

Regulatorna uloga tRNA u mehanizmu djelovanja T-box riboprekidača

Škulac, Melody

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:735057>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-05**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Kemijski odsjek

Melody Škulac

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

**Regulatorna uloga tRNA u mehanizmu
djelovanja *T-box* riboprekidača**

Regulatory function of tRNA in T-box riboswitch

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: prof. dr. sc. Ita Gruić-Sovulj

Zagreb, 2020.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

20. lipnja 2020.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

25. rujna 2020.

Mentor rada: prof. dr. sc. Ita Gruić-Sovulj

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	IV
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME	3
2.1. Struktura tRNA.....	3
2.2. Kanonska uloga tRNA	7
2.3. Nekanonske uloge tRNA.....	8
2.3.1. Uloga aminoacil-tRNA kao neribosomskih supstrata.....	9
2.3.2. Aminoacil-tRNA ovisno aminoaciliranje membranskih lipida.....	10
2.3.3. Uloga aminoacil-tRNA u biogenezi antibiotika	11
2.3.4. Transfer-RNA ovisna adicija aminokiselina na amino-kraj proteina.....	12
2.3.5. Uloga fragmenata tRNA u ekspresiji gena.....	13
2.3.6. Uloga fragmenata tRNA kao regulatora utišavanja gena	14
2.3.7. Transfer-RNA u regulaciji ekspresije gena.....	14
2.3.8. tRNA u regulaciji stanične smrti.....	15
2.4. Regulatorni mehanizam T-box riboprekidača.....	16
2.4.1. Identifikacija mehanizma T-box riboprekidača	17
2.4.2. Strukturna obilježja T-box vodeće RNA.....	18
2.4.4. tRNA kao efektor	21
2.4.5. In vitro ispitivanje dodatnih faktora	22
2.4.6. Utjecaj modifikacija tRNA na mehanizam T-box riboprekidača	23
2.4.7. Uloge različitih elemenata sekundarne strukture vodećeg slijeda RNA te utjecaj modifikacija T-box slijeda na mehanizam T-box riboprekidača	24
2.4.8. Mehanizam regulacije na razini inicijacije translacije.....	27
2.4.9. Prisutnost i raznolikost T-box riboprekidač mehanizama	28
2.4.10. Značaj i daljnja istraživanja.....	29
§ 3. ZAKLJUČAK	31
§ 4. LITERATURNI IZVORI.....	32
§ 5. POPIS SLIKA	35

§ Sažetak

Regulacija ekspresije gena mehanizmom *T-box* riboprekidača temelji se na vezanju odgovarajuće neaminoacilirane tRNA na vodeću RNA. Vezanjem dolazi do promjene strukture vodeće RNA. Kontrola se najčešće odvija na razini utišavanja transkripcije iako postoje i primjeri regulacije na razini inicijacije translacije. Najčešći geni regulirani ovim mehanizmom poticanja ekspresije nizvodnog kodirajućeg slijeda su geni za aminoacil-tRNA-sintetaze i geni uključeni u biosintezu aminokiselina te njihov unos/iznos iz stanice. Dva ključna mjesta interakcije čine specifična petlja vodeće RNA u kojoj se nalazi kodon koji interagira s antikodonom molekule tRNA te četiri nukleotida koji su dio antiterminatorskog slijeda koji se vežu za akceptorski kraj tRNA. Obje interakcije trebaju biti ostvarene kako bi došlo do formacije strukture antiterminatora i poticanja ekspresije nizvodnog kodirajućeg slijeda. Mehanizam ovisi i o nizu drugih interakcija za koje je potrebna očuvanost dijelova strukture vodeće RNA i odgovarajuće tRNA. *T-box* riboprekidač posebno je prisutan kod Gram-pozitivnih bakterija što daje mogućnost selektivnog djelovanja na jednu skupinu organizama. Istraživanje mehanizma dovelo je otkrivanja njegovog potencijala za proučavanja mogućnosti manipulacije ekspresije gena i razvoj lijekova koji će utjecati specifično na jednu skupinu bakterija te minimalizirati utjecaj na organizam domaćina ili organizme u okolini.

§ 1. UVOD

Regulacija ekspresije gena ima ključnu ulogu u oblikovanju sastava, strukture i funkcije stanice te makroskopski gledano organizma kao cjeline i njegovih bioloških svojstava. Načini kontrole razlikuju se unutar različitih domena živih organizama te postoje brojni mehanizmi ovisni o specifičnim signalnim molekulama koje su određene vrste razvile kao regulatorne alate. RNA (eng. *ribonucleic acid*) je primjer jedne od takvih molekula koja osim kanonske kodirajuće funkcije ima bitnu ulogu kao nekodirajuća u procesima transkripcije i translacije te može biti dio mRNA koja kodira gen koji se regulira (cis djelujuća) ili kao zasebna molekula koja interagira s kodirajućom mRNA (trans djelujuća).⁶ Riboprekidač (eng. *riboswitch*) je dvolančani segment molekule RNA i predstavlja cis mehanizam regulacije ekspresije gena, a identificiran je kod bakterija, arheja, gljiva i biljaka.⁹ Djeluje na razini utišavanja transkripcije ili inicijacije translacije tako što odgovara na fiziološki signal čime dolazi do promjene u strukturi mRNA što u konačnici rezultira promjenom u sintezi proteina kodiranih prikladnom mRNA. Elementi sustava riboprekidača reagiraju na stupanj aminoaciliranosti molekula tRNA, temperaturu ili pH vrijednost okoline, a signalizacijske molekule ovih sustava su najčešće metaboliti koji su konačni produkti ili međuprodukti nekog biosintetskog puta.⁶ Poseban razred čini T-struktura riboprekidača (eng. *T-box riboswitch*) mehanizam koji se temelji na selektivnom prepoznavanju aminoaciliranih ili neaminoaciliranih molekula tRNA i s obzirom na to regulira ekspresiju gena kodiranih pripadajućom mRNA. Regulacija se postiže ili utišavanjem transkripcije putem stvaranja terminatora (strukture RNA koja onemogućava transkripciju) ili utišavanjem translacije. Dok su translacijski riboprekidači reverzibilni jer regulatorna molekula može interagirati s riboprekidačem više puta tijekom postojanja transkripta i tako mijenjati njegovu strukturu i mogućnost translacije, regulacija transkripcije može se smatrati ireverzibilnom jer signalna molekula regulira nastajanje samog transkripta.^{6,7}

Značaj mehanizma *T-box* riboprekidača proizlazi iz njegove specifičnosti djelovanja i činjenice da nije pronađen u životinjskim stanicama što omogućuje selektivno djelovanje na one organizme koje posjeduju ovaj mehanizam kao što su bakterije. Jedinstvena obilježja regulacije ekspresije gena interakcijom tRNA i *T-box* riboprekidača otvaraju prostor za istraživanje

mogućnosti manipulacije ekspresije gena i otkrivanje novih antibakterijski aktivnih tvari koje će u što manjem omjeru utjecati na stanice organizma domaćina. Također, važno je napomenuti da je otkrivanje i poznavanje načina funkcije svakog mehanizma, pa tako i ovoga, izrazito važno za razumijevanje cjelokupnog živog svijeta i mogućnosti koje nam takva znanja pružaju u smislu znanstvenog razvoja u različitim područjima. Uzimajući u obzir potencijal mehanizma *T-box* riboprekidača u području biokemije, medicine i farmacije, cilj ovog rada je detaljno opisati ulogu tRNA i mehanizam djelovanja kao temelj iz kojeg proizlazi značaj ovakve regulacije, prikazati mogućnosti specifičnog ciljanja mehanizma u razvoju tvari s antimikrobijskim djelovanjem te kako bi se istaknula područja u mehanizmu *T-box* prekidača koja su neobjašnjena i trebaju daljnje istraživanje.

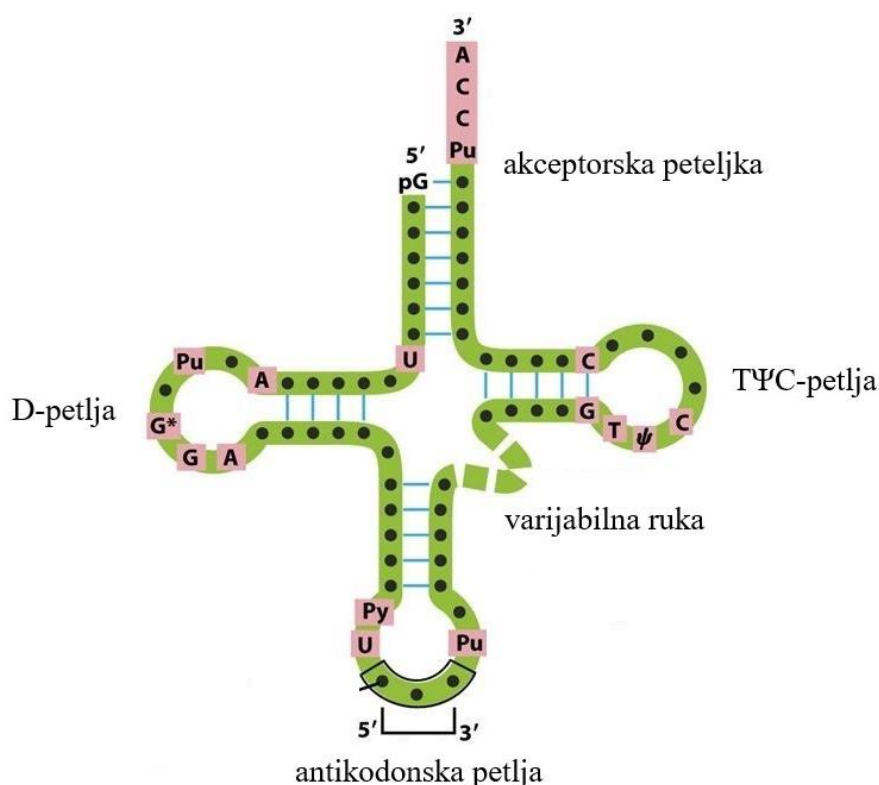
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Struktura tRNA

RNA, odnosno ribonukleinska kiselina je jednolančana molekula izgrađena od nukleotida koji se sastoje od purinskih i pirimidinskih dušičnih baza (gvanina, adenina, citozina, i uracila), riboze i fosfata te su međusobno povezani u lanac fosfodieterskom vezom koje nastaju između 3'-hidroksilne skupine nukletioda rastućeg lanca i 5'- α -fosfatne skupine nadolazećeg nukleotida. Sintezu ribonukleinske kiseline kataliziraju enzimi RNA-polimeraze i reakcija je praćena izlaskom molekula pirofosfata. Prva nukleinska kiselina kojoj je određen cjelokupni nukleotidna slijed, odnosno primarna struktura je molekula alaninske tRNA kvasca, a sekvencirao ju je R.W. Holley (1965.).¹ Broj nukleotida u sastavu bakterijske i eukariotske citoplazmatske tRNA kreće se od 73 do 93 dok su mitohondrijske i kloroplastidne nešto manje. Obično molekule tRNA imaju osam ili više modificiranih nukleotida kao što su metilirani nukleotidi, dihidrouridin, pseudouridin i ribotimidin koji nastaju post-transkripcijskom dorodom. Karakteristično je da se na 5' kraju nalazi gvanilat (pG), a na 3' kraju trinukleotidna sekvenca CCA te se konvencionalno numerira od 5' kraja prema 3' kraju.²

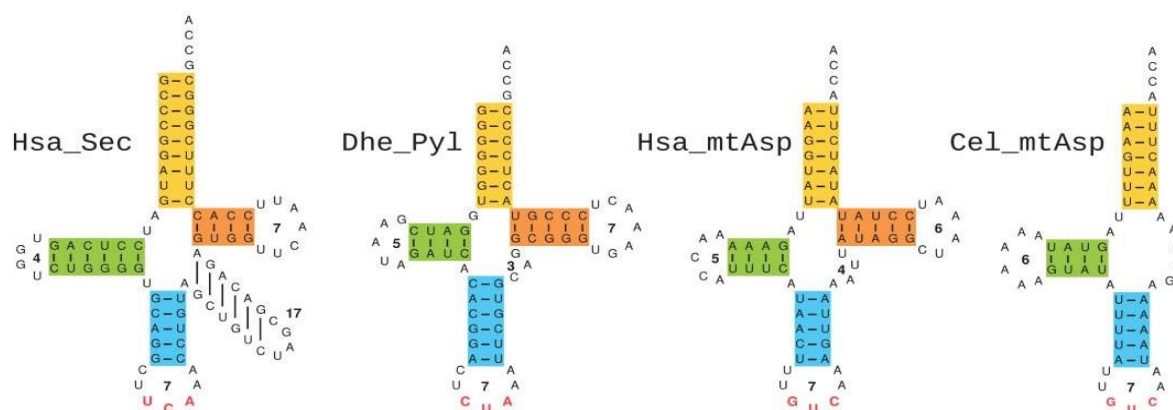
Sekundarna struktura molekula tRNA ima karakteristični oblik "djeteline" (eng. *cloverleaf*) koji je posljedica stvaranja vodikovih veza između pojedinih parova baza koje čine Watson-Crick-ovi parovi, ali ponekad i ne-Watson-Crick-ovi parovi baza. Sekundarna struktura sastoji se od akceptorske peteljke, T Ψ C-petlje, antikodonske petlje, D-petlje i varijabilne ruke (Slika 1.). Akceptorska ruka ima ključnu funkciju u prijenosu aminokiselina jer se na njezinom 3' kraju nalazi adenzin čija 2' ili 3' hidroksilna skupina riboze stvara estersku vezu s karboksilnom skupinom odgovarajuće aminokiseline te rezultira nastankom aminoacilirane tRNA. Spomenuti adenzin je dio tripletnog slijeda CCA koji se nalazi na 3' kraju i koji zajedno sa 5' krajem (pG), diskriminatorskom bazom koja prethodi tripletu CCA i još 7 parova baza čini strukturu akceptorske peteljke. T Ψ C-ruka specifična je po tome što unutar strukture sadrži ribotimidin koji inače nije prisutan u RNA i pseudouridin koji ima ugljik-ugljik vezu između uracila i riboze. Petljku ove ruke najčešće čini 5 parova baza od kojih je jedan par G-C visoko očuvan.

Antikodonska ruka sadži 5 parova baza i 7 nesparenih baza koje čine omču. Središnji triplet omče je antikodonski slijed dok se u smjeru 5' nalaze uridin i pirimidinski nukleotid, a u 3' smjeru purinski nukleotid. D-ruku čini 3-4 para baza na koje se nastavlja omča duljine do 7 nukleotida, a u sastav omče ulaze modificirani nukleotidi dihidrouridina čiji položaji nisu strogo određeni. Također ova ruka sadži očuvane adeninske, purinske, gvaninske i gvaninske modificirane nukleotide. Varijabilna ruka nije tipična za sve tRNA, prisutna je najčešće kod dužih molekula i može sadržavati do 21 nukleotid koji mogu biti spareni ili ne spareni.¹⁰



Slika 1. Općenita sekundarna struktura tRNA molekula. Crne točke predstavljaju neodređene nukleotide, nukleotidi označeni ružičastim kvadratima su karakteristični za sve tRNA, a plave linije predstavljaju parove baza. Preuzeto i prilagođeno iz: Cox M., Nelson D.L.: Lehninger Principles of Biochemistry 5th Edition. W. H. Freeman & Company, 2008. (str. 1092)

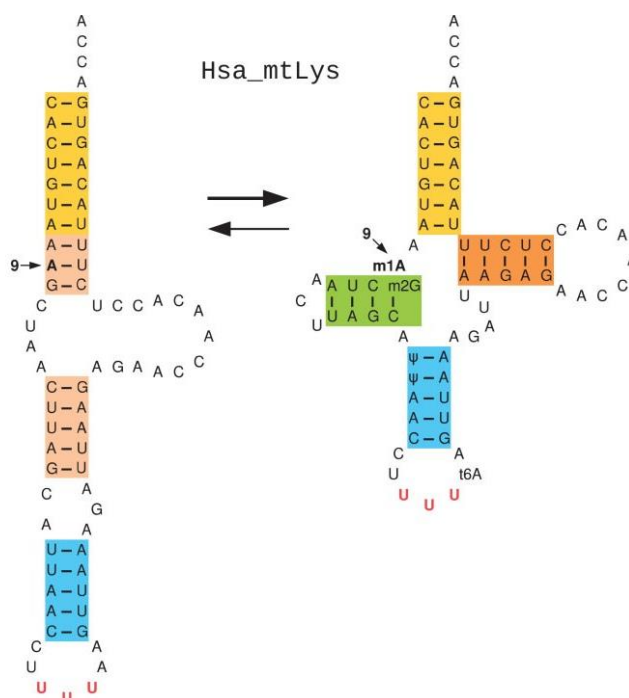
Unatoč visokoj očuvanosti sekundarne strukture pronađene su citosolne tRNA s atipčnom strukturom koja odstupa od kanonske strukture djeteline. Primjerice *Hsa* tRNA^{Sec} odstupa od tipične strukture budući da ima 9 parova baza u akceptorskoj peteljci umjesto 7, D-peteljku s 6 parova baza umjesto 4 i T-peteljku s 4 para baza umjesto 5. (Slika 2.)



Slika 2. Primjeri sekundarnih struktura tRNA koje odstupaju od kanonske strukture djeteline.

Preuzeto i prilagođeno iz: Giege R., Juhling F., Putz J., Stadler P., Sauter C., Florentz C., Structure of transfer RNAs: similarity and variability, *Wiley Interdiscip Rev RNA* **3** (2012) 37-61.

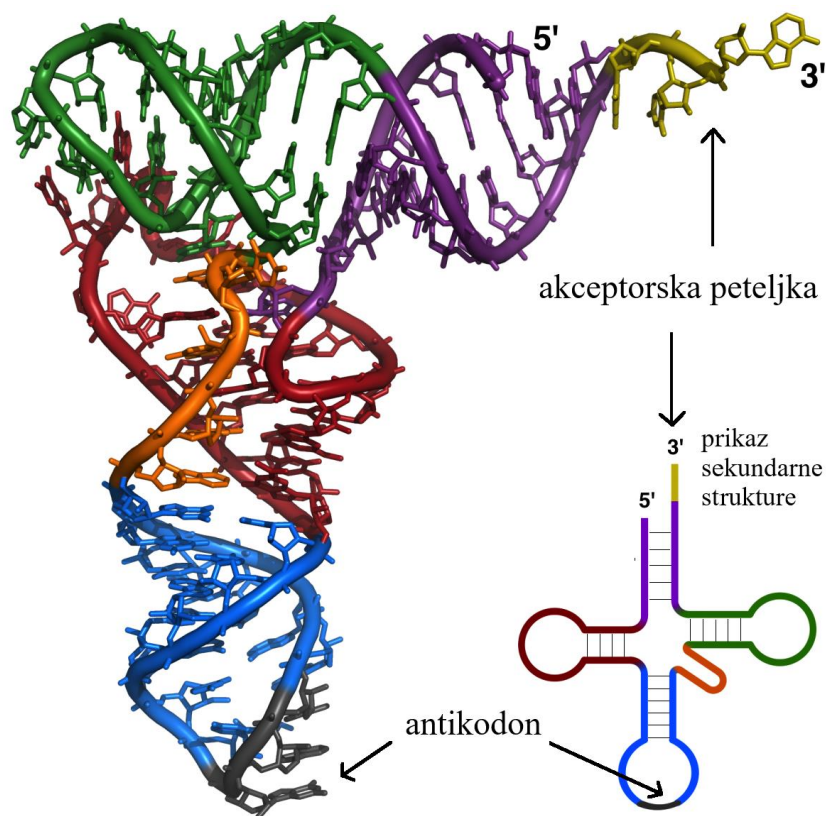
Nadalje, neke tRNA primarno imaju strukturu koja ne odgovara kanonskoj, ali posttranskripcijskim modifikacijama poprimaju karakterističnu strukturu djeteline. Primjer ovakve kontrole smatanja pronađen je kod mt-tRNA^{Lys} vrste *Homo sapiens* (*Hsa*) gdje metiliranje A₉ u m¹A₉ uzrokuje smatanje molekule iz strukture produžene ukosnice (eng. *extended hairpin*) u strukturu djeteline. Pomak u ravnoteži posljedica je spomenute metilacije koja sprječava Watson-Crickovo sparivanje A₉ s U₆₄. Ovakva preraspodjela u strukturi identificirana je i kod *Hsa* mt-tRNA^{Lys} dobivene prekomjernom ekspresijom u *E. coli*.³ (Slika 3.)



Slika 3. Promjena sekundarne strukture *Hsa* mt-tRNA^{Lys} uvjetovana metilacijom adeninskog nukletida. Preuzeto iz: Giege R., Juhling F., Putz J., Stadler P., Sauter C., Florentz C., Structure of transfer RNAs: similarity and variability, *Wiley Interdiscip Rev RNA* **3** (2012) 37-61.

Trodimenzionalna struktura tRNA oblika obrnutog slova L predložena je na temelju rezultata dobivenih difrakcijom rendgenskog zračenje pri malim kutovima (SAXS, eng. *small-angle x-ray scattering*) i prije nego je sekvencirana prva tRNA. Tercijarna struktura ključna je za funkciju tRNA koja zahtjeva dualna strukturalna svojstva, odnosno globalnu homogenost za ostvarivanje interakcije s ribosomom i heterogenost za specifičnu interakciju s aminoacil-tRNA sintetazom.² Na prikazu Slike 4. mogu se identificirati osnovne sastavnice strukture molekule tRNA, na donjem kraju nalazi se antikodonska ruka (plavo) s antikodonskom sekvencom (sivo) koja prepoznaje kodon na mRNA. Na donjem dijelu 'zgloba' nalazi se D-petlja (crveno), a na gornjem TΨC-petlja (zeleno) dok se akceptorska petlja (ljubičasto) s CCA slijedom na koji se veže aminokiselina (žuto) nalazi na gornjem kraju.

Prostorni L-oblik je očuvan i prisutan kod većine tRNA, ali postoje značajne razlike u veličini kuta koji zatvaraju dvije grane i u detaljima unutar strukture. Također, oblik se mijenja s obzirom na reakcije u kojima tRNA sudjeluje i s obzirom na interakcije koje ostvaruje s molekulama u svojoj okolini.

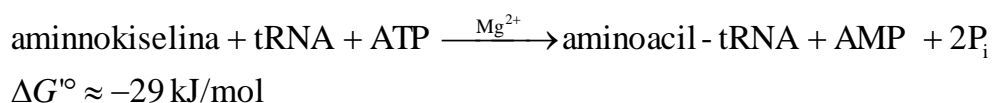


Slika 4. Tercijarna struktura tRNA (oblik obrnutnog slova L). Preuzeto i prilagođeno iz: <https://www.khanacademy.org/science/biology/gene-expression-central-dogma/translation-polypeptides/a/trna-and-ribosomes>(28.01.2020.)

2.2. Kanonska uloga tRNA

Sinteza proteina temeljni je proces u razvoju svakog živog organizma. Ovaj proces slijedi nakon replikacije DNA te transkripcije replicirane DNA u mRNA nakon čega se odvija translacija, odnosno prevođenje genetskog koda zapisanog u mRNA u obliku niza tripleta nukleotida (kodona) u slijed aminokiselina koje izgrađuju proteine. Molekula koja sudjeluje kao glavni posrednik između genetskog zapisa i sintetskih građevnih jedinica (aminokiselina) je tRNA koja ima ulogu adaptera (F. Crick) u dekodiranju tripletnog kodona u mRNA i aktivira odgovarajuću aminokiselinu koja će formirati peptidnu vezu s posljednjom aminokiselinom u rastućem polipeptidnom lancu. Tijekom početne faze translacije enzimi aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) kataliziraju reakciju esterifikacije aminokiseline s njoj odgovarajućom tRNA čime nastaje aminoacil-tRNA. Reakcija se odvija u dva koraka, u prvom nastaje aminoacil-AMP i izlazi pirofosfat, a u drugom dolazi do nastajanje esterske veze između aminokiseline i

tRNA uz izlazak AMP-a. Nastali pirofosfat hidrolizira i time osigurava ireverzibilnost reakcije, ukupna jednadžba ove reakcije je:



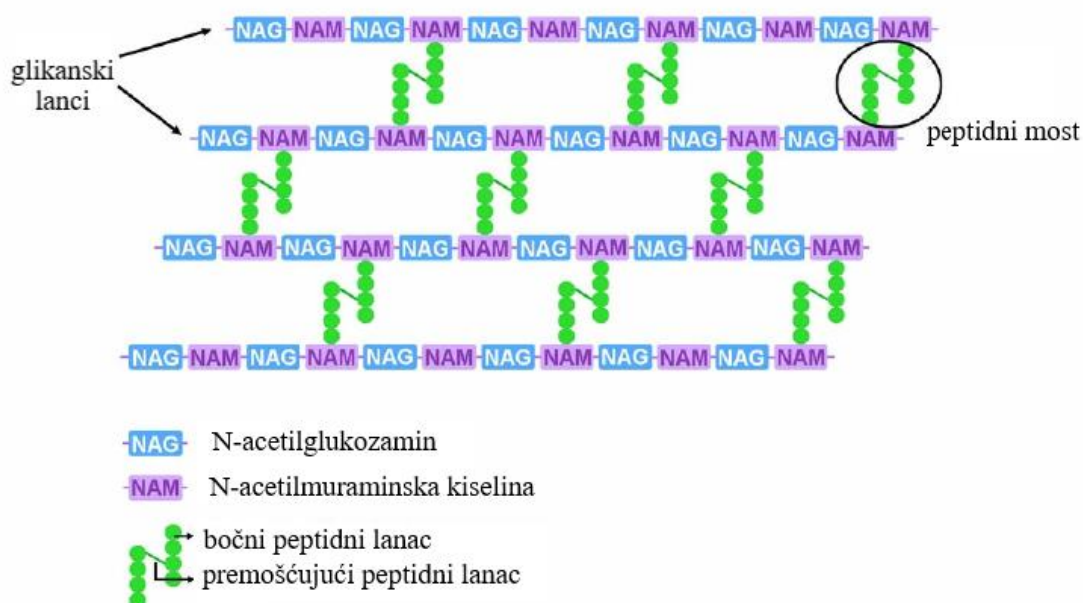
Tijekom sinteze aminoacil-tRNA može doći do vezanja pogrešne aminokiseline na tRNA što u konačnici rezultira ugradnjom pogrešne aminokiseline u rastući polipeptidni lanac tijekom translacije i nastankom mistranslatiranog proteina. Ovaj korak je bitan za točnost translacije budući da u drugim koracima mehanizmi popravka nisu učinkoviti za popravak pogreške vezanja strukturno sličnih aminokiselina kao što su valin i izoleucin. Pojedine aminoacil-tRNA-sintetaze posjeduju razvijene mehanizme popravka pogrešno vezane aminokiseline na tRNA i dodatne domene s aktivnim mjestima za hidrolizu pogrešno aminoacilirane tRNA. Nakon toga aminoacilirana tRNA sudjeluje u translaciji prepoznavajući komplementarni kodon na mRNA i vezajući se u A aktivno mjesto u maloj podjedinici ribosoma u kompleksu s elongacijskim faktorom EF-Tu koji štiti vezanu aminokiselinu i labilnu estersku vezu od spontane hidrolize. Ispravno prepoznavanje kodona i antikodona potiče GTP-aznu aktivnost EF-Tu te se aminoacil-tRNA otpušta u mjesto A. Peptidil-transferazna aktivnost velike podjedinice ribosoma katalizira sintezu peptidne veze između aminokiseline vezane za tRNA i zadnje aminokiseline rastućeg polipeptidnog lanca koji se nalazi u P-mjestu. Elongacijski faktor EF-G omogućuje translokaciju peptidil-tRNA i pomjeranje kalupa mRNA za jedan triplet uz hidrolizu GTP-a. Terminacija translacije temelji se na prepoznavanju STOP-kodona (UAA, UAG i UGA), a funkciju detektora imaju faktori otpuštanja (RF) koji potiču hidrolizu esterske veze peptidil-tRNA u P-mjestu velike podjedinice te konačno otpuštanje polipeptida.² Sudjelovanje u sintezi proteina glavna je uloga tRNA u živim organizmima, ali tRNA sudjeluje i u brojnim drugim metaboličkim i staničnim procesima.

2.3. Nekanonske uloge tRNA

Molekule tRNA imaju širok funkcionalni spektar u neaminoaciliranom i aminoaciliranom obliku te kao fragmenti tRNA koji su se prvobitno smatrali nefunkcionalnim međuproduktima degradacije. U nastavku su obrađene najvažnije nekanonske funkcije tRNA.

2.3.1. Uloga aminoacil-tRNA kao neribosomskih supstrata

Prvi nekanonski proces u kojem sudjeluju aminoacil-tRNA je izgradnja peptidoglikanskih mostova. Peptidoglikani su polimeri naizmjenično vezanih $\beta(1-4)$ *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) i *N*-acetilmuraminske kiseline (MurNAc) s peptidnim mostovima koji povezuju slojeve. Peptidi su vezani na svaku laktatnu skupinu MurNAc i najčešće se sastoje od pet aminokiselina sa slijedom L-Ala- γ -D-Glu-X-D-Ala-D-Ala, a s peptidom iz paralelnog lanca povezuju se direktno ili kratkim peptidima vezanim na X poziciji jednog pentapeptida i L-Ala na 4. poziciji drugog pentapeptida. Aminokiseline koje čine spojnice između dvije grane peptida najčešće potječu od aminoaciliranih tRNA donorskih molekula, a proces prijenosa i stvaranja peptidne veze kataliziraju tRNA-ovisne aminoacil-ligaze. Način na koji se aminoacil-tRNA iz procesa sinteze proteina odvajaju i postaju supstrati ovih enzima zasada je nepoznat, ali postoje hipotetski mehanizmi koji imaju čvrstu teorijsku podlogu no nisu još dokazani. Kod bakterijske vrste *Staphylococcus aureus* mehanizam se objašnjava saznanjima dobivenim istraživanjem identitetnih elemenata u sekvencama tRNA^{Gly}. Tri od pet tRNA^{Gly} izoakceptora kodiranih u genomu imaju identitetne elemente u sekvenci koje su povezane sa slabim vezanjem EF-Tu, odnosno ti specifični elementi uključuju zamjenu određenih parova baza u T-petlji koji su odgovorni za snažno vezanje s EF-Tu. Zbog slabijeg vezanja s ključnim elongacijskim faktorom tri neprotinogena izoakceptora ne sudjeluju učestalo u translaciji te mogu omogućiti zalihe Gly-tRNA^{Gly} i za translaciju i za izgradnju peptidoglikanskih mostova.⁴



Slika 5. Peptidoglikan. Preuzeto i prilagođeno iz: Maliničova, L., Piknova, M., Pristaš, P., Javorský, P.: Peptidoglycan hydrolases as novel tool for anti-enterococcal therapy, Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, 2010. (464).

2.3.2. Aminoacil-tRNA ovisno aminoaciliranje membranskih lipida

Proces aminoaciliranja membranskih lipida u bakterijama važan je za istraživanje otpornosti bakterija na djelovanje kationskih antimikrobnih peptida (CAMPs, eng. *cationic antimicrobial peptides*). Djelovanje CAMP-ova temelji se na njihovim kationskim svojstvima zbog kojih posjeduju veliki afinitet prema negativno nabijenim bakterijskim lipidima poput fosfatidilglicerola (PG) i kardiolipina (CL). Veliki broj bakterijskih vrsta razvija CAMP-rezistenciju pomoću proteina MprF (eng. *multiple peptide resistance factor*), enzima koji aminoaciliraju anionske fosfolipide najčešće L-lizinom ili L-alaninom čime se površina membrane nabija pozitivno i smanjuju afinitet CAMP-a za vezanje. Aminokiseline lizin i alanin potječu od aminoacil-tRNA. MprF proteini su integralni membranski proteini koji imaju hidrofilnu, citoplazmatsku domenu na C-kraju koja je odgovorna za prijenos aminokiselina na fosfatidilglicerol i hidrofobnu transmembransku domenu na N-kraju koja prebacuje novosintetizirani lizin-fosfatidilglicerol na vanjsku stranu membrane. MprF se mogu klasificirati kao aminoacil-fosfatidilglicerol-sintetaze budući da različiti homolozi proteina

imaju različitu specifičnost za aminoacil-tRNA koju koriste. MprF iz bakterije *S. aureus* sintetizira samo Lys-PG, a iz *P. aeruginosa* Arg-PG dok navedeni enzim iz *Enterococcus faecium* ima manju specifičnost i sintetizira Lys-PG i Arg-PG. Također, postoji razlika i u odabiru akceptora pa tako *Listeria monocytogenes* proizvodi i Lys-PG i Lys-CL. Kao i u procesu izgrađivanja peptidoglikanskih mostova iz prehodnog naslova, točan mehanizam odvajanja aminoacil-tRNA od translacije i usmjeravanje prema membranskim lipidima nije poznat. Istraživanje dijelova tRNA koji prepoznaju MprF i EF-Tu mogla bi pružiti objašnjenje kako se aminoacil-tRNA raspoređuju između procesa sinteze proteina i aminoaciliranja membranskih lipida. Rezultati dobiveni usporedbom K_D vrijednosti kompleksa Lys-tRNA i EF-Tu s vrijednostima za kompleks Lys-tRNA i MprF ukazuju na sličan afinitet EF-Tu i MprF za tRNA pri fiziološkim uvjetima. Kako bi se objasnio mehanizam odvajanja aminoacil-tRNA od translacije potrebno je identificirati i istražiti faktore koji bi mogli utjecati na usmjeravanje aminoacil-tRNA prema procesu aminoaciliranja membranskih lipida.

2.3.3. Uloga aminoacil-tRNA u biogenezi antibiotika

Proteinogene aminokiseline sudjeluju u biosintezi antibiotskih kemijskih spojeva, ali tijekom tog procesa aminokiseline podilaze brojnim promjenama do bitno različitog krajnjeg produkta. Aminoacil-tRNA ima ulogu donora aminokiseline u biogenezi nekih antibiotika. Valanimicin, pacidamicin i ciklodipeptidi su neke od vrsta u čijoj sintezi sudjeluju aminoacil-tRNA. Primjerice valanimicin nastaje od L-Val i L-Ser, a međuprodukt reakcije je izobutilhidroksilamin. Enzimi VlmD, VlmH i VlmR kataliziraju pretvorbu valina u izobutilhidroksilamin, VlmL seril-tRNA-sintetaza reakciju stvaranja L-seril-tRNA, a VlmA katalizira prijenos L-serina s L-seril-tRNA na izobutilhidroksilamin čime nastaje O-(L-seril)-izobutilhidroksilamin. Enzimi VlmJ i VlmK kataliziraju posljednji korak u sintezi: fosforilaciju i dehidrataciju valanimicin hidrata u valanimicin. Način odvajanja Ser-tRNA^{Ser} od procesa translacije nije poznat ni u ovo slučaju, također nisu poznati identifikacijski elementi tRNA^{Ser} koje prepoznaju VlmA i VlmL.⁴

2.3.4. *Transfer-RNA ovisna adicija aminokiselina na amino-kraj proteina*

Aminoacil-tRNA sudjeluju u dodavanju aminokiselina na krajeve proteina te su vrlo bitne u ovom procesu budući da prisutnost određene aminokiseline na N-kraju proteina određuje hoće li protein biti razgrađen. Razlikuju se dva tipa destabilizirajućih aminokiselina: sekundarne (pro-N-degroni) i primarne (N-degroni). Podjela se temelji na tome je li određena aminokiselina krajnji signalni element za razgradnju (primarne) ili je element koji prethodno usmjerava vezanje posljednje aminokiseline koja će biti primarna (sekundarne). Specifičan odabir proteina koji će biti označeni za degradaciju temelji se na prepoznavanju sekundarnih destabilizirajućih aminokiselina, a enzimi koji kataliziraju prijenos i identificiraju signalne elemente su aminoacil-tRNA-transferaze. Ovaj koncept otkriven je istraživanjem različitih proteina β -galaktozidaze iz *E. coli* proizvedenih u *Saccharomyces cerevisiae*. Dobiveni rezultati pokazali se bitno različite vrijednosti vremena poluživota u rasponu od 20 sati do 3 minute ovisno o tome koja se aminokiselina nalazi na N-kraju proteina. Povezanost sastava krajeva proteina i vremena njihova poluživota prisutna je kod bakterija, gljiva, biljaka i sisavaca. Određene aminokiseline predstavljaju primarne destabilizirajuće elemente, ali se razlikuju u slučaju eukariota i prokariota. Eukarioti preferentno imaju arginin na N-kraju kao N-degron koji označava protein za konjugaciju ubikvitinom i razgradnju proteasomom koja slijedi. Arginin dolazi od Arg-tRNA, a prenosi ga arginil-(R)-transferaza te se arginin veže na N-kraj na α -amino skupinu oksidiranog cisteina, asparagina ili glutamina koji imaju ulogu sekundarnih destabilizirajućih elemenata. U slučaju prokariota N-degroni su leucin ili fenilalanin te ih prenose dvije vrste enzima leucil/fenilalanin(L/F)-transferaza i leucil-transferaza. L/F-transferaza veže Leu ili Phe za pro-N-degronske aminokiseline Lys, Met ili Arg, a leucil-transferaza prenosi Leu na sekundarne destabilizirajuće aminokiseline Asp ili Glu. Ovako označeni proteini postaju meta za ClpS koji ih prenosi do ClpAP za razgradnju. Prokariotske aminoacil-tRNA-transferaze specifično prepoznaju aminoacil-tRNA na temelju interakcije između Leu ili Phe i skupina prisutnih u izrazito hidrofobnom džepu unutar transferaze koji točno odgovara strukturi hidrofobnih aminokiselina koje nemaju razgranati β -ugljikov atom. L/F-transferaza i EF-Tu su kompetitivni akceptori aminoacil-tRNA budući da se aktivnost L/F-transferaza smanjuje u prisutnosti suviška EF-Tu.⁴

2.3.5. Uloga fragmenata tRNA u ekspresiji gena

Postoje različite vrste molekula koje su nastale ‘izrezivanjem’ dijela tRNA pod određenim uvjetima, a osnovna se podjela može raščlaniti na: male nekodirajuće RNA (sncRNA) veličine 16-35 nukleotida i tRNA polovice, veličine 30-35 nukleotida. sncRNA dijele se na microRNA (miRNA), male interferirajuće RNA (siRNA, eng. *small-interfering*), piwi-interacting RNA (piRNA), male nukleolarne RNA (snoRNA, eng. *small nucleolar RNA*) i tRNA izvedeni RNA fragmenti (tRFs, eng. *tRNA-derived RNA fragments*). Najistraženiji su siRNA i miRNA koji sudjeluju u regulaciji ekspresije gena tako što potiskuju ekspresiju vezanjem na ciljnu mRNA. tRNA polovice nastaju od 5’ ili 3’ krajeva normalne zrele tRNA cijepanjem u dijelu antikodonske petlje pod utjecajem nutritivnog, biološkog, fizikalno-kemijskog ili oksidativnog stresa. tRNA izvedeni RNA fragmenti mogu imati 13-20 nukleotida te postoje četiri vrste koje se dijele na temelju dijela tRNA iz kojeg su izvedeni 5’ tRFs, 3’ CCA tRFs, 3’ U tRFs ili 5’ vodeći-egzon tRFs. U uvjetima stresa stvaranje fragmenata tRNA cijepanjem cjelovite tRNA ne čini značajnu promjenu u količini dostupnih cjelovitih tRNA pa na taj način značajno ne utječe na dostupnost tRNA za sudjelovanje u translaciji. Dakle, fragmenti tRNA ne sudjeluju u regulaciji translacije na način da smanjuju količinu dostupnih tRNA, ali sudjeluju u regulaciji ekspresije gena na druge načine od kojih su dva navedena u nastavku.

Neke tRNA polovice imaju mogućnost inhibiranja sinteze proteina i pokretanja fosfo-eIF2 α -neovisnog okupljanja stres-granula (SGs) koje su sastavljene od zaostalog pred-inicijacijskih kompleksa što znači da bi 5’ tRNA polovice mogle utjecati na sustav inicijacije translacije. Istraživanja su pokazala da je za regulaciju translacije s promatranim 5’ tRNA^{Lys} i 5’ tRNA^{Ala} polovicima bio ključan njihov oligo-G motiv koji sadrži četiri do pet uzastopnih gvanozina što ukazuje na to da je inhibicija uzrokovana interakcijom s fragmentom tRNA koji sadrži određeni slijed te da ne mogu bilo koji fragmenti tRNA regulirati translaciju na ovaj način.

Haloferax volcanii je vrsta iz carstva arheja kod koje je uočen primjer regulacije translacije moderiran tRF-ovima. Fragment dug 26 parova nukleotida 5’ tRF tipa koji potječe od tRNA^{Val} se u stresom induciranim uvjetima izravno veže na malu podjedinicu ribosoma i inhibira translaciju interferirajući s aktivnošću peptidil-transferaze. Sličan mehanizam pronađen je i u

ljudskim stanicama u kojem sudjeluje isti tip fragmenata te je otkriveno da je za inhibiciju fragmentu potreban očuvan GG dinukleotid što se može povezati s prethodno opisanim djelovanjem tRNA polovica koje također imaju specifičan slijed potreban za regulaciju.⁴

2.3.6. Uloga fragmenata tRNA kao regulatora utišavanja gena

tRF-ovi također reguliraju i utišavanje gena. Prvi primjer ovakvog djelovanja otkriven je u stanicama zaraženim virusom humane imunodeficijencije.¹¹ Fragment 3'tRF ljudske citoplazmatske tRNA^{Lys} uzrokuje izrezivanje komplementarnog slijeda koji se koristi kao početnica za aktivnost HIV reverzne transkriptaze.

2.3.7. Transfer-RNA u regulaciji ekspresije gena

Postoje brojni mehanizmi regulacije ekspresije gena, a najistraženiji kod bakterija su oni koji se temelje na nedostatku aminoaciliranih tRNA uslijed nedostatka odgovarajućih aminokiselina (eng. *stringent response*). Sustav je posredno kontroliran proizvodnjom signalnih molekula 5'-difosfat-3'-difosfat gvanozin (ppGpp) i 5'-trifosfat-3'-difosfat gvanozin (pppGpp). *E. coli* koristi dva sintetska puta za sintezu (p)ppGpp. Jedan od dva sintetska puta ovisi (p)ppGpp sintetazi RelA koja je pridružena ribosomu i osjetljiva na prisutnost neaminoaciliranih tRNA koje se nakupljaju u A mjestu na ribosomu. Povećana koncentracija neaminoaciliranih tRNA signalizira ograničene količine aminokiselina i uzrokuje usporavanje sinteze proteina, odnosno aktivaciju RelA i fosforilaciju GTP-a ili GDP-a s ATP-om kao donorom fosfata.⁴ Molekula (p)ppGpp djeluje kao alosterički modulator koji se veže na površinu ω i β' podjedinice RNA-polimeraze čime inhibira transkripciju gena za biosintezu ribosoma, paralelno stimulirajući ekspresiju gena vezanih za sintezu aminokiselina.¹² Drugi sintetski put ovisi o bifunkcionalnom enzimu SpoT koji kontrolira razinu (p)ppGpp s obzirom na dostupnost nutrijenata, a kontrolu provodi sintetskom i hidrolitičkom aktivnošću no točan mehanizam prepoznavanja nedostatka aminokiselina i sinteze (p)ppGpp nije poznat. Većina drugih bakterija ima samo jednu vrstu enzima koja posjeduje i sintetsku i hidrolitičku aktivnost te se zovu jednim imenom Rel.⁴

Regulacija ekspresije gena neaminoaciliranim tRNA uočena je i kod eukariota te je vezana za protein-kinazu Gcn2p koja ima nekoliko regulatornih jedinica koje uključuju regiju amino kraja, domenu pseudokinaze, regiju protein-kinaze, regiju sličnu histidil-tRNA-sintetazi (HisRS), C-kraj dimerizacijske sekvence i sekvence koje vežu ribosom. U uvjetima nutritivne deprivacije, neaminoacilirana tRNA aktivira Gcn2p vezanjem na HisRS domenu te Gcn2p fosforilira α podjedinicu translacijskog inicijacijskog faktora eIF2 koji sudjeluje u procesu vezanja GTP-a i Met-tRNA^{Met} i formira trostruki kompleks koji je potreban za inicijaciju translacije. Fosforilacijom dolazi do smanjivanja aktivnosti eIF2 te posljedično ukupne sinteze proteina. Budući da Gcn2p veže nekoliko vrsta neaminoaciliranih tRNA sličnim afinitetom, ali ima manji afinitet za aminoacil-tRNA može se zaključiti da je sposoban razlikovati dva stanja tRNA.⁴

T-box riboprekidač jedan je od mehanizama regulacije ekspresije gena u kojemu sudjeluju neaminoacilirane tRNA. Najčešće se odvija na razini stišavanja transkripcije. Ovaj mehanizam detaljnije je objašnjen u nadolazećem poglavlju.

2.3.8. tRNA u regulaciji stanične smrti

Stanična smrt ili apoptoza je proces kojim se uklanjaju oštećene i štetne stanice, odnosno one koje organizam prepozna kao neželjene. Tijekom apoptoze aktiviraju se proteaze kaspaze koje signaliziraju početak procesa cijepanjem transkripcijskih faktora, strukturnih proteina i proteina uključenih u metabolizam DNA i RNA i dr. U konačnici postupna razgradnja dovodi do fagocitičkog prepoznavanja i proždiranja odumiruće stanice. Tijekom procesa intrinzičnog dijela aktivacije kaspaze dolazi do otpuštanja citokroma c (cyt c) zbog permeabilizacije vanjske membrane mitohondrija te je otkriveno da cyt c reagira s apoptotičkim proteaza-aktivirajućim faktorom-1 (APAF-1) u citosolu te se oblikuje apoptosomski kompleks.⁴ Činjenica da je aktivacija kaspaze-9 regulirana nukleotidima navela je na istraživanje utjecaja tRNA u aktivaciji. Istraživanje je provedeno tako da je prvo ispitan utjecaj hidrolize RNA na aktivaciju kaspaze-9 citokromom c u S100 staničnim ekstraktima iz sisavaca. Dodavanje RNaze A u stanične ekstrakte te zatim dodavanje cyt c rezultiralo je povećanom aktivacijom kaspaze-9 u odnosu na aktivaciju u S100 staničnim ekstraktima koji nisu tretirani s RNazom A prije dodatka

cyt c. No, dodavanje pročišćene ukupne stanične RNA zajedno s cyt c u S100 stanične ekstrakte iz sisavaca inhibiralo je aktivaciju kaspaze-9. Daljnje istraživanje dovelo je do saznanja da je vrsta RNA zaslužna za inhibiciju zapravo tRNA te da se veže na cyt c i tako sprječava formaciju apoptosomskog kompleksa.²² Pretpostavljeni model objašnjava ovakvu inhibiciju vezanjem tRNA na hem u cyt c čime je pozitivno nabijena površina cyt c zaklonjena i ne može interagirati s APAF-1 kompleksom. Ovom modelu doprinosi činjenica da kada se cyt c izloži oksidirajućem spoju ili vrstama koje modificiraju cistein on gubi sposobnost interakcije s tRNA budući da u tom stanju hem ne može vezati tRNA te se pozitivno nabijeni ogranci aminokiselina cyt c vežu za APAF-1. Prekomjerna ekspresija tRNA uočena je kod različitih transformiranih stanica kao što su stanice raka jajnika i vrata grlića maternice, karcinoma i stanica multiplog mijeloma. Nepoznato je kako se regulira vezanje tRNA i je li vezanje specifično. Budući da je analiza sastava takvih stanica pokazala neujednačenu prisutnost svih tRNA, može se zaključiti da prekomjerna ekspresija nije slučajna i nasumična te bi mogla biti vezana za interakciju s citokromom c.⁴

2.4. Regulatorni mehanizam *T-box* riboprekidača

Mehanizam djelovanja *T-box* riboprekidača prvobitno su predložili Henkin, Glass i Grundy (1992) na temelju rezultata dobivenih istraživanjem *tyrS* gena bakterije *B. subtilis* koji kodira tirozil-tRNA-sintetazu (TyrRS).¹³ Daljnje istraživanje i analiza doveli su do saznanja da veliki broj gena koji kodiraju aminoacil-tRNA-sintetaze kod ovih bakterija ima sličnu strukturnu organizaciju transkripta, identične sačuvane elemente i odgovarajući mehanizam djelovanja. Nadalje, otkriveno je da ovakvu građu i sustav regulacije imaju i brojne druge Gram-pozitivne bakterije, a prisutan je i kod nekih Gram-negativnih bakterija, arheja, gljiva i biljaka.^{9,5} Rezultati bioinformatičkih analiza različitih istraživačkih skupina u ovom području identificirale su prisutnost više od 1000 gena s konzerviranim elementima mRNA ovog tipa.^{5, 14, 15, 16} Principi djelovanja mehanizma i uloga utemeljeni su na istraživanju *tyrS* gena u *B. subtilis* koji predstavlja izvorni primjer te će se stoga u daljnjem tekstu razraditi sustav regulacije u glavnini na primjeru *B. subtilis*.

2.4.1. Identifikacija mehanizma T-box riboprekidača

Mehanizam T-box riboprekidača otkriven je istraživanjem već spomenutog *tyrS* gena bakterije *Bacillus subtilis*. Proučavanje povećane razine aktivnosti tirozil-tRNA-sintetaze u uvjetima smanjene dostupnosti tirozina dovelo je do rezultata koji pokazuju da se izvor ovog efekta nalazi u čitanju transkripcijskog terminatora u vodećoj regiji transkripta gena. Pretpostavku da se radi o očuvanom regulatornom mehanizmu potkrijepila je očuvanost terminatorske regije i T-box slijeda u brojnim *B. subtilis tyrS* genima. Budući da je T-box sekvenca, identificirana i u drugim genima aa-tRNA-sintetaza te *ilv-leu* operonu uključenom u biosintezu razgranatih aminokiselina bilo je jasno da mehanizam nije specifičan samo za *tyrS* gen već je njegova prisutnost raširenija što su dokazale i bioinformatičke analize. Specifičnost za pojedinu aminokiselinu riješena je identifikacijom tripleta u specifičnoj petlji koji komplementarno odgovara antikodonu odgovarajuće tRNA. Rezultati mutacijske analize tripleta dokazali su da je on zaslužan za specifično prepoznavanje. Tirozinski kodon UAC zamjenjen je fenilalaninskim kodonom UUC što je u konačnici rezultiralo time da je gen odgovarao na dostupnost fenilalanina, a ne tirozina čime je blokirana indukcija ekspresije gena *tyrS-lacZ* reportera pri uvjetima smanjene razine tirozina. Eksperiment koji je dokazao da je tRNA efektor, odnosno ligand koji aktivira antiterminaciju transkripcije proveden je uvođenjem točkastih mutacija na pozicije specifičnog kodona što je dovelo do terminacije ekspresije. Dodavanje odgovarajuće tRNA koja suprimira točkaste mutacije uzrokovalo je poticanje ekspresije. tRNA koje djeluju kao supresori točkaste mutacije sadrže točkastu mutaciju u slijedu antikodona koja omogućava čitanje stop-kodona. Dokaz da je neaminoacilirana tRNA ključan efektor proizlazi iz pokusa s tRNA mutantima koji ne mogu biti aminoacilirani. Takve tRNA inducirale su ekspresiju tijekom rasta u mediju bogatom odgovarajućom aminokiselinom iz čega se može zaključiti da su neaminoacilirane tRNA odgovorne za pozitivan efekt na ekspresiju te da količina aminokiselina nema izravan utjecaj na aktivnost već samo posredno kao reaktanti koji sudjeluju u stvaranju aminoaciliranih tRNA.⁸

2.4.2. Strukturna obilježja *T-box* vodeće RNA

Transkript *tyrS* gena u *B. subtilis* sastoji se od vodećeg dijela RNA (eng. *leader RNA*) koji čini nekodirajući slijed nukleotida i kodirajuće sekvence nizvodno od vodećeg dijela.⁷ Struktura predvodećeg dijela RNA ima određene očuvane elemente prisutne kod većeg broja gena koji kodiraju aminoacil-tRNA-sintetaze i druge gene vezane za biosintezu razgranatih alifatskih aminokiselina u *B. subtilis*. Numeracija vodeće RNA kreće od 5' kraja, odnosno početne točke transkripcije te završava posljednjim nukleotidom terminatora transkripcije koji je 274. u nizu. Model cjelokupne strukture vodeće RNA prikazana je na Slici 6. Glavne domene čine (počevši od 5' kraja) peteljka I, II, III (eng. *Stem I, II, III*), peteljka IIA/B strukture pseudočvora (eng. *pseudoknot*) iza koje slijedi regija T-strukture (eng. *T-box*). Visoko očuvani nukleotidi označeni su znakom zvjezdice (*).⁷

Peteljku I čini nekoliko očuvanih strukturalnih elemenata. Prvi je GA motiv strukture *kink-turn* koji je građen od slijeda zavojnica-petlja-zavojnica s *kink* elementom u zavojnici koji nastaje zbog prisutne unutarnje petlje koja prekida slijed sparenih nukleotidnih baza. Naziv GA dolazi od očuvanih nukleotida gvanilata i adenilata. Drugi je specifična petlja (eng. *specifier loop*) koja sadrži *S-turn* motiv i specifični slijed (eng. *specifier sequence*). *S-turn* sadrži očuvane AGUA i GAA slijedove. Specifični slijed je kodon za aminokiselinu koja regulira transkripciju gena koji su regulirani mehanizmom *T-box* riboprekidača, odnosno aminokiselinu specifičnu za aminoacil-tRNA-sintetazu kodiranu genom koji se nalazi nizvodno od *T-box* regije. Ovaj element zaslužan je za specifičnost mehanizma na temelju koje dolazi do regulacije ekspresije gena s obzirom na dostupnost aminoaciliranih i neaminoaciliranih tRNA. Posljednji motiv je *AG bulge* koji sadrži očuvani slijed adeninskih i gvaninskih nukleotida.

Peteljku II čini slijed nukleotida koji nisu osobito očuvani i jedan *S-turn* strukturalni element koji je očuvan te sadrži karakterističnu AGUA sekvencu.

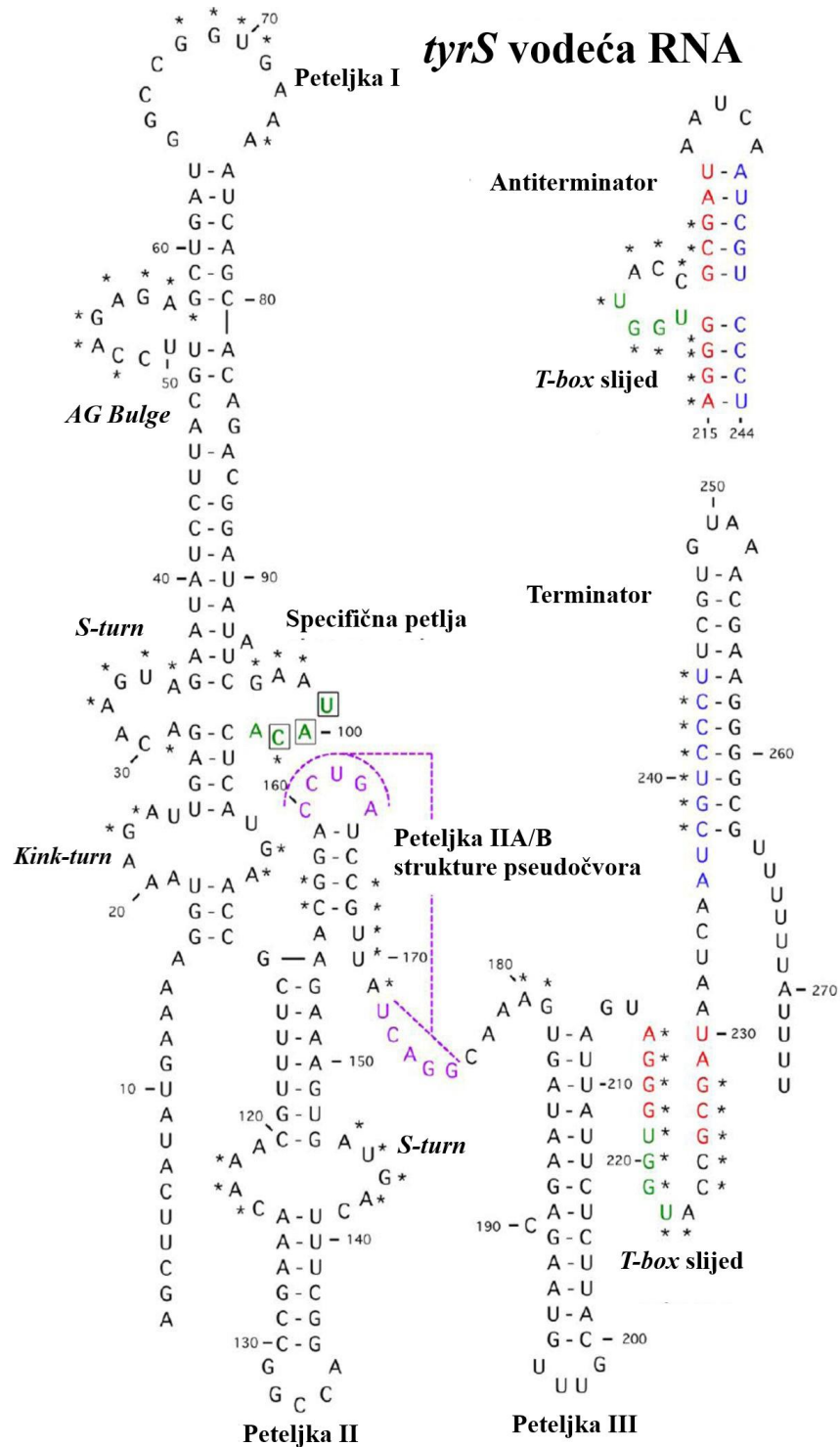
Peteljka IIA/B strukture pseudočvora je domena koja predstavlja ‘čvor’ u kojemu dolazi do interkalacije polovine jedne peteljke između dvije polovine druge peteljke. Nukleotidi koji se sparuju u pseudočvoru obojeni su ljubičasto na Slici 6.

Peteljka III nalazi se uzvodno od *T-box* sekvence i ima veliku mogućnost varijacije u slijedu te je većina nukleotida sparjena unutar strukture zavojnice.

Nizvodno od peteljke III nastavlja se T-struktura koju čini slijed od 14 uzastopnih visoko očuvanih nukleotida od 215. do 228. nukleotida među kojima su i oni ključni za interakciju s 3' XCCA slijedom tRNA (zeleno) i interakciju s dijelom *T-box* regije (crveno).⁷

Nakon T-strukture slijedi ostatak *T-box* regije koji ovisno o regulaciji može imati strukturu terminatora ili antiterminatora. Na Slici 6 *T-box* regija je prikazana u strukturi terminatora. Središnji dio čini motiv ukosnice (eng. *hairpin*) bogat G i C nukleotidima nakon kojih slijedi niz uridilata koji čine U-A RNA-DNA hibrid u elongacijsko-transkripcijskom kompleksu. Struktura sadrži niz od 7 visoko očuvanih nukleotida koji se mogu spariti s dijelom T-strukture (plavo) i formirati antiterminatorsku strukturu.⁶

Antiterminator prikazan u gornjem desnom kutu Slike 6. nastaje interakcijom baza nukleotida *T-box* elementa i terminatora. Sekundarna struktura se može opisati kao dvostruka zavojnica s jednim motivom ispupčene petlje (eng. *bulge*) i jednom standardnom petljom.⁷



Slika 6. Sekundarni strukturni model *B. subtilis tyrS* vodeće RNA. Preuzeto i prilagođeno iz: N.J. Green, F.J. Grundy, T.M. Henkin, The T-box mechanism: tRNA as a regulatory molecule, *FEBS Letters* **584**(2) (2009), 319.

2.4.3. *Mehanizam i princip regulacije riboprekidača*

Riboprekidač predstavlja *cis* regulaciju ekspresije gena, odnosno mehanizam u kojemu je ekspresija gena pod kontrolom riboprekidača koji je element vodećeg dijela molekule mRNA koja kodira navedeni gen. Drugim riječima, sam transkript sudjeluje u regulaciji gena kojeg kodira. Aktivnost ovakvih sustava odvija se najčešće na razini utišavanja transkripcije, ali uočena je i na razini inicijacije translacije kod pojedinih vrsta bakterija. Djelovanje se temelji na svojstvu osjetljivosti strukture riboprekidača na određeni fiziološki signal i reakciji sukladnoj s primljenom informacijom koje se posljedično odražava na ekspresiju gena. Strukturna promjena u RNA je način na koji sustav odgovara na određeni signal i kontrolira ishod čitanja gena. Signali na koje riboprekidači najčešće odgovaraju su stanični metaboliti koji mogu biti produkt sintetskog puta u kojem sudjeluje enzim kodiran u pripadajućoj mRNA i slični ligandi, aminoaciliranost tRNA, pH, temperatura i drugi fizikalni parametri. Najčešće riboprekidači sadrže dvije odvojene domene: domenu za prepoznavanje liganda i domenu za regulacijski odgovor koje su povezane zajedničkom regijom iako postoje i strukture s jednom domenom koja obavlja obje funkcije. Vezanje liganda na domenu za prepoznavanje liganda uzrokuje promjenu strukture domene za regulacijski odgovor i tako regulira ekspresiju gena kodiranog nizvodno u kodirajućem dijelu transkripta. Selektivnost sustava temelji se na komplementarnosti oblika, izravnoj interakciji vodikovim vezama, interakcijama slaganja i prepoznavanje nabijenih skupina liganda.⁶

2.4.4. *tRNA kao efektor*

T-box mehanizam djeluje kao detektor isključivo omjera koncentracije aminoaciliranih i neaminoaciliranih tRNA. Kao što je već spomenuto, indukcija ekspresije nije kontrolirana ograničenjem dostupnosti aminokiselina kao samostalnih molekula već kao molekula koje sudjeluju u proizvodnji aminoaciliranih tRNA. Dakle, ako bi aminoaciliranje bilo onemogućeno nekim drugim faktorima, u mediju bogatom aminokiselinama, došlo bi do antiterminacije bez obzira na dostupnost aminokiselina. Prisutnost tRNA koja može biti aminoacilirana u mediju bogatom aminokiselinama u slučaju *tyrS* uzrokovala je smanjenu ekspresiju gena što je dokazalo da se indukcija antiterminacije smanjuje što je koncentracija

Tyr-tRNA^{Tyr} veća. Dakle, što je omjer Tyr-tRNA^{Tyr}/ tRNA^{Tyr} manji to je indukcija antiterminacije veća te se može zaključiti da sustav nadzire prisutnost oba oblika, a aminoacilirana tRNA djeluje kao kompetitivni inhibitor. Istraživanje kompeticije transkripcijskih kompleksa pokazalo je da u trenutku kada je antiterminator u potpunosti formiran u nastalom transkriptu uslijed vezanja neaminoacilirane tRNA ne može se destabilizirati dodavanjem imitatorske aminoacilirane tRNA. Dakle, interakcija akceptorskog kraja i antiterminatora 'zaključava' kompleks u stabilniji oblik koji je otporan na daljnji utjecaj prisutnih kompeticijskih molekula aminoacilirane tRNA.⁸

2.4.5. *In vitro* ispitivanje dodatnih faktora

Ispitivanje dodatnih faktora koji bi mogli utjecati na regulacijski odgovor nije lako provesti u *in vivo* analizi budući da u živim organizmima nije moguće kontrolirati utjecaje kojima je određeni sustav izložen niti je moguće primjerice varirati uvjete pojedinačno zbog čega se pristupa *in vitro* analizi koja dopušta kontrolu tvari koje će sudjelovati u određenom eksperimentu i mogućnost pojedinačnog testiranja što olakšava identifikaciju ključnih efektoru u mehanizmu i isključivanje ostalih faktora koji ne sudjeluju u mehanizmu. Pokušaj reproduciranja tRNA^{Tyr} ovisne antiterminacije kod *B. Subtilis tyrS* u *in vitro* uvjetima nije bilo uspješno. Alternativno rješenje bilo je uporaba *glyQS* gena koji kodira enzim glicil-tRNA-sintetazu (GlyRS) iste bakterije koji u strukturi vodeće sekvence nema peteljku II i peteljku IIA/B.⁸ Uloga ovih elemenata vodeće RNA nije poznata i riboprekidači koji ih ne posjeduju funkcioniraju bez njih, ali očuvanost i osjetljivost na mutacije u ovim elementima kod vodećih RNA koje ih posjeduju ukazuju na to da peteljka II i peteljka IIA/B imaju bitnu ulogu u antiterminaciji kod takvih vrsta. Dodatna prednost *glyQS* gena za biokemijsku analizu je nemodificirana antikodonska petlja odgovarajuće tRNA što olakšava njezino dobivanje transkripcijom kataliziranom enzimom T7 RNA-polimerazom u *in vitro* uvjetima i povećava vjerojatnost da će biti funkcionalna. Pokušaj induciranja antiterminacije u ovom slučaju je bio uspješan te je dodatak tRNA^{Gly} bio dovoljan za regulatorni odgovor.⁷ Paralelno je napravljen eksperiment s *thrS* genom koji u vodećoj sekvenci sadrži peteljku II i peteljku IIA/B, ali ne sadrži *S-turn* u specifičnoj petlji. Antiterminacija je uspješno provedena samo u prisutnosti

spermidina (uz tRNA) ili staničnog ekstrakta što upućuje na to funkcionalan mehanizam zahtjeva više od same tRNA.

Istraživanje mehanizma s *glyQS* genom *in vitro* pokazalo je da antiterminacija nije osjetljiva na brzinu transkripcije i da su određena mjesta na kojima se transkripcija privremeno zaustavlja neobavezna za antiterminaciju.⁸ Za neke gene regulirane *T-box* mehanizmom karakteristično je i posttranskripcijsko procesiranje. U nekim slučajevima posttranskripcijsko procesiranje uključuje cijepanje transkripta u regiji antiterminatora koje je katalizirano enzimom RNaza J1. Na temelju dosadašnjih istraživanja pretpostavlja se da procesiranje povećava stabilnost transkripta što povećava efektivnost tRNA usmjerene antiterminacije, ali da također sudjeluje u otpuštanju tRNA s transkripta.⁷

2.4.6. Utjecaj modifikacija tRNA na mehanizam *T-box* riboprekidača

Nadalje, ispitano je kakav utjecaj imaju modifikacije tRNA na aktivnost riboprekidača. Vežanje bilo koje molekule na 5' ili 3' kraj tRNA potpuno zaustavlja proces, najvjerojatnije zbog steričkih smetnji koje onemogućavaju interakciju akceptorskog kraja tRNA s antiterminatorom. Dodatak dvaju parova baza u antikodonskoj zavojnici dovodi do značajne redukcije antiterminacije. Dodavanje 4 para baza akceptorskoj zavojnici nije smanjilo aktivnost, ali daljnji dodatak od 5 ili 8 parova baza uzrokuje nestanak antiterminacije. Dodavanje 11 parova baza, odnosno punog okreta zavojnice rezultira aktivnom antiterminacijom dok 1.5 ili 2 okreta uzrokuju terminaciju. Utjecaji ovih modifikacija doveli su do zaključka da je prostorna orijentacija zavojnice akceptorskog kraja u odnosu na antiterminatorsku petlju ključna te da ovisi o tome kako je 'lice zavojnice' (eng. *face-of-the-helix*) usmjereno s obzirom na petlju. Također, ustanovljeno je da postoji određena linearna fleksibilnost u udaljenosti između specifične petlje i antiterminatora. Umetanje nukleotida na različitim mjestima u vodećoj RNA *glyQS* kako bi se nadomjestila duljina u skladu s produljenom tRNA za dva okreta zavojnice nije rezultiralo antiterminacijom što znači da je rotacijska fleksibilnost jedne od ili obje RNA ograničena. Ovakva fleksibilnost svojstvena je za *glyQS*, ali nije istraženo je li svojstvena i za druge gene ili je samo specifična za ovaj gen koji nema petljku II i petljku IIA/B budući da bi ti elementi mogli uvesti dodatna prostorna ograničenja.⁷

Niz mutacija proveden je na tRNA^{Tyr} te je zaključeno da je tercijarna interakcija između D-petlje i T-petlje ključna dok izmjene u zavojnicama nemaju veliki utjecaj. Također, istraženo je ima li varijabilna ruka ulogu u mehanizmu i vezanju. Duga varijabilna ruka tRNA^{Tyr} zamijenjena je kraćom ili je umetnut duži dio zavojnice unutar varijabilne ruke, ali su obje modifikacije zanemarivo utjecale na mehanizam iz čega je jasno da ovaj dio tRNA nema važnu ulogu u antiterminaciji.

2.4.7. Uloge različitih elemenata sekundarne strukture vodećeg slijeda RNA te utjecaj modifikacija T-box slijeda na mehanizam T-box riboprekidača

Antiterminatorska izbočena petlja je vrlo fleksibilna što ukazuje na to da se tRNA veže modelom induciranog pristajanja. Zamjena jednog od očuvanih citozinskih nukleotida antiterminatora dovodi do značajnog povećanja fleksibilnosti što u konačnici rezultira smanjenjem afiniteta za vezanje tRNA i manje efikasnom antiterminacijom *in vitro* i *in vivo*.

Mutacije uvedene u slijedu motiva GA uzrokuju zaustavljanje antiterminacije *in vivo* dok u *in vitro* uvjetima mutacije nemaju utjecaj na aktivnost. Uzrok različitog odgovora je nepoznat. *Kink-turn* element koji čini GA motiv u drugim RNA ima ulogu elementa za prepoznavanje proteina L7AE obitelji. Dva ORF-a (eng. *open reading frame*, dio genetskog koda koji u okviru čitanja genetskog koda može dati funkcionalni produkt) nepoznate funkcije za koje se pretpostavlja da kodiraju proteine iz L7AE obitelji prisutna su u genomu *B. subtilis*. Utjecaj tih proteina na aktivnost mehanizma ispitana je na način da su izvedene delecije u ORF dijelovima no one nisu utjecale na antiterminaciju. Ovi rezultati ukazuju na to da *kink-turn* element u ovom slučaju nije vezan za prepoznavanje L7AE proteina i funkcionira bez partnerskog proteina te da ovo nije razlog različitog odgovora *in vivo* i *in vitro*.⁷

Uvođenje mutacija u *S-turn* element specifične petlje sastavljenog od AGUA i GAA nukleotida uzrokuje prestanak antiterminacije u slučaju *tyrS* i *glyQS*. NMR analiza modelne RNA temeljene na strukturi specifične petlje *tyrS* potvrđuje da uvođenjem mutacija u AGUA i GAA sljedove dolazi do nestanka *S-turn* motiva. Rezultati koji pokazuju da odsutnost *S-turn* strukturnog motiva uzrokuje gubitak antiterminacije potvrđuju hipotezu da struktura ovog elementa sudjeluje u pravilnom pozicioniranju specifičnog kodona za interakciju s antikodonom iz antikodonske petlje tRNA. Također, kod *glyQS* vodeći slijed RNA s

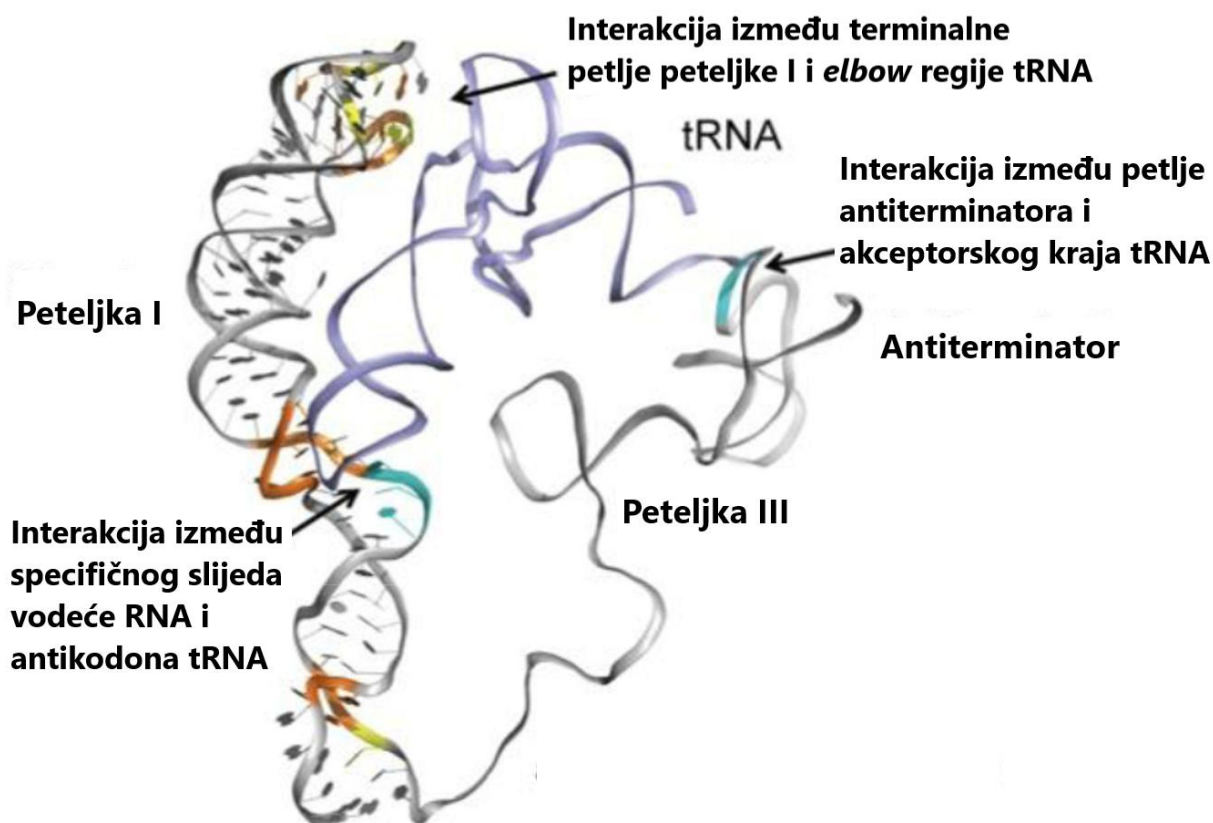
modifikacijom na mjestu A98 koji se nalazi odmah prije specifičnog kodona ne može vezati tRNA na specifični kodon u specifičnoj petlji što je pokazano testovima temeljenim na fluorescenciji s modelom RNA koji ima 2-aminopurin na mjestu A98. Delecija A98 nukleotida u vodećem slijedu RNA nema utjecaj na njegovu funkciju.⁷ Nadalje pokazano je da purinska baza (A) koja slijedi nakon specifične sekvence nizvodno sudjeluje u stabilizaciji interakcije mRNA i antikodona tRNA, ali se ne sparuje s očuvanim uracilom u antikodonskoj petlji.⁸

Strukture *AG-buldge-a* i terminalne petlje u peteljci I *glyQS* gena pokazale su da postoji interakcija između ova dva motiva i *elbow* regije tRNA odnosno 'ugla' trodimenzionalne strukture tRNA. Uzevši u obzir ove rezultate i rezultate filogenetičkih i genetičkih analiza može se zaključiti da ovi dijelovi peteljke I sudjeluju kao treća interakcija u održavanju specifičnosti za tRNA no budući da su u drugim genima ovi elementi odsutni ili drugačije raspoređeni neophodno je pretpostaviti da postoje i alternativne strukture koje su također funkcionalne.⁸

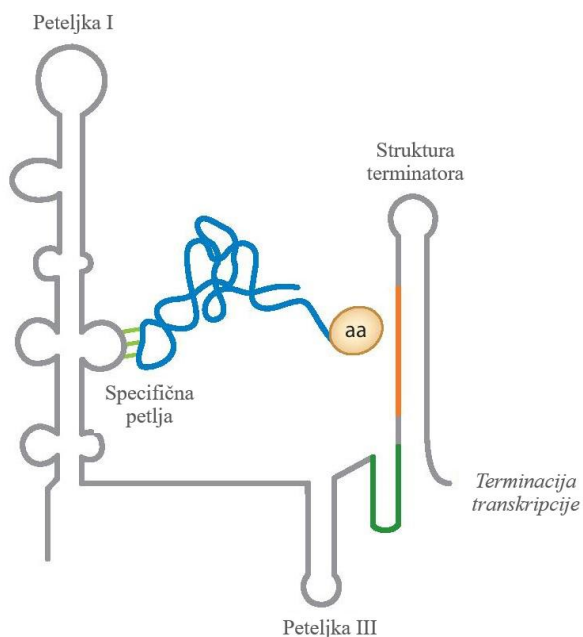
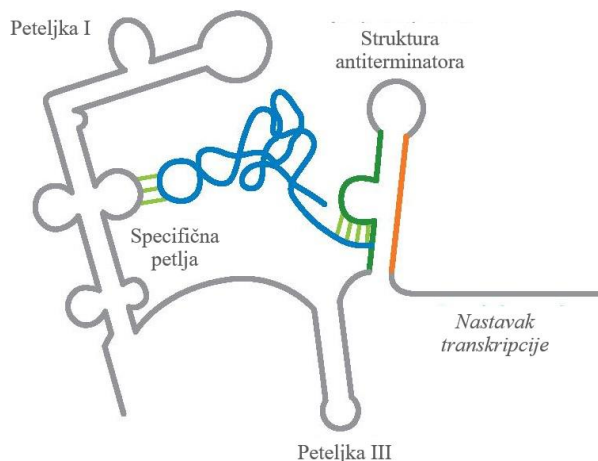
Funkcija peteljke II, IIA/B pseudočvora i peteljke III koja je podložna varijabilnosti nije poznata, no utjecaj mutacija na učinkovitost mehanizma antiterminacije kod peteljke II i pseudočvora ukazuje na to da su to bitni elementi za funkciju riboprekidača.⁸

Najvažniji dijelovi vodećeg slijeda RNA za ostvarivanje interakcije između vodeće RNA i pripadne tRNA su specifični slijed (kodon) unutar petlje koja diktira specifičnost (specifična petlja) koji se sparuje s antikodonom tRNA te dio *T-box* slijeda koji je komplementaran NCCA kraju neaminoacilirane tRNA s kojim interagira. Mutacije u ovim sekvencama direktno uzrokuju onemogućavanje antiterminacije jer interakcije potrebne za signaliziranje strukturne promjene i stvaranje antiterminatorske strukture ne mogu biti ostvarene. Vezanje, odnosno sparivanje antikodona tRNA s specifičnim slijedom (kodonom) u specifičnoj petlji vodeće RNA nije u potpunosti ovisno o postojanju antiterminatorske strukture već je afinitet za vezanje većinski određen interakcijom s peteljkom I u kojoj se nalazi specifični slijed. Fluorescencijski testovi pokazali su da vodeća RNA koja ima samo donji dio peteljke I koji uključuje GA motiv i specifičnu petlju može ostvariti interakciju s antikodonom cjelovite tRNA, ali i antikodonom molekule koja imitira antikodonsku zavojnicu.⁸ Mutacijske analize potvrdile su pretpostavku da sparivanje akceptorskog kraja neaminoacilirane tRNA (NCCA) i antiterminatorske petlje (UGGN, slika 6. nukleotidi od 219 do 222) stabilizira antiterminatorsku strukturu. Također, varijabilni N nukleotid, odnosno diskriminatorna baza tRNA djeluje kao sekundarna značajka za specifičnost prepoznavanja tRNA.⁷ No, budući da komplementarna zamjena na varijabilnim

pozicijama u antiterminatoru i u tRNA nije bila dovoljna da bi antiterminacija bila uspješna može se zaključiti kako i očuvanje slijeda i strukturnih elemenata u drugim dijelovima antiterminatora utječe na afinitet za vezanje tRNA, primjerice prvi C u očuvanoj UGGNACC (slika 6. nukleotidi 219 do 225) sekvenci utječe na afinitet iako ne sudjeluje direktno u sparivanja baza.⁸



Slika 7. Model interakcije *glyQS* vodeće RNA i tRNA^{Gly}. Preuzeto i prilagođeno iz: J.C. Grigg, Y. Chen, F.J. Grundy, T.M. Henkin, L. Pollack, A. Ke, T box RNA decodes both the information content and geometry of tRNA to affect gene expression, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**(2013), 7240–7245.

a učinkovitost aminoaciliranja tRNA visoka**b učinkovitost aminoaciliranja tRNA niska**

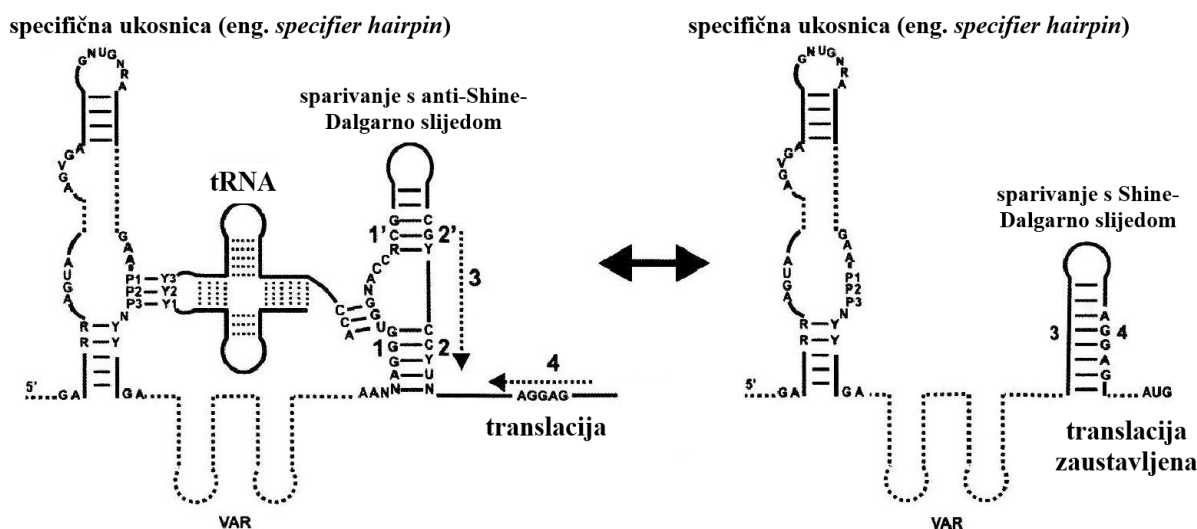
Slika 8. Prikaz a) strukture vodeće RNA s vezanom aminoaciliranom tRNA i b) mehanizma vezanja akceptorskog kraja neaminoacilirane tRNA i nastanka antiterminatorske strukture.

Preuzeto iz A.V. Sherwood, T.M. Henkin, Riboswitch-Mediated Gene Regulation: Novel RNA Architectures Dictate Gene Expression Responses, *Annual Review of Microbiology* **70** (2016), 367.

2.4.8. Mehanizam regulacije na razini inicijacije translacije

Postoje i geni čija je ekspresija regulirana *T-box* riboprekidačem na razini inicijacije translacije, ali su oni manje učestali. Takvi geni pronađeni su kod organizama s visokim udjelom G i C nukleotida iz vrste *Actinobacteria* te su uglavnom radi o *ileS* genima. Vodeća RNA nema slijed terminatora već sadrži slijed koji se sparuje s Shine-Dalgarno (SD) sekvencom nizvodnog kodirajućeg slijeda i formira zavojnicu. Način na koji funkcionira mehanizam je sličan antiterminaciji, no u ovom slučaju anti-Shine-Dalgarno slijed, (ASD) vodeće RNA koji se inače sparuje s SD regijom može se spariti s dijelom *T-box* sekvence i tako formirati strukturu sličnu antiterminatoru te dopustiti da SD sekvenca bude slobodna za vezanje 30S podjedinice ribosoma i inicijaciju translacije.¹⁸ Ovakav mehanizam omogućuje da regulacija može biti reverzibilna jer signalna molekula može interagirati s riboprekidačem više puta tijekom postojanja transkripta te pruža brži odgovor na stimulaciju iz okoline jer je transkript gena

dostupan za trenutnu translaciju. Mana regulacije na razini translacije je ta što je energetski „skuplja“ budući da mogu nastati nepotrebni transkripti koji su neaktivni u translaciji.⁶



Slika 9. Mehanizam *T-box* riboprekidač regulacije na razini inicijaciji translacije. Preuzeto iz A.G.Vitreschak, A.A. Mironov, V.A. Lyubetsky, M.S. Gelfand, Comparative genomic analysis of T-box regulatory systems in bacteria, *RNA* **14** (2008), 719.

2.4.9. Prisutnost i raznolikost *T-box* riboprekidač mehanizama

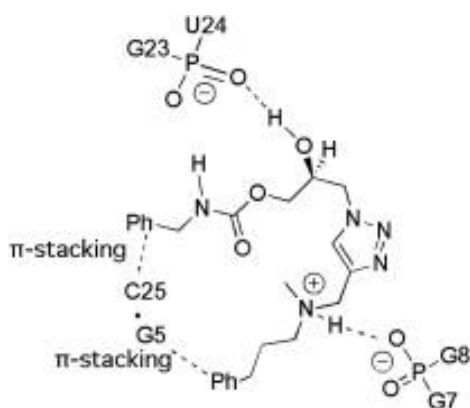
Baza podataka sastavljena do 2010. godine sadrži više od 1000 pažljivo određenih *T-box* sustava koji su identificirani pretragom genomskih podataka kako bi se pronašli očuvani primarni elementi slijedova *T-box* vodeće RNA i pretragom istih podataka kako bi se pronašle kodirajuće sekvence koje bi najvjerojatnije bile regulirane ovim mehanizmom.⁶ *T-box* transkripti identificirani su kod članova svih skupina Gram-pozitivnih bakterija, ali i kod drugih skupina bakterija kao što su *Deinococcus* i *Thermus* te Gram-negativnih bakterija primjerice *Geobacter* i *Chloroflexus*.⁷ Pokazano je da se svojstva mehanizma regulacije kod *tyrS B. subtilis* primjenjiva i kod gena *glyQS*, *thrS*, *thrZ*, *ilv-leu* i *valS*. Pojedini geni regulirani mehanizmom *T-box* riboprekidača razlikuju se od uobičajnog modela u strukturi vodeće RNA pa shodno tome i u mehanizmu. Geni *thrS* nemaju *S-turn* element u specifičnoj petlji, neki geni vezani za metabolizam glicina i alanina nemaju peteljku II i peteljku IIA/B strukture pseudočvora dok neki geni vezani za metabolizam izoleucina nemaju dio slijeda uzvodno od specifične petlje.⁸

Unatoč razlikama u strukturi vodeće RNA mehanizam je funkcionalan kod svih prethodno navedenih gena. Činjenica da su elementi kao što je *S-turn* motiv, peteljka II, peteljka IIA/B strukture pseudočvora i slijed uzvodno od specifične petlje kod gena koji ih posjeduju vrlo očuvani i osjetljivi na mutacije ukazuje na to da su se *T-box* sustavi koji ih ne posjeduju razvili tako da nadomjeste odsutnost ovih elemenata. *T-box* mehanizam najprisutniji je kod aaRS gena (62% identificiranih) zatim slijede geni uključeni u biosintezu aminokiselina (18%) i prijenos aminokiselina preko staničnih membrana i membrana organela (12%), a ostatak od 8% pripada genima za sada još nepoznate funkcije.⁷

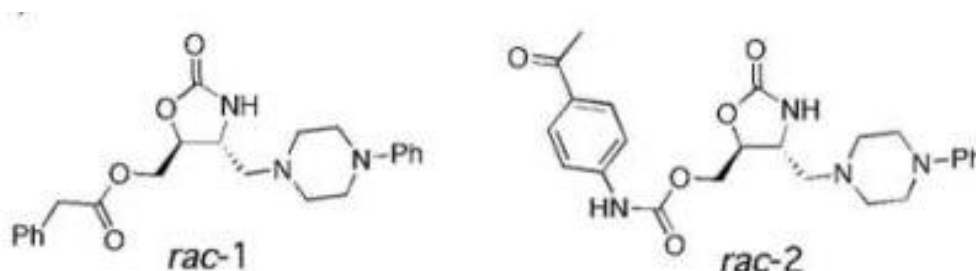
2.4.10. Značaj i daljnja istraživanja

Nakon njihova otkrića riboprekidači su zbog svojih svojstava i specifičnog mehanizma postali učestali predmet istraživanja u području ekspresije gena u različitim biološkim sustavima. Raznolikost strukturnih značajki i prepoznavanja signalnih liganada pruža mogućnost različitih pristupa istraživanju mehanizma. Riboprekidači se rabe kao alati za razvoj manipulacije ekspresije gena i kao mete za razvoj novih tvari s antimikrobijskim djelovanjem. Mehanizam *T-box* riboprekidača ukazuje na prilagodljivost molekule tRNA kao regulatorne molekule, sposobnost stanica da prepoznaju specifične tRNA pomoću nastalog transkripta i razlikuju aminoacilirane od neaminoaciliranih tRNA. Najočuvaniji element *T-box* vodeće RNA je antiterminatorski slijed i njegova strukturna raspodjela zavojnice s umetnutom izbočenom petljom od 7 očuvanih nukleotida. Kako bi antiterminatorska struktura nastala mora biti stabilizirana interakcijom s akceptorskim krajem tRNA, stoga je ovaj element najčešća meta istraživanja i dizajniranja tvari za koje se pretpostavlja da vezanjem omogućuju ili onemogućuju nastajanje strukture antiterminatora. Tvari koje su dizajnirane na ovaj način testirane su kako bi se proučio njihov utjecaj na vezanje tRNA, stabilizaciju antiterminatora i samu antiterminaciju. Budući da je mehanizam *T-box* riboprekidača široko rasprostranjen kod Gram-pozitivnih bakterija istraživanja se usredotočuju na razvoj antimikrobijskih tvari specifičnih za Gram-pozitivne bakterije. Prednost ovakvih tvari je što omogućuju razlikovanje između organizama, odnosno činjenica da svojstveno ciljaju mehanizam prisutan većinski kod jedne skupine bakterija čime se eliminira moguća interakcija s organizmom domaćina ili okoline.⁸ Primjer tvari koje onemogućuju antiterminaciju vezanjem za antiterminatorski slijed su 1,4-disupstituiran 1,2,3-triazol (Slika 9.) i 4,5-disupstituirani oksazolidinon (Slika 10.).

Molekula 1,4-disupstituiranog 1,2,3-triazola) veže se na izbočeni dio antiteminatora i smanjuje fleksibilnost petlje te stabilizira sekundarnu strukturu RNA.¹⁹ Molekule oksazolidinona također zaustavljaju antiterminaciju, no 4,5-disupstituirani oksazolidinon amino skupinom pokazuje značajno veći afinitet za vezanje na antiterminatorski slijed.^{20,21} Osim mogućnosti razvoja novih lijekova bitno je napomenuti da je istraživanje *T-box* mehanizma značajno za temeljno razumijevanje sveukupnog živog svijeta i raznolikosti načina regulacije ekspresije gena.



Slika 10. 1,4-disubstituiran 1,2,3-triazol. Preuzeto iz S. Zhou, J.A. Means, G. Acquah-Harrison, S.C. Bergmeier, J.V. Hines, Characterization of a 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole binding to T Box antiterminator RNA, *Bioorg. Med. Chem.* **20**(2012) 1298-1302.



Slika 11. Strukture trans-4,5-disupstituiranog oksazolidinona. Preuzeto iz C.M. Orac, S. Zhou, J.A. Means, D. Boehm, S.C. Bergmeier, J.V. Hines, Synthesis and Stereospecificity of 4,5-disubstituted Oxazolidinone Ligands Binding to T-box Riboswitch RNA, *J Med Chem.* **54**(2011) 6786-6795.

§ 3. ZAKLJUČAK

Mehanizam *T-box* riboprekidača predstavlja regulaciju ekspresije gena na razini terminacije transkripcije ili inicijacije translacije. Specifičnost sustava je što „nadzire“ omjer neaminoacilirane tRNA i aminoacilirane tRNA dok općenito riboprekidači djeluju kao sustavi povratne sprege u kojima krajnji produkt biosintetskog puta djeluje kao signalna molekula te uzrokuje potiskivanje ekspresije gena. Također, mehanizam je specifičan za Gram-pozitivne bakterije (iako ne isključivo) što omogućuje selektivno djelovanje na određenu skupinu organizama djelovanjem na *T-box* sustav. Ova svojstva mehanizma čini ga povoljnim za istraživanje i razvoj novih antimikrobijskih tvari koje će djelovati samo na pojedine organizme. Iako su strukture vodećih RNA sustava reguliranih *T-box* riboprekidačem i osnovni principi interakcije tRNA i transkripta objašnjeni, postoji još niz interakcija koje sudjeluju u mehanizmu djelovanja *T-box* riboprekidača, a nisu u potpunosti opisane u dosadašnjim istraživanjima. Uzimajući u obzir potencijal i značaj ovog mehanizma može se zaključiti da postoji široko područje za istraživanje njegovih svojstava i čimbenika koji utječu na njegovu aktivnost te za primjenu dobivenih znanja koje pruža razmatranje mehanizma *T-box* riboprekidača u području biokemije, medicine i farmacije.

§ 4. LITERATURNI IZVORI

1. R.W. Holley, Structure of a ribonucleic acid. *Science*, **147** (1965), 1462-1465.
2. Cox M., Nelson D.L.: *Lehninger Principles of Biochemistry* 7th Edition, W. H. Freeman & Company, New York, 2017, (1057-1058, 1092-1093, 1143-1146).
3. R. Giege, F. Juhling, J. Putz , P. Stadler, C. Sauter, C. Florentz, Structure of transfer RNAs: similarity and variability, *Wiley Interdiscip Rev RNA* **3** (2012), 37-61.
4. M. Raina, M. Ibba, tRNAs regulators of biological processes, *Front. Genet.* **5** (2014), 171.
5. A.G.Vitreschak, A.A. Mironov, V.A. Lyubetsky, M.S. Gelfand, Comparative genomic analysis of T-box regulatory systems in bacteria, *RNA* **14** (2008), 717-735.
6. A.V. Sherwood, T.M. Henkin, Riboswitch-Mediated Gene Regulation: Novel RNA Architectures Dicateate Gene Expression Responses, *Annual Review of Microbiology* **70** (2016), 361-374.
7. N.J. Green, F.J. Grundy, T.M. Henkin, The T-box mechanism: tRNA as a regulatory molecule, *FEBS Letters* **584**(2) (2009), 318-324.
8. T.M. Henkin, The T-box Riboswitch: novel regulatory RNA that utilizes tRNA as its ligand, *Biochim Biophys Acta.* **1839**(10) (2014), 959-963.
9. A.L. Edwards & R.T. Batey, Riboswitches: A Common RNA Regulatory Element, *Nature Education* **3**(9):9 (2010).
10. D. Voet, J.G. Voet, Translation. In Voet D., Voet J.G.(eds): *Biochemistry*, John Wiley & Sons Inc., New York, 2011, (1345-1350).

11. Yeung et al., Pyrosequencing of small non-coding RNAs in HIV-1 infected cells: evidence for the processing of a viral-cellular double-stranded RNA hybrid, *Nucleic Acid Res.*, **37**(19) (2009), 6575-6586.
12. W. Ross, C.E. Vrentas, P. Sanchez-Vazquez, T. Gaal, R.L. Gourse, The magic spot: appGpp binding site on E. coli RNA polymerase responsible for regulation of transcription initiation, *Molecular Cell* **50**(3) (2013,) 420-429.
13. T.M. Henkin, B.L. Glass, F.J. Grundy, Analysis of the *Bacillus subtilis tyrS* gene: conservation of a regulatory sequence in multiple tRNA synthetase gene, *J. Bacteriol*, **174** (1992), 1299-1306.
14. H. Frenkiel, J. Bardowski, S.D. Ehrlich, A. Chopin, Transcription of the *trp* operon in *Lactococcus lactis* is controlled by antitermination in the leader region, *Microbiology*, **144** (1998) 2103-2111.
15. M. Wels, T.G.Kormelink, M. Kleerebezem, R.J. Siezen, C. Francke, An in silico analysis of T-box regulated genes and T-box evolution in prokaryotes, with emphasis on prediction of substrate specificity of transporters, *BMC Genomics* **9** (2008) 330.
16. F.J. Grundy, M.T. Haldeman, G.M. Hornblow, J.M. Ward, A.F. Chalker, T.M. Henkin, The *Staphylococcus aureus ileS* gene, encoding isoleucyl-tRNA synthetase, is a member of the T-box family, *J. Bacteriol* **179**(1997) 3767–3772.
17. F.J. Grundy, S.M. Rollins, T.M. Henkin, Interaction between the acceptor end of tRNA and the T-box stimulates antitermination in the *Bacillus subtilis tyrS* gene: a new role for the discriminator base, *J. Bacteriol* **176**(1994) 4518-4526.
18. R.T. Fuchs, F.J. Grundy, T.M. Henkin, The S_{MK} box is a new SAM-binding RNA for translation regulation of SAM synthetase, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**(2006) 226-33.
19. S. Zhou, J.A. Means, G. Acquah-Harrison, S.C. Bergmeier, J.V. Hines, Characterization of a 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole binding to T Box antiterminator RNA, *Bioorg. Med. Chem.* **20**(2012) 1298-1302.

20. C.M. Orac, S. Zhou, J.A. Means, D. Boehm, S.C. Bergmeier, J.V. Hines, Synthesis and Stereospecificity of 4,5-disubstituted Oxazolidinone Ligands Binding to T-box Riboswitch RNA, *J Med Chem.* **54**(2011) 6786-6795.

21. R. Anupam, A. Nayek, N.J. Green, F.J. Grundy, T.M. Henkin, J.A. Means, S.C. Bergmeier, J.V. Hines, 4,5-Disubstituted oxazolidinones: High affinity molecular effectors of RNA function, *Bioorg Med Chem Lett.* **18**(2008) 3541-3544.

22. Y. Mei et al., tRNA binds to cytochrome c and inhibits caspase activation, *Mol Cell.* **37**(5) (2010), 668-678.

,

§ 5. POPIS SLIKA

1. **Slika 1.** Općenita sekundarna struktura tRNA molekula. Crne točke predstavljaju neodređene nukleotide, nukleotidi označeni ružičastim kvadratima su karakteristični za sve tRNA, a plave linije predstavljaju parove baza. Preuzeto i prilagođeno iz: Cox M., Nelson D.L.: *Lehninger Principles of Biochemistry 5th Edition*. W. H. Freeman & Company, 2008. (str. 1092)
2. **Slika 2.** Primjeri sekundarnih struktura tRNA koje odstupaju od kanonske strukture djeteline. Preuzeto i prilagođeno iz: Giege R., Juhling F., Putz J., Stadler P., Sauter C., Florentz C., *Structure of transfer RNAs: similarity and variability*, *Wiley Interdiscip Rev RNA* **3** (2012) 37-61.
3. **Slika 3.** Promjena sekundarne strukture *Hsa* mt-tRNA^{Lys} uvjetovana metilacijom adeninskog nukletida. Preuzeto i prilagođeno iz: Giege R., Juhling F., Putz J., Stadler P., Sauter C., Florentz C., *Structure of transfer RNAs: similarity and variability*, *Wiley Interdiscip Rev RNA* **3** (2012) 37-61.
4. **Slika 4.** Tercijarna struktura tRNA (oblik obrnutnog slova L). Preuzeto i prilagođeno iz: <https://www.khanacademy.org/science/biology/gene-expression-central-dogma/translation-polypeptides/a/trna-and-ribosomes>(28.01.2020.)
5. **Slika 5.** Peptidoglikan. Preuzeto i prilagođeno iz: Maliničova, L., Piknova, M., Pristaš, P., Javorský, P.: *Peptidoglycan hydrolases as novel tool for anti-enterococcal therapy*, *Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 2010. (464).
6. **Slika 6.** Sekundarni strukturni model *B. subtilis tyrS* vodeće RNA. Preuzeto i prilagođeno iz: N.J. Green, F.J. Grundy, T.M. Henkin, *The T-box mechanism: tRNA as a regulatory molecule*, *FEBS Letters* **584**(2) (2009), 319.
7. **Slika 7.** Model interakcije *glyQS* vodeće RNA i tRNA^{Gly}. Preuzeto i prilagođeno iz: J.C. Grigg, Y. Chen, F.J. Grundy, T.M. Henkin, L. Pollack, A. Ke, *T box RNA decodes both the information content and geometry of tRNA to affect gene expression*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**(2013), 7240–7245.
8. **Slika 8.** Prikaz a) strukture vodeće RNA s vezanom aminoaciliranom tRNA i b) mehanizma vezanja akceptorskog kraja neaminoacilirane tRNA i nastanka anititerminatorske strukture. Preuzeto iz A.V. Sherwood, T.M. Henkin, *Riboswitch-Mediated Gene Regulation: Novel RNA Architectures Dictate Gene Expression Responses*, *Annual Review of Microbiology* **70** (2016), 367.
9. **Slika 9.** Mehanizam *T-box* riboprekidač regulacije na razini inicijaciji translacije. Preuzeto iz A.G. Vitreschak, A.A. Mironov, V.A. Lyubetsky, M.S. Gelfand, *Comparative genomic analysis of T-box regulatory systems in bacteria*, *RNA* **14** (2008), 719.

10. **Slika 10.** 1,4-disubstituiran 1,2,3-triazol. Preuzeto iz S. Zhou, J.A. Means, G. Acquah-Harrison, S.C. Bergmeier, J.V. Hines, Characterization of a 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole binding to T Box antiterminator RNA, *Bioorg. Med. Chem.* **20**(2012) 1298-1302.
11. **Slika 11.** Strukture trans-4,5-disupsttuiranog oksazolidinona. Preuzeto iz C.M. Orac, S. Zhou, J.A. Means, D. Boehm, S.C. Bergmeier, J.V. Hines, Synthesis and Stereospecificity of 4,5-disubstituted Oxazolidinone Ligands Binding to T-box Riboswitch RNA, *J Med Chem.* **54**(2011) 6786-679.