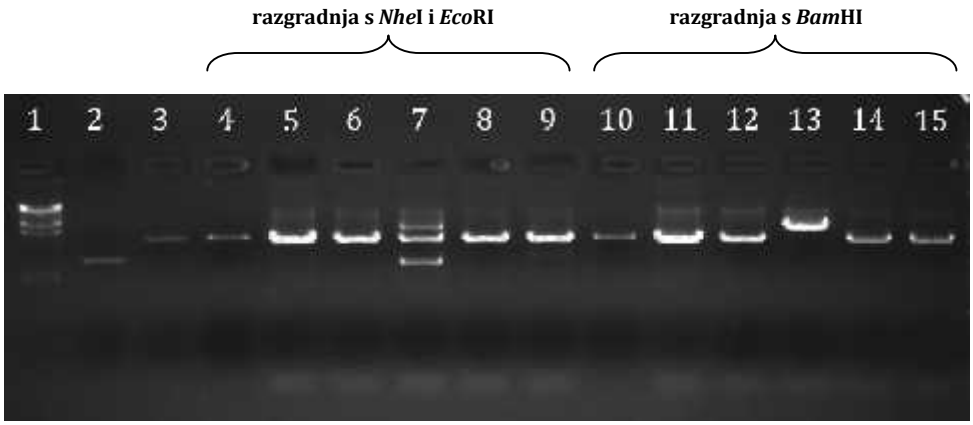
Slika 3.1. Elektroforeza produkta PCR-a na 1 % agaroznom gelu. 1 – marker, 2 – PCR produkt tj. ValRS gen umnožen početnicama prikazanim u na slici 2.5.

Iz agaroznog gela procjenjena duljina PCR-produkta odgovara očekivanoj veličini umnoženog gena za ValRS – 2,86 kb. Umnoženi fragment pročišćen je i razgrađen istim restrikcijskim enzimima kao i vektor pET28b te je postavljena reakcija ligacije prema protokolu opisanom u poglavlju 2.2.1.2. Bakterije *E. coli* soja DH5α transformirane su ligacijskom smjesom, a rast samo transformiranih bakterija, budući da je vektor pET28b nositelj gena za rezistenciju na kanamicin, osiguran je dodatkom kanamicina u hranjive podloge. Nasumično je odabrano 12 bakterijskih kolonija koje su uzgojene u tekućem 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 (λ DNA-*Hind*III), 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 označen superzavijeni oblik izoliranih plazmida. Budući da je pokretljivost plazmida u liniji 9 znatno manja i odgovara pokretljivosti vektora s ugrađenim 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 restrikcijskoj analizi kao što je opisano u poglavlju 2.2.1.5. Nastali fragmenti DNA provjereni su elektroforezom na 1 % agaroznom gelu (slika 3.3.).



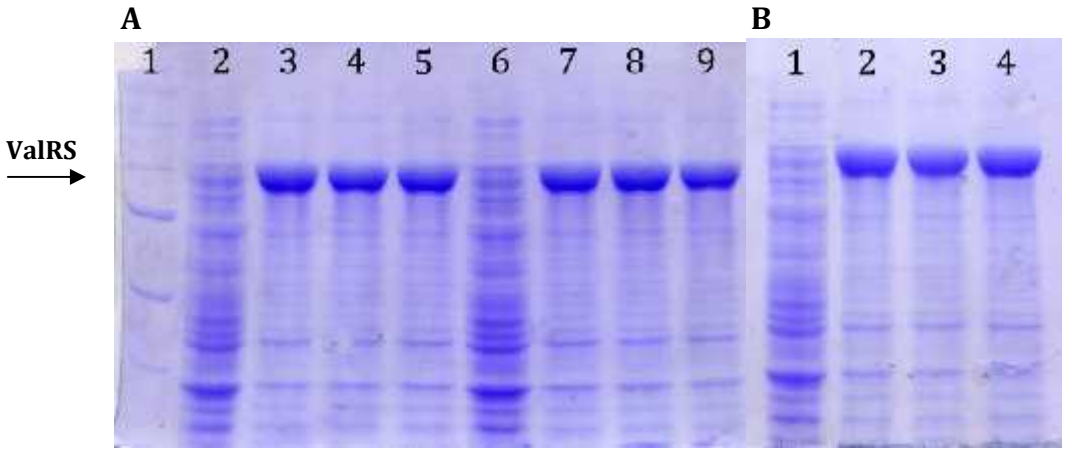
Slika 3.3. Restrikcijska analiza 4 odabrana plazmida. 1 - marker (λ DNA-*Hind*III), 2 - pET28b, 3 - pET28b razgrađen s *Nhe*I i *Eco*RI (vektor korišten u ligaciji), 4 – 9: dvostruke razgradnje s *Nhe*I i *Eco*RI (4: pET28b - kontrola uspješnosti razgradnje, 5-9: odabrani izolirani plazmidi), 10-15: razgradnje s *Bam*HI (10: pET28b - kontrola uspješnosti razgradnje, 11-15: 5 odabranih izoliranih plazmida).

Od pet plazmida podvrgnutih restrikcijskoj analizi, jedan plazmid razgrađen je na fragmente očekivane veličine (uzorak plazmida u liniji 7 i 13). U reakciji dvostruke razgradnje s *Nhe*I i *Eco*RI, očekivane veličine fragmenata u slučaju razgradnje rekombinantnog plazmida su 2,86 kb (veličina inserta) i 5,33 kb (ostatak vektora), a kod razgradnje s *Bam*HI očekuje se lineariziran rekombinantni vektor veličine 8,19 kb. Za konačnu 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 poglavlje 2.2.1.6.). Pritom su korištene početnice T7_F i T7_R (nukleotidni sljedovi prikazani su u tablici 2.2.).

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

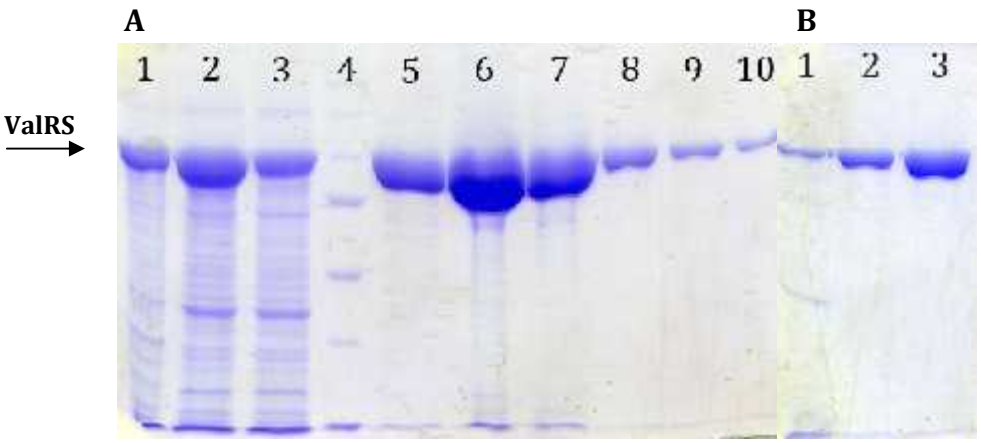
Kao što je opisano u prethodnom poglavlju, kako bi se postigla prekomjerna ekspresija, gen za ValRS ugrađen je u plazmidni vektor pET28b pod kontrolom T7 promotora. Rekombinantnim plazmidom transformirane su stanice *E. coli* soja BL21(DE3) (Novagen) gdje je T7-RNA-polimeraza integrirana u bakterijski genom pod kontrolom lac*UV5* promotora. Dodatkom IPTG-a, inducirana je ekspresija T7-RNA-polimeraze koja zatim prepisuje ciljni gen pod kontrolom T7 promotora.

Prije preparativnog pročišćavanja enzima ValRS, optimirana je njegova ekpresija. Testirani uvjeti obuhvaćali su koncentraciju IPTG-a korištenu u indukciji, vrijeme ekspresije te tri različita domaćina, 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 mmol dm^{-3} IPTG-om (3), indukcija s 0,5 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 mmol dm^{-3} IPTG-om (7), indukcija s 0,5 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 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 pročišćavanju afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozi prema protokolu opisanom u poglavlju 2.2.2.2. Frakcije prikupljene u pojedinim koracima pročišćavanja, analizirane su SDS-poliakrilamidnom elektroforezom (slika 3.5., postupak je opisan u poglavljima 2.2.2.3. i 2.2.2.4.)

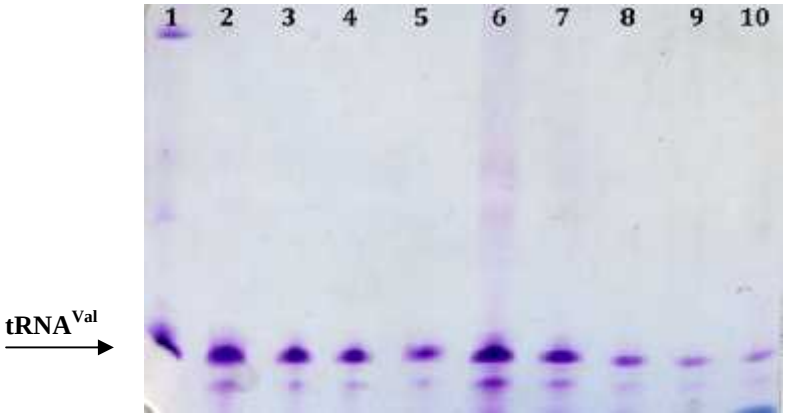


Slika 3.5. Provjera uspješnosti pročišćavanja proteina ValRS. A) 1 - provjera indukcije, 2 – proteinski ekstrakt nakon sonikacije (topiva citosolna frakcija), 3 – proteinski ekstrakt nakon vezanja za Ni-NTA kolonu, 4 – marker, 5 – 10: 1 ml frakcije skupljene prilikom eluiranja s imidazolom koncentracije 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 postići pročišćavanje proteina ValRS na Ni-NTA kromatografskoj koloni. Liza stanica sonikacijom također je bila efikasna, budući da je ValRS prisutan u citosolnoj frakciji u velikoj količini (linija 2, ValRS je označen na gelu strelicom). Specifične interakcije His-privjeska s Ni-NTA agarozom, omogućile su vezanje ValRS-a na kolonu i time uklanjanje ostalih proteina ispiranjem puferima s različitim 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 količina proteina ValRS, no budući 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. Čistom proteinu određena je koncentracija metodom po Bradfordu ili spektrofotometrijski (vidi poglavlje 2.2.2.6.). Iz taloga bakterijskih stanica dobivenog uzgojem u 0,25 l LB medija, pročišćeno je 5,2 mg ValRS proteina čistoće veće od 90 % (procjenjeno iz analize pročišćenog proteina na SDS-gelu).

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

Naručeni su sintetski geni za $tRNA^{Ile}_{GAT}$ i $tRNA^{Val}_{TAC}$ s odgovarajućim restrikcijskim mjestima koja omogućavaju kloniranje gena u pUC18 vektor za tranksripciju *in vitro*, te ΔpET3a vektor za transkripciju *in vivo* (nukleotidni slijed prikazan je u poglavlju 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 Dulić, dipl. ing. U ovom radu proizvedena je $tRNA^{Val}$ metodom transkripcije *in vitro* i pročišćena je na stupcu DEAE-celuloze prema kromatografskom postupku razvijenom u okviru izrade rada za Rektorovu nagradu (Cvetesic i Majsec 2008). DEAE-celuloza je anionski izmjenjivač koji se često koristi za pročišćavanje bioloških makromolekula. Vrlo je korisna za pročišćavanje nukleinskih kiselina koje kao nosioci negativnog naboja ostvaruju jače interakcije s DEAE-celulozom i eluiraju se visokom ionskom jakošću, dok većina proteina izađe s kolone u puferima niske ionske jakosti. Prije pročišćavanja $tRNA^{Val}$ 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 podvrgnuta 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} $MgCl_2$, 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 različite ionske 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 - nepročišćena transkripcijska smjesa, 2 – frakcija skupljena prilikom ispiranja s TXN puferom uz dodatak NaCl koncentracije 0,25 mol dm^{-3}, 3-10 – frakcije skupljene tijekom elucije s TXN puferom uz dodatak NaCl koncentracije 0,4 mol dm^{-3}.

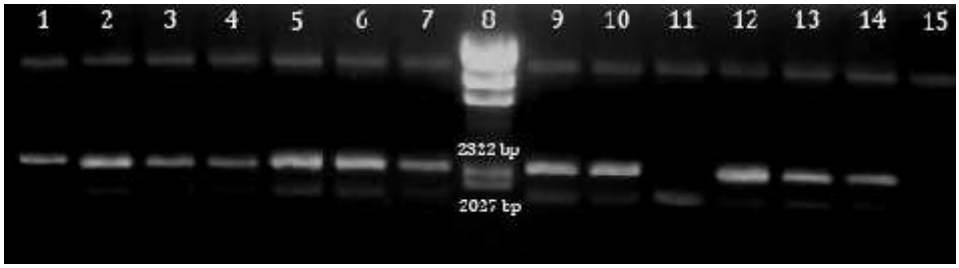
Spojene su eluirane frakcije najbogatije s $tRNA^{Val}$ (linije 3-7), dobiveni uzorak je istaložen standardnim postupkom, nakon čega je talog je otopljen i dijaliziran prema redestiliranoj vodi. Koncentracija pročišćenog $tRNA^{Val}$ transkripta određena je spektrofotometrijski (vidi poglavlje 2.2.3.5.). Transkript $tRNA^{Val}$ kinetički je okarakteriziran* – pokazana je normalna aktivnost u reakciji aminoaciliranja, no suprotno literaturnim 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 $tRNA^{Ile}_{GAT}$ najprije je pripremljen kao transkript T7-RNA-polimeraze *in vitro.* Potvrđeno† je da nemodificirani transkript nije aktivan 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 ΔpET3a vektor, sintetski geni razgrađeni su sa *Sal*I enzimom (budući da su oligonukleotidi naručeni sa *Eco*RI i *Bam*HI stršećim krajevima), a ΔpET3a vektor sa *Sal*I i

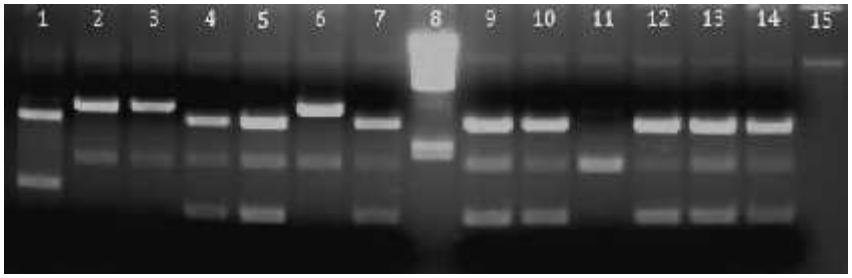
* Kinetičke pokuse s transkriptom $tRNA^{Val}$ napravila je doc. dr. sc. Ita Gruić-Sovulj.
† Kinetičke pokuse s transkriptom $tRNA^{Ile}$ napravila je Morana Dulić, dipl. ing.

*Bam*HI prema uputama proizvođača. Sastav ligacijskih smjesa opisan je u poglavlju 2.2.1.1. Budući da su ΔpET3a vektori nositelji gena za ekspresiju β-laktamaze, bakterije *E. coli* soja DH5α transformirane ligacijskom smjesom, nasađene su na selektivne podloge s ampicilinom. Nasumično je odabrano 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.



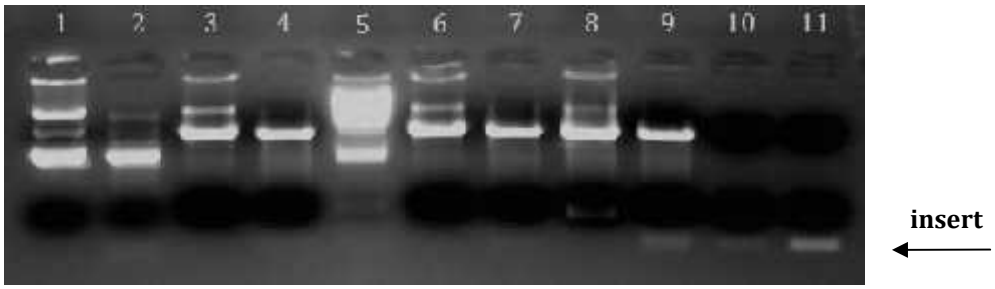
Slika 3.7. Elektroforeza plazmidne DNA izolirane metodom alkalne lize. 1 – prazan vektor ΔpET3a, 2-7 i 9-14 plazmidi izolirani iz bakterijskih kolonija naraslih na selektivnoj podlozi s ampicilinom, 8 - marker (λ DNA-*Hind*III), 15 –uzorak bez plazmidne DNA – negativna kontrola.

Iz slike 3.7 vidljiva je uspješna izolacija svih dvanaest plazmida. Jedanaest od dvanaest izoliranih plazmida, odgovara po veličini praznom ΔpET3a 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 očekivana 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 *Ava*I i *Bam*HI). 1 – razgrađen prazan ΔpET3a, 2-7 i 9-14 razgrađeni izolirani plazmidi, 8 - marker (λ DNA-*Hind*III), 15 – prazna linija (uzorak bez plazmidne DNA) – negativna kontrola.

Budući da je očekivana duljina fragmenata rekombinantnog plazmida razgrađenog 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 čišće preparacije, i podvrgnut daljnjoj restrikcijskoj analizi (slika 3.9.).



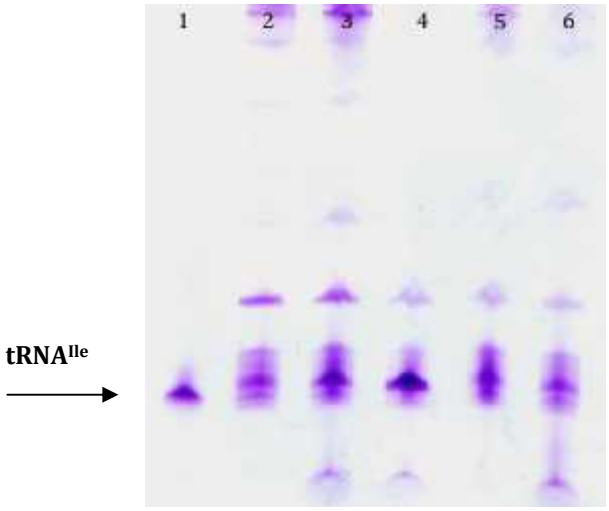
Slika 3.9. Restrikcijska analiza (razgradnja s *Bam*HI, *Sal*I ili oba enzima). 1 – nerazgrađen prazan ΔpET3a, 2 – nerazgrađen rekombinantni ΔpET3a, 3 i 4: ΔpET3a i rekombinantni ΔpET3a razgrađeni s *Bam*HI, 5 - marker (λ DNA-*Hind*III), 6 i 7: ΔpET3a i rekombinantni ΔpET3a razgrađeni sa *Sal*I, 8 i 9: ΔpET3a i rekombinantni ΔpET3a 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 izbačen 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 $\Delta pET3atRNA^{Ile}_{GAT}$ i $\Delta pET3atRNA^{Val}_{TAC}$ 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 indukcijskim 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 denaturirajućem poliakrilamidnom gelu s dodatkom ureje (poglavlje 2.2.3.3.). Prikazani su rezultati indukcije s IPTG-om konačne koncentracije 1 mmol dm^{-3}, budući da se rezultati indukcije IPTG-om koncentracije 1 ili 3 mmol dm^{-3} podudaraju.



Slika 3.10. Analiza ukupne tRNA s prekomjerno eksprimiranom $tRNA^{Ile}$ na denaturirajućem poliakrilamidnom gelu s urejom. 1 - $tRNA^{Ile}$ transkribirana *in vitro*, 2-4: ukupna tRNA izolirana iz stanica transformiranih ΔpET3a$tRNA^{Ile}_{GAT}$ 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 ΔpET3a 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 količine pojedinog uzorka (masa izoliranih nukleinskih kiselina) nanesene su u svaku liniju, stoga količine tRNA (označena strelicom na slici 3.10.) mogu nagovjestiti prisutnost prekomjerne ekspresije. Budući da je lako uočljiva razlika u količini 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 ΔpET3a vektora (linije 5 i 6) gdje pojačanje vrpce u usporedbi inducirane (linija 6) i neinducirane bakterijske kulture (linija 5) nije uočljivo. Ovakva analiza, iako potvrđuje transkripciju *in vivo*, ne ukazuje na funkcionalnost molekula tRNA u uzorku izolirane ukupne tRNA. S ciljem određivanja udjela biološki funkcionalnih molekula tRNA, uzorcima je određena akceptorska aktivnost (objašnjeno u poglavlju 2.2.3.9.). Dobivene akceptorske aktivnosti (tablica 3.1.) potvrdile su prekomjernu ekspresiju molekula $tRNA^{Ile}$ *in vivo*. Budući da je najveći prinos $tRNA^{Ile}$ dobiven nakon 15 sati ekspresije potaknute s IPTG-om

konačne koncentracije 1 mmol dm^{-3} pri 30 °C, isti indukcijski uvjeti korišteni su u preparativne svrhe.

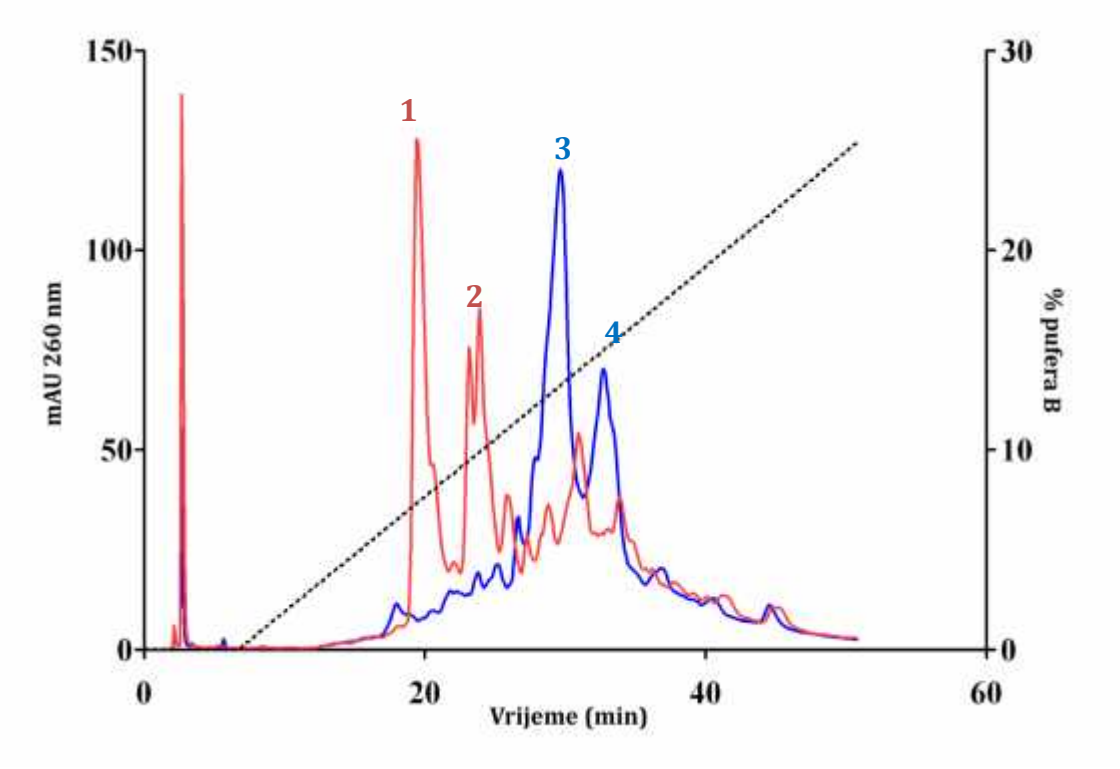
Tablica 3.1. Akceptorske aktivnosti za izoleucin.

	ΔpET3atRNA$^{Ile}_{GAT}$ - IPTG, 3 h	ΔpET3atRNA$^{Ile}_{GAT}$ + IPTG, 3 h	ΔpET3atRNA$^{Ile}_{GAT}$ + IPTG, 15 h	ΔpET3a - IPTG, 15 h	ΔpET3a + IPTG, 15 h
% aktivne tRNA	3,74	19,63	55,89	3,66	2,48

Prilikom izolacije ukupne tRNA u preparativnim količinama, uveden je korak taloženja nukleinskih kiselina velike molekulske mase pomoću PEG-a 8000 za dodatno pročišćavanje tRNA (vidi poglavlje 2.2.3.7.). Budući da je akceptorska aktivnost izolirane $tRNA^{Val}$ prekomjerno eksprimirane *in vivo* bila oko 85 %, nisu bila potrebna dodatna pročišćavanja za kinetičke pokuse. Međutim, akceptorska aktivnost $tRNA^{Ile}$ bila je u prosjeku manja od 60 %, zbog čega je razvijena metoda pročišćavanja 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 pročišćavanja prekomjerno eksprimirane $tRNA^{Ile}$ od ukupne tRNA kromatografijom obrnutih faza, uspoređeni su analitički kromatogrami uzorka ukupne tRNA te uzorka tRNA podvrgnutog preparativnom aminoaciliranju izoleucinom (vidi poglavlje 2.2.3.9.). Budući da se razdvajanje u kromatografiji obrnutih faza temelji na razlici u pokretljivosti molekula kroz kromatografsku kolonu uslijed hidrofobnih interakcija s punilom kolone, očekivana je promjena u pokretljivosti Ile-$tRNA^{Ile}$ u odnosu na $tRNA^{Ile}$ zbog djelovanja izoleucina kao hidrofobnog privjeska. Usporedbom preklopljenih kromatograma (slika 3.11.), utvrđeno je da vrhovi 1 i 2 odgovaraju $tRNA^{Ile}$ jer se nakon aminoaciliranja eluiraju pri većem udjelu etanola, što je i očekivano 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 sličnih površina upućuje 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).

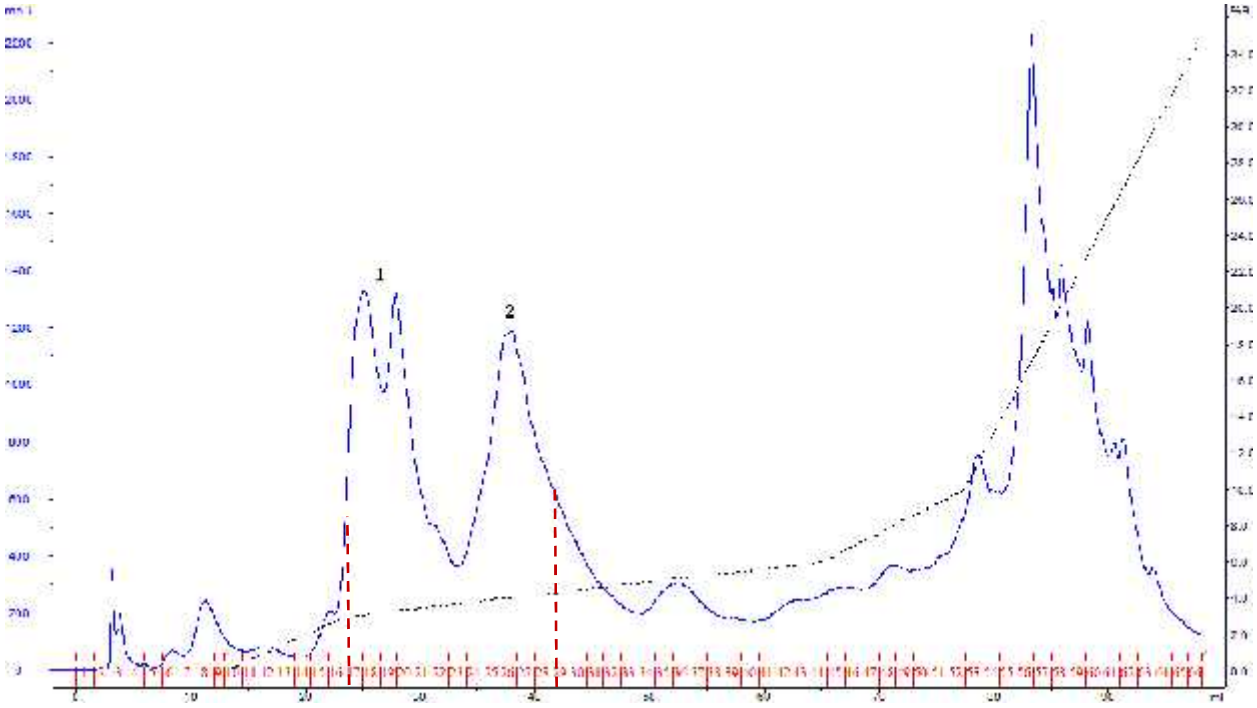
3.7. Preparativno pročišćavanje molekula tRNA^{Ile} kromatografijom obrnutih faza

Analitičkim kromatografijama utvrđeni su uvjeti izolacije tRNA^{Ile} iz ukupne tRNA, ali i razdvajanja dviju molekulskih vrsta tRNA^{Ile} kromatografijom obrnutih faza. Međutim, unatoč optimalnim uvjetima u analitičkim kromatografijama, prijelaz na preparativno pročišćavanje na kolonu većih dimenzija (semi-preparativna C4 kolona) nije izravan i posve jednostavan. Naime, bilo je potrebno testirati kapacitet kolone za vezanje tRNA, odnosno koliku količinu uzorka ukupne tRNA je moguće nanijeti te pri kojem optimalnom volumenu, a da se pritom zadrži razdvajanje postignuto u analitičkim kromatografijama. Isprobano je nanošenje 1 mg ukupne tRNA u volumenu od 50 ili 500 µl i utvrđeno je da su kromatografski vrhovi uži i razdvajanje bolje ukoliko se uzorak nanosi u što manjem volumenu. Nadalje, na kolonu su injektirane i veće količine ukupne tRNA (3-5 mg) i uočen je gubitak razlučivosti pri injektiranju količina većih od 3 mg. Također, 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 konačnici je

preparativno pročišćavanje $tRNA^{Ile}$ provedeno kromatografskim razdvajanjem 3 mg uzorka ukupne tRNA s prekomjerno eksprimiranom $tRNA^{Ile}$. 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 određena koristeći spektrofotometar NanoDrop 1000. U frakcijama kromatografskih vrhova 1 i 2 s dovoljno visokom koncentracijom tRNA (slika 3.12, označeno s crvenom iscrtkanom linijom), određena je akceptorska aktivnost za izoleucin koja odražava udio aktivne $tRNA^{Ile}$ (postupak određivanja akceptorske aktivnosti detaljno je opisan u poglavlju 2.2.3.9.; rezultati su opisani u idućem poglavlju).



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

vremena zadržavanja na C4 koloni (vrh 2). Iscrtkana 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 čistoće, 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 pročišćavanja $tRNA^{Ile}$ 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

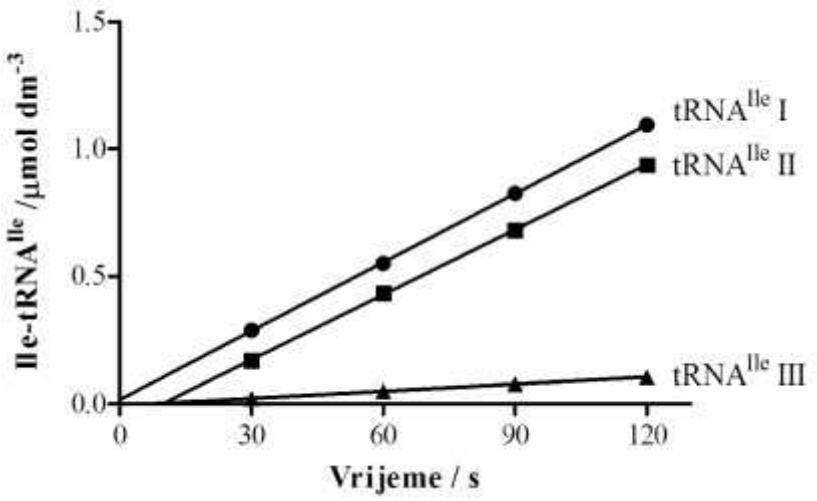
Uzorci $tRNA^{Ile}$ I-III kinetički su okarakterizirani – za svaki uzorak određena je konačna akceptorska aktivnost te koeficijent brzine aminoacilacije (k_{obs}, tablica 3.3.) pomoću standardne reakcije aminoaciliranja (detalji uvjeta reakcije opisani su u poglavlju 2.2.3.9.). U reakciji aminoaciliranja 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

μmol dm^{-3}, Zhou i Rosevear 1995), odnosno 2-4 K_m vrijednosti ukoliko se računa koncentracija aktivne tRNA u reakciji s obzirom na akceptorsku aktivnost.

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

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

Uočeno je da se u jednakim aminoacilacijskim uvjetima, uzorak $tRNA^{Ile}$ III (kromatografski vrh 2) čak 10 puta sporije aminoacilira (tablica 3.3., slika 3.13.) u odnosu na uzorke $tRNA^{Ile}$ 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 pročišćena $tRNA^{Ile}$ stimulira popravak pogreške kao što je to u literaturi poznato (Fersht 1977), odnosno da li je $tRNA^{Ile}$

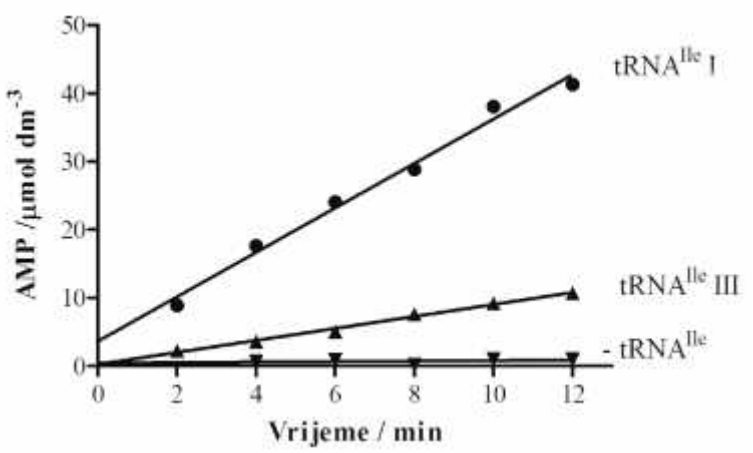
‡u standardnoj reakciji aminoaciliranja, korištena je 8 μmol dm^{-3} ukupna koncentracija uzorka $tRNA^{Ile}$

pripremljena *in vivo* i pročišćena metodama razvijenim u ovom radu, odgovarajući supstrat za detaljne kinetičke studije mehanizama popravaka pogreške. Budući da uzorci $tRNA^{Ile}$ I i II pokazuju jednaku aminoacilacijsku aktivnost (k_{obs} za $tRNA^{Ile}$ I iznosi 0,45 s^{-1}, a k_{obs} za $tRNA^{Ile}$ II iznosi 0,43 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 uzoraka $tRNA^{Ile}$ I i III u popravku pogreške.

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

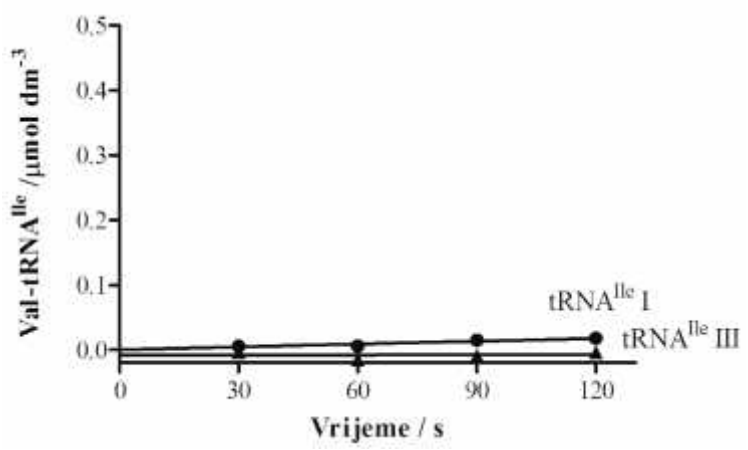
Dijagnostički test za popravak pogreške je gomilanje AMP-a koje se ne može objasniti kao posljedica aminoaciliranja, budući da koncentracija nastalog AMP-a uobičajeno značajno premašuje koncentraciju tRNA (vidi slika 3.14., uzorak $tRNA^{Ile}$ I).



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 s^{-1}, tablica 3.4.), u odnosu na k_{obs} za aminoaciliranje uzorka $tRNA^{Ile}$ III (0,045 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

[^{14}C]-valina koncentracije 100 μmol dm^{-3}, IleRS konačne koncentracije 1 μmol dm^{-3} i tRNA koncentracije 8 μmol 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 kinetička 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 s^{-1}; dok za modificiranu $tRNA^{Ile}_{GAT}$ proizvedenu *in vivo* iznosi 1,6 s^{-1} (Nureki i sur. 1994). Uzrok 500 puta slabijoj aktivnosti je nedostatak treonilkarbamoila na N-6 atomu nukleozida A_{37} pozicioniranog na 3'-kraju uz antikodon (modifikacija t^6A37, 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 aktivan i ne stimulira mehanizam popravka pogreške prije prijenosa, odnosno da je za kinetička istraživanja enzima IleRS nužna modificirana $tRNA^{Ile}$ proizvedena *in vivo*. Glavni problem kod takvog načina proizvodnje tRNA je njeno pročišćavanje iz staničnog ekstrakta, odnosno izdvajanje od ostalih staničnih molekula tRNA. Vrlo često kod prekomjerne ekspresije molekula tRNA *in vivo*, postižu se visoki stanični udjeli željene tRNA (oko 60 %), a dodatnim pročišćavanjem, primjerice ionskom izmjenom (Perona i sur. 1988) ili taloženjem nukleinskih kiselina velike molekulske mase pomoću PEG-a (postupak korišten u ovom diplomskom radu), dobivaju se akceptorske aktivnosti čak iznad 80 %, što je dovoljno dobro za rutinske kinetičke pokuse. Situacija je nešto drugačija kod prekomjerne ekspresije i pročišćavanja 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 mehanizama razgradnje (Alexandrov i sur. 2006). Pročišćavanje željene funkcionalne modificirane tRNA iz takvog staničnog ekstrakta znatno otežava prisutnost bliskih djelomično modificiranih molekulskih vrsta. Jedna od jednostavnijih i izravnijih metoda pročišćavanja funkcionalnih tRNA je afinitetna kromatografija pomoću prokariotskog elongacijskog faktora Tu (EF-Tu). Metoda se zasniva na razlici u konstantama disocijacije za ternarne komplekse EF-Tu·GTP·$tRNA^{aa}$ (>10^{-4} mol dm^{-3}) EF-Tu·GTP·aa-$tRNA^{aa}$ (10^{-10}-10^{-9} mol dm^{-3}, Ribeiro i sur. 1995). Postupak pročišćavanja 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 će 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 pročišćavanje 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 pročišćavanje aktivnih transkripata ovom metodom. Budući da je tada korišten transkript tRNA iz metanogene arheje (*Methanosarcina barkeri*), isti eksperimenti ponovljeni su s *E. coli* ukupnom tRNA obogaćenom s tRNA^{Ile} prekomjerno eksprimiranom *in vivo*, no vezanje također iz nije bilo uspješno te ovu metodu nismo mogli koristiti za pročišćavanje funkcionalnih tRNA^{Ile} proizvedenih *in vivo.* Druga metoda često korištena za pročišćavanje 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 jače hidrofobne interakcije usporavanju kretanje molekula duž kromatografske kolone. Vrlo često korištena strategija pri pročišćavanju tRNA je povećanje hidrofobnosti ciljne molekule tRNA, kako bi se značajnije izdvojila po pokretljivosti od ostatka tRNA. Dodatna hidrofobnost može se postići aminoaciliranjem pripadnom aminokiselinom, što je u slučaju tRNA^{Tyr} ili tRNA^{Trp} dovoljno za postizanje visoke čistoće u samo jednom koraku pročišćavanja zbog jakog hidrofobnog karaktera tirozina, odnosno triptofana. U slučaju ostalih tRNA, aminoacilirana tRNA često se derivatizira aromatskim reagensom zahvaljujući reaktivnosti α-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 s aromatskim reagensom je upravo modifikacija ključna za njenu aktivnost –t^6A_{37} (slika 1.6. B). Kako mehanizam kemijske modifikacije najčešće iskorištava nukleofilnost α-aminoskupine aminokiseline, slobodna karboksilna skupina treonina posttranskripcijski modificiranog nukleozida $t^6A_{37,}$ mogla bi poslužiti kao nukleofil umjesto α-aminoskupine. Takva kemijska modifikacija vjerojatno bi inaktivirala tRNA, budući da je upravo t^6A_{37} ključan za aktivnost. Zbog svega navedenog, u ovom radu optimirana je metoda

pročišćavanja $tRNA^{Ile}$ kromatografijom obrnutih faza bez uvođenja dodatnih kemijskih modifikacija. Prednost ovakve metode u odnosu na afinitetno pročišćavanje aminoacilirane ciljne tRNA, temelji se na mogućnosti razdvajanja molekulskih vrsta tRNA koje se razlikuju po broju posttranskripcijskih modifikacija, odnosno razdvajanje potpuno modificirane od hipomodificirane tRNA. Iz rezultata analitičkog 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 upućuje upravo na postojanje dvaju molekulskih vrsta $tRNA^{Ile}$ – u potpunosti posttranskripcijski modificirane te hipomodificirane $tRNA^{Ile}$, što nije neočekivano budući da količina prekomjerno eksprimirane tRNA zasigurno premašuje kapacitete enzimskog sustava odgovornog za posttranskripcijske modifikacije. Pročišćena $tRNA^{Ile}$ izdvojena je u tri uzorka - $tRNA^{Ile}$ I i II odgovaraju prvom kromatografskom vrhu, kraćeg vremena zadržavanja na koloni, a $tRNA^{Ile}$ III drugom kromatografskom vrhu koji se dulje zadržava na koloni i time odgovara hidrofobnijoj tRNA. Uzorcima je određena akceptorska aktivnost (vidi poglavlje 3.8., tablica 3.3.) koja odražava udio molekula tRNA koje je moguće aminoacilirati, zbog čega možemo pratiti stupanj pročišćenosti željene tRNA. U skladu s time, za uzorak $tRNA^{Ile}$ I moglo bi se reći da je najviše čistoće (94 %), dok uzorci II i III sadrže znatno više onečišćenja (redom 74 % i 57 %). Kako bi istražili da li aminoacilacijska aktivnost ovisi o prisutnosti posttranskripcijskih modifikacija, standardnim aminoacilacijskim testom utvrđeni su koeficijenti brzine aminoaciliranja uzoraka $tRNA^{Ile}$ 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 s^{-1}), dok se uzorak III čak deset puta sporije aminoacilira. Najlogičnije 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 čega razlika u aktivnosti uzorka $tRNA^{Ile}$ I i III možda bolje ističe utjecaj t^6A_{37} na aktivnost (Motorin i Helm 2010). Za detaljnu karakterizaciju dviju molekulskih vrsta $tRNA^{Ile}$ i utvrđivanje broja i tipa posttranskripcijskih modifikacija, biti će potrebne analize pojedinačnih nukleozida tRNA metodom spektrometrije mase.

Prilikom konstrukcije sintetskih gena za $tRNA^{Val}$, kao i za $tRNA^{Ile}$, uvedena su restrikcijska mjesta koja omogućavaju upotrebu oba sustava transkripcije – *in vitro* i *in vivo*. $tRNA^{Val}$ proizvedena je *in vitro* i pročišćena 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 zasićenja, podudarala se s publiciranim vrijednostima (1,7 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). Međutim, 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 slučaj 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, obuhvaća nastanak transkripta s izmijenjenim CCA krajem, odnosno pirimidinom na 3'-kraju. Međutim, iako je T7-RNA-polimerazi problematična sinteza homogenih 5'- i 3'- krajeva (Pleiss i sur. 1998), nije poznat slučaj u kojem ona sustavno ugrađuje pogrešni krajnji nukleotid i to neovisno o kalupu. Uobičajena pogreška T7-RNA-polimeraze je proizvodnja transkripata kraćih 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 čega nesavršenost metode transkripcije *in vitro* zasigurno nije uzrok nefunkcionalnosti $tRNA^{Val}$ u stimulaciji popravka pogreške. Usporedbom 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 $tRNA^{Val}$ djelomično narušena tercijarna struktura uslijed smanjene stabilnosti peteljki i oslabljenih interakcija D i T omči. Navedeni efekti bili su najizraženiji pri niskim koncentracijama magnezijevih iona. Budući da su dobili i značajno niži T_m za transkript u odnosu na tRNA proizvedenu *in vivo* pri svim testiranim koncentracijama magnezijevih iona, zaključili su da posttranskripcijske modifikacije značajno doprinose uređenju 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 aktivan transkript. Unatoč razvijenom sustavu za ekspresiju *in vivo*, sustav transkripcije molekula tRNA *in vitro* svakako ne treba odbaciti. Vrijednost funkcionalnog sustava za proizvodnju transkripata 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 domaćinu, bilo bi gotovo nemoguće.

5. ZAKLJUČAK

- Prekomjerna ekspresija tRNA *in vivo* pod kontrolom jakog T7 promotora, brz je i jeftin način za dobivanje velike količine biološki aktivne tRNA.
- U ovom radu, razvijena je brza, jeftina i efikasna metoda pročišćavanja prekomjerno eksprimirane $tRNA^{Ile}$ u jednom koraku. Kromatografijom obrnutih faza mogu se izolirati specifične tRNA u preparativnim količinama, bez potrebe za dodatnim kemijskim modifikacijama tRNA.
- Izoleucil-tRNA-sintetaza ne aminoacilira nemodificiranu $tRNA^{Ile}$ proizvedenu transkripcijom *in vitro*, no vrlo učinkovito aminoacilira posttranksripcijski modificiranu $tRNA^{Ile}$ proizvedenu prekomjernom ekspresijom *in vivo*. Navedeno potvrđuje 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 učinkovito 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 odgovarajući je supstrat za kinetička istraživanja.

6. LITERATURA

Agris P.F. (1996): The importance of being modified: roles of modified nucleosides and Mg^{2+} 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 (Ap_4N) 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 čiste tRNA iz transkripcijske smjese kromatografijom na ionskom izmjenjivaču 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.

Gruić-Sovulj I. (2007): Sinteza tRNA *in vitro*. U Ambriović Ristov, A. (ur): Metode u molekularnoj biologiji. Institut Ruđer Bošković, 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., Kisselev 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 tRNAVal 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 relatioships 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 seminarskom radnjom "Mehanizam konformacijske promjene proteina G prilikom prijenosa signala" pod mentorstvom doc. dr. sc. Ite Gruić-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. 23^{rd} 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 tečajevima

1. EMBO Practical Course: Protein Expression, Purification and Crystallisation (EMBL Hamburg, Njemačka 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 čiste tRNA iz transkripcijske smjese kromatografijom na ionskom-izmjenjivaču u jednom danu"
- 2006: Državna stipendija