

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

KATARINA BELAČIĆ I ANJA KOSTELAC

**Priprema humane seril-tRNA-sintetaze i tRNA<sup>Ser</sup>  
za analizu mistranslacije serinskih kodona**

Zagreb, 2016.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za biokemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ite Gruić - Sovulj i neposrednim voditeljstvom dr. sc. Vlatke Godinić - Mikulčić i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2015. / 2016..

## Popis kratica

aaRS	aminoacil-tRNA-sintetaza
Amp	ampicilin
APS	amonijev persulfat
ATP	adenozin-5'-trifosfat
BMAA	$\beta$ -N-metilamino-L-alanin
BSA	albumin iz seruma goveda
cDNA	komplementarna DNA
hcitSerRS	humana citosolna seril-tRNA-sintetaza
CV	volumen kromatografske kolone
dNTP	deoksiribonukleotid
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
EtBr	3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridinijev bromid (etidijev bromid)
FPLC	brza proteinska tekućinska kromatografija
hcit tRNA <sup>Ser</sup> <sub>AGA</sub>	humana citosolna tRNA s antikodonom AGA koja se acilira serinom
HEPES	<i>N</i> -(2-hidroksietil)piperazin- <i>N'</i> -2-(etansulfonska kiselina)
hmt tRNA <sup>Ser</sup> <sub>TGA</sub>	humana mitohondrijska tRNA s antikodonom TGA koja se acilira serinom
IPTG	izopropil- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid
kb	kilobazni parovi nukleotida
LB	Luria-Bertani (hranjiva podloga)
mtaaRS	mitohondrijska aminoacil-tRNA-sintetaza
mtSerRS	mitohondrijska seril-tRNA-sintetaza
Ni-NTA (agaroza)	nikal-nitrilotrioctena kiselina (agaroza)
NTP	Ribonukleotid
pb	parova baza nukleotida
PCR	lančana reakcija polimerazom
SDS-PAGE	poliakrilamidna denaturirajuća elektroforeza na gelu u prisutnosti natrijevog dodecilsulfata
SDS	natrijev dodecilsulfat
SerRS	seril-tRNA-sintetaza
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletildiamin
Tris	tris(hidroksimetil)aminometan
X-gal	5-brom-4-klor-3-hidroksiindolil- $\beta$ -galaktopiranozid

## SADRŽAJ RADA

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. Mistranslacija .....	1
1.1.1. Neproteinogene aminokiseline .....	1
1.1.1.1. B-N-metilamino-L-alanin (BMAA) .....	2
1.1.1.2. L-norvalin .....	2
1.1.1.3. L-norleucin .....	3
1.2. Mitohondrijske i citosolne humane tRNA .....	3
1.3. Humane aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) .....	6
1.3.1. Humana citosolna seril-tRNA-sintetaza (hcitSerRS) .....	7
1.3.2. Mitohondrijska seril-tRNA-sintetaza (mtSerRS) .....	8
<b>2. HIPOTEZA I CILJEVI RADA</b> .....	<b>12</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>13</b>
3.1. Materijali .....	13
3.1.1. Standardne kemikalije .....	13
3.1.2. Komercijalni kompleti za pročišćavanje DNA .....	13
3.1.3. Enzimi i pripadajući puferi .....	13
3.1.4. Ostali materijali .....	13
3.1.5. Markeri .....	14
3.1.6. Boje .....	14
3.1.7. Sastojci LB hranjive podloge .....	14
3.1.8. Otopine .....	14
3.1.9. Puferi .....	15
3.1.10. Oligonukleotidi .....	18
3.1.11. Plazmidni vektori .....	20
3.1.12. Bakterijski sojevi .....	23
3.2. Metode .....	23
3.2.1. Metode rada s DNA .....	23
3.2.1.1. Kloniranje sintetskih oligonukleotida tRNA .....	23
3.2.1.1.1. Priprema vektora pUC18 za ugradnju sintetskih oligonukleotida tRNA .....	24
3.2.1.1.2. Kinaziranje sintetskih oligonukleotida tRNA i priprema smjese za sparivanje komplementarnih oligonukleotida .....	24
3.2.1.1.3. Ligacija gena za tRNA u vektor pUC18 .....	25
3.2.1.1.4. Identifikacija pozitivnih kolonija plavo bijelom selekcijom .....	25
3.2.1.2. Kloniranje gena za humanu mtSerRS .....	26
3.2.1.2.1. Izolacija gena za humanu mtSerRS pomoću PCR-a .....	26
3.2.1.2.2. Cijepanje krajeva inserta za humanu mtSerRS restrikcijom endonukleazama .....	

.....	26
3.2.1.2.3. Ligacija gena za humanu mtSerRS s vektorom pProEX HTb .....	26
3.2.1.3. Transformacija kompetentnih stanica <i>E. coli</i> metodom kemijske transformacije .....	27
3.2.1.4. Izolacija plazmidne DNA iz bakterijskih stanica .....	27
3.2.1.4.1. Izolacija plazmidne DNA iz prekonodne kulture bakterijskih stanica pomoću QIAprep Spin Miniprep Kit-a.....	27
3.2.1.4.2. Izolacija plazmidne DNA iz prekonodne kulture bakterijskih stanica pomoću QIAfilter plasmid MEGA and GIGA Kit-a.....	27
3.2.1.5. Restriksijske analize.....	28
3.2.1.5.1. Provjera ugradnje željenog gena u plazmid.....	28
3.2.1.5.2. Razgradnja i pročišćavanje plazmidne DNA s ciljem dobivanja kalupa za transkripciju <i>in vitro</i> .....	28
3.2.1.6. Lančana reakcija polimerazom (PCR) .....	29
3.2.1.6.1. Preparativni PCR.....	29
3.2.1.6.2. PCR na bakterijskim kolonijama (eng. <i>colony PCR</i> ) .....	30
3.2.1.6.3. PCR na kalupu pročišćenih plazmida .....	31
3.2.1.7. Elektroforeza molekula DNA u gelu agaroze .....	32
3.2.1.8. Sekvenciranje DNA .....	32
3.2.1.9. Mjerenje koncentracije nukleinskih kiselina .....	33
3.2.2. Metode rada s RNA.....	33
3.2.2.1. <i>In vitro</i> transkripcija molekula tRNA.....	33
3.2.2.2. Pročišćavanje transkripcijske smjese od DNA kalupa.....	34
3.2.2.3. Izolacija molekula tRNA iz gela .....	34
3.2.2.4. Računanje molekulske mase tRNA transkripata .....	34
3.2.2.5. Provjera veličine tRNA transkripata na poliakrilamidnom gelu u prisustvu ureje .....	35
3.2.2.6. Poliakrilamidna gel-elektroforeza tRNA pri denaturirajućim uvjetima u prisutnosti ureje .....	35
3.2.2.7. Bojanje poliakrilamidnih gelova toluidinom .....	35
3.2.3. Metode rada s proteinima.....	35
3.2.3.1. Indukcija proizvodnje mitohondrijskog proteina SerRS .....	35
3.2.3.2. Afinitetno pročišćavanje proteina na Ni-NTA agarozima.....	36
3.2.3.3. Određivanje prisutnosti proteina po Bradfordu.....	36
3.2.3.4. Poliakrilamidna denaturirajuća elektroforeza na gelu u prisutnosti natrijevog deodecil-sulfata .....	37

3.2.3.5.	Bojanje proteina razdvojenih na poliakrilamidnom gelu bojom <i>Coomassie Brilliant Blue</i> .....	37
3.2.3.6.	Određivanje koncentracije proteina spektrofotometrom .....	37
3.2.3.7.	Pročišćavanje proteina ionskom izmjenom pomoću brze proteinske tekućinske kromatografije .....	38
3.2.3.8.	Koncentriranje proteina u otopini .....	38
3.2.3.9.	Kinetičke metode: aktivacija serina i BMAA mjerena ATP/PP <sub>i</sub> izmjenom .....	38
3.2.3.10.	Kinetičke metode: aminoaciliranje .....	40
<b>4.</b>	<b>REZULTATI</b> .....	<b>41</b>
4.1.	Konstrukcija rekombinantnih plazmida za transkripciju molekula tRNA <i>in vitro</i> ....	41
4.1.1.	Kloniranje gena za tRNA u pUC18 vektor .....	41
4.1.2.	Transformacija bakterija <i>E. coli</i> soja DH5α s pUC18-tRNA i selekcija pozitivnih kolonija.....	41
4.1.3.	Provjera ugradnje gena za tRNA u vektor pUC18 .....	42
4.1.3.1.	Izolacija plazmidne DNA iz bakterijskih stanica i restrikcijska analiza s ciljem provjere ugradnje gena za hmt tRNA <sup>Ser<sub>TGA</sub></sup> u vektor pUC18 .....	42
4.1.3.2.	Provjera ugradnje hcit tRNA <sup>Ser<sub>AGA</sub></sup> u pUC18 vektor kolonijskim PCR-om .....	44
4.1.3.3.	Transformacija bakterija <i>E. coli</i> soja BL21 s pUC18 koji sadrži gen za tRNA .....	45
4.2.	Sekvenciranje rekombinantnih pUC18 vektora s tRNA insertima .....	46
4.2.1.	Sekvenciranje pročišćenih pUC18 vektora s ugrađenim hmt tRNA <sup>Ser<sub>TGA</sub></sup> genima .....	46
4.2.2.	Sekvenciranje pročišćenih pUC18 vektora s ugrađenim hcit tRNA <sup>Ser<sub>AGA</sub></sup> genima .....	47
4.3.	Priprema sustava za <i>in vitro</i> transkripciju tRNA iz pročišćene rekombinantne plazmidne DNA .....	47
4.3.1.	Pročišćavanje rekombinantne plazmidne DNA.....	47
4.3.2.	Probna <i>in vitro</i> transkripcija .....	48
4.3.3.	Optimiranje <i>in vitro</i> transkripcije hcit tRNA <sup>Ser<sub>AGA</sub></sup> .....	49
4.4.	<i>In vitro</i> transkripcija i izolacija tRNA transkripata .....	50
4.5.	Provjera izoliranih tRNA transkripata.....	51
4.6.	Predikcija signalne sekvence, dizajn početnica i sinteza gena za humanu mtSerRS preparativnim PCR-om.....	52
4.7.	Konstrukcija rekombinantnih plazmida za ekspresiju humane mtSerRS <i>in vivo</i> ...54	
4.7.1.	Ugradnja PCR produkata gena za humanu mtSerRS u vektor pProEX HTb .....	54
4.7.2.	Transformacija bakterija <i>E. coli</i> soja DH5α s pProEX HTb-mtSerRS i selekcija pozitivnih kolonija .....	55

4.8.	Sekvenciranje rekombinantnih vektora s ugrađenim genom za humanu mtSerRS .....	58
4.8.1.	Sekvenciranje pročišćenih vektora pOTB7 s ugrađenim cDNA mtSerRS .....	59
4.8.2.	Sekvenciranje pročišćenih vektora pProEX HTb s ugrađenim mtSerRS varijantama .....	59
4.9.	Pročišćavanje proteina SerRS eksprimiranog <i>in vivo</i> u <i>E. coli</i> soja BL21 .....	60
4.9.1.	Pročišćavanje humane citosolne SerRS.....	60
4.9.2.	Pročišćavanje humane mitohondrijske SerRS.....	60
4.9.2.1.	Provjera indukcije humane mitohondrijske SerRS .....	60
4.9.2.2.	Pročišćavanje d34 mtSerRS i optimizacija kromatografije na Ni-NTA agarozu .....	61
4.9.2.3.	Optimizacija ionske izmjene na kromatografskom sustavu AKTA.....	65
4.9.2.4.	Pročišćavanje humane mitohondrijske SerRS optimiranim metodama iz 4l kulture stanica <i>E. coli</i> .....	70
4.10.	Aktivnost mtSerRS i citSerRS u reakciji aktivacije i aminoacilacije serina i BMAA .....	73
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA.....</b>	<b>77</b>
5.1.	Kloniranje i <i>in vitro</i> transkripcija hcit tRNA <sup>Ser</sup> <sub>AGA</sub> i hmt tRNA <sup>Ser</sup> <sub>TGA</sub> .....	77
5.2.	Predikcija signalne sekvence humane mtSerRS .....	78
5.3.	Indukcija ekspresije varijanta mtSerRS d21 i d34.....	79
5.4.	Pročišćavanje d21 i d34 mtSerRS kromatografskim metodama .....	79
5.5.	Aktivnost mtSerRS i citSerRS u reakciji aktivacije i aminoacilacije serina i BMAA .....	81
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČAK.....</b>	<b>83</b>
<b>7.</b>	<b>ZAHVALE.....</b>	<b>84</b>
<b>8.</b>	<b>POPIS LITERATURE .....</b>	<b>85</b>
<b>9.</b>	<b>SAŽETAK.....</b>	<b>88</b>
<b>10.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>90</b>

## 1. Uvod

### 1.1. Mistranslacija

Translacija je biokemijski proces koji opisuje dirigitiranu ugradnju aminokiselina u novosintetizirani polipeptid. Slijed aminokiselina u polipeptidu je određen slijedom nukleotida u mRNA nastalu transkripcijom odgovarajućeg slijeda nukleotida u DNA. Tijekom procesa translacije ribosom čita kodone u mRNA tako što ih sparuje s tRNA koje imaju antikodon komplementaran kodonu i, u pravilu, svaka tRNA je aminoacilirana aminokiselinom koju određuje taj kodon prema pravilima genetičkog koda (Leningher, 2008). U posebnim uvjetima može doći do ugradnje neodgovarajuće aminokiseline u polipeptid – ta pojava se naziva mistranslacija. Mistranslacija može biti uzrokovana ugradnjom aminokiselina na pogrešno mjesto, odnosno ugradnjom aminokiseline na mjesto kodona koji ne kodira ugrađenu aminokiselinu ili ugradnjom neproteinogene aminokiseline u peptid. U uvjetima *in vivo* vjerojatnost pogreške tijekom translacije je mala - 1:1000-10000 aminokiselina se prosječno netočno ugrađuje u proteine (Edelmann, 1977). Stanica održava nizak stupanj pogreške mnoštvom mehanizama koji sprečavaju pogreške u biosintezi proteina. Jedan od najvažnijih faktora sprečavanja pogreške, uz ostale, su aminoacil-tRNA-sintetaze koje imaju razrađen mehanizam razlikovanja pripadne od nepripadne aminokiseline i tRNA (Gromadski, 2004). Taj mehanizam popravka pogreške može biti prije prijenosa aktivirane nepripadne aminokiseline na tRNA u aktivnom mjestu aaRS ili nakon prijenosa u posebnoj domeni za popravak (Leningher, 2008). Neurodegenerativne bolesti su poremećaji koji zahvaćaju neurone središnjeg živčanog sustava. Pošto neuroni nemaju sposobnost diobe, pogreške prilikom translacije proteina se akumuliraju i imaju za posljedicu neurodegeneraciju i poremećaj živčanih funkcija. Neurodegenerativne bolesti su često prouzročene proteinima neuređene strukture koji agregiraju, a zbog toga se takvi poremećaji nazivaju 'proteinopatije'. Ugradnja nepripadnih aminokiselina može uzrokovati proteinske agregacije (Dunlop, 2013). Jedan od glavnih faktora ugradnje nepripadnih/neproteinogenih aminokiselina u proteine su pogreške aminoacil-tRNA-sintetaza (Sauter, 2015). Dokazano je da su mutacije ovih enzima povezane s pojavom neurodegenerativnih bolesti (Sauter, 2015).

#### 1.1.1. Neproteinogene aminokiseline

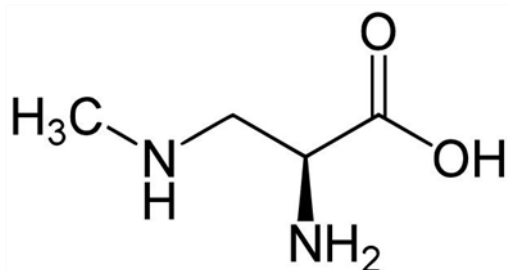
Neproteinogene aminokiseline su aminokiseline koje ne grade proteine, ali postoje u stanici kao intermedijeri različitih biokemijskih puteva. Zbog svoje sličnosti s proteinogenim aminokiselinama potencijalno se mogu ugrađivati u proteine. Ugradnja u proteine se najčešće događa zbog misacilacije tRNA neproteinogenom aminokiselinom jer su neke



od njih dobri supstrati za aaRS koje ih ne prepoznaju kao pogrešne. Neproteinogene aminokiseline zbog svojih karakterističnih kemijskih svojstava narušavaju funkcionalnost proteina te u nekim slučajevima uzrokuju proteinsku agregaciju (Bell, 2009). Smatra se da su neurodegenerativne bolesti prouzročene ugradnjom nekih neproteinogenih aminokiselina. Parkinsonova bolest, amiotrofična lateralna skleroza i Alzheimerova bolest su samo neke od bolesti za koje se pretpostavlja da su uzrokovane mistranslacijom neproteinogenih aminokiselina (Dunlop, 2013).

#### 1.1.1.1. $\beta$ -N-metilamino-L-alanin (BMAA)

$\beta$ -N-metilamino-L-alanin ili BMAA (kemijska formula  $C_4H_{10}N_2O_2$ ) je derivat L-alanina s metilnom skupinom na bočnom ogranku (Slika 1.1.) (Bell, 2009). BMAA je produkt metabolizma simbiotskih i slobodnoživućih cijanobakterija koje nastanjuju bočate i svježe vode. Prilikom naglog porasta populacija cijanobakterija, tzv. cvjetanja mora, dolazi do oslobađanja velikih količina BMAA. Zbog sveprisutnosti cijanobakterija u okolištu te svojstava kao neurotoksina, biokemijsko istraživanje toksičnosti BMAA je postalo važno kako bi se došlo do saznanja o njenim potencijalnim učincima na čovjeka (Cox, 2005). U uvjetima *in vitro* je pokazano da ugrađena BMAA uzrokuje apoptozu neuroblastoma (Dunlop, 2009). Također je pokazano da L-serin inhibira ugrađnju BMAA u proteine (Main, 2015). Pretpostavlja se da je ugrađnja BMAA u proteine jedan od uzroka agregiranja funkcionalno aktivnih proteina te je zbog toga potencijalno jedan od uzroka, između ostalog, amiotrofične lateralne skleroze (ALS) i Alzheimerove bolesti (Dunlop, 2013). Tijekom 2014. godine pokrenuta je globalna akcija osvještavanja javnosti o ALS-u nazvana 'ALS Ice Bucket Challenge' u kojoj su sudionici donirali novac ako su uspjeli zaliti se posudom punom leda.

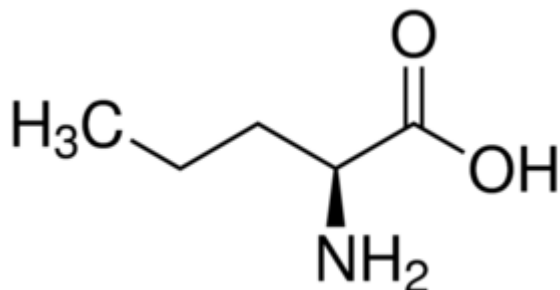


**Slika 1.1.** Struktura  $\beta$ -N-metilamino-L-alanin (BMAA).

#### 1.1.1.2. L-norvalin

L-norvalin ili Nva (kemijska formula  $C_5H_{11}NO_2$ ) je derivat proteinogene aminokiseline L-valina bez jedne metilne skupine (Slika 1.2.). L-norvalin je jedan od nusprodukata

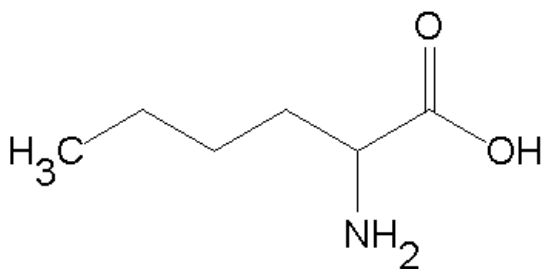
metabolizma aminokiselina u *E.coli* koji se u uvjetima manjka kisika može akumulirati do milimolarne koncentracije (Soini, 2008). Njegovu ugradnju u proteine sprječava popravak pogreške aminoacil-tRNA-sintetaza (Cvetesic, 2014). U uvjetima ljudskog organizma smatra se da L-norvalin sprječava kardiovaskularne bolesti, ali i liječi upalne procese kardiovaskularnog sustava (Ming, 2009).



**Slika 1.2.** Struktura L-norvalina

### 1.1.1.3. L-norleucin

L-norleucin ili Nle (kemijska formula C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>) je derivat proteinogene aminokiseline L-leucina bez jedne metilne skupine (Slika 1.3.). Amiloidni-beta-peptid (AbetaP) je neurotoksin koji djeluje na neurone te uzrokuje degeneraciju živčanog sustava i pad kognitivnih funkcija. AbetaP je glavni konstituent plakova Alzheimerove bolesti. Utvrđeno je u uvjetima *in vitro* da ugradnja norleucina umjesto metionina u protein uzrokuje redukciju stvaranja i nakupljanja plakova te tako smanjuje širenje bolesti (Clementi, 2005).



**Slika 1.3.** Struktura L-norleucina.

## 1.2. Mitohondrijske i citosolne humane tRNA

Humani mitohondrijski genom kodira 13 proteina koji se nalaze u sastavu kompleksa koji čine respiratorni lanac na unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani. Sinteza tih proteina događa se na mitohondrijskim ribosomima uz pomoć 22 različite molekule tRNA koje su također kodirane mitohondrijskim genomom. Humane mitohondrijske tRNA su probudile interes znanstvenika otkrićem poveznice između točkastih mutacija u humanim

mitohondrijskim tRNA genima i brojnih neuromuskularnih i neurodegenerativnih poremećaja (Florentz, 2003). U mitohondrijskom genomu postoji 22 različita gena za humane mitohondrijske tRNA, po jedan za svaku aminokiselinu s izuzecima za aminokiseline leucin i serin za koje postoje dva različita gena za mitohondrijsku tRNA<sup>Leu</sup>, odnosno mitohondrijsku tRNA<sup>Ser</sup>. Dvije različite mitohondrijske tRNA specifične za aminokiselinu serin su tRNA<sup>Ser</sup><sub>GCT</sub> s 8 kopija gena i tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> sa 6 kopija gena (Tablica 1.) u mitohondrijskom genomu. Mitohondrijske tRNA<sup>Ser</sup><sub>GCT</sub> i TGA dešifriraju odgovarajuće kodone koji određuju ugradnju serina u protein (Florentz, 2003).

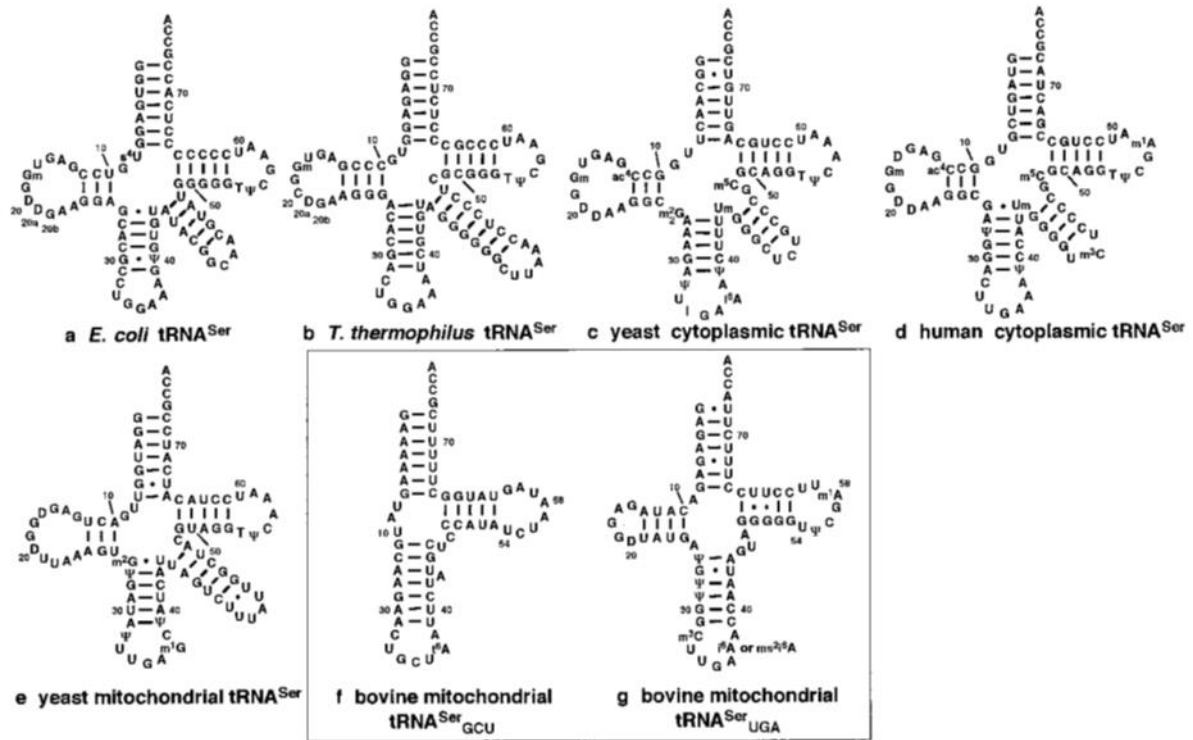
**Tablica 1.1.** Šest izoakceptorskih tRNA<sup>Ser</sup> (citosolnih i mitohondrijskih) i broj gena u genomu koji kodiraju pojedinu izoakceptorsku tRNA<sup>Ser</sup>. Mt označava mitohondrijske tRNA<sup>Ser</sup> kodirane mitohondrijskim genomom.

(Preuzeto s <http://qtrnadb.ucsc.edu/genomes/eukaryota/Hsapi19/Hsapi19-align.html#Ser>)

Izoakceptorska tRNA	Broj tRNA gena za pojedini antikodon						Ukupno
	AGA	GGA	CGA	TGA (mt)	ACT	GCT (mt)	
Ser	12	1	4	6	1	8	32

U radu su korištne tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> i tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> izoakceptorske tRNA. Humane mitohondrijske tRNA sadrže strukturne karakteristike koje više ili manje odstupaju od klasične (kanonske) strukture citosolnih tRNA čija je sekundarna struktura oblika lista dijeteline, a tercijarna poprima oblik slova L. Struktura tRNA je temelj njihove funkcije. Struktura dijeteline sadrži točno definirane karakteristike koje uključuju veličinu peteljki i petlji i prisutnost brojnih konzerviranih nukleotida na strateškim položajima (Florentz, 2003). Sekundarna struktura tRNA definirana je s četiri peteljke: akceptorska peteljka čiji 3' kraj nosi esterificiranu aminokiselinu na 2' ili 3' OH skupini riboze adenilata, dihidrouridinska peteljka ili D-peteljka, TψC peteljka i antikodonska peteljka na čijem kraju petlja sadrži antikodon. Neke tRNA sadrže dodatnu strukturu tzv. varijabilnu ruku (npr. humana citosolna tRNA<sup>Ser</sup>) koja se nalazi između TψC i antikodonske peteljke i može biti različitih duljina (Lehninger, 2008). Dok neke humane mt tRNA imaju strukturu oblika dijeteline sličnu onoj kanonskoj, neke se razlikuju strukturom od kanonskog oblika te ih se naziva 'bizarnim' tRNA (Slika 1.4.). Obje humane mitohondrijske tRNA<sup>Ser</sup> pripadaju u skupinu 'bizarnih' tRNA. Za razliku od humane citosolne tRNA<sup>Ser</sup>, humane mitohondrijske tRNA<sup>Ser</sup> nemaju produženu

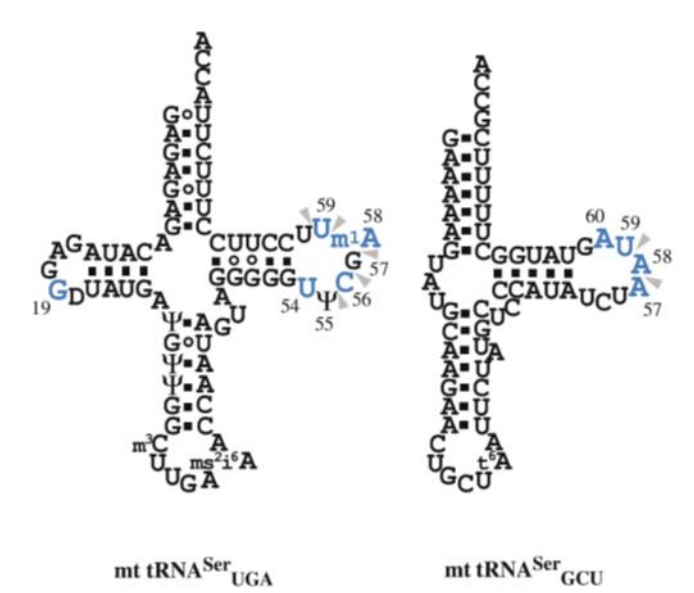
varijabilnu domenu koja je važna za prepoznavanje citosolne tRNA<sup>Ser</sup> citosolnom SerRS (Florentz, 2003). tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> ima neobičnu strukturu oblika dijeteline s produljenom antikodonskom petljom od 6 parova baza, nema očuvanu bazu U8 i ima malu D-petlju, dok tRNA<sup>Ser</sup><sub>GCT</sub> ima kraću konektor 1 domenu i nedostaje joj cijela D-peteljka s D-petljom u odnosu na humanu citosolnu tRNA<sup>Ser</sup> (Chimnaronk, 2005).



**Slika 1.4.** Sekundarne strukture tRNA<sup>Ser</sup> iz nekoliko organizama. a) *E. coli* tRNA<sup>Ser</sup>, b) *T. thermophilus* tRNA<sup>Ser</sup>, c) kvaščeva citoplazmatska tRNA<sup>Ser</sup>, d) humana citoplazmatska tRNA<sup>Ser</sup>, e) kvaščeva mitohondrijska tRNA<sup>Ser</sup>, f) goveđa tRNA<sup>Ser</sup><sub>GCT</sub>, g) goveđa mitohondrijska tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> (Yokogawa, 2000).

AaRS razlikuju pojedine tRNA s vrlo visokom selektivnošću birajući između mnogo strukturno sličnih tRNA. Kako bi se izbjegla pogrešna aminoacilacija tRNA, odnosno pogrešno prepoznavanje tRNA od strane aaRS unutar tRNA postoje identitetni elementi koje prepoznaje samo ispravna aaRS. Identitetni elementi se najčešće nalaze unutar antikodona, akceptorske peteljke i 'diskriminatorne' baze na položaju 73 (Yokogawa, 2000). Biokemijska istraživanja identitetnih elemenata tRNA<sup>Ser</sup> iz *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Homo sapiens* pokazala su da se glavni element odgovoran za prepoznavanje prokariotskih i eukariotskih citosolnih tRNA<sup>Ser</sup> od strane SerRS nalazi unutar varijabilne ruke (Yokogawa, 2000). Pošto obje humane mitohondrijske tRNA<sup>Ser</sup> nedostaje varijabilna ruka mehanizam prepoznavanja humanih mitohondrijskih tRNA<sup>Ser</sup> od strane humane

mtSerRS ne može se temeljiti na identitetnim elementima u varijabilnoj ruci kao što je to slučaj s prokariotskim i eukariotskim citosolnim tRNA<sup>Ser</sup> (Yokogawa, 2000). Eksperimentima na goveđim mitohondrijskim tRNA<sup>Ser</sup> ustanovljeno je da se identitetni elementi koje prepoznaje goveđa mtSerRS nalaze u T petlji (Slika 1.5.) (Chimnaronk, 2005).

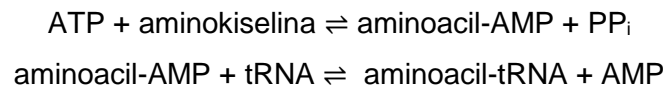


**Slika 1.5.** Sekundarne strukture mt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> i mt tRNA<sup>Ser</sup><sub>GCT</sub> iz *Bos taurus* (divlje govedo). Identitetni elementi dobiveni mutagenetičkim istraživanjima delecijom pojedinih nukleotida u tRNA su označeni plavim slovima (delecija plavo označenih nukleotida je rezultirala smanjenim prepoznavanjem mitohondrijske tRNA<sup>Ser</sup> od strane mtSerRS iz *Bos taurus*). Identitetni elementi dobiveni metodom otiska prsta kojom se spriječila interakcija mt SerRS s određenim nukleotidima su označeni glavom strelice (spriječavanje interakcija s nukleotidima označenih glavom strelice je rezultiralo smanjenim prepoznavanjem mitohondrijske tRNA<sup>Ser</sup> od strane mtSerRS iz *Bos taurus*) (Chimnaronk, 2005).

### 1.3. Humane aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS)

Tijekom prve faze sinteze proteina aminoacil-tRNA-sintetaze esterificiraju pripadnu aminokiselinu na pripadnu tRNA koja nosi antikodon koji je komplementaran kodonu koji kodira za pripadnu aminokiselinu. Svaka aminoacil-tRNA-sintetaza je specifična za jednu aminokiselinu i jednu ili više pripadnih (izoakceptorskih) tRNA. Izoakceptorske tRNA su molekule tRNA koje se aciliraju istom aminokiselinom, a posjeduju različiti antikodon. Antikodoni su komplementarni kodonima na mRNA. Sinonimni kodoni su kodoni koji kodiraju za istu aminokiselinu, a imaju različiti nukleotidni slijed. Većina organizama imaju po jednu aminoacil-tRNA-sintetazu za svaku aminokiselinu. Aminoacil-tRNA-sintetaze kataliziraju aminoacilaciju molekula tRNA u dva koraka: 1. aktivacija pripadne

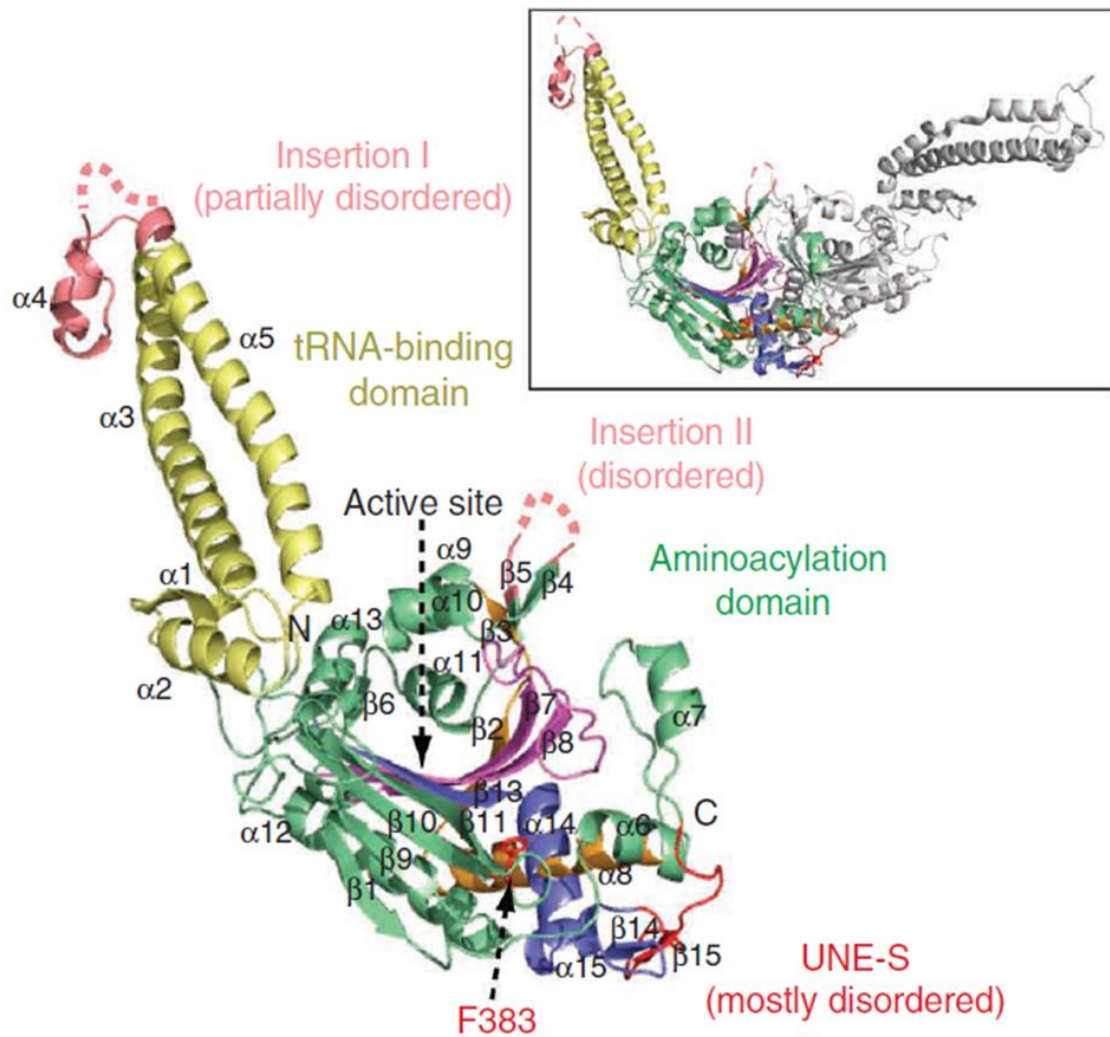
aminokiseline uz pomoć ATP-a i nastajanje aminoacil-adenilatnog međuprodukta i 2. prijenos aktivirane aminokiseline na 2' ili 3'-OH skupinu riboze adenilata na 3'-kraju pripadne tRNA.



Pojedina aaRS mora biti specifična ne samo za pojedinačnu aminokiselinu već i za određene tRNA. Diskriminacija pojedinih tRNA pomoću aaRS je vrlo važna za sveukupnu vjernost u biosintezi proteina kao što je i razlikovanje pojedinih aminokiselina (Lehninger, 2008).

### **1.3.1. Humana citosolna seril-tRNA-sintetaza (hCitSerRS)**

Humana citosolna seril-tRNA-sintetaza (hCitSerRS) pripada u razred II aminoacil-tRNA-sintetaza. Aminoacil-tRNA-sintetaze razreda II su homodimeri i prenose aminokiselinu direktno na 3'OH skupinu riboze adenilata na 3' kraju tRNA. Kristalna struktura humane citosolne SerRS određena je na atomskoj rezoluciji 2.9 Å (Slika 1.6.). Konformacija aminoacilacijske domene je jednaka u sva tri homodimera jedne asimetrične jedinice. N-terminalna tRNA-vezna domena ima fleksibilnu strukturu. C-terminalni kraj koji sadrži tzv. UNE-S domenu (sadrži slijed za usmjeravanje u jezgru) ima neuređenu strukturu u svih šest podjedinica što ukazuje na dinamičnost konformacije slijeda za usmjeravanje u jezgru koja povećava njenu pristupačnost od strane molekula zaduženih za transport citosolne SerRS u jezgru (Xu, 2012).



**Slika 1.6.** Kristalna struktura jedne podjedinice homodimera humane citosolne SerRS. Sekundarne strukture su označene vrpčastim dijagramom. Motivi 1, 2 i 3 unutar aminoacilacijske domene su prikazani narančastom, ljubičastom i plavom bojom. Umetak: SerRS dimer sa drugom podjedinicom obojanom sivo. Dimerizacija SerRS se odvija preko aminoacilacijske domene (Xu, 2012).

### 1.3.2. Mitohondrijska seril-tRNA-sintetaza (mtSerRS)

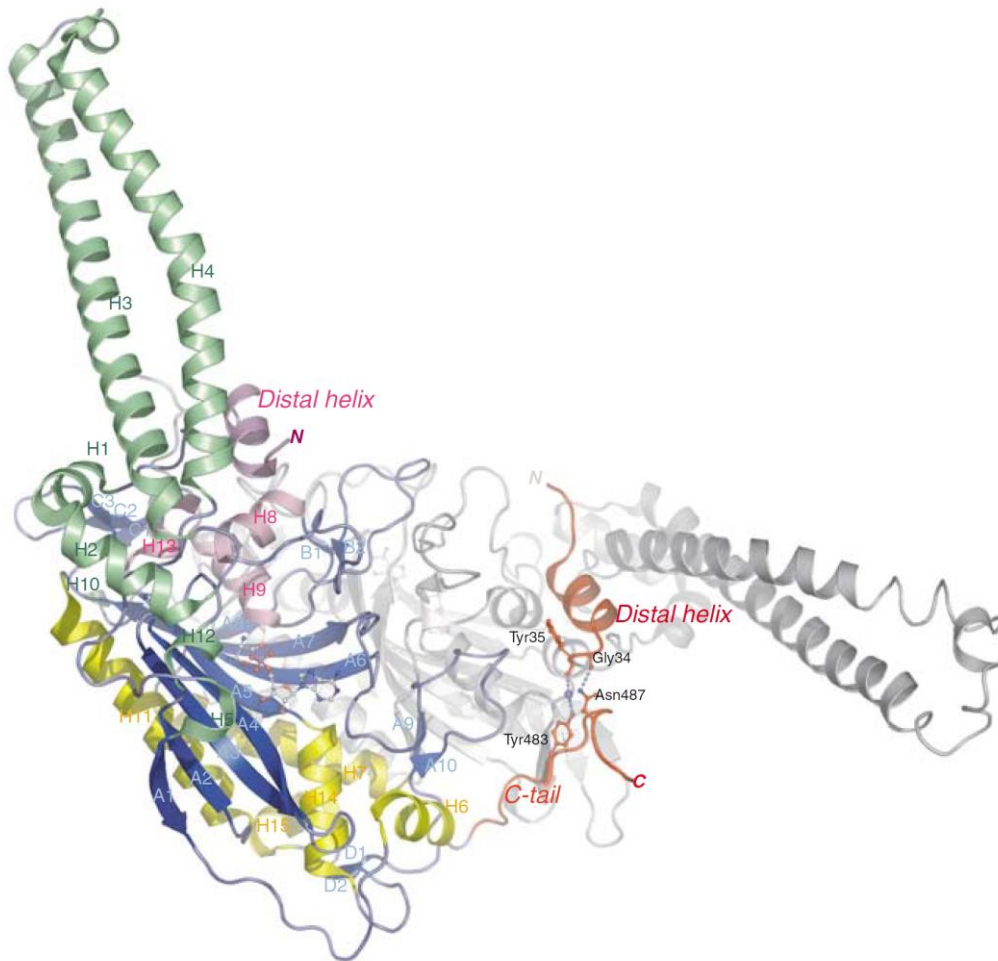
Mitohondrijske aminoacil-tRNA-sintetaze (mtaaRS) su kodirane jezgrinim genomom, sintetiziraju se u citoplazmi i transportiraju u mitohondrije. Humane mtaaRS na svom N-kraju sadrže slijed aminokiselina koji služi kao signalni slijed usmjeravanja proteina u mitohondrije. Za različite humane mtaaRS različita je duljina i sastav signalne sekvence, a može se sastojati od 18 do 54 aminokiselina. Signalne sekvence koje usmjeravaju proteine u mitohondrije, iako se razlikuju po duljini i slijedu aminokiselina, obavljaju istu funkciju zbog prisutnosti brojnih pozitivno nabijenih aminokiselina i zbog stvaranja sekundarne strukture u obliku amfipatske  $\alpha$ -uzvojnice. Nakon unosa humane mtaaRS u

mitohondrij dolazi do cijepanja signalne sekvence pomoću mitohondrijske procesirajuće proteaze (MPP) i mitohondrijske intermedijerne peptidaze (MIP) (Sissler, 2013).

Biokemijska istraživanja mtaaRS u sisavaca su rađena na enzimskim ekstraktima iz tkiva jetre štakora, goveda, humane placentе i HeLa staničnih linija. Aktivnost mtSerRS ustanovljena je u svim ekstraktima, a njeno pročišćavanje je bilo najuspješnije iz enzimskog ekstrakta tkiva jetre goveda. Geni koji kodiraju pet humanih ili govedih mtaaRS su definirani i klonirani, enzimi su nadeksprimirani i analizirana su njihova strukturalna i funkcionalna svojstva. Među njima su humane mtPheRS, mtLeuRS, mtLysRS i mtTrpRS te goveđa mtSerRS (Sissler, 2013).

Određena je kristalna struktura mtSerRS iz *Bos taurus* (divlje govedo) u kompleksu sa seril-adenilatом na atomskoj rezoluciji 1.65Å (Slika 1.7.) (Chimnarоnk, 2005). Do sada, ovo je prva određena strukturalna aaRS iz organela s visokom rezolucijom naspram velikom broju drugih poznatih cijelokupnih strukturalna aaRS. MtSerRS iz *Bos taurus* je homodimer, što je zajedničko svojstvo aaRS razreda II kojem pripada i citosolna SerRS. N-terminalna domena mtSerRS sadrži produžetke koji se sastoje od kratkih  $\alpha$ -uzvojnica građenih od 25 do 33 aminokiselina povezane sa zavojnicom H1 s kojom tvore zavojnica-omča-zavojnica motiv. Na vrhu  $\alpha$ -zavojnice nalazi se dodatna strukturalna element u obliku omče jedinstven za mtSerRS, a sastoji se većinom od polarnih aminokiselina. N-terminalna zavojnica se naziva 'distalna zavojnica' i ona je jedinstvena i visoko konzervirana strukturalna unutar aaRS mitohondrija sisavaca. C-terminalna globularna domena u kojoj se nalazi aktivno mjesto je građena od osmerolančane  $\beta$ -ploče obuhvaćene s tri snopa zavojnica. Na C-kraju se također nalazi jedinstvena dodatna strukturalna 'C-rep' koja ima oblik 4 nm duge, fleksibilne omče koja se proteže izvan tijela monomera. 'C-rep' se nalazi na poleđini druge podjedinice i stvara interakcije unutar monomera kojima doprinosi dimernoj površini (Chimnarоnk, 2005).

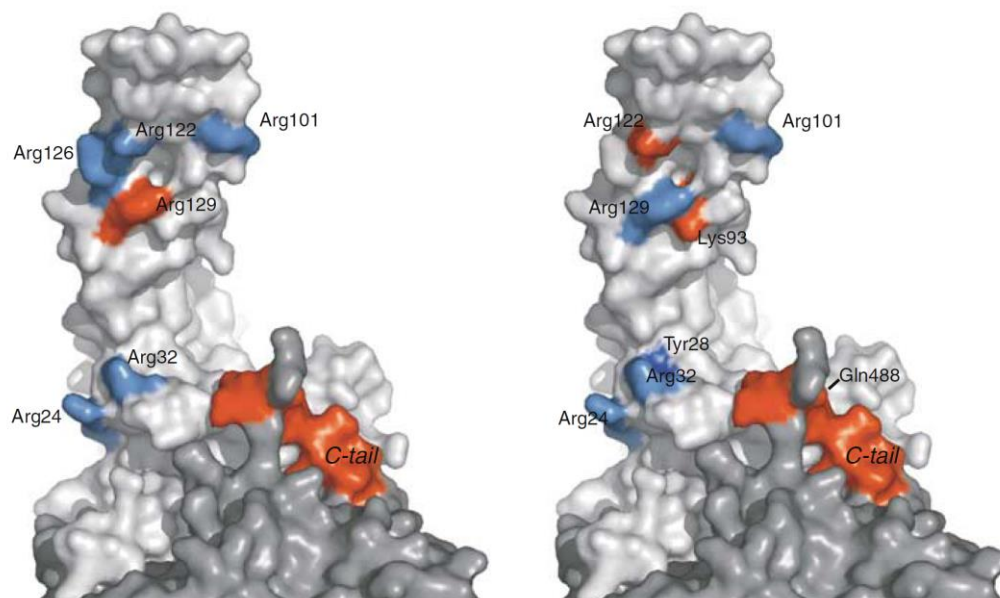




**Slika 1.7.** Vrpčasti dijagram trodimenzionalne kristalne strukture mtSerRS iz *Bos taurus* pri 1.65Å. Različitim bojama su označena tri snopa  $\alpha$ -uzvojnica i niti  $\beta$ -ploča. N-treminalni distalni heliks (monomera 2) i C-rep (monomera 1) su obojani ružičasto, odnosno crveno štapičastim dijagramom koji pokazuje međusobne interakcije tih dviju domena. Drugi monomer je pokazan sivim vrpčama zbog jasnoće (Chimnaronk, 2005).

Kombinacijom strukturnih informacija s modelom prepoznavanja mitohondrijskih tRNA<sup>Ser</sup> i mutagenetičkim istraživanjima otkrili su se ključni elementi odgovorni za specifičnosti vezanja mitohondrijskih tRNA<sup>Ser</sup> i mtSerRS koji se razlikuju od svih ostalih poznatih mehanizama vezanja aaRS i tRNA kod bakterija i eukariota (Chimnaronk, 2005). Istraživanjima na mtSerRS i njenim mehanizmima prepoznavanja tRNA ustanovilo se da mtSerRS aminoacilira tRNA<sup>Ser</sup> iz *E. coli* s raznim antikodonskim sekvencama koje SerRS iz *E. coli* ne bi aminoacilirala (Kumazawa, 1991). To je ukazalo da glavni identitetni elementi prepoznavanja mt tRNA<sup>Ser</sup> od strane mtSerRS nisu isti identitetnim elementima za prepoznavanje *E. coli* tRNA<sup>Ser</sup> od strane SerRS iz *E. coli* i da antikodonski slijed možda nema bitnu ulogu u procesu diskriminacije mt tRNA od strane mtaaRS (Kumazawa, 1991). Humana mtSerRS aminoacilira tRNA<sup>Ser</sup><sub>GCT</sub> koja je komplementarna kodonu AGY (Y=U ili

C) i tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> koja je komplementarna kodonu UCN (N=A, G, C i U) (Chimnaronk, 2005). Ustanovljen je jedinstveni dvojni način prepoznavanja goveđe mtSerRS alternativnom kombinacijom interakcijskih mjesta kako bi ona diskriminirala između dviju goveđih mt tRNA<sup>Ser</sup> (Chimnaronk, 2005). Zbog nedostatka u analogiji primarnih i sekundarnih struktura dviju goveđih mitohondrijskih tRNA<sup>Ser</sup>, goveđa mtSerRS stvara različite kombinacije mjesta prepoznavanja goveđih mitohondrijskih tRNA<sup>Ser</sup> i međusobno ih razlikuje „skenirajući“ šećerno-fosfatnu zavojnicu tRNA<sup>Ser</sup> koristeći bazične aminokiseline distalnog heliksa (Slika 1.8.).



**Slika 1.8.** Aminokiseline uključene u prepoznavanje goveđe mitohondrijske tRNA<sup>Ser</sup><sub>GCT</sub> (lijevo) i goveđe mitohondrijske tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> (desno) označene na površini dimerne strukture (svijetlo i tamno sivo za svaki monomer) goveđe mtSerRS. Efektivna mjesta su obojana plavo, kritične aminokiseline su obojane crveno (Chimnaronk, 2005).

## 2. Hipoteza i ciljevi rada

Pretpostavlja se da se neproteinogena aminokiselina BMAA ugrađuje u proteine umjesto L-serina. Dokazano je da cijeli kaskadni proces apoptoze koji započinje aktivacijom kaspaze-3 potiče ugradnja BMAA u protein. Aktivnost kaspaze-3 je reducirana dodatkom L-serina. Također, aktivnost lizozima, odnosno lizosomalnih proteaza katepsina L i B je bila smanjena dodatkom BMAA u prisutnosti L-serina (Main, 2015). Prema tome, može se zaključiti da L-serin kompetira BMAA za ugradnju u proteine. Navedeni podaci sugeriraju da enzim seril-tRNA-sintetaza ima ulogu pri ugradnji BMAA u proteine. Stoga je hipoteza ovog rada da će humana mitohondrijska i/ili citosolna seril-tRNA-sintetaza aktivirati BMAA i prenositi ju na pripadnu tRNA<sup>Ser</sup>.

Ciljevi rada: eksperimentalni dio rada se sastojao od tri dijela. Prvi dio bio je prirediti rekombinantne plazmide s ugrađenim genima za humanu citosolnu tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> i humanu mitohondrijsku tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> te *in vitro* transkripcijom proizvesti preparativnu količinu hčit tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> i hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub>. Drugi dio bio je *in vivo* nadeksprimirati humanu mitohondrijsku seril-tRNA-sintetazu u bakteriji *E.coli* soja BL21 obzirom na različite predikcije signalne sekvence te pročistiti enzim kromatografskim metodama. Treći dio bio je provjeriti hoće li enzimi mitohondrijska seril-tRNA-sintetaza i/ili citosolna seril-tRNA-sintetaza aktivirati L-serin i/ili BMAA i prenjeti aktiviranu BMAA na pripadne tRNA<sup>Ser</sup>.

### 3. Materijali i metode

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Standardne kemikalije

Akrilamid (*Sigma*), ampicilin (*Sigma*), APS (*Sigma*),  $\beta$ -merkaptetoetanol (*Sigma*), ditioneitol (DTT) (*Sigma*), EDTA (*Sigma*), etanol (*Kemika*), EtBr (*Boehringer Mannheim*), fenol (*Kemika*), fosfatna kiselina (*Kemika*), glicerol (*Kemika*), glicin (*USB Corporation*), HEPES (*Sigma*), imidazol (*Sigma*), izopropanol (*Alkaloid*), kalijev acetat (*Kemika*), kalijev dihidrogenfosfat (*Kemika*), kalcijev klorid (*Kemika*), kloridna kiselina (*Kemika*), kloroform (*Kemika*), magnezijev klorid (*Fluka*), metanol (*Carlo Erba*), *N,N'*-metilenbisakrilamid (*Merck*), natrijev klorid (*Kemika*), polietilenglikol 8000 (PEG) (*Sigma*), SDS (*Sigma*), spermidin (*Sigma*), TEMED (*Sigma*), Tris (*Sigma*), Tween 20 (*Sigma*), urea (*Acros organics*), X-gal (*Sigma*).

##### 3.1.2. Komercijalni kompleti za pročišćavanje DNA

QIAprep Spin Miniprep Kit (*Qiagen*) i QIAfilter plasmid MEGA and GIGA Kit (*Qiagen*) za izolaciju plazmidne DNA, QIAquick Gel Extraction Kit (*Qiagen*) za izolaciju DNA iz agaroznih gelova.

##### 3.1.3. Enzimi i pripadajući puferi

AmpliTaq Gold DNA-polimeraza (*New England Biolabs*), pufer za AmpliTaq Gold DNA-polimerazu (*New England Biolabs*), anorganska pirofosfataza (IPPaza) (s amonijevim sulfatom) (*Sigma*), anorganska pirofosfataza (IPPaza) (bez amonijeva sulfata) (*New England Biolabs*), restrikcijska endonukleaza BamHI (*New England Biolabs*), DNaza (*New England Biolabs*), DNA-ligaza (*New England Biolabs*), pufer za DNA-ligazu (*New England Biolabs*), restrikcijska endonukleaza EcoRI (*New England Biolabs*), lizozim (*Sigma*), pufer NEBuffer 3 (*New England Biolabs*), restrikcijska endonukleaza NsiI (*New England Biolabs*), Pfu DNA-polimeraza (*New England Biolabs*), pufer za Pfu DNA-polimerazu (*New England Biolabs*), restrikcijska endonukleaza Sall (*New England Biolabs*), T4 polinukleotid-kinaza (*New England Biolabs*), pufer za T4 polinukleotid-kinazu (*New England Biolabs*), T7 RNA-polimeraza (*Sigma*).

##### 3.1.4. Ostali materijali

ATP (*Boehringer Mannheim*), BMAA (*Sigma*), BSA (*New England Biolabs*, 10 mg ml<sup>-1</sup>), dNTP smjesa (*Sigma*), GMP (*Sigma*), IPTG (*Fischer Scientific*), NTP smjesa (*Sigma*), magnezijev klorid za reakcije (MgCl<sub>2</sub>) (*Applied Biosystems*), Ni-NTA agarozna (*Qiagene*),

kolona MonoQ HR 10/10 (*GE Healthcare*), polietileniminska pločica za tankoslojnu kromatografiju (*Fluka*), RNazin (*Promega*), L-serin (*Sigma*), [<sup>32</sup>P]PP<sub>i</sub> (*Perkin Elmer*).

### 3.1.5. Markeri

Generuler 1kb ladder (*Thermofisher*), Precision Plus Protein Standards Dual Color (*Bio-Rad*), SeeBlue Plus2 Pre-stained Protein Standard (*Invitrogen*).

### 3.1.6. Boje

Bromfenol plavo (*Serva*), Coomassie Brilliant Blue R-250 (*Sigma*), Coomassie Brilliant Blue G-250 (*Sigma*), ksilencijanол fluorofosfat (*Serva*), toludinsko modriло (*Sigma*).

### 3.1.7. Sastojci LB hranjive podloge

Agar (*Difco*), kvaščev ekstrakt (*Liofilchem*), natrijev klorid (*Kemika*), tripton (*Liofilchem*).

### 3.1.8. Otopine

Agarozna boja (10x koncentrirana otopina)	$\varphi = 50 \% \text{ glicerol}$ $c = 0,1 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ EDTA pH} = 8,0$ 0,4 % (w/v) ksilencijanол fluorofosfat 0,4 % (w/v) bromfenol plavo
Boja za nanošenje uzoraka i praćenje elektroforeze proteina (4x koncentrirana otopina)	$\gamma = 50 \text{ g dm}^{-3} \text{ SDS}$ $c = 50 \text{ mmol dm}^{-3} \beta\text{-merkaptоetanol}$ $c = 0,25 \text{ mol dm}^{-3} \text{ Tris-HCl pH} = 6,8$ $\varphi = 25 \% \text{ glicerol}$ $\gamma = 0,1 \text{ mg ml}^{-1} \text{ bromfenol plavo}$
Coomassie Brilliant Blue za bojanje SDS gelova	$\varphi = 0,25 \% \text{ Coomassie Brilliant Blue R-250}$ $\varphi = 45 \% \text{ etanol}$ $\varphi = 10 \% \text{ octena kiselina}$

Boja za nanošenje uzoraka na denaturirajuće ureja gelove (RNA boja)

$c = 2 \text{ mol dm}^{-3}$  ureja

$c = 8 \text{ mmol dm}^{-3}$  EDTA pH =8,0

0,1 % (w/v) ksilencijanол fluorofosfat

0,1 % (w/v) bromfenol plavo

$\varphi = 50 \%$  glicerol

Toluidinsko modriло za bojanje urea gelova

$\varphi = 0,4 \%$  toluidinsko modriло

$\varphi = 50 \%$  metanol

$\varphi = 10 \%$  octena kiselina

Bradfordov reagens

$\gamma = 0,1 \text{ g dm}^{-3}$  *Coomassie Brilliant Blue G-250*

$\varphi = 5 \%$  etanol

$\varphi = 8,5 \%$  fosfatna kiselina

### 3.1.9. Pufferi

5x KCM puffer za transformaciju bakterija

$c = 500 \text{ mmol dm}^{-3}$  kalijev klorid

$c = 150 \text{ mmol dm}^{-3}$  kalcijev klorid

$c = 250 \text{ mmol dm}^{-3}$  magnezijev klorid

Puffer TAE (za elektroforezu nukleinskih kiselina na gelu agaroze)

$c = 40 \text{ mmol dm}^{-3}$  Tris

$c = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$  octena kiselina

$c = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$  EDTA

konačan pH = 8,0

Pufer za elektroforezu proteina (sustav Laemmli)	$c = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$ Tris $c = 192 \text{ mmol dm}^{-3}$ glicin $\gamma = 1 \text{ mg ml}^{-1}$ SDS konačan pH = 8,3
4X pufer za gel za razdvajanje (sustav Laemmli)	$c = 1,5 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris $\gamma = 4 \text{ mg ml}^{-1}$ SDS konačan pH = 8,8
4X pufer za gel za sabijanje (sustav Laemmli)	$c = 1,5 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris $\gamma = 4 \text{ mg ml}^{-1}$ SDS konačan pH = 6,8
10 x pufer za transkripciju (TXN)	$c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris-HCl pH=8,0 $c = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ magnezijev klorid $c = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ spermidin
Pufer za razvijanje	$c = 750 \text{ mmol dm}^{-3}$ kalijev dihidrogenfosfat pH=3,5 $c = 4 \text{ mol dm}^{-3}$ ureja

***Puferi za pročišćavanje proteina s privjeskom (His)<sub>6</sub> na Ni-NTA agarozu***

Pufer za sonikaciju (lizu) stanica:

$c = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$  Tris-HCl pH=8,0

$c = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$  magnezijev acetat

$c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$  natrijev klorid

$c = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$  ureja

$c = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$  imidazol

$c = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$   $\beta$ -merkaptotanol

$\varphi = 0,1 \%$  Tween 20

Pufer za ispiranje

$c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$  Tris-HCl pH=8,0

$c = 1,75 \text{ mol dm}^{-3}$  natrijev klorid

$c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$  ureja

$\varphi = 10 \%$  glicerol

$c = 30 \text{ mmol dm}^{-3}$  imidazol

$c = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$   $\beta$ -merkaptotanol

Pufer za eluciju proteina:

$c = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$  Tris-HCl pH=8,0

$c = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$  magnezijev acetat

$c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$  natrijev klorid

$c = 400 \text{ mmol dm}^{-3}$  imidazol

$c = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$   $\beta$ -merkaptotanol

Pufer za pohranu proteina:

$c = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$  Tris-HCl pH=8,0

$c = 0,15 \text{ mol dm}^{-3}$  natrijev klorid

$c = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$   $\beta$ -merkaptotanol



## Puferi za ionsku izmjenu proteina metodom FPLC

Pufer A

$c = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$  Tris-HCl pH=8,0

$c = 30 \text{ mmol dm}^{-3}$  natrijev klorid

$c = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$   $\beta$ -merkaptetanol

Pufer B

$c = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$  Tris-HCl pH=8,0

$c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$  natrijev klorid

$c = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$   $\beta$ -merkaptetanol

### 3.1.10. Oligonukleotidi

Proizvedeni u *MacroGen*, Južna Koreja.

**Tablica 3.1.** Popis korištenih oligonukleotida i PCR početnica

Naziv oligonukleotida	Slijed (5' → 3')	Svrha
<b>TGAF</b>	AATTCGTCGACTAATACGACTCACTATAG AGAAGGTCACAGAGGTTATGGGATTGGC TTGAAACCAGTCTGTGGGGGGTTTCGATT CCCTCCTTTTTCCACCATGCATG	<b>Gen na kodirajućem lancu za tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> (mitohondrijska)</b>
<b>TGAR</b>	GATCCATGCATGGTGAAAAAGGAGGGAA TCGAACCCCCACAGACTGGTTTCAAGC CAATCCCATAACCTCTGTGACCTTCTCTA TAGTGAGTCGTATTAGTCGACG	<b>Gen na nekodirajućem lancu za tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> (mitohondrijska)</b>
<b>AGAF</b>	AATTCGTCGACTAATACGACTCACTATA GTAGTCGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGA TGGACTAGAAATCCATTGGGGTTTCCC	<b>Gen na kodirajućem lancu za tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> (citosolna)</b>

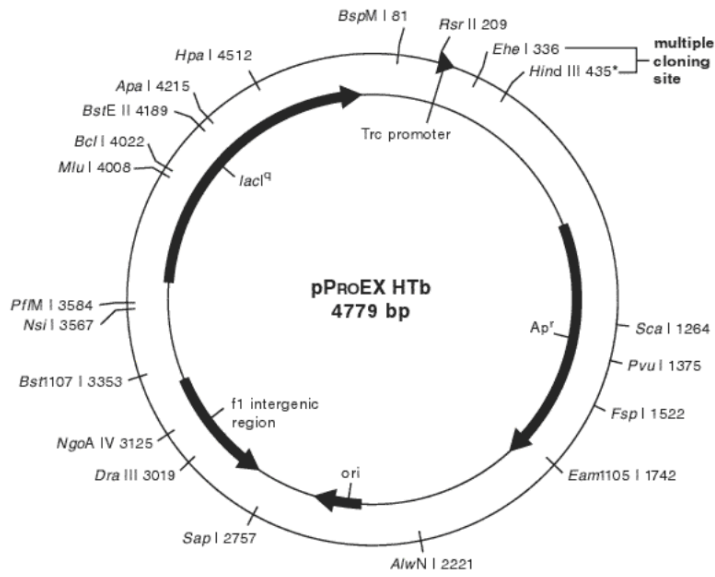
	CGCGCAGGTTCTGAATCCTGCCGACTAC GCCATGCATG	
<b>AGAR</b>	GATCCATGCATGGCGTAGTCGGCAGGA TTCGAACCTGCGCGGGGAAACCCCAAT GGATTTCTAGTCCATCGCCTTAACCACT CGGCCACGACTACTATAGTGAGTCGTA TTAGTCGACG	<b>Gen na nekodirajućem lancu za tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> (citosolna)</b>
<b>pUCF</b>	GGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGG	<b>Uzvodna početnica na vektoru pUC18</b>
<b>pUCR</b>	GAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGG	<b>Nizvodna početnica na vektoru pUC18</b>
<b>pProEXR</b>	CAGACCGCTTCTGCGTTC	<b>Nizvodna početnica na vektoru pProEX HTb</b>
<b>pProEXF</b>	GAAGCTGTGGTATGGCTGTGCAGGTC	<b>Uzvodna početnica na vektoru pProEX HTb</b>
<b>M13F</b>	GGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGG	<b>Uzvodna univerzalna početnica korištena pri sekvenciranju</b>
<b>M13R</b>	AGGAAACAGCTATGACCAT	<b>Nizvodna univerzalna početnica korištena pri sekvenciranju</b>
<b>3Sal</b>	GAGAGTCGACTTAGCTTACAGCAGGCT GGCC	<b>Nizvodna početnica za mtSerRS s restriksijskim mjestom Sall</b>
<b>mtSRsD21Bam</b>	GAGAGAGGATCCCGGGGAGGCTGCATC TCC	<b>Uzvodna početnica mtSerRS s restriksijskim mjestom BamHI</b>
<b>mtSRsD34Bam</b>	GAGAGAGGATCCACTACAGAGAAACGA AACCGG	<b>Uzvodna početnica mtSerRS s restriksijskim mjestom BamHI</b>

<b>mtSRsD33Bam</b>	GAGAGAGGATCCTTCACTACAGAGAAAC GAAACC	<b>Uzvodna početnica mtSerRS s restrikcijskim mjestom BamHI</b>
<b>mtSRsD56Bam</b>	GAGAGAGGATCCCAGCTGGACATAGAG CGG	<b>Uzvodna početnica mtSerRS s restrikcijskim mjestom BamHI</b>
<b>mtSRsD29Bam</b>	GAGAGAGGATCCCCAAGGAGAAGTTTC ACTAC	<b>Uzvodna početnica mtSerRS s restrikcijskim mjestom BamHI</b>

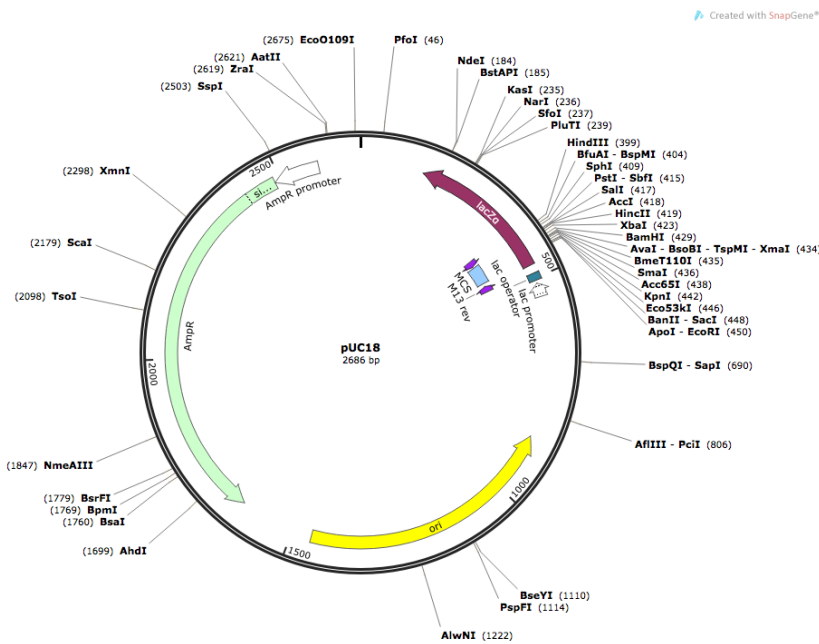
### 3.1.11. Plazmidni vektori

Tablica 3.2. Plazmidni vektori

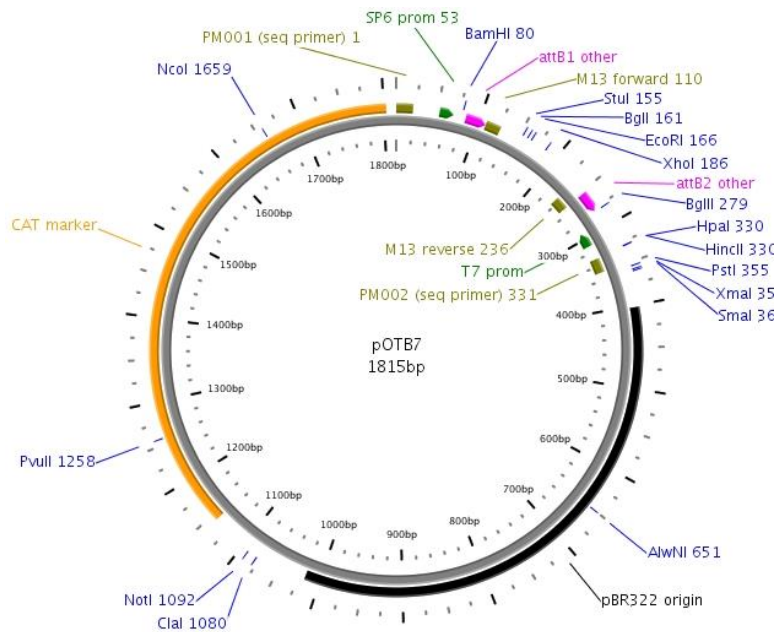
<b>Naziv vektora i kratak opis</b>	<b>Insert (ugrađeni gen)</b>	<b>Napomena</b>
Vektor za ugradnju cDNA SerRS - pOTB7	mtSerRS	Ugrađena cDNA je omeđena mjestima za restrikcijske endonukleaze XhoI/ EcoRI
Vektor za prekomjernu ekspresiju proteina - pProEX HTb	d21 mtSerRS d34 mtSerRS	Gen je omeđen mjestima za restrikcijske endonukleaze BamHI/ Sall
Vektor korišten za <i>in vitro</i> proizvodnju molekula tRNA - pUC18	tRNA <sup>Ser</sup> <sub>TGA</sub> tRNA <sup>Ser</sup> <sub>AGA</sub>	Gen omeđen mjestima za restrikcijske endonukleaze BamHI/ EcoRI



A)



B)



C)

**Slika 3.1.** Plazmidni vektori korišteni u ovom radu. A) pProEX HTb (preuzeto s [www.biofeng.com](http://www.biofeng.com)), B) pUC18 (preuzeto s [www.snapgene.com](http://www.snapgene.com)), C) pOTB7 (preuzeto s [www.lifesciences.sourcebioscience.com](http://www.lifesciences.sourcebioscience.com))

**pProEX HTb** - plazmid s genom za otpornost na ampicilin, omogućava inducibilnu ekspresiju proteina pod kontrolom *trc* promotora (prepoznaje ga bakterijska RNA-polimeraza). Omogućava nastanak ciljnog proteina s His-privjeskom na N-kraju, koji se nakon pročišćavanja proteina afinitetnom kromatografijom može odcijepiti proteazom TEV. Proteaza TEV (eng. *tobacco etch virus*) je podrjetlom iz virusa bolesti duhana, prepoznaje slijed Glu–Asn–Leu–Tyr–Phe–Gln–Gly/Ser, a cijepa između Gln i Gly, odnosno Ser.

**pUC18** - plazmid visokog broja kopija, često upotrebljavan za kloniranje ili sekvenciranje. Njegove osnovne značajke su gen za rezistenciju na ampicilin, *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  $\beta$ -galaktozidazu što omogućava selekciju rekombinantnih plazmida na temelju plave ili bijele boje kolonija na podlozi koja sadrži X-gal.

**pOTB7** - plazmid koji sadrži gen za otpornost na kloramfenikol. Sadrži mjesta komplementarna univerzalnim uzvodnim i nizvodnim M13 početnicama. Najviše se koristi u svrhu kloniranja cDNA jer sadrži tzv. 'gateway' rekombinacijsku kazetu u regiji za kloniranje.

### 3.1.12. Bakterijski sojevi

Bakterijski soj *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (*Stratagene GmbH*) korišten je za transformacije i umnažanje bakterijskih vektora (Meselson i Yuan, 1968). Genotip soja je: F<sup>-</sup> endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG  $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>),  $\lambda$ <sup>-</sup>. Pogodan je za transformaciju zbog nekoliko svojstava. *RecA1* gen odgovoran je za rekombinaciju i popravak molekule DNA. Njegovom mutacijom onemogućena je homologna rekombinacija čime se osigurava stabilnost transformirane DNA. Mutacijom *endA1* gena (endonukleaza I) izbjegnuta je nespecifična razgradnja DNA, a  $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 mutacija omogućava  $\alpha$ -komplementaciju s amino-krajem  $\beta$ -galaktozidaze kodirane u pUC vektorima (Sambrook i Russell, 2001).

Bakterijski soj *Escherichia coli* BL21(DE3) (*Stratagene GmbH*) korišten je za postizanje visoke razine ekspresije željenog proteina (Studier i Moffatt, 1986). Genotip soja je: F<sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>)  $\lambda$ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]). Soj BL21(DE3) je derivat soja B834 *E. coli* i sadrži DE3 ( $\lambda$  profag s genom za T7 RNA-polimerazu i gen lacI<sup>q</sup>). Gen za T7 RNA-polimerazu ugrađen u genom soja BL21(DE3) inducira se dodatkom IPTG-a s promotora lacUV5 (Dubendorff i Studier, 1991). Bakterijski soj BL21(DE3)pLys genotipa F<sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>)  $\lambda$ (DE3) pLysS(cm<sup>R</sup>) je izvedenica soja BL21(DE3). Gen za T7 RNA-polimerazu ugrađen u genom soja BL21(DE3)pLys inducira se dodatkom IPTG s promotora T7. Pogodan je za ekspresiju proteina toksičnih za stanicu i uzgaja se uz antibiotik kloramfenikol u koncentraciji 50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> zbog derivata plazmida pACYC (pLys) koji sadrži gen za enzim lizozim (gen 3.5 bakteriofaga T7) koji je inhibitor T7 RNA-polimeraze (Moffatt i Studier, 1987) pri čemu dolazi do ukidanja prijevremene ekspresije transformiranih gena s T7 promotorom u uvjetima kad nije prisutan induktor npr. IPTG (preuzeto s <http://www.stratagene.com>).

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Metode rada s DNA

#### 3.2.1.1. Kloniranje sintetskih oligonukleotida tRNA

Sintetski oligonukleotidi (MacroGen, Južna Koreja), koji sadrže nukleotidni slijed za promotor T7 RNA-polimeraze i slijed za željenu molekulu tRNA te na početku i kraju slijeda restrikcijska mjesta EcoRI i BamHI, upotrebljeni su za konstrukciju kalupa DNA za transkripciju *in vitro*. Komplementarni oligonukleotidi s ljepljivim krajevima za restrikcijske endonukleaze EcoRI i BamHI ugrađeni su u vektor pUC18 koji je prehodno bio razgrađen istim restrikcijskim endonukleazama (EcoRI i BamHI) i pročišćen. Postupak ugradnje gena

za tRNA pomoću komplementarnih sintetskih oligonukleotida u plazmid pUC18 uključuje nekoliko koraka.

#### **3.2.1.1.1. Priprema vektora pUC18 za ugradnju sintetskih oligonukleotida tRNA**

Da bi se ugradila tRNA u vektor pUC18 krajevi lineariziranog vektora moraju biti komplementarni krajevima sintetskih gena za tRNA. To se u ovom radu postiglo cijepanjem vektora restrikcijskim endonukleazama EcoRI i BamHI jer se njihova restrikcijska mjesta nalaze i na sintetskim genima za tRNA. Reakcijske smjese volumena 50  $\mu\text{l}$  su se sastojale od 30  $\mu\text{l}$  vektora pUC18, 1,5  $\mu\text{l}$  EcoRI (20 jedinica/ $\mu\text{l}$ ), 1,5  $\mu\text{l}$  BamHI (20 jedinica/ $\mu\text{l}$ ), 5  $\mu\text{l}$  10x NEBuffer 2 i 12  $\mu\text{l}$   $\text{ReH}_2\text{O}$ . Razgradnja se odvijala 3 sata na 37 °C. Nakon toga su pocijepani plazmidi pročišćeni od enzima i kratkih fragmenata DNA pomoću QIA Gel Extraction Kit protokola. Reakcijske smjese su nanosene na kolonu i dodano je 500  $\mu\text{l}$  QG pufera, kolona je stavljena u epruveticu za sakupljanje i centrifugirana 1 minutu na 10 000 x g. Iz epruvetice za sakupljanje je bačen QG pufer i dodano je 750  $\mu\text{l}$  pufera PE u kolonu te je ona centrifugirana 1 minutu na 10 000 x g. Iz epruvetice za sakupljanje je bačen PE pufer i kolona je ponovno centrifugirana 1 minutu na 10 000 x g. Kolona je premještena u čistu Ependorf epruveticu i u sredinu kolone je nanoseno 35  $\mu\text{l}$  pufera EB za eluciju plazmida. Uzorak je stajao 20 minuta i nakon toga je centrifugiran 1 minutu na 10 000 x g pri čemu se eluirao plazmid kojem je potom izmjerena koncentracija.

#### **3.2.1.1.2. Kinaziranje sintetskih oligonukleotida tRNA i priprema smjese za sparivanje komplementarnih oligonukleotida**

Oligonukleotidi su otopljeni u vodi u koncentraciji 10  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  te su zatim fosforilirani T4 polinukleotid-kinazom 1 h pri 37 °C. Reakcijske smjese od 20  $\mu\text{l}$  su se sastojale od 4  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  otopine oligonukleotida (jedna smjesa je sadržavala oligonukleotidnu sekvencu tRNA kodirajućeg lanca, a druga smjesa je sadržavala oligonukleotidnu sekvencu tRNA nekodirajućeg lanca) (konačna koncentracija 2  $\mu\text{mol dm}^{-3}$ ), 2  $\mu\text{l}$  10x pufera za T4 polinukleotid-kinazu, 2  $\mu\text{l}$  100  $\text{mmol dm}^{-3}$  DTT-a (konačna koncentracija 10  $\text{mmol dm}^{-3}$ ), 2  $\mu\text{l}$  10  $\text{mmol dm}^{-3}$  ATP-a (konačna koncentracija 1  $\text{mmol dm}^{-3}$ ), 0,5  $\mu\text{l}$  T4 polinukleotid-kinaze i 9,5  $\mu\text{l}$   $\text{ReH}_2\text{O}$ . Inaktivacija T4 polinukleotid-kinaze postigla se inkubacijom reakcijske smjese 10 minuta na 65 °C. Smjese su centrifugirane 1 minutu na 10 000 x g. Smjesa za sparivanje komplementarnih oligonukleotida sadržavala je 20  $\mu\text{l}$  2  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  oligonukleotida kodirajućeg lanca i 20  $\mu\text{l}$  2  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  oligonukleotida nekodirajućeg lanca (konačne koncentracije oligonukleotida u smjesi za hibridizaciju su bile 1  $\mu\text{mol dm}^{-3}$ ). Smjesa za sparivanje komplementarnih oligonukleotida se 5 minuta inkubirala u termobloku pri 95 °C pri čemu dolazi do denaturacije oligonukleotida. Nakon toga smjesa se sporo hladila do sobne temperature 30 minuta čime se omogućilo sparivanje i

sljepljivanje komplementarnih oligonukleotida i na taj način dobiven je sintetski gen za tRNA koji je korišten za ligaciju u vektor pUC18.

#### **3.2.1.1.3. Ligacija gena za tRNA u vektor pUC18**

Reakcijske smjese od 50  $\mu$ l za ligaciju su sadržavale 2  $\mu$ l vektora pUC18 (400 ng), 5  $\mu$ l 10x pufera za DNA-ligazu, 0,5  $\mu$ l DNA-ligaze, 20  $\mu$ l smjese za hibridizaciju i 22,5  $\mu$ l ReH<sub>2</sub>O. Ligacija se odvijala 2 sata na sobnoj temperaturi nakon čega su reakcije transformirane u odgovarajući bakterijski soj.

#### **3.2.1.1.4. Identifikacija pozitivnih kolonija plavo bijelom selekcijom**

Plavo bijela selekcija je brza i efikasna metoda za identifikaciju rekombinantnih bakterija. Temelji se na aktivnosti enzima  $\beta$ -galaktozidaze kodiranog genom *lacZ* koji cijepa laktozu na glukozu i galaktozu. Prisutnost laktoze u okolišu aktivira ekspresiju operona *lac* u *E. coli*. Aktivacija operona rezultira sintezom  $\beta$ -galaktozidaze. Većina plazmidnih vektora nose kratki segment *lacZ* gena koji sadrži informaciju za prvih 146 aminokiselina  $\beta$ -galaktozidaze. Domaćinski soj *E. coli* koji se koristi za transformaciju s vektorom je kompetentan jer sadrži *lacZ* $\Delta$ M15 deleciju mutaciju. Kada se plazmid unese u stanice takvog kompetentnog soja, zahvaljujući  $\alpha$ -komplementacijskom procesu, nastaje funkcionalna  $\beta$ -galaktozidaza. Plazmidni vektori korišteni za kloniranje su prilagođeni tako da proces  $\alpha$ -komplementacije služi kao marker za komplementaciju. Višestruko mjesto za kloniranje (eng. *multiple cloning site*, MCS) se nalazi unutar slijeda za gen *lacZ* u plazmidnom vektoru. Taj slijed se može pocijepati s restrikcijским endonukleazama kako bi se ugradio insert strane DNA koju se želi klonirati. Kada se plazmidni vektor koji sadrži uspješno ugrađeni insert unese u kompetentni soj *E. coli* ne dolazi do procesa  $\alpha$ -komplementacije odnosno ne nastaje funkcionalna  $\beta$ -galaktozidaza. Ako se unese plazmidni vektor u koji se nije ugradio insert doći će do procesa  $\alpha$ -komplementacije i nastati će funkcionalna  $\beta$ -galaktozidaza. Za selekciju klonova koji sadrže rekombinantnu DNA u LBamp podlogu je dodan kromogeni supstrat tzv. X-Gal. Ako klonovi stvaraju funkcionalnu  $\beta$ -galaktozidazu dolazi do hidrolize X-Gal na 5-bromo-4-kloro-indoksil koji spontano dimerizira i stvara netopivi plavi pigment 5,5'-dibromo-4,4'-dikloro-indigo. Uz X-Gal za plavo bijelu selekciju korišten je i IPTG koji služi za indukciju ekspresije *lacZ* gena. S LBamp podloge na kojoj su uzgajane stanice *E. coli* soja DH5 $\alpha$  transformirane s pUC18 - hmt tRNA<sup>Ser<sub>TGA</sub></sup> nasumično je odabrano 42 različite kolonije i 9 kolonija transformiranih s pUC18 - hmt tRNA<sup>Ser<sub>AGA</sub></sup>. Svaka kolonija nanosena je u svoj kvadratić na tri LBamp podloge s X-Gal-om i IPTG-om. Kolonije nastale od stanica koje ne sadrže rekombinantnu DNA su poprimile plavu boju, a kolonije nastale od stanica koje sadrže rekombinantnu DNA su bile bijele boje. Bijele kolonije su presađene na nove LBamp krute i tekuće podloge.



### **3.2.1.2. Kloniranje gena za humanu mtSerRS**

#### **3.2.1.2.1. Izolacija gena za humanu mtSerRS pomoću PCR-a**

Dobiveni su tupi PCR produkti preparativnim PCR-om na pOTB7 vektoru koji sadrži ugrađenu cDNA za humanu mtSerRS. Rezultati su analizirani elektroforezom u agaroznom gelu te pročišćeni iz agaroznog gela pomoću QIA Gel Extraction Kit kompleta tako što se skalpelom pod UV-lampom izrezao dio gela koji je sadržavao PCR produkt. Izrezani dio gela je stavljen u Ependorf epruveticu i dodano je QG pufera u volumenu koji je odgovarao tri volumena gela. Gel je otapan 10 minuta na 50°C. Smjesa je prebačena u QIAquick spin kolonu i centrifugirana 1 minutu na 10 000 x g. Sve što je prošlo kroz kolonu u epruveticu za sakupljanje je bačeno. Kako bi se odstranili zaostali komadići agaroze na kolonu je dodano 0,5 ml QG pufera i centrifugirano 1 minutu na 10 000 x g. Iz epruvetice za sakupljanje bačen je QG pufer i dodano je 750 µl pufera PE u kolonu te je centrifugirano 1 minutu na 10 000 x g. Iz epruvetice za sakupljanje bačen je PE pufer i ponovo centrifugiran 1 minutu na 10 000 x g. Kolona je premještena u čistu Ependorf epruveticu i u sredinu kolone je nanoseno 35 µl pufera EB za eluciju plazmida. Uzorak je inkubiran 20 minuta i nakon toga centrifugiran 1 minutu na 10 000 x g te je na kraju određena koncentracija pročišćene DNA.

#### **3.2.1.2.2. Cijepanje krajeva inserta za humanu mtSerRS restrikcijskim endonukleazama**

Kako bi se dobiveni PCR produkti mogli ugraditi u pProEX HTb vektor, pročišćeni tupi PCR produkti su preko noći razgrađeni s restrikcijskim endonukleazama BamHI i Sall, a reakcijska smjesa od 100 µl se sastojala od 50 µl pročišćenog tupog PCR produkta (oko 3,75 µg), 10 µl 10x NEBuffer 3, 0,5 µl BamHI (10 jedinica/µl), 0,5 µl Sall (10 jedinica/µl) i 37 µl ReH<sub>2</sub>O. Dobiveni ljepljivi inserti za humanu mtSerRS su pročišćeni kao i vektor pUC18 u poglavlju 3.2.1.1.1. i korišteni su za ligaciju u vektor pProEX HTb.

#### **3.2.1.2.3. Ligacija gena za humanu mtSerRS s vektorom pProEx HTb**

Ligacijska smjesa volumena 50 µl se sastojala od 6 µl vektora pProEx HTb (300 ng vektora u smjesi), 10 µl otopine gena za humanu mtSerRS (600 ng inserta u smjesi), 5 µl 10x pufera za ligaciju, 0,5 µl DNA-ligaze i 28,5 µl ReH<sub>2</sub>O. Ligacija se odvijala 2 sata na sobnoj temperaturi.

### **3.2.1.3. Transformacija kompetentnih stanica *E.coli* metodom kemijske transformacije**

Plazmidni vektori s genima od interesa su uneseni u odgovarajuće stanice *E. coli* soja DH5 $\alpha$  za umnažanje i BL21 za ekspresiju metodom kemijske transformacije. Reakcijska smjesa volumena 170  $\mu$ l se sastojala od 25  $\mu$ l ligacijske smjese, 20  $\mu$ l 5x KCM pufera, 100  $\mu$ l kompetentnih stanica *E. coli* soja DH5 $\alpha$  ili BL21 i 25  $\mu$ l ReH $_2$ O. Smjesa je inkubirana 30 minuta na ledu, zatim 10 minuta na sobnoj temperaturi i nakon toga je dodano 500  $\mu$ l medija LB i inkubirano 1 sat na 37°C. Bakterijska suspenzija je centrifugirana 3 minute na 8 000 x g i supernatant je pomoću mikropipete odvojen od taloga. Talog je resuspendiran u 100  $\mu$ l LB medija. 100  $\mu$ l bakterijske suspenzije transformirane s pUC18, odnosno pProEX HTb plazmidom nasađeno je na krutu LBamp podlogu.

### **3.2.1.4. Izolacija plazmidne DNA iz bakterijskih stanica**

#### **3.2.1.4.1. Izolacija plazmidne DNA iz prekončne kulture bakterijskih stanica pomoću QIAprep Spin Miniprep Kit-a**

Plazmidna DNA iz bakterijskih stanica izolirana je pomoću komercijalnog kompleta QIAprep Spin Miniprep Kit. Dva obroka od 900  $\mu$ l prekončne kulture je centrifugirano na 10 000 x g tijekom 3 minute na sobnoj temperaturi. U talog je dodano 250  $\mu$ l pufera P1 te je smjesa resuspendirana. U resuspendiranu smjesu dodano je 250  $\mu$ l pufera P2 za lizu bakterijskih stanica i ručno promiješano dok otopina nije postala plava i prozirna. Inkubacija je trajala 5 minuta. Nakon toga, dodano je 350  $\mu$ l pufera N3 te je smjesa ručno promiješana, a otopina je postala bezbojna. Uzorak je centrifugiran 10 minuta na 10 000 x g. Supernatant je dekantiran u QIAprep spin kolonu i centrifugiran 1 minutu na 10 000 x g. Nevezana frakcija se odstranila. Kolona je isprana s 500  $\mu$ l pufera PB te ponovno centrifugirana 1 minutu na 10 000 x g. Kolona je isprana sa 750  $\mu$ l pufera PE te ponovno centrifugirana 1 minutu na 10 000 x g. Nakon toga, uzorak je dodatno centrifugiran 1 minutu na 10 000 x g. QIAprep spin kolona je premještena u čistu Ependorf epruvetu i dodano je 50  $\mu$ l pufera EB za eluciju plazmidne DNA s kolone. Uzorak je inkubiran 25 minuta i centrifugiran 1 minutu na 10 000 x g.

#### **3.2.1.4.2. Izolacija plazmidne DNA iz prekončne kulture bakterijskih stanica pomoću QIAfilter plasmid MEGA and GIGA Kit-a**

250 ml prekončne bakterijske kulture centrifugirano je na 6 000 x g 15 minuta pri 4°C. Odbačen je supernatant, a talog resuspendiran u 10 ml pufera P1. Dodano je 10 ml pufera P2, epruvetica je četiri puta ručno preokrenuta i smjesa je poprimila plavu boju. Smjesa je inkubirana 5 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije dodano je 10 ml pufera P3 i

epruvetica je četiri puta ručno preokrenuta i smjesa je postala bijele boje. Smjesa je centrifugirana 15 minuta na 4 000 x g te je supernatant odvojen. QIAGEN-tip 500 je uravnotežen s 10 ml QBT pufera i pufer je pušten da isteče gravitacijom. U QIAGEN-tip 500 je nanesen supernatant i pušten je da isteče gravitacijom pri čemu se na filter-membranu vezala plazmidna DNA. Filter-membrana je isprana s QC puferom dva puta po 30 ml. Plazmidna DNA je eluirana s filtera s 15 ml QF pufera. U eluiranu plazmidnu DNA dodano je 10,5 ml izopropanola za precipitaciju plazmidne DNA i centrifugirano je 45 minuta na 10 000 x g. Odvojen je supernatant i talog je ispran s 5 ml etanola ( $\varphi = 0,7$ ) na sobnoj temperaturi. Uzorak je centrifugiran 15 minuta na 10 000 x g. Odvojen je supernatant, talog osušen i resuspendiran u 1 ml QF pufera. Izmjerena je koncentracija DNA.

### **3.2.1.5. Restriksijska analiza**

Razgradnja DNA restriksijskim enzimima korištena je u svrhu provjere ugradnje željenog gena u plazmid. Također je korištena i u preparativne svrhe, npr. razgradnja plazmidne DNA s ciljem dobivanja kalupa DNA za transkripciju *in vitro*.

#### **3.2.1.5.1. Provjera ugradnje željenog gena u plazmid**

Za provjeru ugradnje gena za hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> u vektor pUC18 korištena je restriksijska endonukleaza Nsil jer ona cijepa samo unutar sekvence gena od interesa. Reakcijska smjesa od 20  $\mu$ l je sadržavala 0,3  $\mu$ l Nsil, 2  $\mu$ l 10x NEBuffer 3, 0,1  $\mu$ l 100x BSA, 4  $\mu$ l pUC18 (oko 140 ng) i 14,7  $\mu$ l ReH<sub>2</sub>O.

#### **3.2.1.5.2. Razgradnja i pročišćavanje plazmidne DNA s ciljem dobivanja kalupa za transkripciju *in vitro***

Plazmidna DNA je pocijepana s restriksijskim enzimom Nsil koji cijepa na kraju gena kako bi se dobio linearizirani kalup kojem T7 RNA-polimeraza može prići i katalizirati transkripciju. Reakcijska smjesa za razgradnju pUC18 s ugrađenim genom za hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> se sastojala od 230  $\mu$ l DNA (oko 150  $\mu$ g DNA), 45  $\mu$ l Nsil, 150  $\mu$ l 10x NEBuffer 3, 15  $\mu$ l 100x BSA i 1200  $\mu$ l ReH<sub>2</sub>O. Reakcijska smjesa za razgradnju pUC18 s ugrađenim genom za hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> se sastojala od 156  $\mu$ l DNA (oko 96  $\mu$ g DNA), 45  $\mu$ l Nsil, 150  $\mu$ l 10x NEBuffer 3, 15  $\mu$ l 100x BSA i 1130  $\mu$ l ReH<sub>2</sub>O. Razgradnja se odvijala preko noći na 37°C. Kako bi pocijepani kalup bio čist za transkripciju, prethodna reakcijska smjesa se pročistila od ostalih komponenti. U reakcijsku smjesu u kojoj se odvijala razgradnja pUC18 s ugrađenim genom za tRNA<sup>Ser</sup> restriksijskom endonukleazom Nsil je dodano 1,5 ml fenol/kloroform smjese, smjesa je vorteksirana 15 sekundi te centrifugirana 5 minuta na 10 000 x g pri 4°C. Gornja vodena faza je odvojena u novu epruveticu i u nju je dodano

1,5 ml kloroforma. Smjesa je vorteksirana 15 sekundi i centrifugirana 5 minuta na 10 000 x g pri 4°C. Gornji vodeni sloj je odvojen u novu epruveticu i u nju je dodano 150 µl 3 mol dm<sup>-3</sup> natrijevog acetata pH 4,8 i 5 ml etanola ( $\varphi = 0,96$ ) u slučaju hcit tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub>, odnosno 650 µl 3 mol dm<sup>-3</sup> natrijevog acetata pH 4,8, 5 ml etanola ( $\varphi = 0,7$ ), i 15 ml izopropanola u slučaju hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub>. Smjese su inkubirane na -80°C na 15 minuta kako bi se ubrzalo taloženje DNA. Smjese su centrifugirane na 10 000 x g 20 minuta i nakon toga je odvojen supernatant i preostali talog je posušen. Talog je dodatno ispran s 4,2 ml etanola ( $\varphi = 0,7$ ) i zatim resuspendiran u 150 µl ReH<sub>2</sub>O.

### 3.2.1.6. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Lančana reakcija polimerazom korištena je u dvije svrhe. Za provjeru ugradnje željenog fragmenta DNA u plazmidni vektor pomoću Taq DNA-polimeraze i amplifikaciju željenog gena s kalupa pomoću Pfu DNA-polimeraze.

#### 3.2.1.6.1. Preparativni PCR

Preparativni PCR je korišten u svrhu umnažanja gena za verzije humane mitohondrijske SerRS (d21, d29, d33, d34 i d56) koji se nalazio ugrađen u vektor pOTB7 u XhoI i EcoRI restrikcijska mjesta naručen iz *GenomeCube*, Ujedinjeno Kraljevstvo. PCR smjesa volumena 100 µl se sastojala od 10 µl 10x pufera za Pfu DNA-polimerazu koji sadrži 2 mmol dm<sup>-3</sup> MgSO<sub>4</sub>, 1 µl pOTB7 s ugrađenim genom za humanu mtSerRS koncentracije 500 ng/µl, 10 µl 25 mmol dm<sup>-3</sup> MgCl<sub>2</sub>, 5 µl 10 mmol dm<sup>-3</sup> smjese dNTP-ova, 2,5 µl Pfu DNA-polimeraze (2,5 jedinica/µl), 1,2 µl 100 µmol dm<sup>-3</sup> početnice1 (mtSRSD21Bam za d21, mtSRSD29Bam za d29, mtSRSD33Bam za d33, mtSRSD34Bam za d34, mtSRSD56Bam za d56 ) i 1,2 µl 100 µmol dm<sup>-3</sup> početnice2 (3Sal koja određuje kraj gena) i 69 µl ReH<sub>2</sub>O. Reakcijski uvjeti navedeni su u Tablici 3.3. Alikvotirano je 5 µl uzorka s PCR produktom za analizu na agaroznom gelu.

**Tablica 3.3.** Uvjeti reakcije preparativnog PCR-a

Korak	Temperatura/°C	Trajanje ciklusa	Broj ciklusa
Početna denaturacija	95	5 min	1
Denaturacija	95	30 s	30
Vežanje početnice na kalup	65	30 s	30
Produljenje lanca	72	2 min	30
Završno produljenje lanca	72	10 min	1

### 3.2.1.6.2. PCR na bakterijskim kolonijama (eng. *colony PCR*)

Za provjeru ugradnje željenog fragmenta DNA u plazmidni vektor korištena je lančana reakcija polimerazom na kolonijama transformiranih bakterija *E.coli* soja DH5 $\alpha$ , odnosno BL21 pomoću AmpliTaq Gold DNA-polimeraze. Kolonijski PCR se proveo sa stanicama transformiranima s pUC18 koji ima ugrađen gen za humanu tRNA<sup>Ser</sup> i sa stanica transformiranima s pProEX HTb koji ima ugrađen gen za humanu mtSerRS.

PCR reakcijska smjesa bakterija transformiranih s pUC18 sadržavala je 2,5  $\mu$ l 10x pufera za AmpliTaq DNA-polimerazu bez MgCl<sub>2</sub>, 1,5  $\mu$ l 25 mmol dm<sup>-3</sup> MgCl<sub>2</sub>, 0,5  $\mu$ l 10 mmol dm<sup>-3</sup> smjese dNTP-ova, 1  $\mu$ l 10  $\mu$ mol dm<sup>-3</sup> pUCF početnice, 1  $\mu$ l 10  $\mu$ mol dm<sup>-3</sup> pUCR početnice, 0,3  $\mu$ l AmpliTaq Gold DNA-polimeraze i 18,7  $\mu$ l ReH<sub>2</sub>O. Transformirane bakterije su unesene vrhom sterilnog nastavka. Reakcijski uvjeti navedeni su u Tablici 3.4. Alikvotirano je 10  $\mu$ l uzorka s PCR produktom za analizu na agaroznom gelu.

**Tablica 3.4.** Uvjeti reakcije PCR na bakterijskim kolonijama transformiranih s pUC18-tRNA<sup>Ser</sup>

Korak	Temperatura/°C	Trajanje ciklusa	Broj ciklusa
Početna denaturacija	95	10 min	1
Denaturacija	95	30 s	25
Vežanje početnice na kalup	65	30 s	25
Produljenje lanca	72	1 min	25
Završno produljenje lanca	72	5 min	1

PCR reakcijska smjesa bakterija transformiranih s pProEX HTb sadržavala je 2,5  $\mu\text{l}$  10x pufera za AmpliTaq DNA-polimerazu bez  $\text{MgCl}_2$ , 1,5  $\mu\text{l}$  25  $\text{mmol dm}^{-3}$   $\text{MgCl}_2$ , 0,5  $\mu\text{l}$  10  $\text{mmol dm}^{-3}$  smjese dNTP-ova, 0,1  $\mu\text{l}$  100  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  pProExF početnice, 0,1  $\mu\text{l}$  100  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  3Sal/pProEXR početnice, 0,3  $\mu\text{l}$  AmpliTaq Gold DNA-polimeraze i 18,5  $\mu\text{l}$   $\text{ReH}_2\text{O}$ . Transformirane bakterije su unesene vrhom sterilnog nastavka. Reakcijski uvjeti navedeni su u Tablici 3.5. Alikvotirano je 10  $\mu\text{l}$  uzorka s PCR produktom za analizu na agaroznom gelu.

**Tablica 3.5.** Uvjeti reakcije PCR na bakterijama transformiranih s pProEX HTb

Korak	Temperatura/ $^{\circ}\text{C}$	Trajanje ciklusa	Broj ciklusa
Početna denaturacija	95	10 min	1
Denaturacija	95	30 s	24
Vežanje početnice na kalup	65	30 s	24
Produljenje lanca	72	2 min	24
Završno produljenje lanca	72	5 min	1

### 3.2.1.6.3. PCR na kalupu pročišćenih plazmida

Reakcijska smjesa za PCR plazmida pProEX HTb/pUC18 sadržavala je 2,5  $\mu\text{l}$  10x pufera za Pfu DNA-polimerazu s  $\text{MgSO}_4$ , 1  $\mu\text{l}$  25  $\text{mmol dm}^{-3}$   $\text{MgCl}_2$ , 0,5  $\mu\text{l}$  25  $\text{mmol dm}^{-3}$  smjese dNTP-ova, 1  $\mu\text{l}$  100  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  pProEXF/pUCF početnice, 1  $\mu\text{l}$  100  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  3Sal/pUCR početnice, 0,3  $\mu\text{l}$  Pfu DNA-polimeraze, 1  $\mu\text{l}$  plazmida s insertom gena za humanu mtSerRS (50  $\text{ng}/\mu\text{l}$ )/ pUC18 s insertom gena za hmt tRNA<sup>Ser<sub>TGA</sub></sup> i 17  $\mu\text{l}$   $\text{ReH}_2\text{O}$ . Reakcijski uvjeti navedeni su u Tablici 3.6. Alikvotirano je 10  $\mu\text{l}$  uzorka s PCR produktom za analizu na agaroznom gelu.

**Tablica 3.6.** Uvjeti PCR reakcije na plazmidu pProEX HTb s ugrađenim genom za humanu mtSerRS i pUC18 s ugrađenim genom za tRNA<sup>Ser-TGA</sup>.

Korak	Temperatura/°C	Trajanje ciklusa	Broj ciklusa
Početna denaturacija	95	5 min	1
Denaturacija	95	30 s	25
Vežanje početnice na kalup	60	30 s	25
Produljenje lanca	72	2 min	25
Završno produljenje lanca	72	10 min	1

### 3.2.1.7. Elektroforeza molekula DNA u gelu agaroze

Za restrikcijsku analizu DNA, određivanje veličine DNA-fragmenata i plazmida, te za izolaciju fragmenata DNA za potrebe kloniranja korištena je metoda razdvajanja DNA u gelu agaroze. Agarozni gelovi pripremljeni su otapanjem agaroze 1% (w/v) na temperaturi vrenja u puferu TAE u kojeg je prethodno dodan etidijev bromid do koncentracije 0,5 mg dm<sup>-3</sup>. Prije nanošenja uzoraka DNA u uzorak se dodaje 1 µl agarozne boje (25 mg ksilencijanolfosforata i 25 mg bromfenol plavo otopi se u 7 ml 0,1 mol dm<sup>-3</sup> EDTA (pH = 8,0) i 3 ml glicerola). Elektroforeza je provedena u puferu TAE u električnom polju jakosti 8-10 V cm<sup>-1</sup> tijekom 45 minuta pri 120 V. Vizualizacija DNA vrpca, zbog interkaliranja etidijevog bromida u DNA, obavlja se promatranjem gela na transiluminatoru (λ = 312 nm).

### 3.2.1.8. Sekvenciranje DNA

Sekvenciranje molekula DNA naručeno je u servisima za sekvenciranje *MacroGen*, Južna Koreja. Sekvenciranje je napravljeno Sanger ABI 3730xl uređajem metodom Dideoksi sekvenciranja DNA po Sangeru kapilarnom elektroforezom. Dideoksi metoda DNA sekvenciranja po Sangeru temelji na sposobnosti DNA-polimeraze da ugradi analoge nukleotidnih baza odnosno u ovoj metodi se koriste 2'-3'-dideoksinukleotidi kao supstrati. Kada se 2'-3'-dideoksinukleotid ugradi na 3' kraj rastućeg lanca dolazi do prekida sinteze tog lanca jer nema 3'-OH skupine koja sudjeluje u stvaranju veze s idućim nukleotidom. Nastaju DNA molekule koje se razlikuju po dužini u jednom ili više nukleotida pri čemu je svaka baza obojana različitom fluorescentnom bojom. Tijekom kapilarne elektroforeze nastale DNA svakog ciklusa sekvenciranja se elektrokinetički unesu u kapilaru ispunjenu polimerom. Primjenom visokog napona negativno nabijena DNA putuje kroz polimer u

kapilari prema pozitivnoj elektrodi. Kapilarna elektroforeza može razdvojiti DNA molekule koje se razlikuju u molekularnoj masi samo jednog nukleotida. Prije nego što dođu do elektrode, fluorescentno obilježeni DNA fragmenti razdvajaju se prema veličini i prolaze kroz lasersku zraku. Laserska zraka uzrokuje fluorescenciju fragmenata pri čemu se analizira fluorescencijski signal. Uređaj za sakupljanje podataka pretvara fluorescencijski signal u digitalni signal i bilježi podatke. Pošto svaka fluorescentna boja emitira svjetlost različite valne duljine kada se pobudi laserom, sve četiri boje odnosno baze u DNA se mogu detektirati i razlikovati u jednom punjenju kapilare.

(preuzeto s [http://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/sequencing/sanger-sequencing/sanger\\_sequencing\\_method.html](http://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/sequencing/sanger-sequencing/sanger_sequencing_method.html))

### 3.2.1.9. Mjerenje 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  $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ , a izračunata pomoću apsorbancije pri valnoj duljini od 260 nm i odnosa u kojem  $A_{260} = 1$  odgovara 50  $\mu\text{g}$  čiste DNA, odnosno 40  $\mu\text{g}$  čiste RNA. Mjerno područje instrumenta za mjerenje koncentracije nukleinskih kiselina je 2 – 3700  $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ .

### 3.2.2. Metode rada s RNA

#### 3.2.2.1. *In vitro* transkripcija molekula tRNA

Reakcijska smjesa za transkripciju *in vitro* hmt tRNA<sup>Ser<sub>TGA</sub></sup> u ukupnom volumenu 1,5 ml sadržavala je 150  $\mu\text{l}$  DNA (koncentracije 551,5  $\text{ng}/\mu\text{l}$  (konačna koncentracija 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), 150  $\mu\text{l}$  10x TXN pufera, 240  $\mu\text{l}$  25  $\text{mmol dm}^{-3}$  smjese NTP-ova (koncentracija svakog NTP-a je 25  $\text{mmol dm}^{-3}$ ), 300  $\mu\text{l}$  0,1  $\text{mol dm}^{-3}$  GMP, 75  $\mu\text{l}$  0,1  $\text{mol dm}^{-3}$  DTT, 7,5  $\mu\text{l}$  100x BSA, 2  $\mu\text{l}$  nerazrijeđenog RNazina, 15  $\mu\text{l}$  T7 RNA-polimeraze, 7,5  $\mu\text{l}$  nerazrijeđene anorganske pirofosfataze (0,242 jedinica/ $\mu\text{l}$ ) i 553  $\mu\text{l}$  ReH<sub>2</sub>O. Reakcijska smjesa je promiješana, kratko centrifugirana i potom 3 sata inkubirana na 37°C.

Reakcijska smjesa za transkripciju *in vitro* hmt tRNA<sup>Ser<sub>AGA</sub></sup> u ukupnom volumenu 1,5 ml sadržavala je 150  $\mu\text{l}$  DNA (konačna koncentracija 717  $\text{ng}/\mu\text{l}$ ), 150  $\mu\text{l}$  10x TXN pufera, 240  $\mu\text{l}$  25  $\text{mmol dm}^{-3}$  smjese NTP-ova (koncentracija svakog NTP-a je 25  $\text{mmol dm}^{-3}$ ), 300  $\mu\text{l}$  0,1  $\text{mol dm}^{-3}$  GMP, 75  $\mu\text{l}$  0,1  $\text{mol dm}^{-3}$  DTT, 7,5  $\mu\text{l}$  100x BSA, 22,5  $\mu\text{l}$  nerazrijeđenog RNazina, 15  $\mu\text{l}$  T7 RNA-polimeraze, 7,5  $\mu\text{l}$  nerazrijeđene anorganske pirofosfataze s amonijevim sulfatom (0,242 jedinice/ $\mu\text{l}$ ) i 532,5  $\mu\text{l}$  ReH<sub>2</sub>O. Reakcijska smjesa je 3 sata inkubirana na 37°C.



### 3.2.2.2. Pročišćavanje transkripcijske smjese od DNA kalupa

Kako bi se iz transkripcijske smjese hčit tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> izdvojila DNA taloženjem, u nju je dodano 4,2 ml 20% PEG-a (konačni volumni udio  $\varphi=0,07$ ), 2 ml 3 mol dm<sup>-3</sup> natrijeva klorida (konačna koncentracija 0,5 mol dm<sup>-3</sup>) i 4,3 ml ReH<sub>2</sub>O. Smjesa je inkubirana 10 minuta na sobnoj temperaturi i zatim je centrifugirana 25 minuta na 4 000 x g na temperaturi od 21°C. Odvojen je supernatant (oko 6 ml) i u njega dodano 3 volumena etanola ( $\varphi=0,7$ ) i 1/10 volumena 3 mol dm<sup>-3</sup> natrijevog acetata pH 4,5 za taloženje tRNA<sup>Ser</sup>. Smjese s istaloženim tRNA<sup>Ser</sup> su centrifugirane na 10 000 x g 30 minuta pri 4 °C. Talog je dodatno ispran s etanolom ( $\varphi=0,7$ ). Smjese s istaloženim tRNA<sup>Ser</sup> su centrifugirane na 10 000 x g 30 minuta pri 4°C. Nakon toga, talozi su posušeni 10 minuta uređajem Speed Vac i otopljeni u 500 µl sterilne redestilirane vode.

### 3.2.2.3. Izolacija molekula tRNA iz gela

U djelomično pročišćene molekule tRNA dodano je 500 µl boje za denaturirajuće ureja gelove i uzorci su nanoseni na poliakrilamidni gel s urejom dimenzija 10,1 x 8,2 cm u jednu veliku jažicu. Elektroforeza je trajala 1 sat na 80 V i 1 sat na 140 V. tRNA<sup>Ser</sup> je iz gela izrezana pomoću skalpela pod UV lampom na pločici PEI-celuloze s fluorescentnim indikatorom. Izrezani komadići gela su inkubirani preko noći uz potresanje u 6 ml ekstrakcijskog pufera sastava 0,5 mol dm<sup>-3</sup> Tris pH 7,0, 0,1 % SDS, 10 mmol dm<sup>-3</sup> MgCl<sub>2</sub> i 0,1 mmol dm<sup>-3</sup> EDTA. Nakon prve noći izdvojen je supernatant i dodano je još 6 ml ekstrakcijskog pufera, ostavljeno je preko noći i drugi dan je opet odvojen supernatant. U svaki supernatant je dodano 15 ml etanola ( $\varphi=0,96$ ) i 1,5 ml 3 mol dm<sup>-3</sup> natrijevog acetata kako bi se istaložila tRNA<sup>Ser</sup>. Smjese su centrifugirane 30 minuta na 10 000 x g pri 4°C. Nakon odvajanja supernatanta talog je posušen 15 minuta, centrifugiran 1 minutu pri 3 800 x g i resuspendiran u 400 µl ReH<sub>2</sub>O za hčit tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> i 450 µl za hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub>.

### 3.2.2.4. Računanje molekulske mase tRNA transkripata

Molekularne mase ( $M_r$ ) tRNA<sup>Ser</sup> transkripata su izračunate pomoću formule:  $M_r = (A_n \times 329.2) + (U_n \times 306.2) + (C_n \times 305.2) + (G_n \times 345.2) + 159$  daltona.  $A_n$ ,  $U_n$ ,  $C_n$  i  $G_n$  predstavljaju brojeve svakog nukleotida u transkriptu (A – adenilat, U – uridilat, C – citidilat i G – gvanilat), a pribrajan je broj 159 zbog trifosfata na 5' kraju tRNA<sup>Ser</sup>. Dobivena vrijednost molekulske mase vrijedi pri fiziološkom pH.

### **3.2.2.5. Provjera veličine i koncentracije tRNA transkripata na poliakrilamidnom gelu u prisustvu ureje**

Uzorci za provjeru veličine i koncentracije pročišćenih tRNA<sup>Ser</sup> su pripremljeni na sljedeći način - za svaku tRNA su pripremljena 3 uzorka sa sljedećim komponentama: prvi uzorak je sadržavao 2  $\mu\text{l}$  0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  tRNA i 4  $\mu\text{l}$  ReH<sub>2</sub>O, drugi uzorak je sadržavao 4  $\mu\text{l}$  0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  tRNA i 2  $\mu\text{l}$  ReH<sub>2</sub>O i treći uzorak 6  $\mu\text{l}$  0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  tRNA.

### **3.2.2.6. Poliakrilamidna gel-elektroforeza tRNA pri denaturirajućim uvjetima u prisutnosti ureje**

U svrhu analize dobivenih transkripata (provjera njihove čistoće i molekulske mase) koristi se poliakrilamidna gel-elektroforeza u prisutnosti denaturirajućeg sredstva - ureje. Pripravljena je otopina za gel sljedećeg sastava: akrilamid:bisakrilamid, (60 mg ml<sup>-1</sup>, u međusobnom masenom omjeru 19:1), 7 mol dm<sup>-3</sup> ureja, TBE pufer (0,02 mol dm<sup>-3</sup> EDTA (pH = 8,0), 0,1 mol dm<sup>-3</sup> Tris-HCl, 0,09 mol dm<sup>-3</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>). Za polimerizaciju gela dodan je APS do konačne koncentracije 0,7  $\mu\text{g ml}^{-1}$  i TEMED do konačnog volumnog udjela 0,05 %. Nakon miješanja, otopina je izlivena među dvije staklene ploče i nakon sat vremena gel je bio polimeriziran. Uzorcima se doda jednak volumen RNA boje. Prije nanošenja uzoraka u jažice, uzorci tRNA su denaturirani inkubacijom 5 minuta na 70 °C, gel je prethodno podvrgnut predelektroforezi u trajanju od 30 minuta, a neposredno prije nanošenja uzoraka jažice su isprane od istaložene ureje. Elektroforeza je provedena pri 140 V, u trajanju 50 minuta, na sobnoj temperaturi u puferu TBE 1x.

### **3.2.2.7. Bojanje poliakrilamidnih gelova toluidinom**

Denaturirajući poliakrilamidni gelovi u prisutnosti ureje boje se u otopini toluidinskog modrila za bojanje urea gelova 15 min na rotacijskoj platformi. Gelovi se odbojavaju u vrućoj destiliranoj vodi.

## **3.2.3. Metode rada s proteinima**

### **3.2.3.1. Indukcija proizvodnje mitohondrijskog proteina SerRS**

Rekombinativni plazmid pProEX HTb s ugrađenim genom za mtSerRS transformiran je u soj BL21 bakterije *E. coli* metodom kemijske transformacije. Stanice su uzgajane preko noći pri 37 °C, a prekonocne kulture su presađene u svježi medij te uzgajane tri sata u ukupno 4 l medija LB na 28 °C u prisutnosti ampicilina u konačnoj koncentraciji 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  do OD<sub>600</sub> = 0,8. Nakon toga su inducirane dodatkom 65  $\mu\text{l}$  IPTG (konačna koncentracija 100 mmol dm<sup>-3</sup>) i uzgajane još 3 sata na 28 °C. Stanice su centrifugirane 15

minuta na 5000 x g, zatim je medij odstranjen i talog je ispran hladnom vodom i ponovo centrifugiran. Stanice su ujedno pohranjene i zamrznute u glicerolskoj kulturi.

### 3.2.3.2. Afinitetno pročišćavanje proteina na Ni-NTA agarozima

U svrhu brzog i jednostavnog pročišćavanja, proteini su prekomjerno eksprimirani s histidinskim privjeskom na N-kraju. Kao kromatografsko punilo korištena je Ni-NTA agaroz. NTA je vezana na 4 od ukupno 6 veznih mjesta u koordinacijskoj sferi iona nikla, dok se na preostala 2 vezna mjesta vežu histidini iz histidinskog privjeska. Protein se s kolone eluirao imidazolom koji je strukturno sličan bočnom ogranku histidina, te se umjesto histidina veže na nikel. Propuštanjem smjese proteina kroz kolonu, na nju će se vezati samo onaj protein koji specifično veže imobilizirani ligand, dok će svi ostali proteini proći kroz kolonu.

Talog zamrznutih stanica resuspendiran je u 30 ml pufera za lizu stanica, te su dodani 5 µl lizozima i 5 µl deoksiribonukleaza. Stanice su sonicirane na ledu u 10 ciklusa, svaki u trajanju od jedne minute, između kojih je bila pauza od 1 min. Dobiven stanični ekstrakt je centrifugiran 1h na 10 000 x g, 4 °C. Za daljnju analizu taloga SDS-PAGE-om stanični talog je nakon centrifugiranja resuspendiran u jednakom volumenu vode u kojem se centrifugiralo. Afinitetno pročišćavanje je išlo slijedećim postupkom: 10 ml Ni-NTA agaroze je prebačeno u kolonu i kolona je isprana s 100 ml ReH<sub>2</sub>O. Nakon toga kolona je uravnotežena s 90 ml pufera za lizu. Nanesen je uzorak supernatanta (stanični ekstrakt) na kolonu te nakon toga 200 ml pufera za lizu i 40 ml pufera za ispiranje (koncentracija imidazola 30 mmol dm<sup>-3</sup>). Proteini koji se su vezali heksahistidinskim privjeskom na Ni-NTA agarozu eluirani su puferom za eluciju u frakcijama od 10 ml (koncentracija imidazola 400 mmol dm<sup>-3</sup>). Uzorci volumena 10 µl su dodani u 100 µl Bradfordovog reagensa kako bi mogli uočiti prisutnost proteina u eluatima i prema potrebi još jednom provesti eluciju. Eluati, talog, supernatant i frakcija nevezanih proteina su analizirani elektroforezom na denaturirajućem gelu uz prisutnost detergenta (SDS).

### 3.2.3.3. Određivanje prisutnosti proteina po Bradfordu

Određivanje koncentracije proteina po Bradfordu (Bradford, 1976) primjenjeno je za općenite svrhe kao što je procjena prisutnosti proteina i/ili koncentracije proteina nakon elucije. Koristi se Bradfordov reagens odnosno kisela otopina boje *Coomassie Brilliant Blue G-250* koja ima maksimum apsorbancije pri valnoj duljini od 465 nm (Stoscheck, 1990). Molekule boje su u anionskom obliku i vežu se sulfonskim skupinama uglavnom za arginin, histidin i lizin, ali i za tirozin, triptofan i fenilalanin jer osim elektrostatskih interakcija, za vezanje boje i proteina u kompleks važne su hidrofobne i Van der Waalsove interakcije. Prilikom vezanja boje za protein, maksimum se pomiče na valnu duljinu od 595

nm. Ova se metoda koristila prilikom Ni-NTA kromatografije za određivanje prisutnosti proteina u eluatima nakon kromatografija.

#### **3.2.3.4. Poliakrilamidna denaturirajuća elektroforeza na gelu u prisutnosti natrijevog deodecil-sulfata (SDS-PAGE)**

Za analizu uzoraka proteina korištena je elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecilsulfata (SDS-PAGE). SDS je negativno nabijen detergent koji se veže za hidrofobne dijelove proteina što dovodi do razdvajanja proteina na pojedinačne polipeptidne lance i maskiranja njihovog neto naboja. SDS se ravnomjerno veže na protein pa je omjer naboja i mase kod svih proteina u uzorku isti, te se oni razdvajaju samo na temelju svoje molekulske mase.

Priprema gela: između dviju staklenih ploča u uspravnom položaju do 4/5 volumena izliven je gel za razdvajanje priređen dodatkom APS-a do konačne koncentracije  $0,7 \mu\text{g ml}^{-1}$  i TEMED do konačnog volumnog udjela 0,05% u otopinu sastava: akrilamid:bisakrilamid ( $90 \text{ mg ml}^{-1}$ , u masenom omjeru 29:1),  $0,375 \text{ mol dm}^{-3}$  Tris-HCl (pH = 8,8), SDS ( $4 \text{ mg ml}^{-1}$ ). Gel je nadsvođen destiliranom vodom čime je poravnat gornji rub gela za razdvajanje. Nakon 30 min voda je izlivena te je izliven gel za sabijanje dodavanjem APS do konačne koncentracije  $0,7 \mu\text{g ml}^{-1}$  i TEMED do konačnog volumnog udjela 0,05% u otopinu sastava: akrilamid:bisakrilamid ( $40 \text{ mg ml}^{-1}$ , u masenom omjeru 29:1),  $0,125 \text{ mol dm}^{-3}$  Tris-HCl (pH = 6,8), SDS ( $4 \text{ mg ml}^{-1}$ ). Uzorci proteina se nanose na gel pomiješani s 1/4 volumena boje za nanošenje uzoraka i praćenje elektroforeze proteina. Prije nanošenja na gel proteini su denaturirani inkubiranjem na  $95^\circ \text{C}$  tijekom 5 min.

#### **3.2.3.5. Bojanje proteina razdvojenih na poliakrilamidnom gelu bojom *Coomassie Brilliant Blue***

Nakon elektroforeze gel je inkubiran 10 minuta u otopini *Coomassie Brilliant Blue* za bojanje SDS gelova na rotacijskoj platformi. Gel je potom odbojavan u kipućoj destiliranoj vodi tijekom 20 minuta.

#### **3.2.3.6. Određivanje koncentracije proteina spektrofotometrom**

Koncentracija proteina određena je mjerenjem apsorbancije pri  $\lambda=280 \text{ nm}$  pomoću spektrofotometra NanoDrop 1000. Volumen uzoraka nanošenih na postolje iznosio je 2  $\mu\text{l}$ . Molarni ekstincijski koeficijent, molekulska masa proteina i izoelektrična točka (vidi Tablicu 3.7.) izračunati su pomoću *ProtParam* (ExPASy Proteomics Server). Koncentracija ispitivanog proteina izražena je u  $\text{mg ml}^{-1}$ , a mjerno područje spektrofotometra NanoDrop 1000 za proteine je  $0,1 - 100 \text{ mg ml}^{-1}$ .

**Tablica 3.7.** Molekulske masa proteina ( $m$ ), molarni apsorpcijski koeficijent ( $\epsilon$ ) te izoelektrična točka ( $pI$ ) određeni serverom *ProtParam*.

Varijanta proteina mtSerRS	Duljina / broj aminokiselina	$m$ / kDa	$\epsilon$ / dm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	$pI$
d34	508	114	72 000	6,33

### 3.2.3.7. Pročišćavanje proteina ionskom izmjenom pomoću brze proteinske tekućinske kromatografije

Ionska (anionska) izmjena je provedena na kromatografskom sustavu *AKTAFPLC*. Korištena kolona bila je MonoQ HR 10/10. Frakcije su bile volumena 1,3 ml, a brzina protoka 3 ml min<sup>-1</sup>. Cijeli je sustav bio ohlađen na 4 °C. Ova metoda je optimirana više puta tijekom projekta. Konačni protokol je bio sljedeći: nanesen je koncentrat proteina na kolonu. Prvo je kolona isprana puferom A u volumenu 2 CV. Nakon toga je skokovito rasla koncentracija pufera B prema sljedećim koracima: 5% (v/v), 30% (v/v) i 100% (v/v), dok je do 0% (v/v) skokovito padala koncentracija pufera A: 95% (v/v), 70% (v/v) i 0% (v/v). Prvi korak je iznosio 3 CV-a, dok su drugi i treći iznosili 2 CV-a. Elucija je praćena apsorbancijom pri 260 i 280 nm (Slika 4.27.).

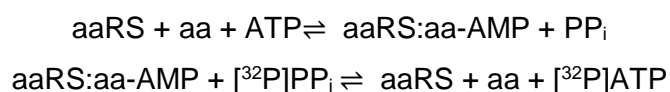
### 3.2.3.8. Koncentriranje proteina u otopini

Nakon FPLC metode odabrani eluati su koncentrirani u centirkonima *Amicon Ultra centrifugal filters (Milipore)* (pore 50 kDa). Svojstvo proteina od interesa (d34 mtSerRS) je molekulska masa od 57156.9 Da. Protein je dimer pa molekulska masa iznosi 2x57156,9 Da, odnosno 114313,8 Da. Centrikon s porama 50 kDa na membrani propušta samo molekule manje od 50 kDa pa se u centrikonu koncentrirao protein, dok su se sve ostale molekule uzorka mase manje od 50 kDa prošle kroz membranu u Falkon epruvetu. Koncentriran protein je pohranjen na -80 °C u puferu za čuvanje proteina.

### 3.2.3.9. Kinetičke metode: aktivacija serina i BMAA mjerena ATP/PP<sub>i</sub> izmjenom

U istraživanju aaRS standardno se koriste neke kinetičke metode, opisane u revijalnom radu Francklyn i sur. 2008. Jedna od njih je ATP/PP<sub>i</sub> izmjena, enzimski test kojim se mjeri brzina aktivacije aminokiseline. Metoda se temelji na mjerenju brzine ugradnje izotopa [<sup>32</sup>P], prvotno prisutnog u pirofosfatu, u molekulu ATP-a. Ta ugradnja se odvija u povratnoj reakciji aktivacije, pirofosforolizi. Do pirofosforolize dolazi zbog visoke koncentracije pirofosfata u reakcijskoj smjesi, a preduvjet za nju je nastajanje njenog drugog supstrata,

aminoacil-adenilata, koji nastaje u naprednoj reakciji aktivacije. Brzina nastajanja radioaktivnog ATP-a funkcija je brzine sinteze aminoacil-adenilata i pirofosforolize.



U ovom istraživanju, određivani su parametri u uvjetima ustaljenog stanja u reakciji aktivacije aminokiselina serin i BMAA. Izmjena ATP/[<sup>32</sup>P]PP<sub>i</sub> se izvodi u odsutnosti tRNA, stoga parametri  $k_{\text{cat}}$  i  $K_m$  dobiveni ovom metodom ne odgovaraju nužno brzini aktivacije u prisutnosti tRNA (Francklyn i sur. 2008.). Reakcijska smjesa sadržavala je 100 mmol dm<sup>-3</sup> HEPES pH 7,5, 20 mmol dm<sup>-3</sup> MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol dm<sup>-3</sup> NaCl, 4 mmol dm<sup>-3</sup> ATP, 1 mmol dm<sup>-3</sup> NaPP<sub>i</sub> (smjesa radioaktivnog i neradioaktivnog), 5 mmol dm<sup>-3</sup> DTT, 0,25 mmol dm<sup>-3</sup> L-serin ili 50 mmol dm<sup>-3</sup> BMAA te odgovarajuću SerRS. Enzimi su prethodno razrijeđeni u puferu sastava: 100 mmol dm<sup>-3</sup> HEPES pH 7,5, 50 mmol dm<sup>-3</sup> NaCl i 5 mmol dm<sup>-3</sup> DTT. Finalne koncentracije SerRS u reakcijama s BMAA bile su 2 μmol dm<sup>-3</sup>, a u reakcijama sa serinom koncentracija SerRS iz *E. coli* iznosila je 0,1 μmol dm<sup>-3</sup>, a za humane enzime 1 μmol dm<sup>-3</sup>. Reakcija se odvijala na 37 °C. Reakcija započinje dodatkom aminokiseline u ostatak reakcijske smjese. Za sve enzime napravljene su i kontrolne reakcije u kojima je umjesto aminokiseline dodan odgovarajući volumen ReH<sub>2</sub>O vode, kako bi se provjerila aktivnost enzima neovisna o dodatku aminokiseline. Nakon 5, 10, 15, 20 i 25 minuta reakcija je zaustavljena dodatkom alikvota reakcijske smjese od 1,5 μl u 3 μl otopine za zaustavljanje reakcije koja je sadržavala 500 mmol dm<sup>-3</sup> natrijeva acetata i 0,1 % SDS. Zatim je 1,5 μl zaustavljene reakcijske smjese nanoseno na polietileniminske pločice za tankoslojnu kromatografiju (*Fluka*), predaktivirane razvijanjem u ReH<sub>2</sub>O te osušene na sobnoj temperaturi.

Razdvajanje [<sup>32</sup>P]PP<sub>i</sub>, [<sup>32</sup>P]ATP i [<sup>32</sup>P]P<sub>i</sub> tankoslojnom kromatografijom odvijalo se razvijanjem pločica u puferu za razvijanje. Nakon sušenja, dobiveni kromatogrami izloženi su preko noći na zaslonu s uskladištenim fosforom, koji je potom snimljen na uređaju *Phosphor Imager Typhoon 9410*. Rezultati su kvantificirani u programu *ImageQuant 5.2* te su iz grafičkih prikaza određene početne brzine ( $v_0$ ) nastanka [<sup>32</sup>P]ATP pri dodanim koncentracijama enzima.

<sup>1</sup>Dijelove pokusa koji su uključivali rad s radioaktivnim materijalom i pisanje dijelova rada izvodila je dr. sc. Vlatka Godnić – Mikuličić.

### 3.2.3.10. Kinetičke metode: aminoaciliranje

Aminoaciliranje je enzimski test koji obuhvaća mjerenje ukupne brzine oba koraka reakcije aminoacil-tRNA-sintetaza. Izvodi se korištenjem radioaktivnih supstrata, ili [ $^{14}\text{C}$ ]aminokiseline ili [ $^{32}\text{P}$ ] obilježene tRNA (revijalno prikazano u Francklyn i sur. 2008.). U ovom radu reakcija je praćena preko tRNA obilježene s  $^{32}\text{P}$  na 3'-terminalnom nukleotidu. Reakcije su se odvijale u puferu koji je sadržavao  $100\text{ mmol dm}^{-3}$  HEPES (pH=7,5),  $20\text{ mmol dm}^{-3}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $10\text{ mmol dm}^{-3}$  NaCl,  $4\text{ mmol dm}^{-3}$  ATP,  $5\text{ mmol dm}^{-3}$  DTT,  $0,2\text{ mmol dm}^{-3}$  L-serin, odnosno  $40\text{ mmol dm}^{-3}$  BMAA ili bez dodatka aminokiseline pri  $37\text{ }^\circ\text{C}$ . Hcit tRNA<sup>Ser<sub>AGA</sub></sup> je bila prisutna u koncentraciji  $7,2\text{ }\mu\text{mol dm}^{-3}$ , a hmt tRNA<sup>Ser<sub>TGA</sub></sup>  $10\text{ }\mu\text{mol dm}^{-3}$ . Objе tRNA denaturirane su zagrijavanjem na  $80\text{ }^\circ\text{C}$  3 minute, te zatim renaturirane dodatkom  $10\text{ mmol dm}^{-3}$   $\text{MgCl}_2$  i polaganim hlađenjem. Hcit tRNA<sup>Ser<sub>AGA</sub></sup> aminoacilirana je s  $1\text{ }\mu\text{mol dm}^{-3}$  citSerRS, a hmt tRNA<sup>Ser<sub>TGA</sub></sup> s  $1\text{ }\mu\text{mol dm}^{-3}$  mtSerRS. Reakcije su nakon 15, 30 i 60 minuta zaustavljene dodatkom alikvota reakcijske smjese od  $1,5\text{ }\mu\text{l}$  u  $3\text{ }\mu\text{l}$  otopine za zaustavljanje reakcije koja je sadržavala  $0,6\text{ mol dm}^{-3}$  natrijevog acetata (pH=4,8) i 0,15 % (w/v) SDS. Zatim se u alikvot zaustavljene reakcijske smjese od  $1,5\text{ }\mu\text{L}$  dodalo  $3\text{ }\mu\text{L}$  P1 nukleaze otopljene u  $0,3\text{ mol dm}^{-3}$  natrijevog acetata (pH=4,8) koja cijepa tRNA do nukleotida. Smjesa je inkubirana 1 sat na sobnoj temperaturi. Radioaktivni produkti takve razgradnje su [ $^{32}\text{P}$ ]AMP koji odgovara neaminoaciliranoj tRNA, te aminoacil- $^{32}\text{P}$ ]AMP (aa- $^{32}\text{P}$ ]AMP) koji je potekao od aminoacilirane tRNA. Omjer navedene dvije radioaktivne molekule govori o omjeru aminoacilirane i neaminoacilirane tRNA. [ $^{32}\text{P}$ ]AMP se od aa- $^{32}\text{P}$ ]AMP-a razdvaja tankoslojnom kromatografijom u puferu za razvijanje ( $0,1\text{ mol dm}^{-3}$  amonijevog acetata i 5 % (v/v) octena kiselina). Nakon sušenja, dobiveni kromatogrami izloženi su preko noći na zaslonu s uskladištenim fosforom, koji je potom snimljen na uređaju *Phosphor Imager Typhoon 9410*. Rezultati su kvantificirani u programu *ImageQuant 5.2.*

<sup>2</sup>Dijelove pokusa koji su uključivali rad s radioaktivnim materijalom izvodila je dr. sc. Morana Dulić.

## 4. Rezultati

### 4.1. Konstrukcija rekombinantnih plazmida za transkripciju molekula tRNA *in vitro*

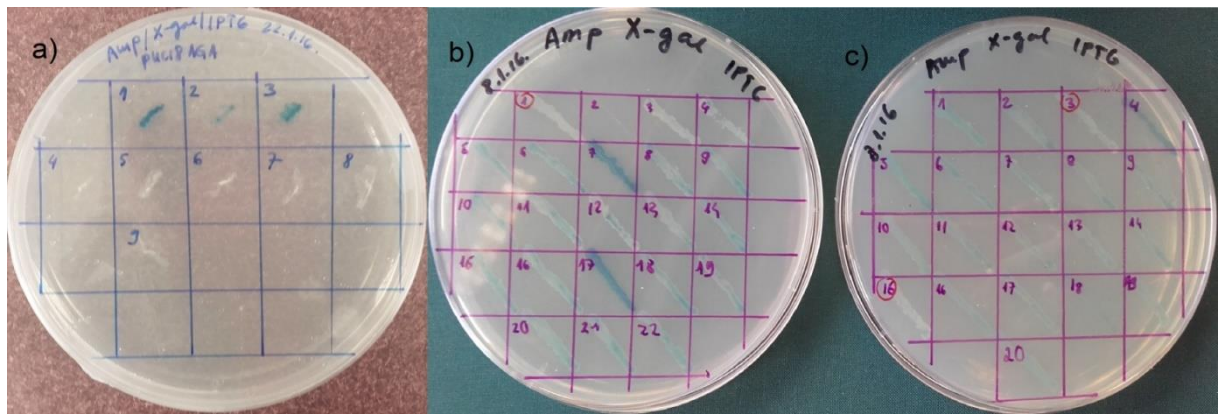
#### 4.1.1. Kloniranje gena za tRNA u vektor pUC18

Za kloniranje u pUC18 vektor naručeni su sintetski geni za hčit tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> i hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> s EcoRI i BamHI stršećim krajevima, a pUC18 vektor je razgrađen s EcoRI i BamHI restriksijskim endonukleazama prema protokolu u 3.2.1.1.1. poglavlju. Prije kloniranja u plazmid, sintetski geni za tRNA<sup>Ser</sup> su kinizirani pomoću T4 polinukleotid-kinaze prema protokolu u poglavlju 3.2.1.1.2.. T4 polinukleotid-kinaza katalizira prienos gama fosfatne skupine ATP-a na 5' krajeve oligonukleotida kako bi se omogućila ligacijska reakcija. Smjesa s kinaziranim oligonukleotidom koji sadrži nukleotidni slijed kodirajućeg lanca gena za tRNA<sup>Ser</sup> i smjesa s kinaziranim oligonukleotidom koji sadrži nukleotidni slijed nekodirajućeg lanca gena za tRNA<sup>Ser</sup> su spojene u smjesu za hibridizaciju, odnosno smjesu u kojoj su se te dvije oligonukleotidne sekvence komplementarno spojile. Sastav ligacijske smjese opisan je u poglavlju 3.2.1.1.3. .

#### 4.1.2. Transformacija bakterija *E. coli* soja DH5α s pUC18-tRNA<sup>Ser</sup> i selekcija pozitivnih kolonija

Vektori pUC18 s ugrađenim genima za tRNA<sup>Ser</sup> su uneseni u bakterijske stanice kemijskom metodom opisanom u poglavlju 3.2.1.3.. Budući da vektor pUC18 nosi gene za ekspresiju β-laktamaze, bakterije *E. coli* soja DH5α transformirane ligacijskom smjesom, nasađene su na selektivne LBamp podloge kako bi se izdvojile uspješno transformirane stanice, odnosno stanice koje su primile pUC18 vektor. S LBamp podloga su nasumično odabrane 42 bakterijske kolonije transformirane s pUC18 – hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> i 9 bakterijskih kolonija transformiranih s pUC18 - hčit tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> i nasađene su na selektivnu podlogu s ampicilinom, X-gal-om i IPTG-om (Slika 4.1.) kako bi se selektirale kolonije koje su primile pUC18 s ugrađenim genom za tRNA<sup>Ser</sup> metodom plavo bijele selekcije. Bijele kolonije su one čije stanice sadrže pUC18 s ugrađenim tRNA genom, a plave kolonije su one čije stanice sadrže pUC18 u koji se nije ugradio tRNA gen. Na slici 4.1. a) prve tri kolonije plave boje sadrže pUC18 u koji se nije ugradio gen hčit tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> dok je za kolonije od 4-9 smatrano da sadrže pUC18 s ugrađenim genom za hčit tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub>. Na slici 4.1. b) i c) odabrane su tri kolonije: kolonija 1 na ploči pod b) i kolonije 3 i 16 pod c). Odabrane kolonije podvrgnute su dodatnim analizama radi utvrđivanja uspješnosti ugradnje gena za tRNA<sup>Ser</sup> u pUC18 vektor.



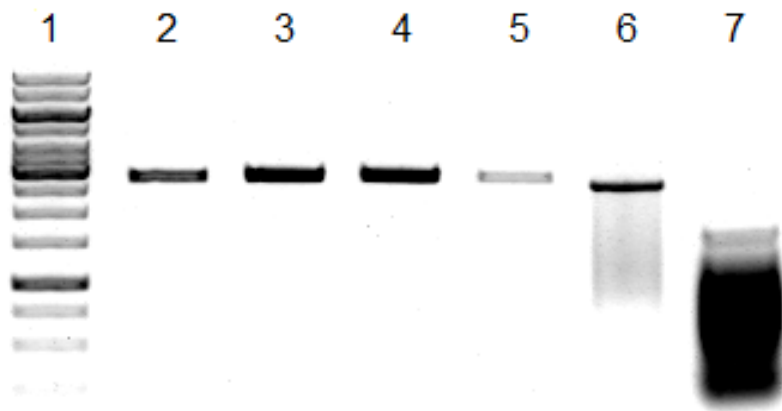


**Slika 4.1.** Plavo bijela selekcija bakterijskih kolonija *E. coli* soja DH5 $\alpha$  transformiranih s pUC18 u kojima je došlo do uspješne ugradnje gena za tRNA<sup>Ser</sup>. a) selekcija kolonija uspješno transformiranih s pUC18- hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub>, b) i c) selekcija kolonija uspješno transformiranih s pUC18 – hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub>.

#### 4.1.3. Provjera ugradnje gena za tRNA u vektor pUC18

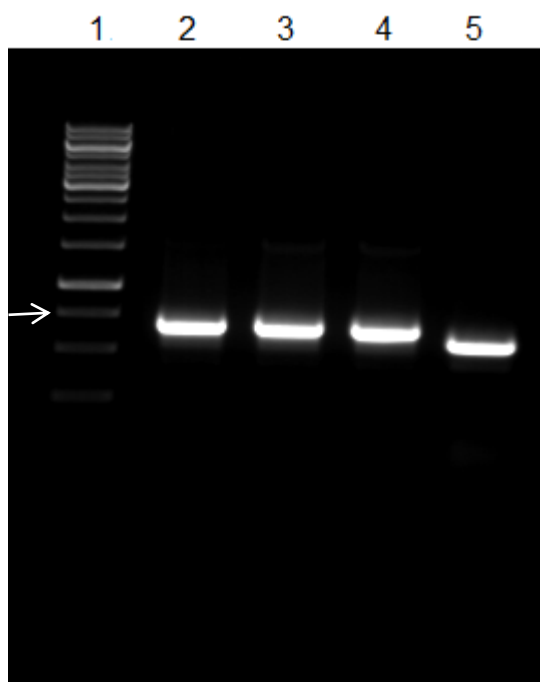
##### 4.1.3.1. Izolacija plazmidne DNA iz bakterijskih stanica i restrikcijska analiza s ciljem provjere ugradnje gena za hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> u vektor pUC18

Iz bakterijskih kolonija selektiranih na LBamp podlozi, X-gal-om i IPTG-om uzgojene su tri prekonoćne tekuće kulture iz kojih je izolirana plazmidna DNA prema protokolu u poglavlju 3.2.1.4.1.. Pročišćenim plazmidima je izmjerena koncentracije na NanoDrop 1000 i one su iznosile 22,7 ng/ $\mu$ l za pUC18 s ugrađenim genom za tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> 3A, 35,1 ng/ $\mu$ l za pUC18 s ugrađenim genom za tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> 1B i 41,7 ng/ $\mu$ l za pUC18 s ugrađenim genom za tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> 1C (3A, 1B i 1C su oznake bakterijskih kolonija iz kojih su plazmidi izolirani). Pročišćeni plazmidi su pocijepani s restrikcijskom endonukleazom Nsil koja cijepa samo na jednom mjestu i to unutar gena hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub>. Pocijepana izolirana plazmidna DNA provjerena je na 1% agaroznom gelu (Slika 4.2.). Na gel je nanoseno 5  $\mu$ l Generuler 1kb ladder markera i 15  $\mu$ l reakcijske smjese pUC18 pocijepanog s Nsil u koju je dodana kap agarozne boje. Elektroforeza se provodila na 120 V u trajanju od 45 minuta.



**Slika 4.2.** Agarozna elektroforeza plazmida pUC18 pocijepanog s Nsil. 1 - Generuler 1kb ladder marker, 2 - pUC18 – hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> 3A pocijepan s Nsil, 3 - pUC18 – hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> 1B pocijepan s Nsil, 4 - pUC18 – hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> 1C pocijepan s Nsil, 5 – pUC18 - tRNA<sup>Ser</sup> iz arhebakterije *Methanothermobacter thermautotrophicus* pocijepana s Nsil, 6 – prazan pUC18 pocijepan s EcoRI i BamHI, 7 – prazan pUC18 cijepan s Nsil - negativna kontrola.

pUC18 je vektor duljine 2,686 kb. Djelovanjem s EcoRI i BamHI na plazmid pUC18, vektor se linearizira i gubi 21 nukleotid (2,665 kb) što se ne može primjetiti na gelu i on putuje jedanko kao cijeli linearizirani vektor pUC18. Međutim, on putuje sporije od cirkularnog pUC18 u jažici 7 jer je cirkularna DNA superzavijena i kompaktnija te lakše putuje kroz pore gela. Nsil nije linearizirao prazan pUC18 vektor jer on ne sadrži restrikcijsko mjesto za taj enzim. Kraj hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> gena sadrži Nsil restrikcijsko mjesto i on je korišten za dokazivanje ugradnje hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> gena. Hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> je insert duljine 107 nt te je ukupna duljina rekombinantnog vektora zajedno s insertom 2,772 kb. Razlika u broju nukleotida između pUC18 s ugrađenim genom pocijepanim s Nsil i praznog pUC18 pocijepanog s EcoRI i BamHI je 107 nt (duljina ugrađenog oligonukleotida) što se lijepo vidi na gelu (Slika 4.2.). 107 nukleotida dulji linearizirani pUC18 vektor s ugrađenim hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> genom u jažicama 2, 3 i 4 putuje malo sporije od lineariziranog pUC18 vektora pocijepanog s EcoRI i BamHI te jednako kao linearizirani pUC18 vektor s ugrađenom tRNA<sup>Ser</sup> iz arheje *Methanothermobacter thermautotrophicus*. Na temelju ove analize utvrđeno je da odabrane bakterijske kolonije iz kojih je izolirana plazmidna DNA sadrže pUC18 s ugrađenim hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> genom. U svrhu dodane potvrde da analizirani plazmidi imaju hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> insert, napravljen je i kolonijski PCR i PCR na izoliranim plazmidima (Slika 4.3.).

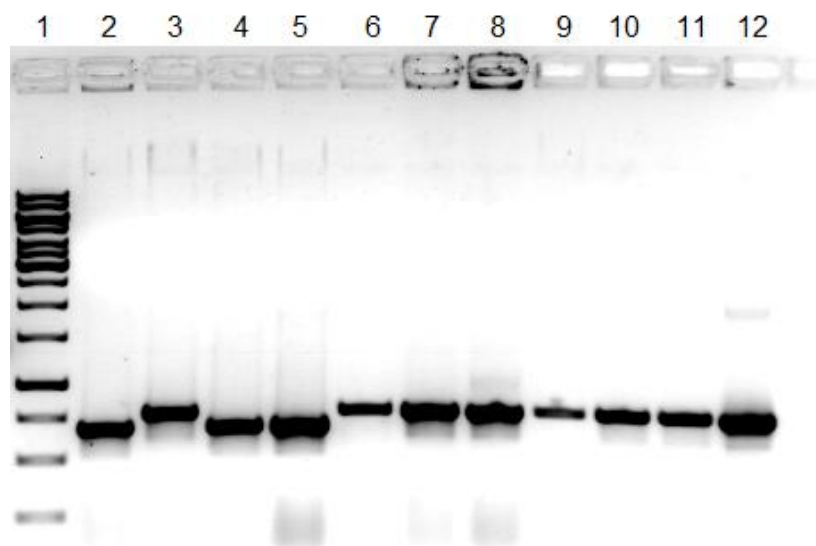


**Slika 4.3.** PCR na izoliranim plazmidima pUC18 – hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub>. 1 – Generuler 1kb ladder marker, 2 – pUC18 - hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> 3A (778 pb), 3 - pUC18 - hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> 1B (778 pb), 4 - pUC18 - hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> 1C (778 pb), 5 – prazan pUC18 (671 pb). Bijela strelica pokazuje marker veličine 750 pb. Korištene su početnice pUCF i pUCR.

Na slici 4.3. se vidi da su sva tri pUC18 – hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> PCR produkta putovala sporije od produkta PCR-a na praznom pUC18 što znači da uzorci 3A, 1B i 1C sadrže pUC18 vektor s ugrađenim hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> insertom.

#### 4.1.3.2. Provjera ugradnje hcit tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> u pUC18 vektor kolonijskim PCR-om

Svih devet bakterijskih kolonija transformiranih s pUC18 – hcit tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> uzgojenih na LBamp podlozi s X-gal-om i IPTG-om su analizirane kolonijskim PCR-om kako bi se potvrdile kolonije koje sadrže pUC18 vektor s uspješno ugrađenim hcit tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> oligonukleotidom. Bakterijske kolonije su vrhom nastavka za pipete unesene u reakcijsku smjesu za PCR (poglavlje 3.2.1.6.2., PCR uvjeti navedeni su u tablici 3.4. unutar poglavlja 3.2.1.6.2.). Korištene početnice su pUCF i pUCR. Produkti PCR reakcije su analizirani na 1% agaroznom gelu (Slika 4.4.). Na gel je nanoseno 5 µl Generuler 1kb ladder markera i 10 µl PCR reakcijske smjese u koju je dodana kap agarozne boje. Elektroforeza se provodila na 140 V u trajanju od 1 sat.



**Slika 4.4.** Agarozna gel elektroforeza PCR produkata kolonijskog PCR-a. Kao kalup korištene su bakterijske kolonije transformirane s pUC18 - hciT tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub>. 1 – Generuler 1kb ladder marker, 2-4 – plave kolonije iz plavo-bijele selekcije kolonija transformiranih s pUC18 – hciT tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub>, 5 – prazan pUC18 – negativna kontrola, 6-11 – bijele kolonije iz plavo bijele selekcije kolonija transformiranih s pUC18 – hciT tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> (6 – pUC18 – hciT tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> 4, 7 - pUC18 – hciT tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> 5, 8 - pUC18 – hciT tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> 6, 9 - pUC18 – hciT tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> 7, 10 - pUC18 – hciT tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> 8, 11 - pUC18 – hciT tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> 9), 12 – pUC18 s ugrađenim hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> oligonukleotidom – pozitivna kontrola.

Iz slike 4.4. vidljiva je uspješna ugradnja hciT tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> inserta u pUC18 vektor kod kolonija čiji se uzorci nalaze u jažicama 6, 7, 8 i 9. HciT tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> oligonukleotid sadrži 119 nukleotida, samo 11 nukleotida više od hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub>. PCR produkti dobiveni iz bijelih kolonija koji prijeđu jednak put kao pozitivna kontrola sadrže uspješno ugrađen hciT tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> gen, te će takvi PCR produkti putovati sporije u odnosu na prazni pUC18 vektor što se lijepo vidi na gelu. Pozitivan rezultat su dali PCR produkti u jažicama 6, 7, 8 i 9. Uzorak u jažicama 10 i 11 je putovao duljinom između praznog pUC18 vektora i pozitivne kontrole tako da se za njega ne može sa sigurnošću utvrditi je li pozitivan ili negativan. Pozitivan rezultat je i u jažici 3, međutim kalup potječe iz plave bakterijske kolonije što je trebalo značiti da ta kolonije nema uspješno ugrađen hciT tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> gen. Metoda plavo bijele selekcije nije 100% pouzdana te je zbog kratkoće ugrađenog inserta moguće došlo do ekspresije β-galaktozidaze.

#### 4.1.3.3. Transformacija bakterija *E. coli* soja BL21 s pUC18 koji sadrži gen za tRNA

Od kolonija za koje je kolonijskim PCR-om utvrđeno da sadrže pUC18 s ugrađenim hciT tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> genom napravljene su tekuće prekonocne kulture bakterijskih stanica iz kojih

je pročišćena plazmidna DNA prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.1.4.1.. Izmjerene koncentracije pročišćenih plazmida na NanoDrop 1000 iznosile su redom za izolirane plazmide: 376,9 ng/μl za pUC18 s ugrađenim tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> 4, 342,8 ng/μl za pUC18 s ugrađenim tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> 5, 364,3 ng/μl za pUC18 s ugrađenim tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> 6 i 436,3 ng/μl za pUC18 s ugrađenim tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> 7 (brojevi 4, 5, 6 i 7 su oznake bakterijskih kultura iz kojih su izolirani plazmidi). Pročišćenim plazmidima transformirane su bakterije *E. coli* soja BL21 metodom kemijske transformacije opisanom u poglavlju 3.2.1.3. te su uzgojene suspenzije bakterijskih kolonija i one su ujedno pohranjene u obliku glicerolskih kultura. Gliceolske kulture su napravljene tako da je u volumen suspenzije dodan jednaki volumen glicerola ( $\varphi=0,5$ ) (konačni volumni udio glicerola u smjesi je 25%) i uzorci su pospremljeni na -80°C. Na isti način su transformirane stanice s izoliranim i provjerenim pUC18 - hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> plazmidima i pohranjene kao glicerolske kulture.

#### 4.2. Sekvenciranje rekombinantnih pUC18 vektora s tRNA insertima

Na sekvenciranje u *MacroGen*, Južna Koreja su poslani izolirani pUC18 vektori s ugrađenim tRNA<sup>Ser</sup> insertima kako bi se provjerilo da su sekvence tRNA<sup>Ser</sup> gena replicirane bez pogrešaka unutar *E. coli* stanica soja DH5α.

##### 4.2.1. Sekvenciranje pročišćenih pUC18 vektora s ugrađenim hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> genima

Na sekvenciranje je poslano tri uzorka (obilježeni su 3A, 1B i 1C) pročišćenih pUC18 vektora s hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub>. Rezultati sekvenciranja su obrađeni u online programima BLAST: Basic Local Alignment Search Tool i Bioninformatics.org. Početnice korištene za sekvenciranje su prikazane u tablici 4.1..

**Tablica 4.1.** Početnice korištene za sekvenciranje pUC18 - tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub>

Sekvencirani uzorak	Početnica
pUC18 – hmt tRNA <sup>Ser</sup> <sub>TGA</sub> 3A	pUCF
pUC18- hmt tRNA <sup>Ser</sup> <sub>TGA</sub> 1B	pUCF
pUC18 – hmt tRNA <sup>Ser</sup> <sub>TGA</sub> 1C	pUCF

Sravnjavanjem sekvenci naručenog sintetskog hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> oligonukleotida i sekvenci dobivenih sekvenciranjem hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> gena ugrađenih i repliciranih unutar vektora pUC18 dobiveni su sljedeći rezultati. Hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> 1B insert je sadržavao mutaciju u

restrikcijom mjestu i unutar gena dok su ostala dva inserta, hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> 3A i 1C sadržavali mutacije samo unutar restrikcijskog mjesta, ali promotor i gen nisu imali mutacija. Za *in vitro* transkripciju je korišten pUC18 – hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> 1C (Prilog 1.).

#### 4.2.2. Sekvenciranje pročišćenih pUC18 vektora s ugrađenim hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> genima

Na sekvenciranje je poslano četiri uzorka pročišćenih pUC18 vektora s hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> (obilježeni su 4, 5, 6 i 7). Rezultati sekvenciranja su obrađeni u online programima BLAST: Basic Local Alignment Search Tool i Bioinformatics.org. Početnice korištene za sekvenciranje su prikazane u tablici 4.2..

**Tablica 4.2.** Početnice korištene za sekvenciranje pUC18 - tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub>

Sekvencirani uzorak	Početnica
pUC18 – hmt tRNA <sup>Ser</sup> <sub>AGA</sub> 4	pUCF
pUC18- hmt tRNA <sup>Ser</sup> <sub>AGA</sub> 5	pUCF
pUC18 – hmt tRNA <sup>Ser</sup> <sub>AGA</sub> 6	pUCF
pUC18 – hmt tRNA <sup>Ser</sup> <sub>AGA</sub> 7	pUCF

Sravnjavanjem sekvenci naručenog sintetskog hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> oligonukleotida i sekvenci dobivenih sekvenciranjem hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> gena ugrađenih i repliciranih unutar vektora pUC18 dobiveni su sljedeći rezultati. pUC18 – hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> insert 5 je sadržavao mutaciju unutar restrikcijskog mjesta za enzim Sall i unutar gena nedostaje tri nukleotida stoga je gen bio prekratak. Ostala tri inserta, hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> 4, 6 i 7 su bila bez greški. Za *in vitro* transkripciju je korišten hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> 4 insert (Prilog 2.).

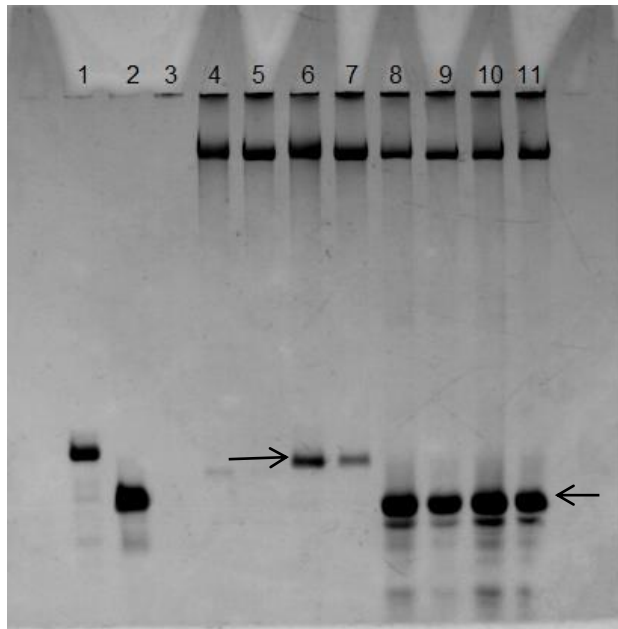
#### 4.3. Priprema sustava za *in vitro* transkripciju tRNA iz pročišćene rekombinantne plazmidne DNA

##### 4.3.1. Pročišćavanje rekombinantne plazmidne DNA

Za svaku tRNA<sup>Ser</sup> iz glicerolskih bakterijskih kultura bakterija *E. coli* soja BL21 za koje je sekvenciranjem plazmidne DNA utvrđeno da sadrže ispravno ugrađen i repliciran tRNA<sup>Ser</sup> gen u pUC18 vektor su uzgojene prekonoćne bakterijske kulture u suspenziji te je iz uzgojenih stanica pročišćena plazmidna DNA prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.1.4.2.. Koncentracije izoliranih plazmidnih DNA su izmjerene na NanoDrop 1000: koncentracija pUC18 s hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> insertom iznosila je 961,8 ng/μl, a koncentracija pUC18 s hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> insertom iznosila je 657,6 ng/μl.

#### 4.3.2. Probna *in vitro* transkripcija

Reakcijska smjesa volumena 10  $\mu\text{l}$  za lineariziranje kalupa se sastojala od 2,5  $\mu\text{g}$  pUC18 s ugrađenim tRNA<sup>Ser</sup> insertom (konačna koncentracija 250 ng/ $\mu\text{l}$ ), 1  $\mu\text{l}$  NEBuffer 3, 0,5  $\mu\text{l}$  Nsil i 0,5  $\mu\text{l}$  ReH<sub>2</sub>O. Za svaku tRNA<sup>Ser</sup> je napravljena zasebna reakcijska smjesa. Cijepanje s Nsil se odvijalo preko noći. Nakon toga su reakcije inaktivirane temperaturom od 65°C tijekom 20 minuta. Transkripcijske reakcijske smjese imale volumen od 20  $\mu\text{l}$  i sadržavale su iduće komponente: 2  $\mu\text{l}$  10x TXN pufera, 3,2  $\mu\text{l}$  25 mmol dm<sup>-3</sup> smjese NTP-ova (koncentracija svakog NTP-a je 25 mmol dm<sup>-3</sup>), 4  $\mu\text{l}$  0,1 mol dm<sup>-3</sup> GMP, 1  $\mu\text{l}$  0,1 mol dm<sup>-3</sup> DTT, 1  $\mu\text{l}$  BSA (1 mg/ml), 0,3  $\mu\text{l}$  RNazina, 0,2  $\mu\text{l}$  T7 RNA-polimeraze, 0,08  $\mu\text{l}$  anorganske pirofosfataze (0,242 jedinice/ $\mu\text{l}$ ) i 10  $\mu\text{l}$  inaktivirane smjese s lineariziranim kalupom. Reakcijske smjese su inkubirane na 37°C, 3 sata. Alikvot za analizu na poliakrilamidnom gelu je uzet nakon 1,5 sata i 3 sata inkubacije. Rezultati su prikazani na slici 4.5..



**Slika 4.5.** . Poliakrilamidna gel elektroforeza u prisustvu ureje probnih *in vitro* transkripcijskih reakcija hci tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> i hci tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub>. 1 – tRNA<sup>Ser</sup> iz *Methanothermobacter thermotrophicus* – pozitivna kontrola (Mr = 27,9 kDa), 2 - humana tRNA<sup>Arg</sup> – pozitivna kontrola (Mr = 24,3 kDa), 3 – transkripcijska smjesa bez DNA kalupa, 4 - hci tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> 5 3h nakon početka transkripcije, 5 - hci tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> 5 1h nakon početka transkripcije, 6 – hci tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> 4 3h nakon početka transkripcije, 7 - hci tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> 4 1h nakon početka transkripcije, 8 - hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> 3A 3h nakon početka transkripcije, 9 - hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> 3A 1h nakon početka transkripcije, 10 – hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> 1C 3h nakon početka transkripcije, 11 - hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> 1C 1h nakon početka transkripcije. Crne strelice prikazuju položaj željenih tRNA molekula.

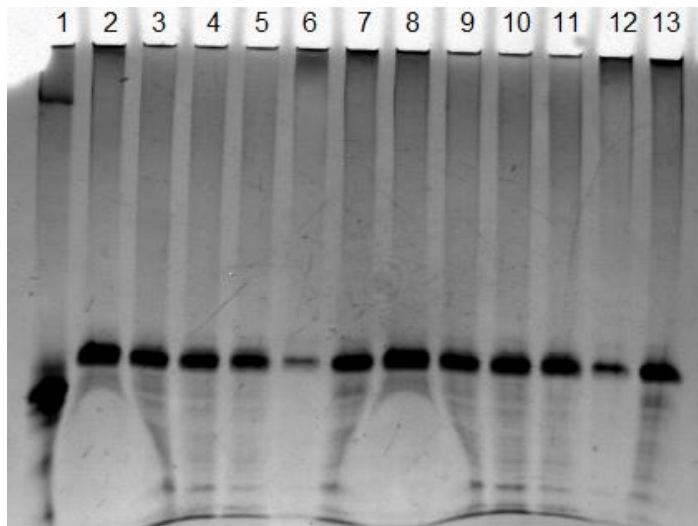
Iz slike 4.5. je vidljivo da je prinos hci tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> 5 transkripta (jažice 4 i 5) izuzetno nizak, a u reakciji s hci tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> 4 nema transkripata (jažice 6 i 7). Međutim, obje hmt

tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub>, 3A i 1C, pokazuju odličan prinos transkripata te je za njihovu transkripciju korišten isti sastav reakcijske smjese dok je sastav reakcijske smjese za transkripciju hcit tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> morao biti optimiran.

#### 4.3.3. Optimiranje *in vitro* transkripcije hcit tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub>

Sustav za transkripciju hcit tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> je optimiran korištenjem anorganske pirofosfataze (s ili bez amonijevog sulfata) različitih proizvođača, dodatkom HEPES-a, različitih koncentracija magnezijevog acetata, Tween20 te dodatnim pročišćavanjem kalupa. Smjese 1 i 2 su sadržavale po 2 µl 10x TXN pufera, 3,2 µl 25 mmol dm<sup>-3</sup> smjese NTP-ova (svaki NTP je koncentracije 25 mmol dm<sup>-3</sup>), 4 µl 0,1 mol dm<sup>-3</sup> GMP, 1 µl 0,1 mol dm<sup>-3</sup> DTT, 0,1 µl 100x BSA, 0,3 µl RNazina (razrijeđeni), 0,2 µl T7 RNA-polimeraze, 2 µl pUC18 s hcit tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> insertom pocijepan s Nsil i 0,1 µl anorganske pirofosfataze (smjesa 1 bez amonijevog sulfata, a smjesa 2 s amonijevim sulfatom). Volumen smjese po svakoj reakciji je 12,9 µl. Pripremljeno je 6 reakcijskih smjesa za svaku smjesu 1 i 2 označenim slovima a), b), c), d), e) i f) s idućim dodacima u smjesi: a) dodano je 8 µl 100 mmol dm<sup>-3</sup> HEPES-a (konačna koncentracija 40 mmol dm<sup>-3</sup>, pH 7,5), b) dodano je 2 µl 100 mmol dm<sup>-3</sup> magnezijevog acetata (konačne koncentracije 10 mmol dm<sup>-3</sup>) i 5 µl ReH<sub>2</sub>O, c) dodano je 4 µl 100 mmol dm<sup>-3</sup> magnezijevog acetata (konačne koncentracije 20 mmol dm<sup>-3</sup>) i 3 µl ReH<sub>2</sub>O, d) dodano je 6 µl 100 mmol dm<sup>-3</sup> magnezijevog acetata (konačne koncentracije 30 mmol dm<sup>-3</sup>) i 1 µl ReH<sub>2</sub>O, e) dodano je 2 µl 1% Tween20 (konačno 0,1%) i 5 µl ReH<sub>2</sub>O i f) dodano je 7 µl ReH<sub>2</sub>O. Nakon transkripcije u trajanju od 4 sata, u smjese je dodano 20 µl boje za RNA i cijeli volumen uzorka je nanesen u jažice te su reakcije analizirane denaturirajućom poliakrilamidnom gel elektroforezom u prisustvu ureje na 120 V 30 minuta i zatim 150 V 20 minuta.





**Slika 4.6.** Poliakrilamidna gel elektroforeza u prisustvu ureje reakcijskih smjesa probne transkripcije *in vitro* hčit tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub>. 1 – transkripcijska smjesa tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub>, 2 – a1 (40 mmol dm<sup>-3</sup> HEPES), 3 – b1 (10 mmol dm<sup>-3</sup> magnezijev acetat), 4 – c1 (20 mmol dm<sup>-3</sup> magnezijev acetat), 5 – d1 (30 mmol dm<sup>-3</sup> magnezijev acetat), 6 – e1 (0,1% Tween20), 7 – f1 (H<sub>2</sub>O), 8 – a2 (40 mmol dm<sup>-3</sup> HEPES), 9 – b2 (10 mmol dm<sup>-3</sup> magnezijev acetat), 10 – c2 (20 mmol dm<sup>-3</sup> magnezijev acetat), 11 – d2 (30 mmol dm<sup>-3</sup> magnezijev acetat), 12 – e2 (0,1% Tween), 13 – f2 (H<sub>2</sub>O).

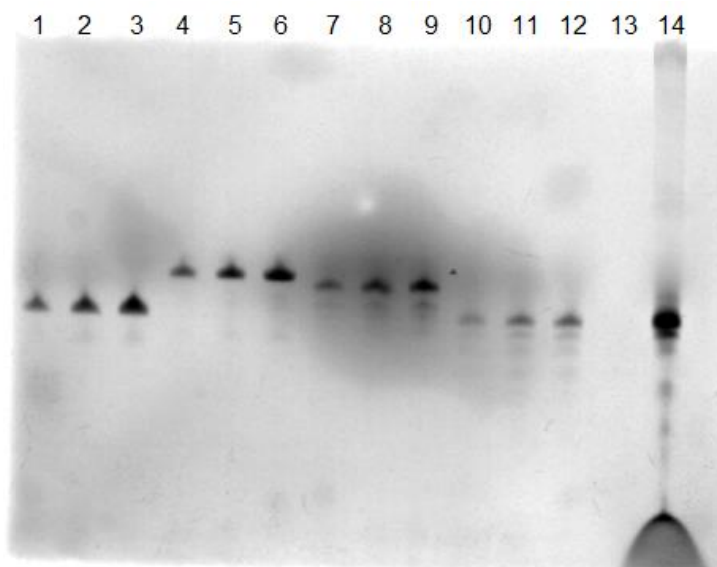
Prema slici 4.6. dobiveni rezultati ukazuju da su reakcije u kojima je anorganska pirofosfataza s amonijevim sulfatom (reakcije a2-f2, jažice 8-13) bile produktivnije od onih u kojima je anorganska pirofosfataza bez amonijeva sulfata (reakcije a1-f1, jažice 2-7). Usporedbom reakcija od a2 –f2 ustanovilo se da su osnovna reakcija (jažica 13) i reakcija s 20 mmol dm<sup>-3</sup> magnezijevog acetata (jažica 10) pružile najpogodnije uvjete za hčit tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> transkripciju *in vitro*. Najmanji prinos transkripta je dala reakcija u kojoj se nalazio 0,1% Tween20 (jažice 6 i 12).

#### 4.4. *In vitro* transkripcija i izolacija tRNA transkripata

Sastavi reakcijskih smjesa transkripcije *in vitro* su navedeni u poglavlju 3.2.2.1.. Iz transkripcijske smjese hčit tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> je prvo istaložen DNA kalup, a zatim tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> dok je iz transkripcijske smjese hčit tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> odmah istaložena hčit tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub>. Talog tRNA<sup>Ser</sup> je resuspendiran u vodi i u cijelosti pomiješan s jednakim volumenom boje za RNA. Provedena je poliakrilamidna elektroforeza u prisustvu ureje na gelu dimenzija 10,1 x 8,2 cm s jednom jažicom za izolaciju tRNA<sup>Ser</sup> iz gela prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.2.3.. Izmjerene su koncentracije izoliranih tRNA<sup>Ser</sup> na NanoDrop 1000: za hčit tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> 308,4 ng/μl i za hčit tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> 540 ng/μl.

#### 4.5. Provjera izoliranih tRNA transkripata

Pročišćeni tRNA<sup>Ser</sup> transkripti su analizirani na poliakrilamidnom gelu u prisustvu ureje kako bi se provjerilo da su cijeloviti i ispravni (Slika 4.7.). Elektroforeza se provodila na 120 V u trajanju 1 sat na sobnoj temperaturi. Na gel je nanoseno po 12  $\mu$ l uzorka. Kretanje transkripata je proporcionalno s njihovom molekulskim masama. Kao kontrole su korištene hcit tRNA<sup>Arg</sup> i tRNA<sup>Ser</sup> iz *Methanothermobacter thermotrophicus* čije su molekulske mase poznate od prije, a molekulske mase hcit tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> i tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> su određene prema formuli navedenoj u poglavlju 3.2.2.4.1.. Molekulska masa hcit tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> iznosi 25,8 kDa, a hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> 22,6 kDa.



**Slika 4.7.** Poliakrilamidna gel elektroforeza u prisustvu ureje transkripata hcit tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> i hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub>. 1,2 i 3 – tRNA<sup>Arg</sup> (Mr = 24,3 kDa), 4,5 i 6 – tRNA<sup>Ser</sup> iz *Methanothermobacter thermotrophicus* (Mr = 27,9 kDa), 7, 8 i 9 – hcit tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> (Mr = 25,8 kDa), 10,11 i 12 – hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> (Mr = 22,6 kDa), 13 - prazna jažica, 14 – transkripcijska smjesa hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub>. Serije tRNA od 1 do 3 za svaku tRNA označavaju 2, 4 i 6  $\mu$ l tRNA koncentracije  $c=0,1 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ .

Prema slici 4.7. i na temelju uzorka transkripcijske smjese hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> jasno se vidi kako je transkripcija *in vitro* bila vrlo uspješna jer ima samo jedna debela vrpca na položaju koji odgovara molekulskoj masi hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub>. Pročišćeni hcit tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> i hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> također gelom putuju sukladno sa svojim molekulskim masama i u usporedbi s kontrolama. Hcit tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> ima molekulsku masu samo 2 kDa manju od tRNA<sup>Ser</sup> iz *Methanothermobacter thermotrophicus* i stoga putuje malo brže (jažice 7-9). Hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> (jažice 10-12) ima molekulsku masu samo 2 kDa manju od tRNA<sup>Arg</sup> i također se na gelu njena vrpca nalazi malo ispod vrpce tRNA<sup>Arg</sup> (jažice 1-3). Za hcit tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> intenzitet vrpce se poklapa s intenzitetima vrpce kontrola, međutim hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> vrpce su slabijeg intenziteta (jažice 10-12) od kontrola te je koncentracija izmjerena

spektrofotometrijski vjerojatno manja od realne zbog prisutnosti male količine kraćih transkripata.

#### 4.6. Predikcija signalne sekvence i dizajn početnica za humanu mtSerRS i sinteza gena za humanu mtSerRS preparativnim PCR-om

Provedbom proteinske sekvence humane mtSerRS kroz servere za određivanje signalne sekvence koja usmjerava u mitohondrij dobiveno je više različitih predikcija (Tablica 4.3.). U doktoratu doc. dr. sc. Jasmine Rokov Plavec napravljeno je sravnjenje proteinskih sekvenci humane mtSerRS sa SerRS iz različitih organizama te su određene duljine signalnih sekvenci različite od onih predviđenih serverima za predikciju signalnih sekvenci (Tablica 4.4.).

**Tablica 4.3.** Predikcije signalne sekvence za humanu mtSerRS serverima za predikciju presekvenci

Server	Duljina signalne sekvence
Target P1.1, Tpred 2.0	34
Yoshinori MitoFates	33
MitoProt II v1.101	21
PSORT II	31

**Tablica 4.4.** Predikcija presekvence humane mtSerRS temeljeno na sravnjenju proteinskih sekvenci humane mtSerRS sa SerRS iz *E. coli* i *Bos taurus*.

Duljina signalne sekvence	Napomena
56	Duljina proteina jednaka kao u <i>E. coli</i>
29	Duljina proteina jednaka kao u <i>Bos taurus</i> i ostalim eukariotima

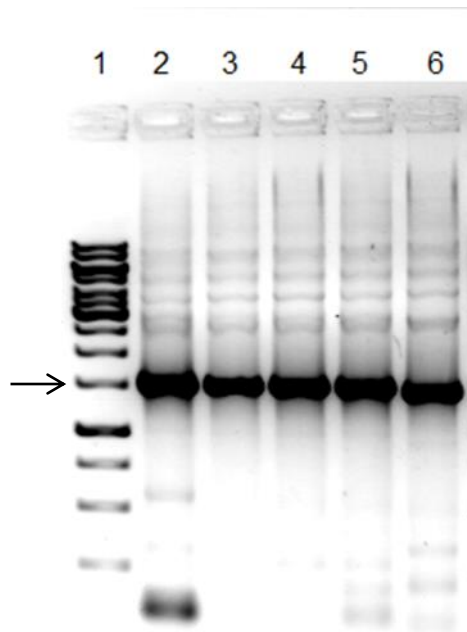
Gen za humanu mtSerRS je naručen iz *GenomeCube*, United Kingdom. cDNA gena je bila ugrađena u vektor pOTB7. Uzvodne početnice za umnažanje gena s pOTB7 kalupa su dizajnirane tako da svojim komplementarnim sparivanjem s kalupom odrede duljinu gena odnosno duljinu presekvence s N-kraja koja nije dio funkcionalnog enzima. Uzvodne početnice su sadržavale 5' slijed koji nije komplementaran kalupu, a sadrži slijed GAGAGA zbog svojstava DNA-polimeraze koja uspješnije sintetizira gen ako je prisutan

naveden slijed. Iza slijeda GAGAGA nalazi se sekvenca koju prepoznaje restrikcijska endonukleaza BamHI potrebna za kasnije kloniranje gena. Zatim ide slijed koji je komplementaran početku gena za mtSerRS bez signalne sekvence na kodirajućem lancu, odnosno taj dio početnice je bio komplementaran različitim dijelovima kalupa s obzirom na odabranu veličinu signalne sekvence. Nizvodna početnica je za željene verzije gena bila ista: na 5' kraju je imala GAGA slijed, nakon njega restrikcijsko mjesto za enzim Sall, UAA stop kodon i još 18 nukleotida uzvodno od stop kodona. Zadnje tri komponente početnice su komplementarne nekodirajućem lancu kalupa (Tablica 4.5.).

**Tablica 4.5.** Početnice za preparativni PCR gena humane mtSerRS. Ljubičasto obojano je slijed koji omogućuje uspješniju aktivnost DNA-polimeraze. Plavo obojano i podcrtano je BamHI restrikcijsko mjesto. Crveno obojano i podcrtano je Sall restrikcijsko mjesto. Ostatak slijeda hibridizira s genom mtSerRS.

Početnica	Veličina početnice	Annealing temperatura/ ° C	Slijed nukleotida
mtSRsD21Bam	30	70	GAG AGA <u>GGA TCC</u> CGG GGA GGC TGC ATC TCC
mtSRsD34Bam	33	65	GAG AGA <u>GGA TCC</u> ACT ACA GAG AAA CGA AAC CGG
mtSRsD33Bam	34	64	GAG AGA <u>GGA TCC</u> TTC ACT ACA GAG AAA CGA AAC C
mtSRsD29Bam	32	64	GAG AGA <u>GGA TCC</u> CCA AGA AGT TTC ACT AC
mtSRsD256Bam	30	67	GAG AGA <u>GGA TCC</u> CAG CTG GAC ATA GAG CGG
3mtSRS-Sal	31	68	GAGA <u>GTC GAC</u> TTA GCT TAC AGC AGG CTG GCC

Sastav reakcijske smjese za umnažanje gena humane mtSerRS i uvjeti PCR reakcije navedeni su u poglavlju 3.2.1.6.1.. Dobiveni PCR produkti analizirani su na 1% agaroznom gelu pri 140 V u trajanju od 1 h (Slika 4.8.). Na gel je nanoseno 5 µl Generuler 1kb ladder markera i 10 µl uzorka s PCR produktima u koji je dodana kap agarozne boje.



**Slika 4.8.** Agarozna gel elektroforeza PCR produkata mtSerRS gena s različitom duljinom signalne sekvence dobivenih preparativnim PCR-om. 1 – Generuler 1kb ladder marker, 2 – PCR produkt mtSerRS gena bez signalne sekvence duljine 21 aminokiselina (d21 – 1491 pb), 3 - PCR produkt mtSerRS gena bez signalne sekvence duljine 29 aminokiselina (d29 – 1467 pb), 4 - PCR produkt mtSerRS gena bez signalne sekvence duljine 33 aminokiseline (d33 – 1455 pb), 5 - PCR produkt mtSerRS gena bez signalne sekvence duljine 34 aminokiselina (d34 – 1451 pb), 6 - PCR produkt mtSerRS gena bez signalne sekvence duljine 56 aminokiselina (d56 – 1386 pb). Crna strelica pokazuje na fragment markera od 1500 pb.

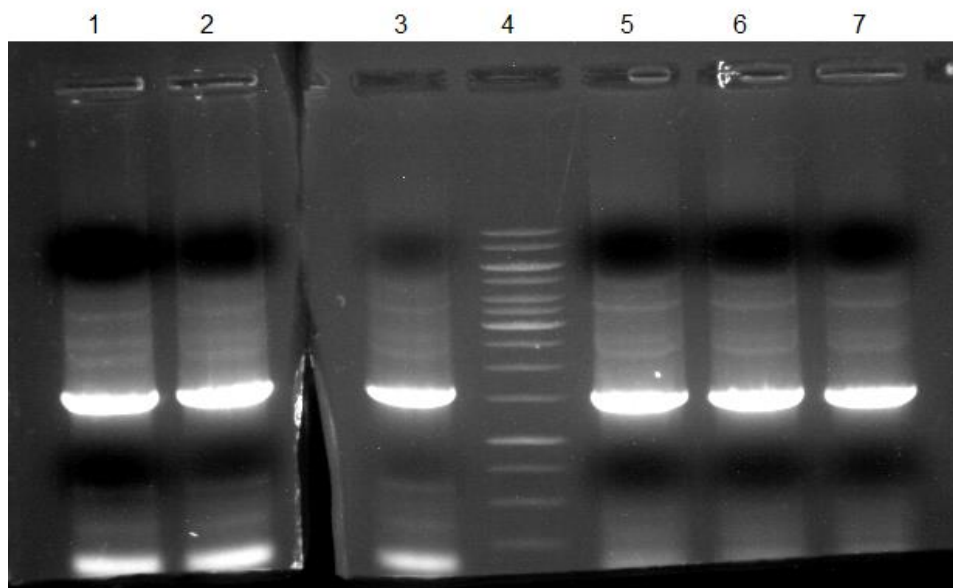
Prema slici 4.8. PCR reakcija je bila vrlo specifična i rezultirala je dobrim prinosom željenih produkata. Svi PCR produkti mtSerRS su putovali malo dulji put u odnosu na marker duljine 1500 pb što se poklapa s izračunatim duljinama PCR fragmenata za svih pet verzija gena. Unatoč sveukupnoj razlici od oko 100 pb između duljine fragmenata na gelu, lijepo se vidi da kraći fragmenti putuju malo dulji put od prethodnog fragmenta koji je veći. Najveća razlika se vidi između fragmenta d21 u jažici 2 i d56 u jažici 6 jer je upravo između njih ta razlika iznosi oko 100 pb. d29, d33 i d34 u jažicama 3, 4 i 5 putuju jedva zamjetno različiti put jer je razlika između njih unutar 20 pb što je premalo da bi se dobro razlučilo na gelu.

#### **4.7. Konstrukcija rekombinantnih plazmida za ekspresiju humane mtSerRS *in vivo***

##### **4.7.1. Ugradnja PCR produkata gena za humanu mtSerRS u vektor pProEX HTb**

Dobiveni PCR produkti d21, d29, d34 i d56 su izolirani iz 1% agaroznog gela nakon provedene elektroforeze pri 120 V i 1 h. Za svaki mutant je podjeljeno po 40  $\mu$ l uzorka u

tri jažice (Slika 4.9.). Tupi PCR produkti su iz gela pročišćeni prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.1.2.1.. Da bi PCR produkti sadržavali ljepljive krajeve za ligaciju s vektorom, tupi PCR produkti su preko noći razgrađeni s enzimima BamHI i Sall, a sastav reakcijske smjese je naveden u poglavlju 3.2.1.2.2.. Prije ligacije u vektor, PCR produkti, sada s ljepljivim krajevima, su pročišćeni prema protokolu navedenom u poglavlju 3.2.1.1.1.. Sastav ligacijske smjese pProEX HTb vektora i gena za humanu mtSerRS naveden je u poglavlju 3.2.1.2.3..

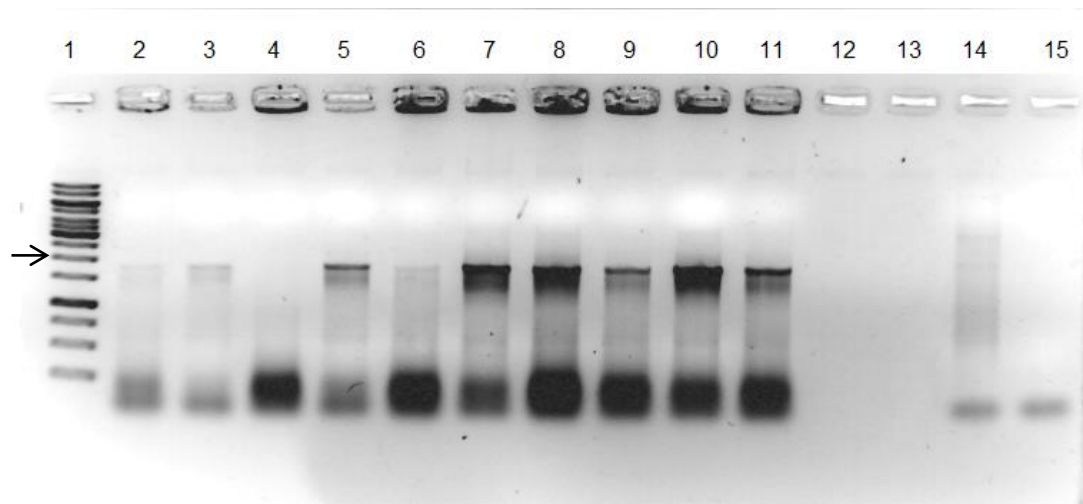


**Slika 4.9.** Gel-elektroforeza u gelu agaroze tupih PCR produkata mtSerRS d21 i d34 za izolaciju DNA iz gela. 1-3 – mt SerRS d21, 4 - Generuler 1kb ladder marker, 5-7 – mtSerRS d34.

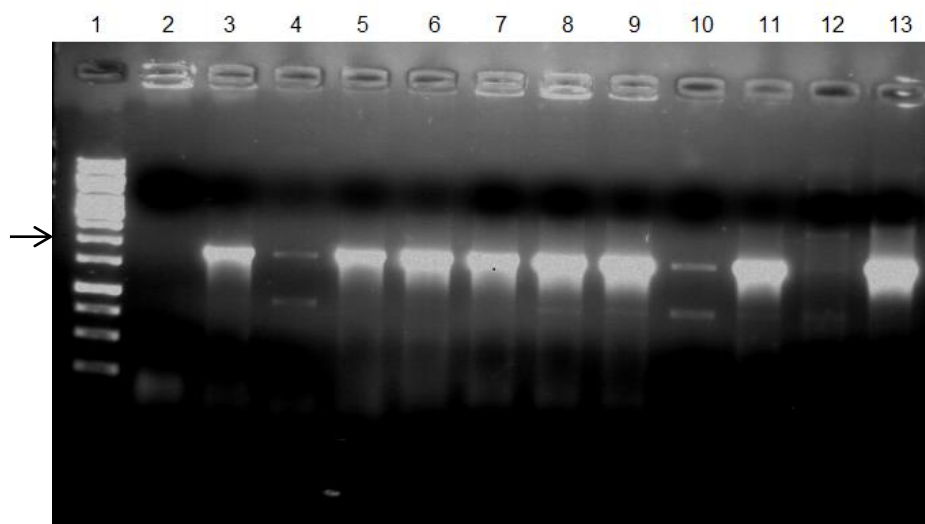
#### **4.7.2. Transformacija bakterija *E. coli* soja DH5 $\alpha$ s pProEX HTb-mtSerRS i selekcija pozitivnih kolonija**

Kompetentne stanice *E. coli* soja DH5 $\alpha$  su transformirane s pProEX HTb vektorom u koji je ugrađen gen za humanu mtSerRS metodom opisanom u poglavlju 3.2.1.3.. Kao i pUC18, pProEX HTb također nosi gen za rezistenciju na antibiotik ampicilin te su transformirane stanice nasađene na LBamp ploče i bakterijske kolonije su uzgajane na 37°C preko noći. pProEX HTb vektor nema svojstvo vektora za plavo-bijelu selekciju stoga je za provjeru pozitivnih kolonija, odnosno kolonija čije stanice sadrže uspješno rekombinirani vektor korištena metoda kolonijskog PCR-a. Nasumično je odabrano 10 kolonija za d21, d29, d34 i d56 na kojima je proveden kolonijski PCR. Reakcijske smjese i uvjeti PCR reakcije navedeni su u poglavlju 3.2.1.6.2. u tablici 3.5.. Rezultati PCR reakcija su analizirani na 1% agaroznom gelu. Za d21 (Slika 4.10.) i d34 (Slika 4.12.) u jažice gela je nanoseno 15  $\mu$ l uzorka i 5  $\mu$ l Generuler 1kb ladder markera, a za d29 (Slika

4.11.) i d56 (Slika 4.13.) 10  $\mu$ l uzorka i 6  $\mu$ l Generuler 1kb ladder markera. Elektroforeza je trajala 45 minuta pri 140 V. Pozitivne kolonije na gelu imaju vrpcu koja se nalazi malo ispod markera od 2,0 kb. Od 10 analiziranih kolonija za d21 bilo je 7 pozitivnih (uzorci 3, 5, 7 – 11) (Slika 4.10.), za d29 je također bilo 7 pozitivnih reakcija (uzorci 3, 5 – 9 i 11) (Slika 4.11.), za d34 8 pozitivnih (uzorci 2, 3, 5-7, 9-11) (Slika 4.12.) i za d56 9 pozitivnih (uzorci 1-5, 7-11) (Slika 4.13.).



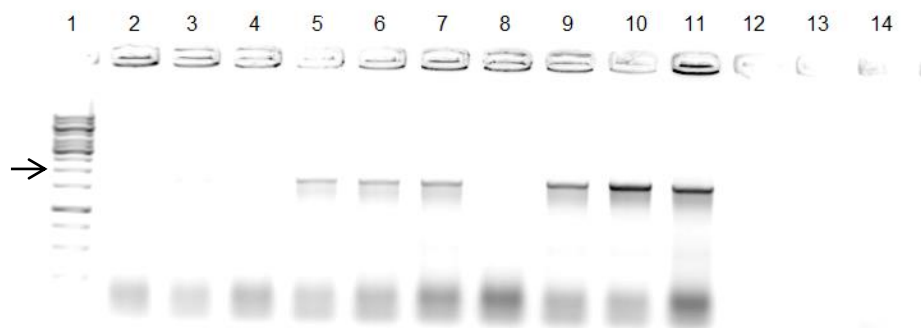
**Slika 4.10.** Gel-elektroforeza u gelu agaroze PCR produkata nakon kolonijskog PCR-a na kolonijama transformiranih s pProEX HTb – mtSerRS(d21). 1 – Generuler 1kb ladder marker, 2-11 – produkti PCR reakcija 10 različitih kolonija (1962 pb), 12-13 – prazne jažice, 14 - prazan pProEX HTb vektor, negativna kontrola 15 – PCR reakcijska smjesa bez kolonije. Crna strelica pokazuje položaj fragmenta DNA duljine 2,0 kb. Početnice korištene u PCR-u su pProEXF i pProEXR.



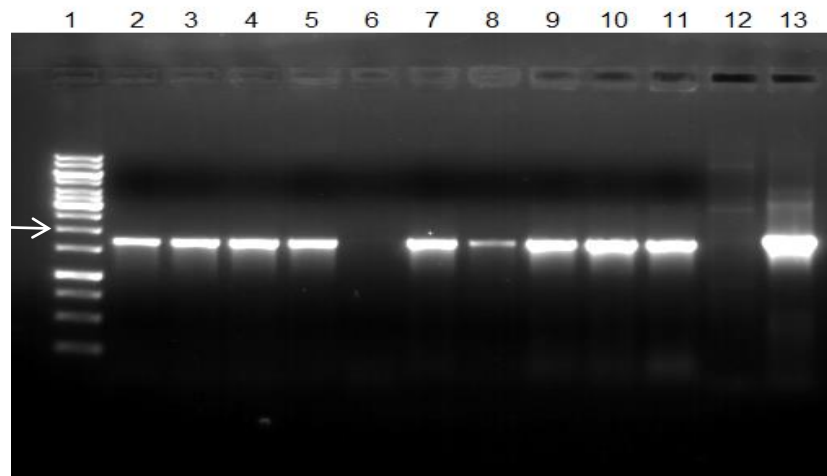
**Slika 4.11.** Gel-elektroforeza u gelu agaroze PCR produkata nakon kolonijskog PCR-a na kolonijama transformiranih s pProEX HTb – mtSerRS(d29). 1 – Generuler 1kb ladder marker, 2-11 – produkti PCR reakcija 10 različitih kolonija (1938 pb), 12 - prazan pProEX HTb vektor - negativna



kontrola, 13 – pProEX HTb - mtSerRS(d21), pozitivna kontrola. Crna strelica pokazuje položaj fragmenta DNA duljine 2,0 kb. Početnice korištene u PCR-u su pProEXF i pProEXR.



**Slika 4.12.** Gel-elektroforeza u gelu agaroze PCR produkata nakon kolonijskog PCR-a na kolonijama transformiranih s pProEX HTb – mtSerRS(d34). 1 – Generuler 1kb ladder marker, 2-11 – produkti PCR reakcija 10 različitih kolonija (1923 pb), 12-13 – prazne jažice, 14 - prazan pProEX HTb vektor - negativna kontrola. Crna strelica pokazuje položaj fragmenta DNA duljine 2,0 kb. Početnice korištene u PCR-u su pProEXF i pProEXR.

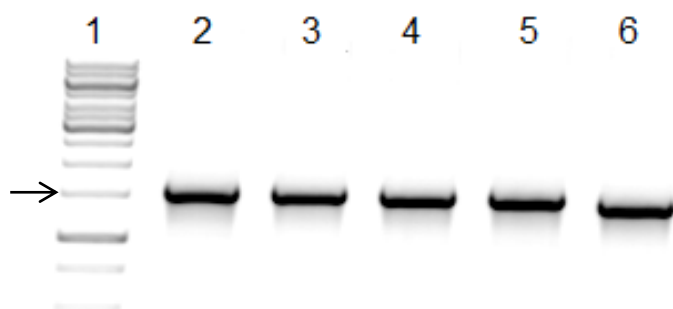


**Slika 4.13.** Gel-elektroforeza u gelu agaroze PCR produkata nakon kolonijskog PCR-a na kolonijama transformiranih s pProEX HTb – mtSerRS(d56). 1 – Generuler 1kb ladder marker, 2-11 – produkti PCR reakcija 10 različitih kolonija (1857 pb), 12 - prazan pProEX HTb vektor, negativna kontrola, 13 – pProEX HTb-mtSerRS(d21), pozitivna kontrola. Bijela strelica pokazuje položaj fragmenta DNA duljine 2,0 kb. Početnice korištene u PCR-u su pProEXF i pProEXR.

Ugradnja gena humane mtSerRS u pProEX HTb je provjerena i PCR reakcijom u kojima je kao kalup korišten pročišćen vektor pProEX HTb – mtSerRS. PCR produkti su analizirani gel-elektroforezom na 1 % agaroznom gelu voženom pri 120 V tijekom 45



minuta (Slika 4.14.). U jažice gela naneseo je 5  $\mu$ l Generuler 1kb ladder markera i 10  $\mu$ l uzorka s kapi agarozne boje.



**Slika 4.14.** Gel-elektroforeza u gelu agaroze za PCR reakcije s kalupom pProEX HTb – mtSerRS. 1 – Generuler 1kb ladder marker, 2 – d21 (1491 pb), 3 – d29 (1467 pb), 4 – d33 (1455 pb), 5 – d34 (1452 pb), 6 – d56 (1386 pb). Crna strelica pokazuje na marker veličine 1,5 kb. Početnice korištene u PCR-u su pProEXF i pProEXR.

Na temelju agarozne gel elektroforeze PCR produkata pProEX HTb – mtSerRS (Slika 4.14.) je potvrđeno da je ugradnja gena za humanu mtSerRS u pProEX HTb vektor bila uspješna jer su položaji svih fragmenata na očekivanom položaju na gelu, a to je malo ispod fragmenta markera veličine 1,5 kb za PCR produkte d21, d29, d33 i d34 pošto je njihova veličina između 1,45 – 1,49 kb, dok je za d56 udaljenost malo veća jer je on veličine oko 1,38 kb.

#### **4.8. Sekvenciranje rekombinantnih vektora s ugrađenim genom za humanu mtSerRS**

Naručen konstrukt cDNA humane mtSerRS u vektoru pOTB7 poslan je na sekvenciranje (*MacroGen*, Južna Koreja) kako bi se utvrdilo da je gen bez mutacija. Izolirane plazmidne DNA pProEX HTb s ugrađenim varijantama gena humane mtSerRS su također poslane na sekvenciranje kako bi se utvrdilo da su sekvence mtSerRS gena ugrađenih u vektor pravilno ugrađene i da nisu nastale mutacije prilikom replikacije plazmida u stanicama *E. coli* soja BL21(DE3).

Na sekvenciranje je poslano tri uzorka pročišćenih pProEX HTb vektora s ugrađenim genom za d21 mtSerRS (obilježeni su brojevima 8, 10 i 11), tri uzorka pročišćenih pProEX HTb vektora s ugrađenim genom za d34 mtSerRS (obilježeni su brojevima 8, 12 i 13), dva uzorka pročišćenih pProEX HTb vektora s ugrađenim genom za d29 mtSerRS (obilježeni su brojevima 2 i 6), dva uzorka pročišćenih pProEX HTb vektora s ugrađenim genom za d56 mtSerRS (obilježeni su brojevima 2 i 6) i uzorak pOTB7 vektora s ugrađenom cDNA mtSerRS. Rezultati sekvenciranja su obrađeni u online programima BLAST: Basic Local Alignment Search Tool i Bioninformatics.org.

**Tablica 4.6.** Popis sekvenciranih uzoraka vektora pOTB7 i pProEX HTb s ugrađenim genom mtSerRS

<b>Sekvenciran uzorak</b>	<b>Početnica</b>
<b>cDNA mtSerRS u pOTB7</b>	M13F, M13R
<b>D21 u pProEX HTb, kolonija 8</b>	M13R, pProEXF
<b>D21 u pProEX HTb, kolonija 10</b>	pProEXF
<b>D21 u pProEX HTb, kolonija 11</b>	pProEXF
<b>D34 pProEX HTb, kolonija 8</b>	pProEXF
<b>D34 pProEX HTb, kolonija 12</b>	pProEXF
<b>D34 pProEX HTb, kolonija 13</b>	pProEXF
<b>D29 pProEX HTb, kolonija 2</b>	pProEXF
<b>D29 pProEX HTb, kolonija 6</b>	pProEXF
<b>D56 pProEX HTb, kolonija 2</b>	pProEXF
<b>D56 pProEX HTb, kolonija 6</b>	pProEXF

#### **4.8.1. Sekvenciranje pročišćenih vektora pOTB7 s ugrađenim cDNA mtSerRS**

Sravnjivanjem sekvenci cDNA mtSerRS nukleotidnih baza podataka (NCBI nucleotide) i sekvence dobivene sekvenciranjem naručenog sintetskog vektora pOTB7 s ugrađenom cDNA mtSerRS dobiveni su sljedeći rezultati: cDNA mtSerRS je bila bez mutacija te je, prema tome, bila spremna za daljnje pokuse (Prilog 3.)

#### **4.8.2. Sekvenciranje pročišćenih vektora pProEX HTb s ugrađenim mtSerRS varijantama**

Sravnjivanjem sekvenci cDNA i sekvenci dobivenih sekvenciranjem gena ugrađenog unutar vektora pProEX HTb dobiveni su sljedeći rezultati: svi konstrukti su bili pravilno ugrađeni, bez mutacija i na pravilnom mjestu omeđeni mjestima za prepoznavanje restrikcijskim endonukleazama BamHI i Sall (Prilog 4). Za daljnje korištenje u eksperimentu odlučeno je uzeti d21 koloniju broj 8 i d34 koloniju broj 13.

## 4.9. Pročišćavanje proteina SerRS eksprimiranog *in vivo* u *E. coli* soja BL21

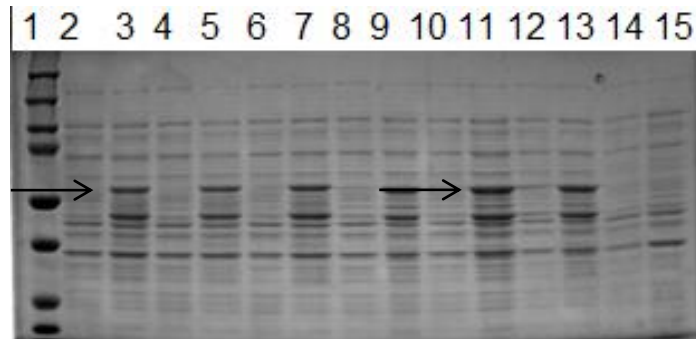
### 4.9.1. Pročišćavanje humane citosolne SerRS

Citosolna verzija humanog enzima SerRS pročišćena je tijekom 2015. godine na Zavodu za biokemiju Kemijskog odsjeka PMF-a od strane dr. sc. Vlatke Godinić Mikulčić i dr. sc. Igora Svibena.

### 4.9.2. Pročišćavanje humane mitohondrijske SerRS

#### 4.9.2.1. Provjera indukcije humane mitohondrijske SerRS

S ciljem prekomjerne ekspresije proteina od interesa u stanicama *E. coli* soja BL21(DE3), stanice su transformirane s vektorom pProEX HTb u koji je ugrađena varijanta gena mtSerRS. Gen mtSerRS je pod kontrolom *trc* promotora (promotor prepoznaje bakterijska RNA-polimeraza) te je zbog toga inducibilan s IPTG-om. Dodatkom IPTG-a u kulturu stanica optičke gustoće  $OD_{600} = 0,6 - 0,8$  potaknuta je transkripcija i translacija u stanicama *E. coli*. Iako je *E. coli* sintetizirala i ostale stanične proteine, zbog velikog broja kopija vektora pProEX HTb i jakog promotora, očekivalo se da produkta gena mtSerRS ugrađenog u vektor ima u većoj količini nego ostalih proteina. Da bi se ispitalo ima li proteina od interesa nakon dodatka induktora, te u kolikoj količini, uzorci su analizirani SDS elektroforezom nakon testa indukcije (Slika 4.15.).



**Slika 4.15.** SDS elektroforeza induciranih i neinduciranih kolonija *E. coli*. 1 - marker Precision Plus Protein Standards Dual, 2 - d21 kolonija 8 (neinducirana), 3 - d21 kolonija (inducirana), 4 - d21 kolonija 10 (neinducirana), 5 - d21 kolonija 10 (inducirana), 6 - d21 kolonija 11 (neinducirana), 7 - d21 kolonija 11 (inducirana), 8 - d34 kolonija 8 (neinducirana), 9 - d34 kolonija 8 (inducirana), 10 - d34 kolonija 13 (neinducirana), 11 - d34 kolonija 13 (inducirana), 12 - d34 kolonija 14 (neinducirana), 13 - d34 kolonija 14 (inducirana), 14 - negativna kontrola ArgRS (neinducirana), 15 - pozitivna kontrola ArgRS (inducirana). Strelice pokazuju protein od interesa.

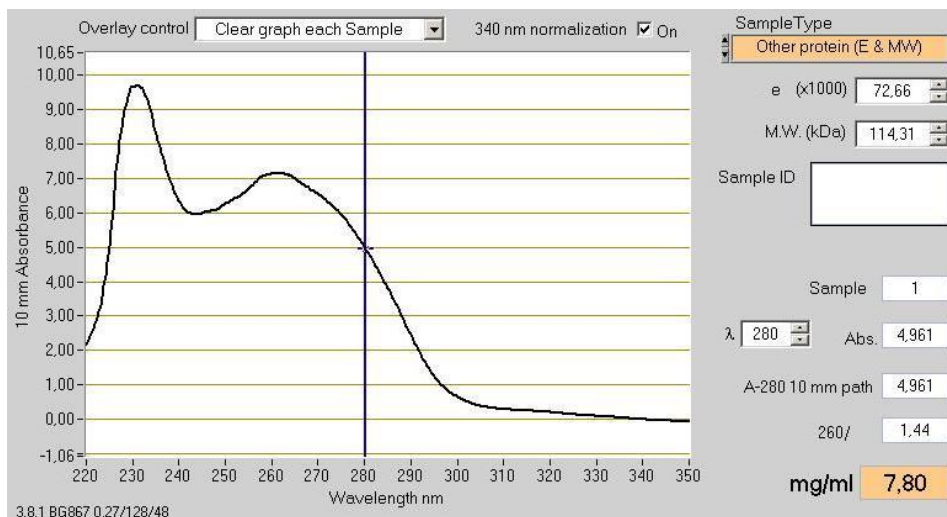
Prema slici 4.15. jasno se uočava razlika između induciranih i neinduciranih bakterijskih kolonija. Razlikom u intenzitetu proteinskih vrpca na gelu između induciranih i neinduciranih kultura zaključeno je da u inducibilnim stanicama ima proteina koji su sintetizirani u većoj količini. Da bi potvrdili ima li proteina od interesa (mtSerRS d21 i d34)

napravljena je usporedba tamnije izraženih vrpca s markerom. Molekulska masa proteina d21 iznosi oko 55 kDa te usporedbom s markerom može se uočiti uzorak istog proteina u jažicama 3, 5 i 7. Molekulska masa proteina d34 iznosi oko 57 kDa te usporedbom s markerom može se uočiti uzorak istog proteina u jažicama 9, 11 i 13. Kontrole su trebale služiti kao mjera zadovoljavajuće količine proteina pri induciranom i neinduciranom stanju stanica IPTG-om, i očekivano se uočilo da nema ekspresije proteina mtSerRS u tim stanicama (jažice 14 i 15). Prema tome, zaključeno je da se geni dobro transkribiraju i transliraju, te da se sintetizira dostatna količina proteina kako bi se protein mogao izolirati u potrebnim količinama.

#### **4.9.2.2. Pročišćavanje d34 mtSerRS i optimizacija kromatografije na Ni-NTA agarozu**

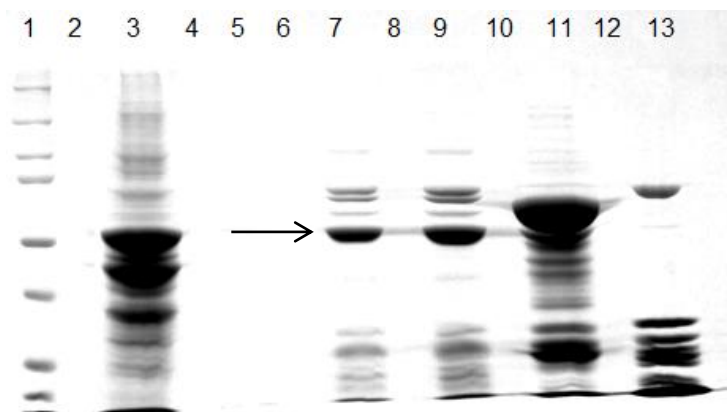
Probna optimizacija kromatografija je ispitivana na uzorku mtSerRS d34. Nakon centrifugiranja inducirane kulture stanica *E. coli* (volumena 1,3 l) s vektorom pProEX HTb u koji je ugrađena varijanta gena mtSerRS d34 te izdvajanja taloga koji je sadržavao stanice, soniciran je talog u puferu za lizu stanica kako bi se protein oslobodio iz stanica. Pretpostavkom da je protein topljiv u vodi, supernatant nakon centrifugiranja soniciranih stanica je podvrgnut kromatografiji na Ni-NTA agarozu. Karakteristika vektora pProEX HTb je sinteza heksahistidinskog privjeska na N-kraju proteina od interesa pa se zbog toga protein vezao na stacionarnu fazu kromatografskog stupca. U ovoj probnoj kromatografiji kolona je napunjena s 2 ml Ni-NTA agaroze, isprana s 30 ml ReH<sub>2</sub>O, uravnotežena s puferom za lizu, nanesen je supernatant nakon sonikacije, kolona je isprana s 80 ml pufera za lizu stanica te su se eluirali proteini puferom za eluciju proteina u obrocima od 5 ml. Frakcije elucije su analizirane Bradfordovim testom paralelno s izvođenjem kromatografije.

Analiziran je spektar uzorka proteina iz eluata koncentriranog u centrikonu nakon Ni-NTA agarozne kromatografije na Nanodropu 1000 (Slika 4.16).



**Slika 4.16.** Spektrofotometrijska analiza uzorka proteina d34 mtSerRS iz 1,3 l kulture nakon kromatografije na Ni-NTA agarozu na Nanodropu 1000.

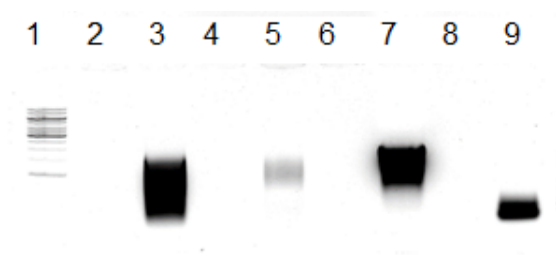
Iz spektra uzorka (Slika 4.16.) uočava se velika koncentracija nukleinskih kiselina pri 260 nm u odnosu na koncentraciju proteina pri 280 nm ( $260/280 = 1,44$ ). Sumnjano je da nukleinske kiseline koje su mogle zaostati su RNA. DNA nije mogla biti prisutna zbog dodatka DNaze prilikom pročišćavanja proteina.



**Slika 4.17.** SDS elektroforeza. 1 - marker Precision Plus Protein Standards Dual, 2 – prazna jažica, 3 - d34 talog nakon soniciranja, 4 - prazna jažica, 5 - uzorak ispiranja kolone prije nanošenja uzorka, 6 - prazna jažica, 7 - 3  $\mu$ l d34 nakon ukoncentriravanja na centrikonu, 8 - prazna jažica, 9 - 5  $\mu$ l d34 nakon ukoncentriravanja na centrikonu, 10 - prazna jažica, 11 - 5  $\mu$ l GST L10, 12 - prazna jažica, 13 - *E. coli* 70S ribosom. Strelica pokazuje protein od interesa.

Prema slici 4.17. je zaključeno da je još velika količina proteina zaostala u talogu stanica nakon sonikacije (usporedba jažica 3 i 7) i da je potrebno promijeniti uvjete ekspresije proteina i modificirati pufere kako bi se povećala koncentracija topljivog proteina. Iz slike 4.17. se može uočiti da jažice 9, 11 i 13 imaju zajedničke proteinske molekule s tim da

jažica 9, tj. uzorak ukoncentriranog proteina imaju, ne samo veliku, nego i malu podjedinicu ribosoma *E. coli*. Kako bi se dodatno ispitala i potvrdila pretpostavka provedena je agarozna elektroforeza (Slika 4.18.).



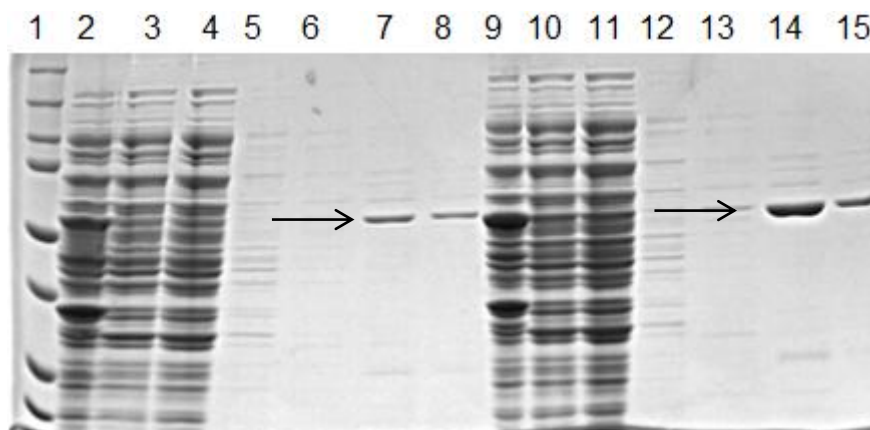
**Slika 4.18.** Elektroforeza u gelu agaroze i analiza prisutnosti rRNA u uzorcima proteina. 1 - marker Generuler 1kb ladder, 2 - prazna jažica, 3 - GST L10, 4 - prazna jažica, 5 - d34 eluat proteina nakon Ni-NTA agarozne kromatografije, 6 - prazna jažica, 7 - *E. coli* 70S ribosom, 8 - prazna jažica, 9 - tRNA<sup>Ser</sup>.

Analiza slike 4.18. pokazala je slijedeće: uzorci u jažicama 3 i 7 služili su kao pozitivna kontrola kako bi usporedili je li ribonukleinska kiselina (jažica 5) koja onečišćuje uzorak proteina ribosomska RNA. Jažica 3 ima uzorak proteina velike podjedinice 50S prokariotskog ribosoma L10 koji veže rRNA, dok jažica 7 ima uzorak cijelog prokariotskog ribosoma od 70 S, tj. veliku i malu podjedinicu. Uzorak u jažici 9 služio je kao negativna kontrola kako bi se uvjerali da RNA u eluatu proteina nije tRNA<sup>Ser</sup>, odnosno da ribonukleinska kiselina koja onečišćuje uzorak proteina nije transportna RNA. Usporedbom jažica 3, 5 i 7 se može uočiti da je uzorak u jažici 5 sličniji uzorku u jažici 7. Prema tome, zaključilo se da je vrlo vjerojatno cijeli ribosom vezan za protein mtSerRS d34.

Iz probne kromatografije zaključiti su se mogla dva problema: nedovoljna količina izoliranog proteina iz stanica *E. coli* i ribosom vezan na protein.

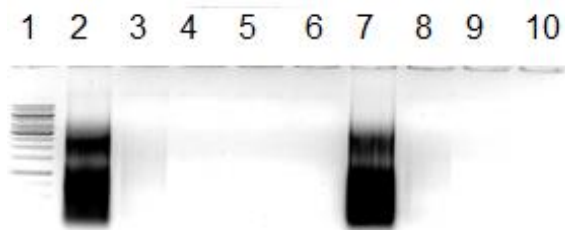
Prvo je bio cilj riješiti problem izolacije što veće količine proteina zadovoljavajuće čistoće. Daljnje pročišćavanje na Ni-NTA agarozu svih verzija proteina izvodilo se uz dodatni (naknadni) pufer, pufer za ispiranje, koji je sadržavao  $\varphi = 10\%$  glicerola,  $c=1,75 \text{ mol dm}^{-3}$  NaCl,  $c=30 \text{ mmol dm}^{-3}$  imidazola te  $c=1 \text{ mol dm}^{-3}$  ureje. Ovim je puferom postignuta veća čistoća eluiranog proteina jer navedene komponente ometaju interakcije drugih proteina u staničnom ekstraktu s proteinom od interesa te interakcije neželjenih proteina s kolonom. Također je u pufer za lizu (sonikaciju) stanica, sadrži  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$  imidazol, dodan detergent Tween20 (konačnog volumnog udjela  $\varphi = 0,1\%$ ) kako bi se što više proteina izoliralo tijekom sonikacije. Paralelno je uvedeno i pročišćavanje proteina d21 mtSerRS prema sličnom postupku kao u početnoj kromatografiji (0,5 ml Ni-NTA agaroz, 10 ml

ReH<sub>2</sub>O, 10 ml pufera za lizu, supernatant, 10 ml pufera za lizu, 2 obroka po 2 ml pufera za ispiranje, 1 ml pufera za eluciju), provedena je kromatografija uzoraka d21 i d34.



**Slika 4.19.** SDS elektroforeza optimizacije elucije d34 mtSerRS Ni-NTA kromatografijom. 1 - marker Precision Plus Protein Standards Dual, 2 - d21 talog nakon soniciranja, 3 - d21 supernatant nakon soniciranja, 4 - d21 frakcija nevezanih proteina, 5 - d21 frakcija ispranih proteina 1, 6 - d21 frakcija ispranih proteina 2, 7 - d21 frakcija elucije 1, 8 - d21 frakcija elucije 2, 9 - d34 talog nakon soniciranja, 10 - d34 supernatant nakon soniciranja, 11 - d34 frakcija nevezanih proteina, 12 - d34 frakcija ispranih proteina 1, 13 - d34 frakcija ispranih proteina 2, 14 - d34 frakcija elucije 1, 15 - d34 frakcija elucije 2. Strelice pokazuju proteine od interesa.

Prema slici 4.19. jažice 3 i 10 sadržavaju veliku količinu različitih staničnih proteina. U jažicama 4 i 11 su proteini koji se uopće nisu vezali na kolonu. Uočava se da najveći dio staničnih proteina ne sadrži protein od interesa. Usporedbom jažica taloga i supernatanta nakon soniciranja (jažice 2 i 3 te jažice 9 i 10) uočava se da je još proteina od interesa zaostalo u talogu (tamnije linije u jažicama 2 i 9) čemu je uzrok to što protein vjerojatno formira inkluzijska tijela te zbog toga zaostaje. U frakcijama ispranih proteina iz supernatanta nakon sonikacije stanica (jažice 5, 6, 12 i 13) uočavaju se nespecifični proteini koji nisu imali heksahistidinski privjesak. Slabo su se vezali za kolonu jer su u svojoj primarnoj strukturi ili imali više histidina zaredom ili su se elektrostatski vezali za matriks kolone. Međutim, nisu se specifično vezali na kolonu i isprali su se puferom za ispiranje. U frakcijama elucije u jažicama 7, 8, 14 i 15 vidljiva je uspješna elucija proteina s heksahistidinskim privjesakom, odnosno varijanti d21 i d34 mtSerRS. Važno je uočiti manju količinu proteina d21 (jažice 7 i 8) u odnosu na d34 (jažice 14 i 15).



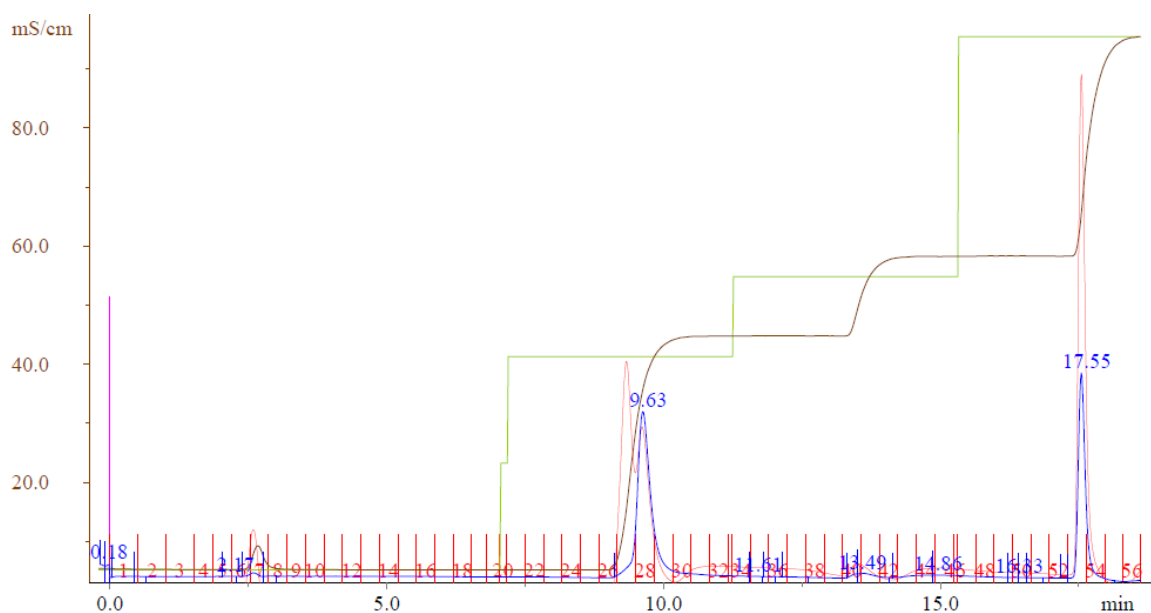
**Slika 4.20.** Agarozna elektroforeza potvrde uklanjanja ribosoma prilikom elucije proteina na Ni-NTA kromatografiji, 1 - marker Generuler 1kb ladder, 2 - d21 frakcija nevezanih proteina, 3 - d21 frakcija ispranih proteina 1, 4 - d21 frakcija ispranih proteina 2, 5 - d21 frakcija elucije 1, 6 - d21 frakcija elucije 2, 7 - d34 frakcija nevezanih proteina, 8 - d34 frakcija ispranih proteina 1, 9 - d34 frakcija ispranih proteina 2, 10 - d34 frakcija elucije 1.

Kako bi potvrdili da je ribosom, odnosno rRNA djelomično disocirala s proteina uvođenjem pufera za ispiranje izvedena je agarozna elektroforeza (Slika 4.20.) na temelju koje se vrlo dobro uočava kako je rRNA prisutna u frakcijama nevezanih proteina (jažice 2 i 7). U ostalim frakcijama, 3-6 i 8-10, nema prisutnosti nukleinskih kiselina. Iz svega navedenog može se zaključiti da su novo uvedeni pufer za ispiranje i dodatak Tweena20 u pufer za lizu uspješni izolirati veću količinu proteina iz stanica te istovremeno poboljšati čistoću proteina mtSerRS d21 i d34.

#### 4.9.2.3. Optimizacija ionske izmjene na kromatografskom sustavu AKTA

Kromatografija na Ni-NTA agarozni nema dovoljno finu gradaciju elucije molekula vezanih na kolonu pa kako bi uzorak proteina bio još čišći za kinetičku analizu, išlo se u daljnju proceduru na kromatografskom sustavu AKTA slabom ionskom (anionskom) izmjenom na koloni MonoQ HR 10/10. Probni program ionske izmjene isproban tijekom 2015. na hctSerRS se odvijao prema slijedećim koracima: 0% B (v/v), skok na 40% B (v/v), skok na 50 % B (v/v) te skok 100% pufera B (v/v). Prvo je optimiran sustav elucije na AKTA-i na uzorcima proteina mtSerRS d34 i d21 nakon Ni-NTA agarozne kromatografije.

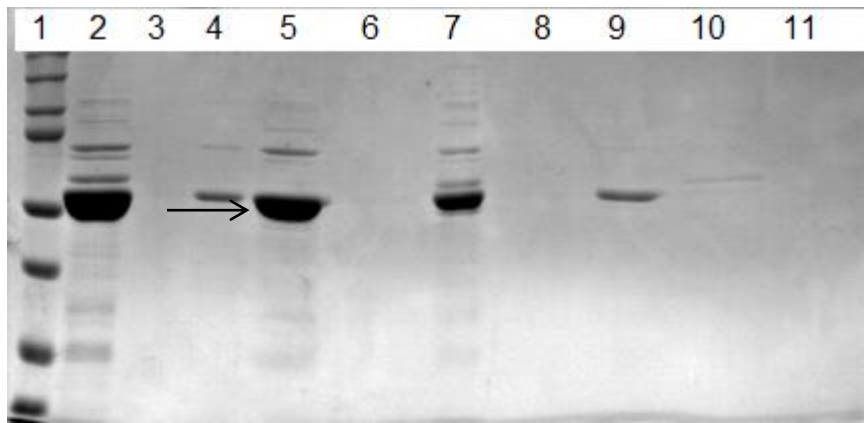




**Slika 4.21.** Kromatogram pročišćavanja proteina d34 na sustavu AKTA u koracima: 0% B (v/v), skok na 40% B (v/v), skok na 50 % B (v/v) te skok 100% pufera B (v/v). Zelena linija predstavlja provodnost (koncentracija pufera B, raspon koncentracije soli je od 30 mmol dm<sup>-3</sup> do 1 mol dm<sup>-3</sup>), crvena linija apsorbanciju pri 260 nm (koristi se preferentno za asignaciju/praćenje udjela nukleinskih kiselina), plava linija apsorbanciju pri 280 nm (koristi se preferentno za asignaciju/praćenje udjela proteina).

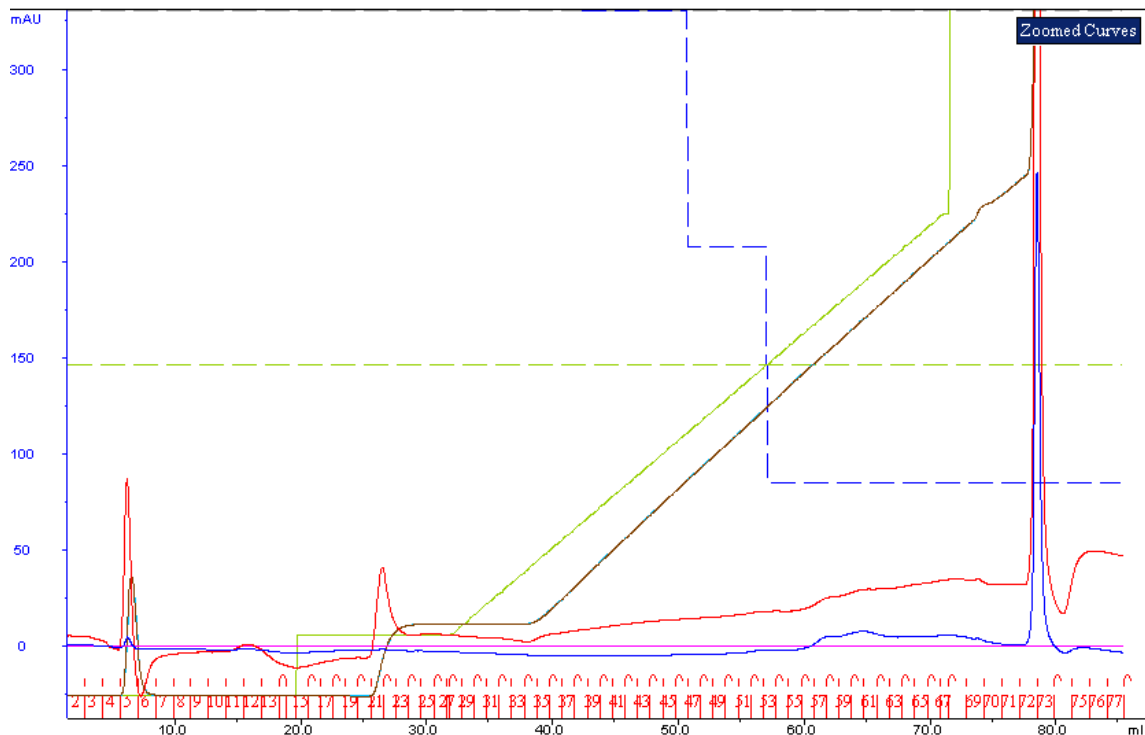
Rezultati pročišćavanja mtSerRS d34 su pokazali slijedeće (Slika 4.21.): frakcije 27 - 29 eluirane pri 40% B (v/v) sadrže željeni protein te bi daljnjom optimizacijom bilo poželjno isprobati razdvojiti protein od zaostale nukleinske kiseline u istim frakcijama. Razdvajanje frakcija proteina i proteina s vezanim ribosomom je uspješno provedeno. Frakcije 53 i 54 sadrže dio proteina koji ima vezane ribosome i u tim će se frakcijama pri 100% koncentracije pufera B (v/v) eluirati ribosomi što će dodatno poboljšati čistoću proteina. Na temelju ovih opažanja, pretpostavilo se da bi se trebala optimirati anionska izmjena oko 40% koncentracije pufera B (v/v).

Kromatogram pročišćavanja proteina mtSerRS d21 je imao sličan sastav frakcija samo što je proteina bilo u puno manjim prinosima (Slika 4.22., jažice 7 -11) te zbog toga u daljnjem radu varijanta mitohondrijskog proteina SerRS d21 nije više korištena.



**Slika 4.22.** Poliakrilamidna gel-elektroforeza u pristunosti SDS-a nakon ionske izmjene na sustavu AKTA za uzorak proteina d34 (s koracima: 0% B (v/v), skok na 40% B (v/v), skok na 50% B (v/v) te skok 100% pufera B (v/v)). 1 - marker Precision Plus Protein Standards Dual, 2 - koncentrirani uzorak proteina d34 nakon afinitetnog pročišćavanja na Ni-NTA agarozu, 3 - frakcija 7, 4 - frakcija 27, 5 - frakcija 28, 6 - frakcija 53, 7 - koncentrirani uzorak proteina d21 nakon afinitetnog pročišćavanja na Ni-NTA agarozu, 8 - frakcija 5, 9 - frakcija 18, 10 - frakcija 56, 11 - frakcija 67. Protein od interesa mtSerRS d34 je obilježen strelicom.

Kao sljedeća optimizacija ionske izmjene proteina d34 mtSerRS napravljen je sljedeći program s naglaskom na optimizaciju kromatografije pri 40% pufera B (v/v): linearni gradijent od 5 - 40% pufera B (v/v) te skok na 100% pufera B (v/v).

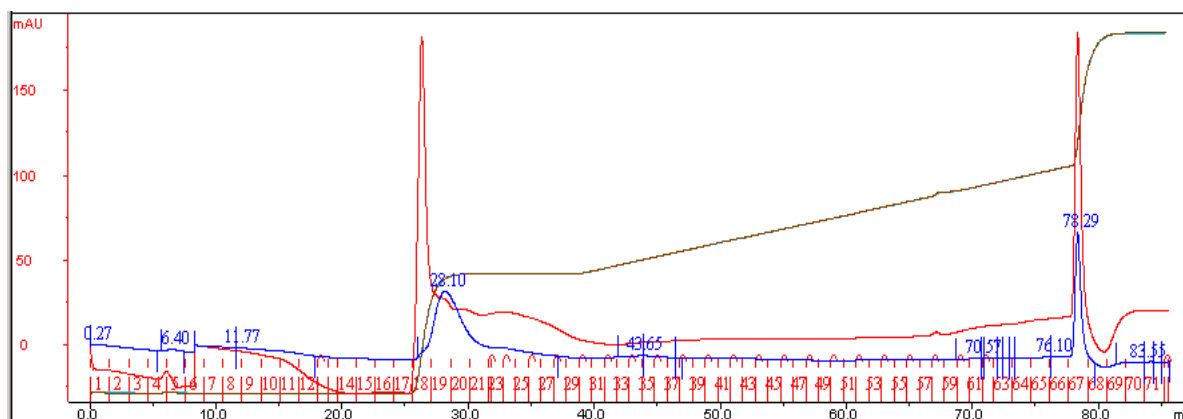


**Slika 4.23.** Kromatogram pročišćavanja proteina d34 na sustavu AKTA u koracima: linearni gradijent od 5 - 40% pufera B (v/v) te skok na 100% pufera B (v/v). Zelena linija predstavlja provodnost (koncentracija pufera B, raspon koncentracije soli je od 30 mmol dm<sup>-3</sup> do 1 mol dm<sup>-3</sup>),

crvena linija apsorbanciju pri 260 nm (koristi se preferentno za asignaciju/praćenje udjela nukleinskih kiselina), plava linija apsorbanciju pri 280 nm (koristi se preferentno za asignaciju/praćenje udjela proteina).

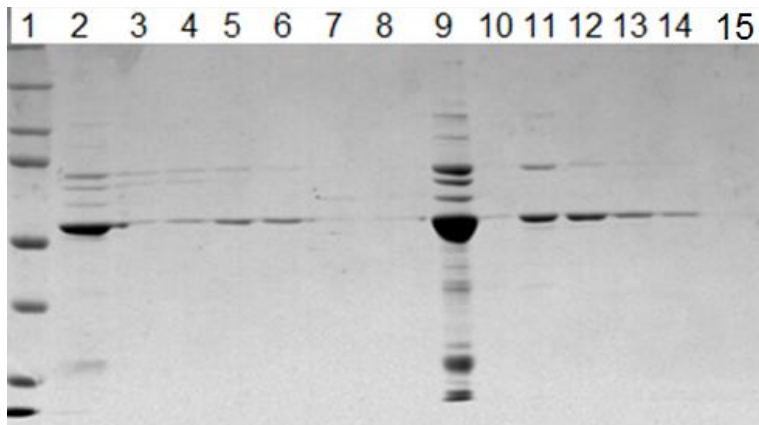
Rezultati pročišćavanja (Slika 4.23.) pokazali su sljedeće: uzorak proteina imao je dva uočljiva područja; jedan od 53. do 70. frakcije pri linearnom gradijentu 5 - 40% pufera B (v/v), a drugi u frakcijama 72 – 73 pri 100% pufera B (v/v). Frakcije 53 - 70 sadrže protein, međutim vrlo male koncentracije proteina. Kao i u prethodnoj kromatografiji, u frakcijama 72 - 73 pri 100% pufera B (v/v) se nalazi protein vezan za ribosom. Zaključeno je da nagli skok na 5% pufera B (v/v) preblagi kako bi se protein eluirao u par frakcija, a ne razvukao u 10-ak istih (frakcije 53 - 70). Uzorci su analizirani SDS elektroforezom (Slika 4.25.).

Prema rezultatima prethodnih kromatografija, napravljen je novi program pročišćavanja proteina: 0% B (v/v), skok do 30% B (v/v), linearni gradijent 30 - 60% B (v/v) te skok do 100% pufera B (v/v).



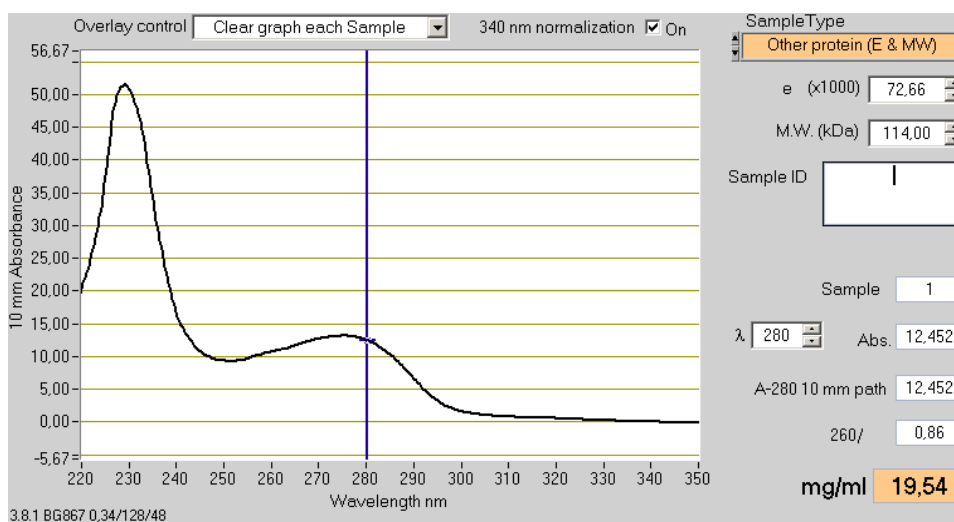
**Slika 4.24.** Kromatogram pročišćavanja proteina d34 na sustavu AKTA u koracima: 0% B (v/v), skok do 30% B (v/v), linearni gradijent 30 - 60% B (v/v) te skok do 100% pufera B (v/v). Crvena linija predstavlja apsorbanciju pri 260 nm (koristi se preferentno za asignaciju/praćenje udjela nukleinskih kiselina), a plava linija apsorbanciju pri 280 nm (koristi se preferentno za asignaciju/praćenje udjela proteina).

Ovom optimizacijom (Slika 4.24.) uočeno je da se protein eluira oko 30% pufera B (v/v) u frakcijama 18 - 22, a i da je odvojen većeg dijela nukleinske kiseline u frakciji 19. U frakcijama 67 i 68, kao što je i očekivano, je ribosom s proteinom. Uzorci su analizirani SDS elektroforezom (Slika 4.25.).



**Slika 4.25.** SDS kromatografija gel frakcija ionskih izmjena na sustavu AKTA proteina d34. 1 - marker Precision Plus Protein Standards Dual, 2 - početni uzorak proteina d34 za program linearni gradijent od 5 - 40% pufera B (v/v) te skok na 100% pufera B (v/v), 3 - frakcija 57, 4 - frakcija 58, 5 - frakcija 60, 6 - frakcija 61, 7 - frakcija 72, 8 - frakcija 73, 9 - početni uzorak proteina d34 za program 0% B (v/v), skok do 30% B (v/v), linearni gradijent 30 - 60% B (v/v) te skok do 100% pufera B (v/v), 10 - frakcija 18, 11- frakcija 19, 12 - frakcija 20, 13 - frakcija 21, 14 - frakcija 22, 15 - frakcija 67.

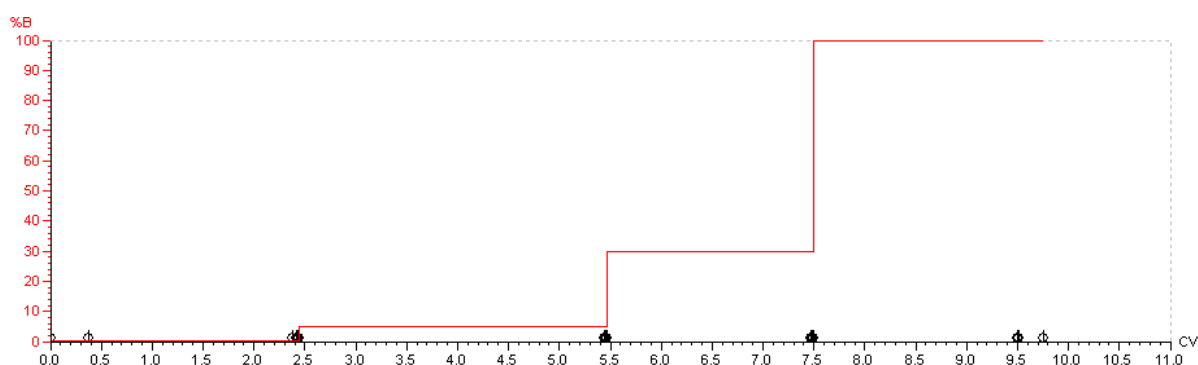
Prema slici 4.25. u prvom načinu ionske izmjene programom (linearni gradijent od 5 - 40% pufera B (v/v) te skok na 100% pufera B (v/v)) : jažice 3 - 6 sadrže protein, dok jažice 7 i 8 također imaju protein (ali s vezanim ribosomom) u manjoj količini. U drugom načinu ionske izmjene programom (0% B (v/v), skok do 30% B (v/v), linearni gradijent 30 - 60% B (v/v) te skok do 100% pufera B (v/v)): jažice 10 - 14 sadrže puno veću količinu proteina, dok jažica 15 očekivano ima vrlo malu količinu proteina od interesa. Za konačnu provjeru analiziran je spektar uzorka (Slika 4.26.) nakon koncentriranja proteina iz frakcija 19 - 22 iz drugog programa ionske izmjene.



**Slika 4.26.** Spektrofotometrijska analiza uzorka proteina d34 na Nanodropu 1000 nakon ionske izmjene na sustavu AKTA u koracima: 0% B (v/v), skok do 30% B (v/v), linearni gradijent 30 - 60% B (v/v) te skok do 100% pufera B (v/v).

Na slici 4.26. se može vidjeti da je apsorbancija pri 260 nm puno manja nego pri početnoj kromatografiji na Ni-NTA agarozu i da je masena koncentracija proteina puno veća ( $19,54 \text{ mg ml}^{-1}$ ). Također, u prilog ide omjer apsorbancija  $260/280 = 0,86$ . Iz svih rezultata, program u koracima skok 0% B (v/v), skok do 30% B (v/v), linearni gradijent 30 - 60% B (v/v) te skok do 100% pufera B (v/v) je dobar program ionske izmjene.

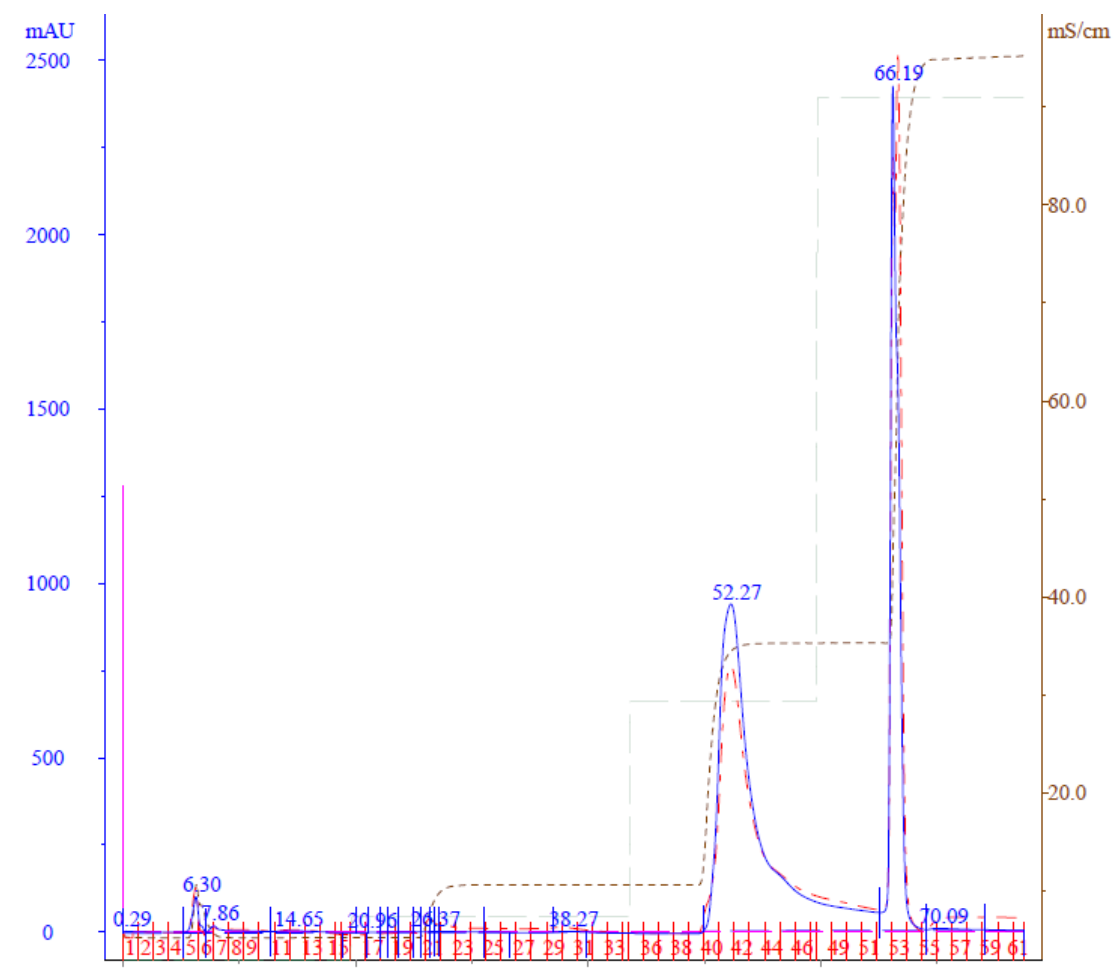
Novim programom u koracima: 0% B (v/v), skok do 5% B (v/v), skok do 30% B (v/v) i skok do 100% pufera B (v/v) (Slika 4.27.) optimirana je ionska izmjena pročišćavanja uzorka humanog mitohondrijskog proteina d34 metodom FPLC te je primjenjena na veće volumene staničnih kultura.



**Slika 4.27.** Konačna shema programa pročišćavanja na kromatografskom sustavu AKTA proteina mtSerRS.

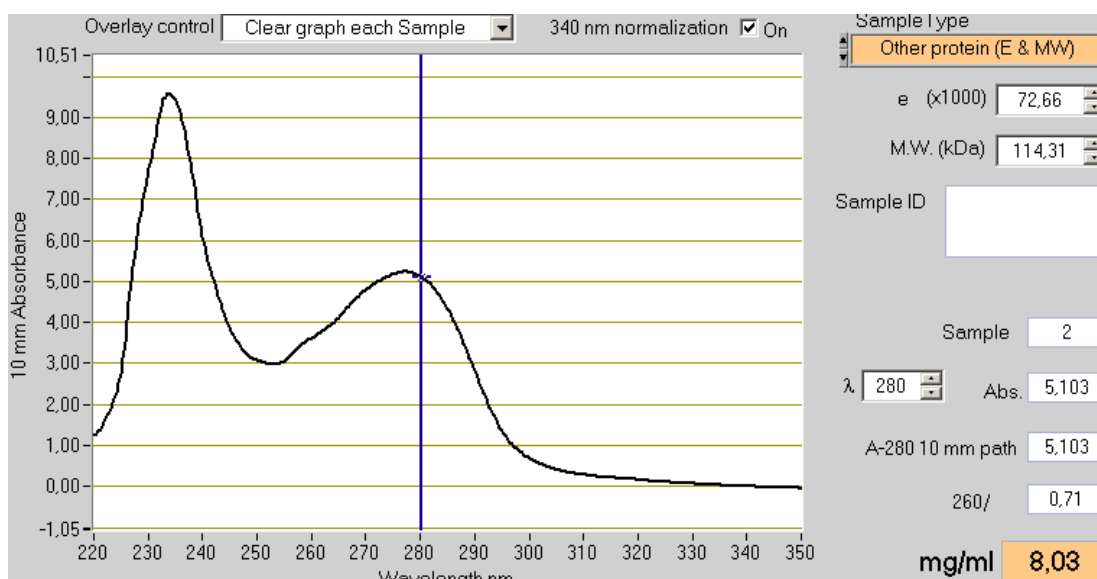
#### 4.9.2.4. Pročišćavanje humane mitohondrijske SerRS optimiranim metodama iz 4 I kulture stanica *E. coli*

Za veće količine proteina potrebne za daljnji nastavak projekta, uzgojeno je 4 l bakterijske kulture transformirane željenim vektorom, te je proteinski ekstrakt iz stanica *E. coli* dobiven sonikacijom. Zbog većih količina proteina izmjenjena je kromatografija na Ni-NTA agarozu; kolona je napunjena s 10 ml Ni-NTA agaroze, isprana sa 100 ml  $\text{ReH}_2\text{O}$ , 90 ml pufera za lizu stanica, nanesen je supernatant nakon sonikacije i centrifugiranja, kolona je isprana s 200 ml pufera za lizu stanica, dodano je 40 ml pufera za ispiranje te su proteini eluirani puferom za eluiranje proteina u obrocima od 10 ml. Eluati koncentrirani u centrikonu razdvojeni su dalje na kromatografskom sustavu AKTA.



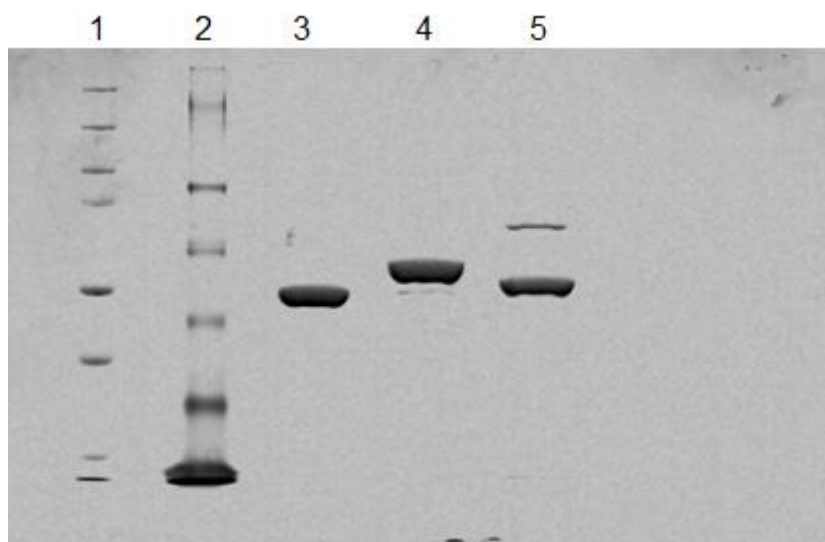
**Slika 4.28.** Kromatogram pročišćavanja proteina d34 iz 4 l bakterijske kulture na sustavu AKTA u koracima: 0% B (v/v), skok do 5% B (v/v), skok do 30% B (v/v) i skok do 100% pufera B (v/v). Zelena linija predstavlja provodnost (koncentracija pufera B, raspon koncentracije soli je od 30 mmol dm<sup>-3</sup> do 1 mol dm<sup>-3</sup>), crvena linija apsorbanciju pri 260 nm (koristi se preferentno za asignaciju/praćenje udjela nukleinskih kiselina), plava linija apsorbanciju pri 280 nm (koristi se preferentno za asignaciju/praćenje udjela proteina).

Iz slike 4.28. protein je eluiran na predviđen način temeljeno na prošlim kromatografijama. Uzorak proteina iz frakcija 40 - 46 je prikupljen i koncentriran u centrikonu te pospremljen na -80 °C u pufer pogodan za čuvanje proteina od interesa. Taj uzorak je upotrebljen za kinetičke analize.



**Slika 4.29.** Spektrofotometrijska analiza uzorka proteina mtSerRS d34 iz 4 l kulture na Nanodropu 1000 nakon ionske izmjene na sustavu AKTA u koracima: 0% B (v/v), skok do 5% B (v/v), skok do 30% B (v/v) i skok do 100% pufera B (v/v).

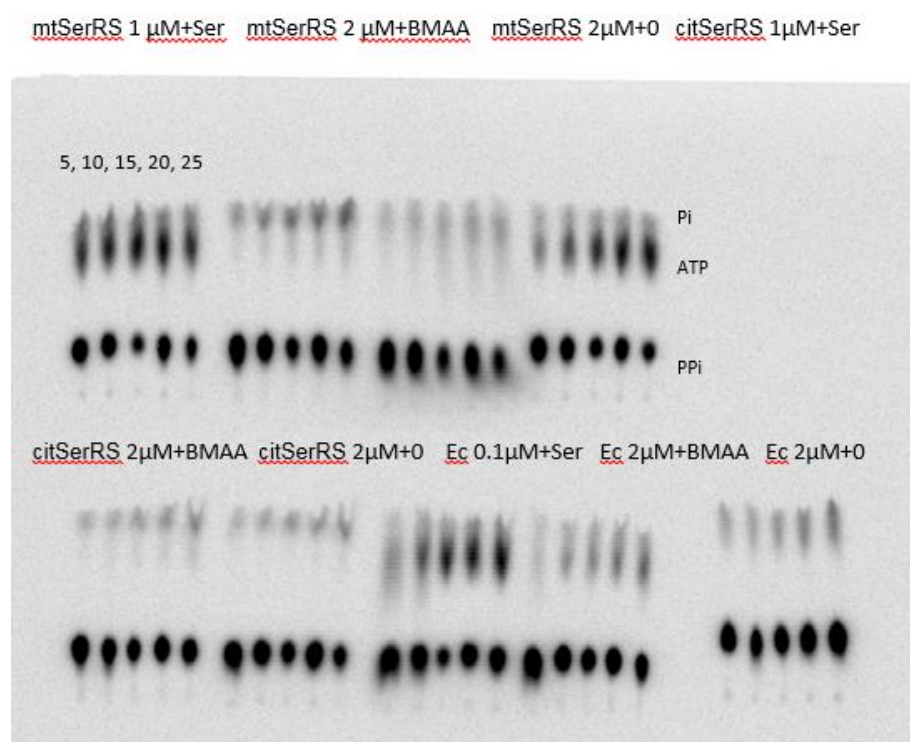
Slika 4.29. potvrđuje čistoću uzorka eluiranog proteina mtSerRS d34 ( $\gamma = 8,03 \text{ mg ml}^{-1}$ ) te omjera apsorbancije  $260/280 = 0,71$ . Kao konačnu potvrdu čistoće mitohondrijskog proteina mtSerRS d34 provedena je elektroforeza u gelu akrilamida u prisutnosti SDS-a (SDS-PAGE) (Slika 4.30.).



**Slika 4.30.** SDS elektroforeza čistih proteina, 1 - marker Precision Plus Protein Standards Dual, 2 - marker SeeBlue Plus2 Pre-stained Protein Standard, 3 - SerRS iz bakterije *E. coli*, 4 - humana citosolna SerRS, 5 - humana mitohondrijska SerRS d34.

#### 4.10. Aktivnost mtSerRS i citSerRS u reakciji aktivacije i aminoacilacije serina i BMAA

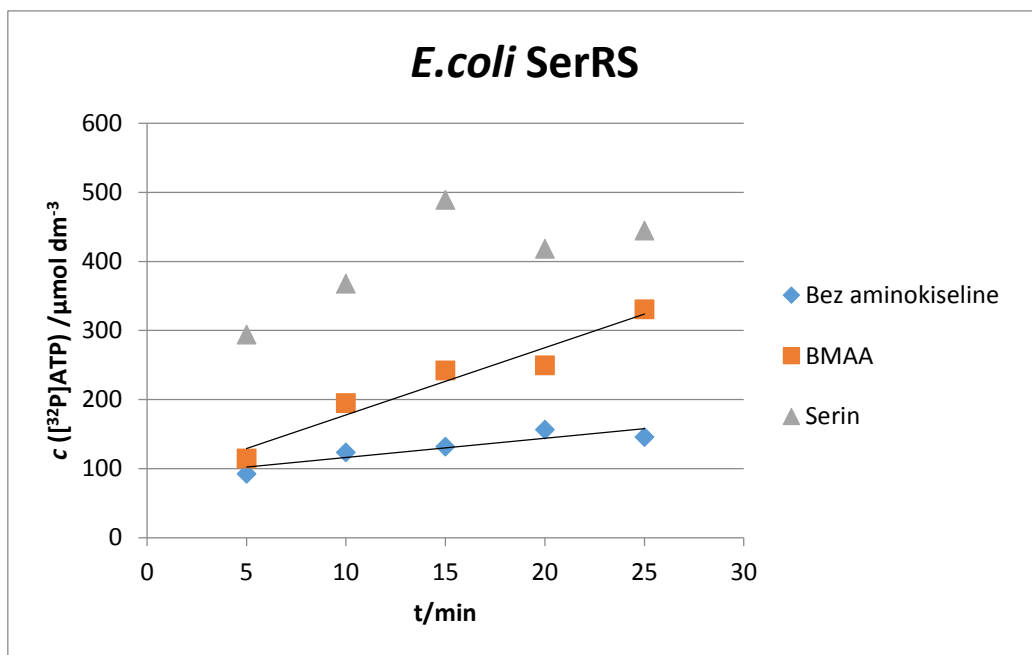
Kako bi se ispitala aktivnost enzima, prvo je istraživana aktivacija aminokiseline reakcijom ATP-PP<sub>i</sub> izmjene. Reakcijska smjesa je uz odgovarajuću SerRS sadržavala 100 mmol dm<sup>-3</sup> HEPES pH 7,5, 20 mmol dm<sup>-3</sup> MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol dm<sup>-3</sup> NaCl, 4 mmol dm<sup>-3</sup> ATP, 1 mmol dm<sup>-3</sup> NaPP<sub>i</sub> (smjesa radioaktivnog i neradioaktivnog), 5 mmol dm<sup>-3</sup> DTT, 0,25 mmol dm<sup>-3</sup> L-serin ili 50 mmol dm<sup>-3</sup> BMAA, te je nakon 5, 10, 15, 20 i 25 minuta zaustavljena dodatkom alikvota reakcijske smjese od 1,5 μl u 3 μl otopine za zaustavljanje reakcije koja je sadržavala natrijev acetat (c=500 mmol dm<sup>-3</sup>) i SDS (φ=0,1 %). Nakon toga je 1,5 μl zaustavljene reakcijske smjese nanoseno na polietileniminske pločice za tankoslojnu kromatografiju (Slika 4.31).



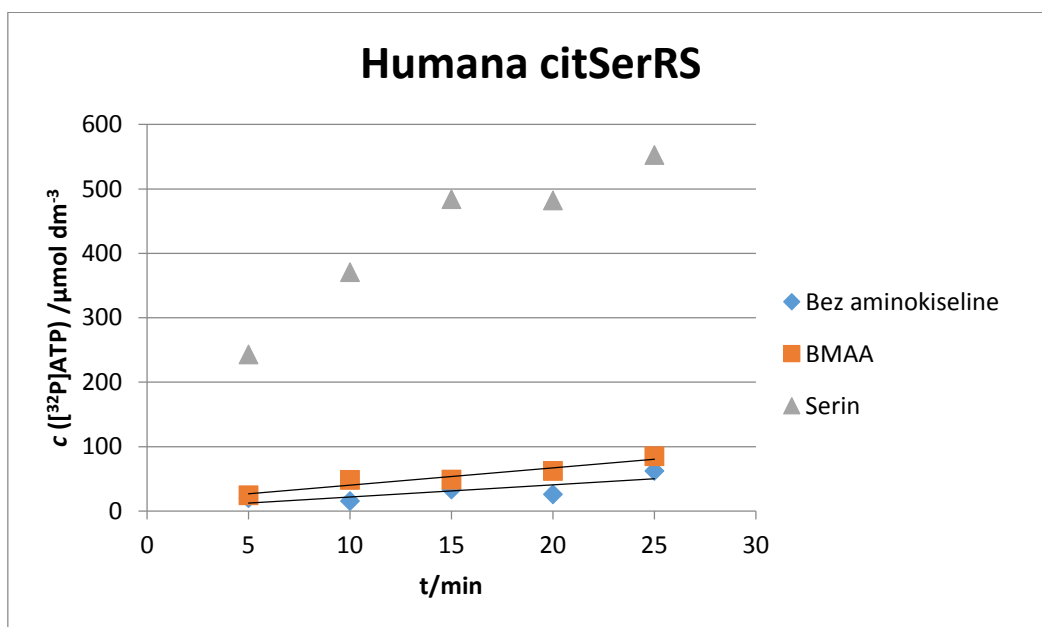
**Slika 4.31.** Kromatogram nakon tankoslojne kromatografije uzoraka aktivacije L-serina i BMAA ATP/PP<sub>i</sub> izmjenom različitih reakcijskih smjesa obzirom na enzim i njegovu koncentraciju (Ec = SerRS iz *E. coli*, citSerRS = humana citosolna SerRS, mtSerRS = humana mitohondrijska SerRS).

Nakon inkubacije u puferu za razvijanje (c = 750 mmol dm<sup>-3</sup> kalijev dihidrogenfosfat pH=3,5 i c = 4 mol dm<sup>-3</sup> ureja) i dodatne obrade, za svaku od reakcija su određeni grafički prikazi nastanka [<sup>32</sup>P]ATP pri određenim koncentracijama enzima (Slika 4.32.-4.34.).

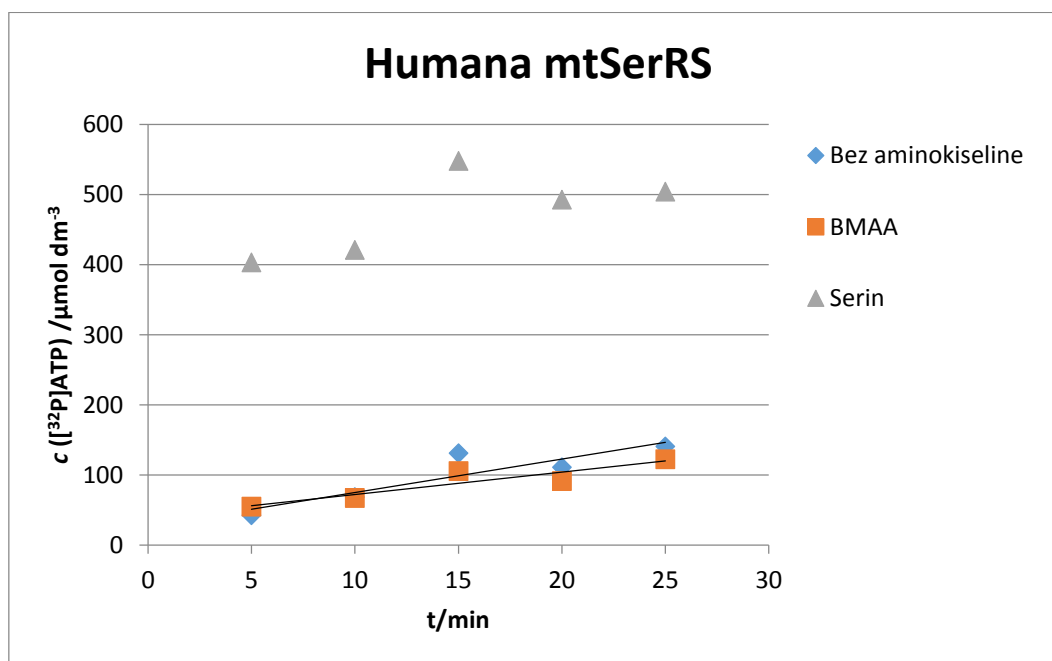




**Slika 4.32.** Ovisnost koncentracije  $[^{32}\text{P}]\text{ATP}$  u vremenu tijekom aktivacije L-serina i BMAA enzimom SerRS-om iz *E. coli* i u reakciji bez dodane aminokiseline ( $c=0,1 \mu\text{mol dm}^{-3}$  u reakciji sa L-serinom,  $c=2 \mu\text{mol dm}^{-3}$  u reakciji s BMAA,  $c=2 \mu\text{mol dm}^{-3}$  u reakciji bez dodane aminokiseline).



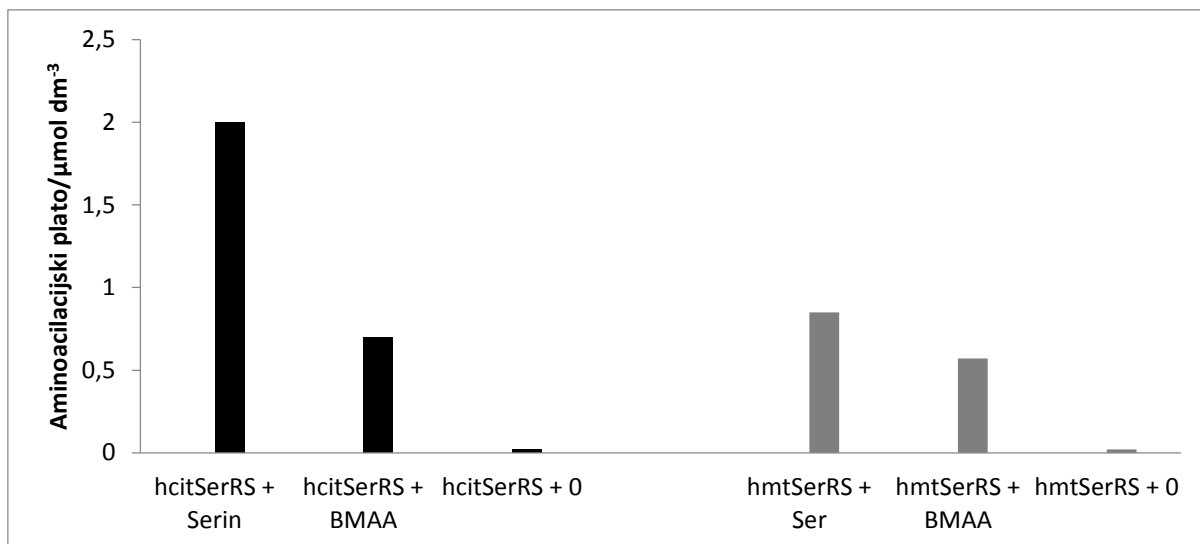
**Slika 4.33.** Ovisnost koncentracije  $[^{32}\text{P}]\text{ATP}$  u vremenu tijekom aktivacije L-serina i BMAA enzimom humanom citSerRS i u reakciji bez dodane aminokiseline ( $c=1 \mu\text{mol dm}^{-3}$  u reakciji sa L-serinom,  $c=2 \mu\text{mol dm}^{-3}$  u reakciji s BMAA,  $c=2 \mu\text{mol dm}^{-3}$  u reakciji bez dodane aminokiseline)



**Slika 4.34.** Ovisnost koncentracije  $[^{32}\text{P}]\text{ATP}$  u vremenu tijekom aktivacije L-serina i BMAA, humanom mtSerRS i u reakciji bez dodane aminokiseline ( $c=1 \mu\text{mol dm}^{-3}$  u reakciji sa L-serinom,  $c=2 \mu\text{mol dm}^{-3}$  u reakciji s BMAA,  $c=2 \mu\text{mol dm}^{-3}$  u reakciji bez dodane aminokiseline).

Na temelju grafičkih prikaza zaključeno je da su svi enzimi aktivni jer aktiviraju svoju pripadnu aminokiselinu L-serin (Slika 4.32., 4.33., 4.34.). Rezultati ukazuju na to da humana citSerRS i SerRS iz *E.coli* aktiviraju BMAA brzinom oko  $0,006 \text{ s}^{-1}$  što je vrlo mala brzina. U reakciji s humanom mtSerRS je primjećena vrlo slaba aktivacija međutim ona nije mogla biti kvantificirana zbog kontaminacije s pripadnim seril-adenilatom (Slika 4.34.).

Aktivnost enzima i funkcionalnost pročišćenih tRNA preliminarno je istražena i u reakciji aminoaciliranja. Izabrani uvjeti u poglavlju 3.2.3.10. ne odgovaraju mjerenju brzine aminoaciliranja već akceptorskoj aktivnosti hcit  $\text{tRNA}^{\text{Ser}_{\text{AGA}}}$  i hmt  $\text{tRNA}^{\text{Ser}_{\text{TGA}}}$ . Reakcija je praćena preko tRNA obilježene s  $^{32}\text{P}$  na 3'-terminalnom nukleotidu. Vremenske točke uzete su na 15, 30 i 60 minuta. Na slici 4.35. prikazane su srednje vrijednosti tih triju mjerenja jer nije bilo sistemskih razlika u tim točkama.



**Slika 4.35.** Grafički prikaz rezultata analize aktivnosti humane citSerRS i mtSerRS u reakciji aminoaciliranja pripadne  $\text{tRNA}^{\text{Ser}}$  aminokiselinom L-serin ( $0,2 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) ili BMAA ( $40 \text{ mmol dm}^{-3}$ ). 0 je negativna kontrola bez dodane aminokiseline. Hcit  $\text{tRNA}^{\text{Ser}_{\text{AGA}}}$  aminoacilirana je s  $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$  citSerRS, a hmt  $\text{tRNA}^{\text{Ser}_{\text{TGA}}}$  s  $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$  mtSerRS.

Iz rezultata (Slika 4.35.) je vidljivo da su obje tRNA funkcionalne te da se djelomično mogu aminoacilirati pripadnom aminokiselinom L-serin (stupci hcitSerRS+Serin i hmtSerRS+Ser). Također, vidljivo je i da enzimi humana citSerRS i mtSerRS prenose neproteinogenu aminokiselinu BMAA na pripadne  $\text{tRNA}^{\text{Ser}}$  (stupci hcitSerRS+BMAA i hmtSerRS+BMAA). Kao kontrolu da je uistinu BMAA bila prenesena, a ne L-serin koji je eventualno bio kopurificiran s enzimom, napravljene su reakcije s vodom (stupci hcitSerRS+0 i hmtSerRS+0) kod kojih nije došlo do aminoacilacije tRNA.

## 5. Rasprava

### 5.1. Kloniranje i *in vitro* transkripcija humane citosolne tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> i humane mitohondrijske tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub>

Naručeni sintetski oligonukleotidi za hčit tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> i hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> su komplementarno spojeni i ugrađeni u plazmidni vektor pUC18 između mjesta za restrikcijske endonukleaze EcoRI i BamHI. Za umnažanje rekombinantnog plazmida korištene su bakterije *E. coli* soja DH5α. Uspješnost ugradnje tRNA<sup>Ser</sup> gena u pUC18 provjerena je metodom plavo bijele selekcije koja se pokazala vrlo korisna iako je tRNA insert vrlo male veličine (119 nt za hčit tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> i 107 nt za hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub>) i ponekad je moguća aktivnost β-galaktozidaze zbog nepotpune inaktivacije gena *lacZ*. Metoda je vrlo brza i služila je za odabir ispravnih kolonija za daljnje metode provjere ugradnje gena u plazmid pUC18. Na plazmidima s ugrađenim hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> insertom izoliranih iz bijelih kolonija dobivenih plavo bijelom selekcijom napravljena je restrikcijska analiza s NsiI koja se temeljila na tome da sam vektor nema restrikcijsko mjesto za NsiI, a hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> insert na svom 3' kraju ima. Stoga se na gelu moglo odrediti koji plazmid ima ugrađeni hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> gen jer je takav plazmid bilo moguće pocijepati s NsiI, odnosno linearizirati plazmid. Linearizirani i cirkularni oblik plazmida putuju kroz agarozni gel različitim načinima jer je cirkularni plazmid puno kompaktniji i lakše se provlači kroz pore gela te putuje brže kroz gel za razliku od lineariziranog plazmida. Iako se restrikcijskom analizom potvrdilo da odabrani plazmidi imaju ugrađen insert hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub>, ipak se dodatno u još jednoj provjeri umnožilo gene PCR-om na plazmidima i dobivene PCR produkte analiziralo agaroznom gel elektroforezom pri čemu su dijelovi umnoženog plazmida s ugrađenim hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> insertom bili dulji od umnoženog dijela praznog vektora te su putovali sporije kroz gel. Za provjeru ugradnje gena za hčit tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> se, osim plavo bijele selekcije, koristio i kolonijski PCR koji se proveo i na plavim i na bijelim kolonijama. Umnoženi PCR produkti su analizirani na agaroznom gelu istim principom kao i hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub>. Rezultati dobiveni kolonijskim PCR-om su većinom bili u skladu s rezultatima plavo-bijele selekcije. Na sekvenciranje su poslani plazmidi puC18 s ugrađenim genom za tRNA<sup>Ser</sup> da bi se provjerilo da li je replikacija tRNA<sup>Ser</sup> gena u plazmidu unutar domaćina *E. coli* soja BL21 bez grešaka odnosno da je sekvenca jednaka naručenim sintetskim oligonukleotidima. Za hčit tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> poslano je četiri uzorka i za hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> tri. Od tri plazmida s točnom sekvencom za hčit tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> i dva plazmida s točnom sekvencom gena za hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> odabrana su po dva za svaku tRNA<sup>Ser</sup> za transkripciju *in vitro*. Vektor pUC18 s ugrađenim genom za tRNA<sup>Ser</sup> se morao linearizirati endonukleazom NsiI kako bi T7 RNA-polimeraza prepisivala samo gen za tRNA<sup>Ser</sup>. Nakon postavljanja transkripcije *in vitro* i analize na poliakrilamidnom gelu uz prisustvo ureje hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> je dala debelu vrpcu

čiji položaj odgovara njenoj veličini od 22,6 kDa. Međutim, vrpca prvog uzoraka hčit tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> je bila izrazito slaba, ali na dobrom položaju na gelu koji odgovara njenoj molekularnoj masi od 25,8 kDa. Za drugi hčit tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> uzorak nije bilo vrpce. U cilju poboljšanja prinosa hčit tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> transkripata provedene su probne transkripcije u kojima je variran sastav transkripcijske smjese. U smjesama je varirana koncentracija magnezijevog acetata (10, 20 i 30 mmol dm<sup>-3</sup>). U optimizaciju je dodan u jednu reakciju HEPES, organski kemijski pufer koji se u biokemiji koristi za održavanje fiziološkog pH, i neionski detergent Tween20. Također su korištene dvije različite anorganske pirofosfataze, jedna s i druga bez amonijeva sulfata. Probne transkripcije su ukazale na to da je dodatno pročišćavanje kalupa za transkripciju hčit tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> povećalo prinos transkripta. Najmanji prinos transkripata je bio u reakciji koja je sadržavala Tween20 zbog mogućih negativnih interakcija s T7 RNA-polimerazom. Od upotrebljenih koncentracija magnezijevog acetata sve su rezultirale dobrim prinosom transkripata, malo veći prinos je bio pri koncentraciji od 20 mmol dm<sup>-3</sup>. Dobiveni transkripti su pročišćeni iz transkripcijske smjese i njihova cjelovitost je analizirana na poliakrilamidnom gelu u prisustvu ureje. Na gel su nanosene i dvije kontrole arhejske tRNA<sup>Arg</sup> i tRNA<sup>Ser</sup> u tri serije tako da svaka serija za svaku tRNA ima istu koncentraciju kako bi provjerili točnost izmjerenih koncentracija hčit tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> i hčit tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> na Nanodrop 1000. Ako je koncentracija dobro izmjerena očekivao se jednaki intenzitet vrpce u serijama tRNA s istim koncentracijama. Serija vrpce dobivenih hčit tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> je bila nešto manjeg intenziteta u odnosu na istu seriju kontrolnih tRNA što djeluje da je koncentracija željenog transkripta izmjerena na Nanodrop 1000 veća nego što realno jest. Razlog je što spektrofotometar mjeri ukupnu koncentraciju nukleinskih kiselina u uzorku, a kod uzorka hčit tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> postoje i male količine kraćih transkripata koje pridonose izmjerenoj koncentraciji. Intenzitet vrpce hčit tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> se poklapao s intenzitetom vrpce kontrola što znači da je njena koncentracija vrlo točno izmjerena na Nanodrop 1000.

## 5.2. Predikcija signalne sekvence humane mtSerRS

Mitohondrijska seril-tRNA-sintetaza je kodirana jezgrinim genomom te se nakon sinteze na ribosomima u citoplazmi peptidnim signalnim slijedom na N-kraju usmjerava prema mitohondriju. Kako bi se dobio kinetički aktivan enzim, enzim je eksprimiran u domaćinu *E. coli* soja BL21 tako da ne sadrži N-terminalni peptidni slijed koji služi kao signalna sekvenca. Sekvenca proteina preuzeta je s NCBI baze podataka (Prilog 5.).

Za predikciju N-terminalne signalne sekvence korišteni su serveri za predikciju mitohondrijskih ciljnih sekvenci i podaci iz doktorske disertacije doc. dr. sc. Jasmine Rokov Plavec. Target P1.1 Server služi za predviđanje unutarstanične lokalizacije eukariotskih

proteina. Temelji se na prisutnosti bilo kakve N-terminalne presekvenca među kojima je i mitohondrijski ciljni peptid. Ako se za neku sekvencu predvidi da sadži N-terminalnu presekvenca server predlaže potencijalno mjesto cijepanja. Predviđeno mjesto cijepanja za humanu mtSerRS ovim serverom je 34, odnosno iza 34. aminokiseline u kompletnoj proteinskoj sekvenci. Yoshinori MitoFates server za predikciju sekvenci, osim klasičnih karakteristika signalnih sekvenci kao što su aminokiselinski sastav i fizikalno-kemijska svojstva, koristi i karakteristike kao što su pozitivno nabijena amfifilnost i motivi presekvenca za predikciju mjesta cijepanja. Predviđeno mjesto cijepanja za humanu mtSerRS ovim serverom je 33, odnosno iza 33. aminokiseline. Sličnim svojstvima se vode i ostali serveri koji su korišteni za predikciju N-terminalne signalne sekvence. Server MitoProt II v1.101 je previdio mjesto cijepanja iza 21. aminokiseline, server PSORT II iza 31. aminokiseline, s server Tpred 2.0 je dao istu veličinu signalne sekvence kao i Target P.1.1. Još dvije duljine signalne sekvence su predviđene sravnjenjem proteinskih sekvenci humane mtSerRS i SerRS iz *E. coli* i *B. taurus* čije su signalne sekvence poznate. Signalna sekvenca predviđena sravnjenjem sa SerRS iz *E. coli* iznosila je 56 aminokiselina, a s *B. taurus* 29 aminokiselina.

### 5.3. Indukcija ekspresije varijanata mtSerRS d21 i d34

Početni vektor pOTB7 u kojem je bila prisutna cDNA mtSerRS nije bio pogodan za prekomjernu ekspresiju proteina. Kako bi protein bio nadeksprimiran i imao heksahistidinski privjesak, cDNA gena je skraćena (ovisno o veziji mtSerRS) u PCR-u i ugrađena u vektor pProEX HTb između mjesta za restrikcijske endonukleaze BamHI i Sall. Nakon toga je vektor unesen u stanice *E. coli* soja BL21(DE3). Tijekom indukcije ekspresije proteina *in vivo* IPTG-om zaključeno je da je najbolji prinos proteina bio pri  $OD_{600}=0,6-0,8$  uz minimalnu količinu IPTG-a, a ne u standardnim uvjetima pri  $OD_{600}=1$  i relativno visokim koncentracijama IPTG-a kako je bilo određeno za mnoge druge proteine.

### 5.4. Pročišćavanje d21 i d34 SerRS kromatografskim metodama

Pošto je većina izvora predikcije signalne sekvence predvidjela duljinu od 34 aminokiseline, prvo je ta verzija proteina pročišćena. Prilikom pročišćavanja proteina od interesa iz staničnog izolata *E. coli* došlo je do puno neočekivanih situacija. Prilikom početne kromatografije na Ni-NTA agarozu, nakon sonikacije bakterija najveći dio proteina je zaostao u talogu u inkluzijskim tijelima što je značilo da je trebalo na dodatan način učiniti protein topljivijim u vodenoj otopini modifikacijom uvjeta uzgoja bakterija i modifikacijom sastava pufera za kromatografiju. U pufer za lizu (sadrži  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$  imidazol) je dodan Tween20 kako bi se efikasnije lizirale bakterijske stanične membrane i, ako je moguće, otopila inkluzijska tijela. Time je postignuto da je veća količina proteina

bila u supernatantu. Također je sljedeći problem postao vidljiv prilikom prvog pročišćavanja spektrofotometrijskom analizom spektra. Uočeno je da je zaostala velika količina nukleinskih kiselina u uzorku proteina. Elektroforezama je pokazano da je nukleinska kiselina bila rRNA te da je uzorak proteina imao vezane cijele ribosome 70S - veliku i malu podjedinicu. Uzrok vezanja ribosoma na protein d34 je nepoznat, ali postoje podatci u literaturi da neke arhejske seril-tRNA-sintetaze vežu ribosome (Godinic-Mikulcic, 2014). Kako bi eluirani protein bio što čišći nakon elucije na Ni-NTA agarozu, u protokol je dodan pufer za ispiranje koji je sadržavao  $c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$  Tris-HCl pH=8,0  $c = 1,75 \text{ mol dm}^{-3}$  natrijev klorid,  $c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$  urea,  $\varphi = 10 \%$  glicerol,  $c = 30 \text{ mmol dm}^{-3}$  imidazol i  $c = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$   $\beta$ -merkaptotanol. Navedene komponente ometaju interakcije drugih proteina u staničnom ekstraktu s proteinom od interesa te interakcije neželjenih proteina s kolonom. Nakon ovih modificiranih koraka uzorak proteina bio je čišći i koncentriraniji.

Kako bi se frakcije koncentriranog proteina dodatno pročistile, korištena je anionska kromatografija na kromatografskom sustavu AKTA. Probni program ionske izmjene isproban tijekom 2015. godine na citosolnom proteinu SerRS se sastojao od nekoliko koraka prema odnosu koncentracije pufera A i B te se elucija odvijala prema sljedećem programu: 0% B (v/v), skok na 40% B (v/v), skok na 50 % B (v/v) te skok 100% pufera B (v/v). Ovim programom pročišćavanja proteina željelo se uočiti u kojim frakcijama će se dio proteina vezan na ribosom eluirati i odvojiti od čistog proteina. U dvije frakcije pri 100% pufera B (v/v) nalazio se protein koji ima vezane ribosome. Prema tome, tijekom svih kromatografija pri ionskoj jakosti 100% pufera B (v/v) uvijek će se eluirati ribosomi. Optimiranjem kromatografije d34 mtSerRS, sve daljnje elucije su optimirane oko 40% pufera B (v/v) kako bi se što više mogao razlučiti protein od nukleinske kiseline koja se pročišćavala u istim i/ili bliskim frakcijama. Daljnja elucija u koracima linearni gradijent 5 - 40% pufera B (v/v) te skok na 100% pufera B (v/v) se nije pokazala najboljom jer nagli skok na 5% pufera B (v/v) je preblagi kako bi se protein eluirao u dvije-tri frakcije, a ne razvukao u 10-ak istih. Također je isproban program u koracima 0% B (v/v), skok do 30% B (v/v), linearni gradijent 30 - 60% B (v/v) te skok do 100% pufera B (v/v). Konačni program 0% B (v/v), skok do 5% B (v/v), skok do 30% B (v/v) i skok do 100% pufera B (v/v) se pokazao najpogodnijim za pročišćavanje proteina.

Tijekom cijelog rada verzija proteina d21 hmtSerRS je uvijek imala manji prinos. Smatrano je da je duljina signalne sekvence od 21 aminokiseline presudna za tercijarnu strukturu proteina te da je zato protein d21 bio manje topljiv i nestabilniji od verzije d34. Stanice *E. coli* su zbog toga vjerojatno proizvodile manju količinu tog proteina. Iako su geni za verzije proteina d29, d33 i d56 bili ugrađeni u vektore, nisu bili nadeksprimirani jer se zaključilo

da je varijanta proteina d34 u prinosu i čistoći zadovoljavajuća za kinetičke eksperimente i vrlo vjerojatno najbolja verzija enzima.

### 5.5. Aktivnost humane mtSerRS i citSerRS u reakciji aktivacije i aminoacilacije

Kao što je navedno u uvodu, neproteinogene aminokiseline su aminokiseline koje ne grade proteine, ali postoje u stanici kao intermedijeri različitih biokemijskih puteva, a zbog svoje sličnosti s proteinogenim aminokiselinama potencijalno se mogu ugrađivati u proteine. U nekim slučajevima mistranslatirane neproteinogene aminokiseline uzrokuju proteinsku agregaciju (Bell, 2009), za što se smatra da je uzrok neurodegenerativnih bolesti. Misaciliranje i ugradnja BMAA u proteine je jedan od uzroka agregiranja funkcionalno aktivnih proteina te je zbog toga potencijalno jedan od uzroka, između ostalog, amiotrofične lateralne skleroze (ALS) i Alzheimerove bolesti (Dunlop, 2013). U literaturi je dokazano da je aktivnost kaspaze-3 reducirana dodatkom L-serina. Također, aktivnost lizozima, odnosno lizosomalnih proteaza katepsina L i B je bila smanjena dodatkom BMAA u prisutnosti L-serina (Main, 2015). Pretpostavka rada je bila da enzim seril-tRNA-sintetaza ima ulogu pri misaciliranju humane tRNA<sup>Ser</sup> s BMAA, odnosno da humana citosolna seril-tRNA-sintetaza acilira tRNA<sup>Ser<sub>AGA</sub></sup> s BMAA i/ili da humana mitohondrijska seril-tRNA-sintetaza acilira tRNA<sup>Ser<sub>TGA</sub></sup> s BMAA. Prema tome, mistranslacija BMAA na mjesto serinskih kodona bi se potvrdila prijenosom aktivirane neproteinogene aminokiseline BMAA na hmit tRNA<sup>Ser<sub>AGA</sub></sup> ili hmt tRNA<sup>Ser<sub>TGA</sub></sup>.

Kao zaključni dio rada aktivnost humane mtSerRS i citSerRS prvo je analizirana reakcijama aktivacije L-serina i BMAA mjerene ATP/PP<sub>i</sub> izmjenom. Uočeno je da svi pročišćeni enzimi nakon pročišćavanja imaju nešto serina ili seril-adenilata u aktivnom mjestu. To nije neobično jer enzimi često jesu kopurificirani i kristalizirani s raznim supstratima i zato je bilo važno napraviti kontrolu u kojoj u reakcijsku smjesu nije dodan aminokiselinski supstrat. Ta reakcija je bila negativna kontrola, odnosno izračunata vrijednost nastanka ATP-a je bila brzina aktivacije serina koji je kopurificiran s enzimom. Provedbom metode aktivacije aminokiselina mjerene ATP/PP<sub>i</sub> izmjenom, zaključeno je da su svi enzimi bili aktivni, uključujući i mitohondrijski enzim d34, što je, kako je gore navedeno, provjereno u reakciji sa L-serinom. Iz rezultata pokusa zaključeno je da humana citosolna SerRS i SerRS iz *E. coli* aktiviraju neproteinogenu aminokiselinu BMAA, dok humana mitohondrijska SerRS pokazuje vrlo slabu aktivaciju BMAA jer je zaostalo seril-adenilata u aktivnom mjestu mtSerRS. Smatramo da je u budućem radu potrebno optimirati aktivaciju BMAA humanom mitohondrijskom SerRS tako da se aktivno mjesto pročisti od seril-adenilata.



Aktivnost enzima je provjerna i metodom aminoacilacije L-serina i BMAA. Iz rezultata pokusa, utvrđeno je da su obje tRNA, hciit tRNA<sup>Ser<sub>AGA</sub></sup> i hmt tRNA<sup>Ser<sub>TGA</sub></sup> funkcionalne. U reakcijama aminoacilacije BMAA, kao kontrolu da je uistinu BMAA bila prenesena, a ne L-serin koji je eventualno bio kopurificiran s enzimom, napravljene su reakcije s vodom (reakcije nazvane 0) kod kojih nije došlo do aminoacilacije tRNA. Nakon provedenog preliminarnog pokusa, zaključeno je da enzimi, humana citSerRS i mtSerRS, prenose neproteinogenu aminokiselinu BMAA na vlastite hciit tRNA<sup>Ser<sub>AGA</sub></sup> i hmt tRNA<sup>Ser<sub>TGA</sub></sup>. Nastajanje tRNA aminoacilirane s BMAA sugerira da se BMAA ugrađuje u proteine na mjesto L-serina.

## 6. Zaključak

- ❖ U ovom radu proizvedene su funkcionalne molekule humane citosolne tRNA<sup>Ser<sub>AGA</sub></sup> i humane mitohondrijske tRNA<sup>Ser<sub>TGA</sub></sup> metodom transkripcije *in vitro* pod kontrolom T7 promotora.
- ❖ Dizajnirane su početnice za gene humane mtSerRS s željenim veličinama bez 21, 29, 33, 34 i 56 aminokiselina signalne sekvence (presekvence). Uspješno su PCR-om umnožene verzije humane mitohondrijske seril-tRNA-sintetaze na kalupu cDNA.
- ❖ Metodama rekombinantne DNA tehnike verzije gena za humane mitohondrijske SerRS su po prvi puta ugrađene u ekspresijski vektor pProEX HTb.
- ❖ Po prvi puta je rekombinatno ekspimirana humana mitohondrijska seril-tRNA-sintetaza bez signalne sekvence od 21 i 34 aminokiseline u bakterijskim stanicama *E. coli* soja BL21.
- ❖ Prekomjerno ekspimirani protein humana mtSerRS bez signalne sekvence od 34 aminokiseline je bio pročišćen iz topljivih frakcija lizata bakterijskih stanica afinitetnom kromatografijom na koloni Ni-NTA agaroze i kromatografijom na anionskom izmjenjivaču na sustavu *FPLC-AKTA*.
- ❖ Potvrđeno je da je humana mtSerRS bez signalne sekvence od 34 aminokiseline aktivan oblik mitohondrijskog enzima.
- ❖ Humana citosolna SerRS i SerRS *E. coli* aktiviraju neproteinogenu aminokiselinu BMAA, dok humana mitohondrijska SerRS bez signalne sekvence od 34 aminokiseline vrlo slabo aktivira BMAA.
- ❖ Nakon provedenog preliminarnog pokusa, zaključeno je da enzimi, humana citosolna SerRS i mitohondrijska SerRS bez signalne sekvence od 34 aminokiseline, prenose neproteinogenu aminokiselinu BMAA na vlastite hcit tRNA<sup>Ser<sub>AGA</sub></sup> i hmt tRNA<sup>Ser<sub>TGA</sub></sup>. Nastajanje tRNA aminoacilirane s BMAA sugerira da se BMAA ugrađuje u proteine na mjesto L-serina.

## 7. Zahvale

Zahvaljujemo se voditeljici dr. sc. Vlatki Godinić - Mikulčić na stručnom vodstvu, korisnim savjetima i pruženom znanju, te na strpljenju, susretljivosti i poklonjenom vremenu tijekom izrade ovog rada za Rektorovu nagradu.

Također se zahvaljujemo dr. sc. Igoru Svibenu na pomoći pri izvođenju eksperimentalnog dijela rada i prijateljskoj atmosferi.

Posebne zahvale bi željele uputiti mentorici izv. prof. dr. sc. Ili Gruić - Sovulj na pruženom znanju biokemije tijekom studija i stručnom vodstvu tokom izrade ovog rada.

Zahvaljujemo se i dr. sc. Morani Dulić na završnim pokusima te ustupljenom vremenu i trudu.

Najviše se zahvaljujemo našim obiteljima i prijateljima na pruženoj podršci i razumijevanju tijekom izrade ovog rada.

## 8. Popis literature

1. Bell EA, The discovery of BMAA, and examples of biomagnification and protein incorporation involving other non-protein amino acids, Amyotrophic Lateral Sclerosis, 2009, 10(2):21-25
2. Bradford MM, A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-257
3. Chimnarong S, Gravers Jeppesen M, Suzuki T, Nyborg J, Watanabe K, Dual-mode recognition of noncanonical tRNAs<sup>Ser</sup> by seryl-tRNA synthetase in mammalian mitochondria, The European Molecular Biology Organization Journal, 2005, 24(19):3369-3379
4. Clementi ME, Misiti F, Substitution of methionine 35 inhibits apoptotic effects of Aβ(31-35) and Aβ(25-35) fragments of amyloid-beta protein in PC12 cells, Medical Science Monitor, 2005, 11(11):BR381-5
5. Cox PA, Banack SA, Murch SJ, Rasmussen U, Tien G, Bidigare RR, Metcalf JS, Morrison LF, Codd GA, Bergman B, Diverse taxa of cyanobacteria produce β-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid, Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005, 102(14): 5074–5078
6. Cvetesic N, Palencia A, Halasz I, Cusack S, Gruic-Sovulj I, The physiological target for LeuRS translational quality control is norvaline, EMBO Journal, 2014, 33(15):1639-1653
7. Dubendorff JW, Studier FW, Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor, Journal of Molecular Biology, 1991, 219(1): 45-59
8. Dunlop RA, Cox PA, Banack SA, Rodgers JK, The non-protein amino acid BMAA is misincorporated into human proteins in place of L-serine causing protein misfolding and aggregation, PLOS ONE, 2013, 8(9): e75376
9. Dunlop RA, Brunk UT, Rodgers KJ, Proteins containing oxidized amino acids induce apoptosis in human monocytes, Biochemical Journal, 2011, 435(1):207-16
10. Edelmann P, Gallant J, Mistranslation in *E. coli*, Cell, 1977, 10(1):131–137
11. Florentz C, Sohm B, Tryoen-Toth P, Putz J, Sissler M, Human mitochondrial tRNAs in health and disease, Cellular and Molecular Life Sciences, 2003, 60(7):1356-1375
12. Francklyn CS, First EA, Perona JJ, Hou YM, Methods for kinetic and thermodynamic analysis of aminoacyl-tRNA synthetases, Methods, 2008, 44(2):100-118
13. Godinic-Mikulcic V, Jaric J, Greber BJ, Franke V, Hodnik V, Anderluh G, Ban N, Weygand-Durasevic I, Archaeal aminoacyl-tRNA synthetases interact with the ribosome to recycle tRNAs, Nucleic Acids Research, 2014, 42(8):5191-5201

14. Gromadski KB, Rodnina MV, Kinetic determinants of high-fidelity tRNA discrimination on the ribosome, *Molecular Cell*, 2004, 13(2):191–200
15. Kumazawa Y, Himeno H, Miura K, Watanabe K, Unilateral Aminoacylation Specificity between Bovine Mitochondria and Eubacteria, *The Journal of Biochemistry*, 1991, 109(3):421-427
16. Lehninger AL, Nelson D, Cox MM, Lehninger: Principles of biochemistry, peto izdanje, W.H. Freeman and Company, New York, 2008
17. Main BJ, Dunlop RA, Rodgers KJ, The use of L-serine to prevent  $\beta$ -methylamino-L-alanine(BMAA)-induced proteotoxic stress in vitro, *Toxicon*, 2015, 109:7-12
18. Meselson M, Yuan R, DNA restriction enzyme from *E. coli*, *Nature*, 1968, 217(5134):1110-1114
19. Ming X, Rajapakse GA, Carvas J M, Ruffieux J, Yang Z, Inhibition of S6K1 accounts partially for the anti-inflammatory effects of the arginase inhibitor L-norvaline, *BMC Cardiovascular Disorders*, 2009, 9:12
20. Moffatt BA, Studier FW, T7 lysozyme inhibits transcription by T7 RNA polymerase, *Cell*, 1987, 49(2): 221-227
21. Sambrook J, Russell D, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, treće izdanje, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001
22. Sauter C, Lorber B, Gaudry A, Karim L, Schwenzer H, Wien F, Roblin, Florentz C, Sissler M, Neurodegenerative disease-associated mutants of a human mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetase present individual molecular signatures, *Scientific Reports*, 2015, 5: 17332
23. Sissler M, Pütz J, Fasiolo F, Mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases, *Madame Curie Bioscience Database Landes Bioscience*, 2013, online izdanje <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6033/> (pristupljeno 1.3.2016)
24. Soini J, Falschlehner C, Liedert C, Bernhardt J, Vuoristo J, Neubauer P, Norvaline is accumulated after a down-shift of oxygen in *Escherichia coli* W3110, *Microbial Cell Factories*, 2008, 7:30
25. Stoscheck CM, Quantitation of protein, *Methods in Enzymology*, 1990, 182: 50-68
26. Studier FW, Moffatt BA, Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes, *The Journal of Molecular Biology*, 1986, 189(1):113-130
27. Xu X, Shi Y, Zhang H, Swindell EC, Marshall AG, Guo M, Kishi S, Yang XL, Unique domain appended to vertebrate tRNA synthetase is essential for vascular development, *Nature Communications*, 2012, 3:681
28. Yokogawa T, Shimada N, Takeuchii N, Benkowski L, Suzuki T, Omori A, Ueda T, Nishikawa K, Spremulli LL, Watanabe K, Characterization and tRNA Recognition of

Mammalian Mitochondrial Seryl-tRNA Synthetase, The Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(26):19913-19920

29. [www.biofeng.com](http://www.biofeng.com) (pristupljeno 22.4.2016.)
30. [gtrnadb.ucsc.edu/genomes/eukaryota/Hsapi19/Hsapi19-align.html#Ser](http://gtrnadb.ucsc.edu/genomes/eukaryota/Hsapi19/Hsapi19-align.html#Ser) (pristupljeno 25.3.2016.)
31. [www.lifesciences.sourcebioscience.com](http://www.lifesciences.sourcebioscience.com) (pristupljeno 22.4.2016.)
32. [www.snapgene.com](http://www.snapgene.com) (pristupljeno 22.4.2016.)
33. [www.stratagene.com](http://www.stratagene.com) (pristupljeno 7.3.2016.)
34. <http://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/sequencing/sanger-sequencing/sanger-sequencing-method.html> (pristupljeno 22.4.2016.)

## 9. Sažetak

### Priprema humane seril-tRNA-sintetaze i tRNA<sup>Ser</sup> za analizu mistranslacije serinskih kodona

KATARINA BELAČIĆ I ANJA KOSTELAC

Transfer-RNA (tRNA) su ključne molekule u prevođenju slijeda nukleotida u glasničkoj-RNA (mRNA) u slijed aminokiselina u proteinu. Njihova sekundarna struktura ima oblik djeteline s dobro definiranim veličinama peteljki i petlji (u parovima baza) te prisutnost konzerviranih nukleotida na definiranim pozicijama koji čine identitetne elemente za prepoznavanje pripadne tRNA od strane aminoacil-tRNA-sintetaza. Kanonska struktura tRNA je trodimenzionalna struktura u obliku slova L, a temelji se na unutrašnjim, preciznim i visoko očuvanim mrežama tercijarnih interakcija. Neke mitohondrijske tRNA imaju kanonsku strukturu, a druge koje odstupaju od nje se nazivaju 'bizarnim' tRNA. U ovom radu priređeni su rekombinantni plazmidi za *in vitro* transkripciju humane citosolne tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> i 'bizarne' humane mitohondrijske tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> pod kontrolom jakog T7 promotora. Optmiran je sustav za preparativnu proizvodnju molekula tRNA *in vitro* transkripcijom T7 RNA-polimerazom.

Aminoacil-tRNA-sintetaze su enzimi koji kataliziraju nastajanje kovalentne veze između pripadnog para aminokiseline i tRNA. Točnost sinteze proteina na razini translacije se oslanja na točno prepoznavanje pripadne aminokiseline i pripadne tRNA od strane aminoacil-tRNA-sintetaze. U određenim slučajevima kada dvije aminokiseline dijele slična strukturalna svojstva, provjera pripadnosti aminokiseline od strane aminoacil-tRNA-sintetaza može biti pogrešna što dovodi do mistranslacije. Mistranslacija može biti uzrokovana ugradnjom aminokiselina na pogrešno mjesto, odnosno ugradnjom aminokiseline na mjesto kodona koji ne kodira ugrađenu aminokiselinu ili ugradnjom neproteinogene aminokiseline u peptid. β-N-metilamino-L-alanin (BMAA) je neproteinogena aminokiselina za koju se pretpostavljalo da se ugrađuje umjesto L-serina u humane proteine prilikom translacije, a smatra se da ugradnja BMAA uzrokuje neurodegenerativne bolesti. Pretpostavka rada je da humani enzim seril-tRNA-sintetaza ima ulogu pri misaciliranju humane tRNA<sup>Ser</sup> s BMAA, odnosno da humana citosolna seril-tRNA-sintetaza acilira tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> s BMAA i/ili da humana mitohondrijska seril-tRNA-sintetaza acilira tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> s BMAA.

Mitohondrijske aminoacil-tRNA-sintetaze su enzimi kodirani jezgrinim genomom, sintetiziraju se na citosolnim ribosomima i prenose se u mitohondrije. Unos u mitohondrije

usmjerava signalna sekvenca na N-kraju proteina koja se uklanja pomoću mitohondrijskih enzima. U ovom radu optimiran je sustav za *in vivo* ekspresiju humane mitohondrijske seril-tRNA-sintetaze (mtSerRS) u bakteriji *E. coli* s pet različitih predikcija signalne sekvence i razvijena je metoda pročišćavanja afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu i kromatografijom na anionskom izmjenjivaču metodom FPLC. Aktivnost humane mitohondrijske SerRS i humane citosolne SerRS provjerene su reakcijama aktivacije L-serina i BMAA. Potvrđeno je da je humana mitohondrijska SerRS bez signalne sekvence od 34 aminokiseline aktivan oblik mitohondrijskog enzima. Humana citosolna SerRS i SerRS *E. coli* aktiviraju neproteinogenu aminokiselinu BMAA, dok humana mitohondrijska SerRS bez signalne sekvence od 34 aminokiseline vrlo slabo aktivira BMAA. Aktivnost humane mitohondrijske SerRS i humane citosolne SerRS provjerena je i reakcijama aminoacilacije L-serina i BMAA. Potvrđeno je da su humana citosolna tRNA<sup>Ser<sub>AGA</sub></sup> i mitohondrijska tRNA<sup>Ser<sub>TGA</sub></sup> funkcionalni oblici tRNA. Nakon provedenog preliminarnog pokusa, zaključeno je da enzimi, humana citosolna SerRS i mitohondrijska SerRS bez signalne sekvence od 34 aminokiseline, prenose neproteinogenu aminokiselinu BMAA na vlastite tRNA - humanu citosolnu tRNA<sup>Ser<sub>AGA</sub></sup> i humanu mitohondrijsku tRNA<sup>Ser<sub>TGA</sub></sup>. Nastajanje tRNA aminoacilirane s BMAA sugerira da se BMAA ugrađuje u proteine na mjesto L-serina.

Ključne riječi: β-N-metilamino-L-alanin (BMAA), humana mitohondrijska seril-tRNA-sintetaza, mistranslacija, signalna sekvenca, tRNA.



## 10. Summary

### Preparation of human seryl-tRNA-synthetase and tRNA<sup>Ser</sup> for mistranslation analysis of serine codons

KATARINA BELAČIĆ I ANJA KOSTELAC

Transfer-RNA (tRNAs) are fundamental actors in the conversion of the nucleotide sequence in messenger-RNA (mRNA) into the amino acid sequence in protein. Their cloverleaf-like secondary structure has well-defined characteristics including size of stems and loops and the presence of a number of conserved nucleotides at the strategic positions. Canonical tRNA structure is L-shaped 3D structure based on an intricate, precise and conserved network of tertiary interactions. While some mitochondrial tRNAs show cloverleaf structures very close to the canonical one, the other are referred to as 'bizarre' tRNAs. In our research recombinant plasmids have been produced for *in vitro* transcription of human cytosolic tRNA<sup>Ser<sub>AGA</sub></sup> and 'bizarre' human mitochondrial tRNA<sup>Ser<sub>TGA</sub></sup> under the control of T7 strong promotor. Moreover, *in vitro* transcription has been optimized for preparative purposes.

Aminoacyl-tRNA synthetases are enzymes that covalently join amino acids with their cognate tRNAs. Fidelity of protein synthesis at the translational level relies on specific recognition of cognate amino acid and cognate tRNA by aminoacyl-tRNA-synthetase. When two amino acids share similar structure, aminoacyl-tRNA-synthetase proofreading step of cognate amino acid can fail and lead to mistranslation. Mistranslation is caused by amino acid incorporation in the wrong place in the protein. In other words, it is induced by amino acid incorporation in the place of codone that does not code for that amino acid or by incorporation of non-proteinogenic amino acid in the pepetide.  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine (BMAA) is a non-proteinogenic amino acid for which was assumed that misincorporates instead of L-serine into human proteins during translation and was believed to be the cause of neurodegenerative diseases. Our research hypothesis states that human enzyme seryl-tRNA-synthetase plays a significant role in misacilation of human tRNA<sup>Ser</sup> with BMAA, i.e. that human cytosolic seryl-tRNA-synthetase acylates tRNA<sup>Ser<sub>AGA</sub></sup> with BMAA and/or human mitochondrial seryl-tRNA-synthetase acylates tRNA<sup>Ser<sub>TGA</sub></sup> with BMAA.

Mitochondrial aminoacyl-tRNA-synthetases are enzymes coded by the genes in the nucleus, synthetized on the cytosolic ribosomes and transported to the mitochondria. Translocation into the mitochondria is guided by the signalling sequence on N-terminus of

the protein. Signalling sequence is cut by the mitochondrial enzymes once the enzyme has been translocated in the mitochondria. In this research, *in vivo* expression of human mitochondrial seryl-tRNA-synthetase (SerRS) with five different signalling sequences has been optimized in bacteria *E. coli*. Furthermore, we developed protein purification on affinity chromatography Ni-NTA agarose and anion exchange chromatography based on FPLC method. Activity of human mitochondrial SerRS and human cytosolic SerRS has been tested by activation of L-serine and BMAA. It has been confirmed that human mitochondrial SerRS without signalling sequence of 34 amino acids is an active form of mitochondrial enzyme. Purified human cytosolic and *E. coli* seryl-tRNA-synthetases activate BMAA, whereas human mitochondrial SerRS without signalling sequence of 34 amino acids very poorly activate BMAA. Activity of human mitochondrial SerRS and human cytosolic SerRS has been tested by aminoacylation with L-serine and BMAA, also. It has been confirmed that human cytosolic tRNA<sup>Ser<sub>AGA</sub></sup> and mitochondrial tRNA<sup>Ser<sub>TGA</sub></sup> are active forms of tRNAs. After running a preliminary test, it has been concluded that enzymes, human cytosolic SerRS and mitochondrial SerRS without signalling sequence of 34 amino acids, transfer non-proteinogenic amino acid BMAA to their own tRNAs - human cytosolic tRNA<sup>Ser<sub>AGA</sub></sup> and mitochondrial tRNA<sup>Ser<sub>TGA</sub></sup>. The formation of aminoacylated tRNA with BMAA suggests that BMAA is incorporated in the proteins instead of L-serine.

Keywords:  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine (BMAA), human mitochondrial seryl-tRNA-synthetase, mistranslation, signalling sequence, tRNA.

## PRILOZI

### Prilog 1: Sekvenciranje pročišćenih pUC18 vektora s ugrađenim hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> genima

Sravnjenje sekvence pUC18 – hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>TGA</sub> 1C s originalnim, naručenim sintetskim oligonukleotidom i rezultat sekvenciranja s označenim dijelovima za restrikcijska mjesta u koja je ugrađen gen, EcoRI crvenom i BamHI zelenom bojom slova, promotor ljubičastom i Nsil restrikcijsko mjesto plavom bojom slova.

```
Sintetska tRNASer(TGA) 1 AATTC-GTCGACTAATACGACTCACTATAGAGAAGGTCACAGAGGTTATGGGATTGGCTT 59
      |||||
pUC18-tRNASer(TGA) 180 AATTCGGTCGACTAATACGACTCACTATAGAGAAGGTCACAGAGGTTATGGGATTGGCTT 121

Sintetska tRNASer(TGA) 60 GAAACCAGTCTGTGGGGGTTTCGATTCCCTCCTTTTTCACCATGCATG 107
      |||||
pUC18-tRNASer(TGA) 120 GAAACCAGTCTGTGGGGGTTTCGATTCCCTCCTTTTTCACCATGCATG 73
```

```
5´ ATATATACATAGCTTCTTAATAAGTCGGAATTAACAATAGCTTGCTAATCAATTAAGATTAATGTGTGCGT
CTCTACACGCTCTCGAATTAATGAAGAGTAGTTTCCTGATTAAGGAGCCAGCATTTAGGAATGAAAAGAGGAG
ATAGATTAACACTTCCCAGTTTGGAGTGAACGACTTACTCCGAAATGAGATACATACAGCGTGAGTTATGAG
AAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGC
GCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTG
AGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTAC
GGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACC
GTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCG
AGGAAGCGGAAGAGCGCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCTGGC
ACGACAGGTTTCCCAGCTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGG
CACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACA
CAGGAAACAGCTATGACATGATTACGAAATTCGGTCGACTAATACGACTCACTATAGAGAAGGTCACAGAGGT
TATGGGATTGGCTTGAAACCAGTCTGTGGGGGTTTCGATTCCCTCCTTTTTCACCATGCATGGATCCTCTAG
AGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTACAACGTCGTGACTGGGAAA 3´
```

### Prilog 2: Sekvenciranje pročišćenih pUC18 vektora s ugrađenim hmt tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> genima

Sravnjenje sekvence pUC18 - tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGA</sub> 4 s originalnim, naručenim sintetskim oligonukleotidom i rezultat sekvenciranja s označenim dijelovima za restrikcijska mjesta u koja je ugrađen gen, EcoRI crvenom i BamHI zelenom bojom slova, promotor ljubičastom i Nsil restrikcijsko mjesto plavom bojom slova.

```
Sintetska tRNASer(AGA) 1 AATTCGTCGACTAATACGACTCACTATAGTAGTCGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGAC 60
      |||||
pUC18-tRNASer(AGA) 206 AATTCGTCGACTAATACGACTCACTATAGTAGTCGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGAC 147
```

Sintetska tRNA<sup>Ser (AGA)</sup> 61 TAGAAATCCATTGGGGTTTCCCCGCGCAGGTTTCAATCCTGCCGACTACGCCATGCATG 119  
 |||  
 pUC18-tRNA<sup>Ser (AGA)</sup> 146 TAGAAATCCATTGGGGTTTCCCCGCGCAGGTTTCAATCCTGCCGACTACGCCATGCATG 88

5' TATAGAACCGCTCTGTTAGGCTGAGCATGTCTCTCAACCAGCCGAAAGACCGAGCGCAGTGAG  
 TCATTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGAGCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCTTGGCCGAT  
 TCATTAATGCAGCTGGCAGCAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTA  
 ATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTG  
 TGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACATGATTACGAATTCGTC  
 GACTAATACGACTCACTATAGTAGTCGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTAGAAATCCATTG  
 GGGTTTCCCCGCGCAGGTTTCAATCCTGCCGACTACGCCATGTCATGGATCCTCTAGAGTCGACCT  
 GCAGGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGAAAGCCCCCTTCTT  
 TAA 3'

### Prilog 3: Sekvenciranje pročišćenih vektora pOTB7 s ugrađenim cDNA mtSerRS

Ispod je prikazano sravnjenje sekvence sa slijedom cDNA mtSerRS nukleotidnih baza podataka. Legenda sravnjenja: pOTB7 predstavlja sekvenciran slijed, a cDNA je sekvenca mtSerRS iz genskih baza podataka.

pOTB7	39	GTTCCCGGTCCAAGATGGCTGCGTCCATGGCGCGGCGCTTGTGGCCTTTGCTGACTCGTC	98
cDNA	1	GTTCCCGGTCCAAGATGGCTGCGTCCATGGCGCGGCGCTTGTGGCCTTTGCTGACTCGTC	60
pOTB7	99	GGGGTTCCGGCCCCGGGAGGCTGCATCTCCAACGATAGTCCAAGGAGAAGTTTCACTA	158
cDNA	61	GGGGTTCCGGCCCCGGGAGGCTGCATCTCCAACGATAGTCCAAGGAGAAGTTTCACTA	120
pOTB7	159	CAGAGAAACGAAACCGGAACCTCCTGTACGAGTATGCGCGGAGGGCTACAGCGCACTCC	218
cDNA	121	CAGAGAAACGAAACCGGAACCTCCTGTACGAGTATGCGCGGAGGGCTACAGCGCACTCC	180
pOTB7	219	CTCAGCTGGACATAGAGCGGTTCTGCGCATGCCAGAAGAGCCGCACACGCCCTGGAGC	278
cDNA	181	CTCAGCTGGACATAGAGCGGTTCTGCGCATGCCAGAAGAGCCGCACACGCCCTGGAGC	240
pOTB7	279	TCCGCAAGGGGAGCTGCGCTCGGCGGACCTGCCCGCATCATCTCGACATGGCAGGAGC	338
cDNA	241	TCCGCAAGGGGAGCTGCGCTCGGCGGACCTGCCCGCATCATCTCGACATGGCAGGAGC	300
pOTB7	339	TGAGGCAGCTGCAGGAGCAGATCCGGAGCCTGGAGGAAGAGAAGGCAGCTGTGACTGAGG	398
cDNA	301	TGAGGCAGCTGCAGGAGCAGATCCGGAGCCTGGAGGAAGAGAAGGCAGCTGTGACTGAGG	360
pOTB7	399	CAGTGCGGGCCCTGCTGGCAAACAGGACAGTGGTGAAGTGCAGCAGGACCCCAAGTACC	458
cDNA	361	CAGTGCGGGCCCTGCTGGCAAACAGGACAGTGGTGAAGTGCAGCAGGACCCCAAGTACC	420
pOTB7	459	AGGGTCTGCGGGCACGTGGCCGGGAGATCCGGAAGGAGCTTGTTCACCTGTACCCAGGG	518
cDNA	421	AGGGTCTGCGGGCACGTGGCCGGGAGATCCGGAAGGAGCTTGTTCACCTGTACCCAGGG	480
pOTB7	519	AGGCCAGCTTGAGGAGCAGTTCTACCTGCAGGCGCTGAAGCTGCCCAACCAGACCCACC	578

cDNA	481	AGGCCAGCTTGAGGAGCAGTTCTACCTGCAGGCGCTGAAGCTGCCCAACCAGACCCACC	540
pOTB7	579	CAGACGTGCCCGTCGGGGATGAGAGCCAGGCTCGAGTGCTCCACATGGTCGGAGACAAGC	638
cDNA	541	CAGACGTGCCCGTCGGGGATGAGAGCCAGGCTCGAGTGCTCCACATGGTCGGAGACAAGC	600
pOTB7	639	CAGTTTTCTCCTTCCAACCTCGGGGCCACCTGGAAATTGGCGAGAAACTCGACATCATCC	698
cDNA	601	CAGTTTTCTCCTTCCAACCTCGGGGCCACCTGGAAATTGGCGAGAAACTCGACATCATCC	660
pOTB7	699	GTCAGAAGCGCCTGTCCCACGTGTCTGGCCACCGTCTATTACCTGCGCGGGGCTGGAG	758
cDNA	661	GTCAGAAGCGCCTGTCCCACGTGTCTGGCCACCGTCTATTACCTGCGCGGGGCTGGAG	720
pOTB7	759	CCCTCCTGCAGCACGGCCTGGTCAACTTACATTCAACAAGCTTCTCCGCCGGGGCTTCA	818
cDNA	721	CCCTCCTGCAGCACGGCCTGGTCAACTTACATTCAACAAGCTTCTCCGCCGGGGCTTCA	780
pOTB7	819	CCCCATGACGGTGCCAGACCTTCTCCGCGGAGCAGTGTGTTGAAGGCTGTGGGATGACAC	878
cDNA	781	CCCCATGACGGTGCCAGACCTTCTCCGCGGAGCAGTGTGTTGAAGGCTGTGGGATGACAC	840
pOTB7	879	CAAATGCCAACCCATCCCAAATTTACAACATCGACCCTGCCCGCTTCAAAGATCTCAACC	938
cDNA	841	CAAATGCCAACCCATCCCAAATTTACAACATCGACCCTGCCCGCTTCAAAGATCTCAACC	900
pOTB7	939	TGGCTGGAACAGCGGAGGTGGGGCTTGCAGGCTACTTCATGGACCACACCGTGGCCTTCA	998
cDNA	901	TGGCTGGAACAGCGGAGGTGGGGCTTGCAGGCTACTTCATGGACCACACCGTGGCCTTCA	960
pOTB7	999	GGGACCTGCCAGTCAGGATGGTTTGCTCCAGCACCTGCTACCGGGCAGAGACAAACACGG	1058
cDNA	961	GGGACCTGCCAGTCAGGATGGTTTGCTCCAGCACCTGCTACCGGGCAGAGACAAACACGG	1020
pOTB7	1059	GACAGGAACCCCGGGGGCTGTATCGAGTACACCACTTACCAAGGTGGAAATGTTTGGGG	1118
cDNA	1021	GACAGGAACCCCGGGGGCTGTATCGAGTACACCACTTACCAAGGTGGAGATGTTTGGGG	1080
pOTB7	1119	TGACAGGCCCTGGGCTGGAACAAAGCTCACAGCTGCTGGAGGAATTCCTGTCCCTTCAAA	1178
cDNA	1081	TGACAGGCCCTGGGCTGGAACAAAGCTCACAGCTGCTGGAGGAGTTTCTGTCCCTTCAAA	1140
pOTB7	1179	TGGAATCTTGACAAAACCTGGGCTTGGATTTCCGGTCTGGATATGCCCA-CCAAGAAC	1237
cDNA	1141	TGGAGATCTTGACAGAGCTGGGCTTGCACCTCCGGTCTGGATATGCCCAACCAAGAAC	1200
pOTB7	1238	TGGGCTCCCGCTAACCC-CAAATTTTACATGTAAGCCTGGATCCCAACCAAGCCCC-	1295
cDNA	1201	TGGGCTCCCGCTAACCC-CAAATTTTACATGTAAGCCTGGATGCCAGGCCGAGGCCGCT	1260
pOTB7	1296	TTGAAAAGTCCCTGTG	1313
cDNA	1261	TTGAGAGGTCACCAGTG	1278

Također, prikazan je sekvenciran slijed s obilježenim crvenim start kodonom.

5' ACGTCTAGTGCAGCCTGGGTGGCGATTCGGCAGCAGGGTTCCCGGTCCAAGATGGCTGCGCCATGGCGC  
GGCGCTTGTGGCCTTTGCTGACTCGTCGGGGGTTCGGCCCCGGGGAGGCTGCACTCCAACGATAGTCCAAG  
GAGAAGTTTCACTACAGAGAAACGAAACCGGAACCTCCTGTACGAGTATGCGCGCAGGGGCTACAGCGCACT  
CCCTCAGCTGGACATAGAGCGGTTCTGCGCATGCCAGAAGAGGCCGCACACGCCCTGGAGCTCCGCAAGGG  
GGAGCTGCGCTCGGCGGACCTGCCCGGATCATCTCGACATGGCAGGAGCTGAGGCAGCTGCAGGAGCAGAT  
CCGGAGCCTGGAGGAAGAGAAGGCAGCTGTGACTGAGGCAGTGCGGGCCCTGCTGGCAAACAGGACAGTGG  
TGAAGTGCAGCAGGACCCCAAGTACCAGGGTCTGCGGGCACGTGGCCGGGAGATCCGGAAGGAGCTTGTTC  
CCTGTACCCAGGGAGGCCAGCTTGAGGAGCAGTTCTACCTGCAGGCGCTGAAGCTGCCCAACCAGACCCA  
CCCAGACGTGCCCGTTCGGGGATGAGAGCCAGGCTCGAGTGCTCCACATGGTCGGAGACAAGCCAGTTTTCTC

CTTCCAACCTCGGGGCCACCTGGAAATTGGCGAGAACTCGACATCATCCGTCAGAAGCGCCTGTCCCACGT  
GTCTGGCCACCGTCTATTACCTGCGCGGGGCTGGAGCCCTCCTGCAGCACGGCCTGGTCAACTTACATT  
CAACAAGCTTCTCCGCCGGGGCTTCACCCCATGACGGTGCCAGACCTTCTCCGCGGAGCAGTGTTTGAAGG  
CTGTGGGATGACACCAAATGCCAACCCATCCCAAATTTACAACATCGACCCTGCCCGCTTCAAAGATCTCAA  
CCTGGCTGGAACAGCGGAGGTGGGGCTTGAGGGTACTTTCATGGACCACACCGTGGCCTTCAGGGACCTGCC  
AGTCAGGATGGTTTGCTCCAGCACCTGTACCAGGACAGAGACAAACACGGGACAGGAACCCCGGGGGCTGTA  
TCGAGTACACCCTTACCAAGGTGGAATGTTTGGGGTGACAGGCCCTGGGCTGGAACAAAGCTCACAGCT  
GCTGGAGGAATTCCTGTCCCTTCAAATGGAATCTTGACAAAACCTGGGCTTGGATTTCCGGGTCTGGATAT  
GCCACCAAGAACTGGGGCTCCCGCTAACCCAAATTTTACATGTAAGCCTGGATCCCAACCAAGCCCCCT  
TGGAAAAGTCCCCTGTGTCTCCT 3'

#### Prilog 4: Sekvenciranje pročišćenih vektora pProEX HTb s ugrađenim mtSerRS varijantama

Za koloniju 13 d34 mtSerRS prikazano je sravnjenje sekvence s naručenim sintetskim cDNA mtSerRS. Legenda sravnjenja: D34 predstavlja sekvenciran slijed, a cDNA je sekvenca mtSerRS iz genskih baza podataka.

D34	102	CACTACAGAGAAACGAAACCGGAACCTCCTGTACGAGTATGCGCGCGAGGGCTACAGCGC	161
cDNA	259		
cDNA	259	CACTACAGAGAAACGAAACCGGAACCTCCTGTACGAGTATGCGCGCGAGGGCTACAGCGC	318
D34	162	ACTCCCTCAGCTGGACATAGAGCGGTTCTGCGCATGCCCAGAAGAGGCCGACACGCCCT	221
cDNA	319		
cDNA	319	ACTCCCTCAGCTGGACATAGAGCGGTTCTGCGCATGCCCAGAAGAGGCCGACACGCCCT	378
D34	222	GGAGCTCCGCAAGGGGAGCTGCGCTCGGCGGACCTGCCCGCATCATCTCGACATGGCA	281
cDNA	379		
cDNA	379	GGAGCTCCGCAAGGGGAGCTGCGCTCGGCGGACCTGCCCGCATCATCTCGACATGGCA	438
D34	282	GGAGCTGAGGCAGCTGCAGGAGCAGATCCGGAGCCTGGAGGAAGAGAAGGCAGCTGTGAC	341
cDNA	439		
cDNA	439	GGAGCTGAGGCAGCTGCAGGAGCAGATCCGGAGCCTGGAGGAAGAGAAGGCAGCTGTGAC	498
D34	342	TGAGGCAGTGCGGGCCCTGCTGGCAAACAGGACAGTGGTGAAGTGCAGCAGACCCCAA	401
cDNA	499		
cDNA	499	TGAGGCAGTGCGGGCCCTGCTGGCAAACAGGACAGTGGTGAAGTGCAGCAGACCCCAA	558
D34	402	GTACCAGGGTCTGCGGGCAGCTGGCCGGGAGATCCGGAAGGAGCTTGTTCACCTGTACCC	461
cDNA	559		
cDNA	559	GTACCAGGGTCTGCGGGCAGCTGGCCGGGAGATCCGGAAGGAGCTTGTTCACCTGTACCC	618
D34	462	CAGGGAGGCCAGCTTGAGGAGCAGTTCTACCTGCAGGCGCTGAAGCTGCCCAACCAGAC	521
cDNA	619		
cDNA	619	CAGGGAGGCCAGCTTGAGGAGCAGTTCTACCTGCAGGCGCTGAAGCTGCCCAACCAGAC	678
D34	522	CCACCCAGACGTGCCCGTTCGGGGATGAGAGCCAGGCTCGAGTGCTCCACATGGTCGGAGA	581
cDNA	679		
cDNA	679	CCACCCAGACGTGCCCGTTCGGGGATGAGAGCCAGGCTCGAGTGCTCCACATGGTCGGAGA	738
D34	582	CAAGCCAGTTTTCTCCTTCCAACCTCGGGGCCACCTGGAAATTGGCGAGAACTCGACAT	641
cDNA	739		
cDNA	739	CAAGCCAGTTTTCTCCTTCCAACCTCGGGGCCACCTGGAAATTGGCGAGAACTCGACAT	798
D34	642	CATCCGTCAGAAGCGCCTGTCCCACGTGTCTGGCCACCGTCTTATTACCTGCGCGGGC	701
cDNA	799		
cDNA	799	CATCCGTCAGAAGCGCCTGTCCCACGTGTCTGGCCACCGTCTTATTACCTGCGCGGGC	858
D34	702	TGGAGCCCTCCTGCAGCACGGCCTGGTCAACTTACATTCAACAAGCTTCTCCGCCGGG	761

cDNA	859	 TGGAGCCCTCCTGCAGCACGGCCTGGTCAACTTCACATTCAACAAGCTTCTCCGCCGGGG	918
D34	762	CTTCACCCCATGACGGTGCCAGACCTTCTCCGCGGAGCAGTGTGTTGAAGGCTGTGGGAT	821
cDNA	919	 CTTCACCCCATGACGGTGCCGAACCTTCTCCGCGAAACAATGTTTGAAGGCTGTGGGAT	978
D34	822	GACACCAAATGCCAACCCATCCCAAATTTACAACATCGACCCTGCCCGCTTCAAAGATCT	881
cDNA	979	 GACACCAAATGCCAACCCATCCCAAATTTACAAAATCGACCCTGGCCGCTTCAAAAATTC	1038
D34	882	CAACCTGGCTGGAACAGCGGAGGTGGGGCTTGCAGGCTACTTCATGGACCA-CACCGTGG	940
cDNA	1039	 CAACCTGGCTGGAACACCGTAGGTGGGGCTTGCCGGCTACTTCGGGGACCAACA-CGTGG	1097
D34	941	CCTTCAGGGACCTGCCAGTCAGGATGGTTTGCTCC-AGCA	979
cDNA	1098	 CCTTCATGGAAGTCCATTGAGGAAGGCTG-TCCTAGCA	1136

Prikazan je sekvenciran slijed s obilježenim crvenim start kodonom, podcrtanim zelenim heksahistidinskim privjeskom te ljubičastim restriksijskim mjestom BamHI. Plavo podcrtno i obojano je TEV mjesto, dok žuto obojano i podcrtno je mjesto vezanja ribosoma.

5' TTGGATCTGCATATTCGTGTCGCTCAGGCGCACTCCCGTTCTGGATAATGTTTTTTCGCGCCGACATCATA  
ACGGTTCGGCAAATATTCTGAAATGAGCTGTTGACAATTAATCATCCGGTCCGTATAATCTGTGGAATTGT  
GAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGACCATGTGCTACTACCATCACCATCACCATCACGATTACGAT  
ATCCCAACGACCGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGCCATGGGATCCACTACAGAGAAACGAAACCGGAACCTC  
CTGTACGAGTATGCGCGCGAGGGCTACAGCGCACTCCCTCAGCTGGACATAGAGCGGTTCTGCGCATGCCCA  
GAAGAGGCCGACACGCCCTGGAGCTCCGCAAGGGGGAGCTGCGCTCGGCGGACCTGCCCGCATCATCTCG  
ACATGGCAGGAGCTGAGGCAGCTGCAGGAGCAGATCCGGAGCCTGGAGGAAGAGAAGGCAGCTGTGACTGAG  
GCAGTGCGGGCCCTGCTGGCAAACCAGGACAGTGGTGAAGTGCAGCAGGACCCCAAGTACCAGGGTCTGCGG  
GCACGTGGCCGGGAGATCCGGAAGGAGCTTGTTCACCTGTACCCAGGGAGGCCAGCTTGAGGAGCAGTTC  
TACCTGCAGGCGCTGAAGCTGCCCAACCAGACCCACCCAGACGTGCCCGTCGGGGATGAGAGCCAGGCTCGA  
GTGCTCCACATGGTCCGAGACAAGCCAGTTTTCTCCTTCCAACCTCGGGGCCACCTGGAAATTGGCGAGAAA  
CTCGACATCATCCGTCAGAAGCGCCTGTCCACGTGTCTGGCCACCGGTCCTATTACCTGCGCGGGGCTGGA  
GCCCTCCTGCAGCACGGCCTGGTCAACTTCACATTCAACAAGCTTCTCCGCCGGGGCTTACCCCATGACG  
GTGCCGAACCTTCTCCGCGAAACAATGTTTGAAGGCTGTGGGATGACACCAAATGCCACCCATCCCAAATT  
TACAAAATCGACCCTGGCCGCTTCAAAAATTTCAACCTGGCTGGAACACCGTAGGTGGGGCTTGCCGGCTAC  
TTCGGGGACCAACACGTGGCCTTCATGGAAGTCCATTGAGGAAGGCTTGTCTAGCA 3'

## Prilog 5: Predikcija signalne sekvence humane mtSerRS

Proteinska sekvencija humane mtSerRS je preuzeta iz GenBank baze podataka:

MAASMARRLWPLLTRRGFRPRGGCISNDSPRRSFTEKRNRLNLLYEYAREGYSALPQLDIERFCACPEEAAH  
ALELRKELRSADLPAIISTWQELRQLQEQIRSLLEEKAADVAVRALLANQDSGEVQQDPKYQGLRARGRE  
IRKELVHLYPREAQLEEQFYLQALKLPNQTHPDVPGVDESQARVLMVGDKPVFSFQPRGHLEIGEKLDIIR  
QKRLSHVSGHRSYYLRGAGALLQHGLVNF'FNKLLRRGFT'PMTVPDLLRGAVFEGCGMTPNANPSQIYNIDP  
ARFKDLNLAGTAEVGLAGYFMDHTVAFRDLVPRMVCSSSTCYRAETNTGQEPRLYRVHHTFKVEMFGVTGPG  
LEQSSQLLEEFSLQMEILTELGLHFRVLDMPQELGLPAYRKFDIEAWMPGRGRFGEVTSASNCTDFQSR

LHIMFQTEAGELQFAHTVNATACAVPRLIIALLESNQQKDGSVLVPPALQSYLGTDRITAPTHVPLQYIGPN  
QPRKPLGQPAVS

Gen za humanu mtSerRS je pomoću servera Expasy, Translate Tool programa proveden kroz tri moguća okvira čitanja. Žuto podebljana slova iznad zeleno podebljanih slova označavaju prve 34 aminokiseline u proteinu (ista ta slova su u proteinskoj sekvenci navedenoj iznad podebljana žuto). Zelena slova označavaju transkripcijski start u DNA sekvenci gena za humanu mtSerRS.

```

T S S A S L G G D S A R G F P V Q D G C F1
R L V R A W V A I R H E G S R S K M A A F2
V * C E P G W R F G T R V P G P R W L R F3
1 ACGTCTAGTGCGAGCCTGGGTGGCGATTCCGGCACGAGGGTTCCCGGTCCAAGATGGCTGC 60
----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|

V H G A A L V A F A D S S G V P A P G R F1
S M A R R L W P L L T R R G F R P R G G F2
P W R G A C G L C * L V G G S G P G E A F3
61 GTCCATGGCGCGCGCTTGTGGCCTTTGCTGACTCGTCCGGGGTTCCGGCCCCGGGGAGC 120
----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|

L H L Q R * S K E K F H Y R E T K P E P F1
C I S N D S P R R S F T T E K R N R N L F2
A S P T I V Q G E V S L Q R N E T G T S F3
121 CTGCATCTCCAACGATAGTCCAAGGAGAAGTTTCACTACAGAGAAACGAAACCGGAACCT 180
----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|

P V R V C A R G L Q R T P S A G H R A V F1
L Y E Y A R E G Y S A L P Q L D I E R F F2
C T S M R A R A T A H S L S W T * S G S F3
181 CCTGTACGAGTATGCGCGGAGGGCTACAGCGCACTCCCTCAGCTGGACATAGAGCGGTT 240
----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|

L R M P R R G R T R P G A P Q G G A A L F1
C A C P E E A A H A L E L R K G E L R S F2
A H A Q K R P H T P W S S A R G S C A R F3
241 CTGCCATGCCAGAAGAGGCCGCACCGCCCTGGAGCTCCGCAAGGGGGAGCTGCGCTC 300
----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|

G G P A R D H L D M A G A E A A A G A D F1
A D L P A I I S T W Q E L R Q L Q E Q I F2
R T C P R S S R H G R S * G S C R S R S F3
301 GGCGACCTGCCCGCATCATCTCGACATGGCAGGAGCTGAGGCAGCTGCAGGAGCAGAT 360
----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|

P E P G G R E G S C D * G S A G P A G K F1
R S L E E E K A A V T E A V R A L L A N F2
G A W R K R R Q L * L R Q C G P C W Q T F3
361 CCGGACCTGGAGGAAGAGAAGGCAGCTGTGACTGAGGCAGTGCGGGCCCTGCTGGCAAA 420
----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|

P G Q W * S A A G P Q V P G S A G T W P F1
Q D S G E V Q Q D P K Y Q G L R A R G R F2
R T V V K C S R T P S T R V C G H V A G F3
421 CCAGGACAGTGGTGAAGTGCAGCAGGACCCCAAGTACCAGGGTCTGCGGGCACGTGGCCG 480
----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|

G D P E G A C S P V P Q G G P A * G A V F1
E I R K E L V H L Y P R E A Q L E E Q F F2
R S G R S L F T C T P G R P S L R S S S F3
481 GGAGATCCGGAAGGAGCTTGTTACCTGTACCCAGGGAGGCCAGCTTGAGGAGCAGTT 540
----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|

```



L P A G A E A A Q P D P P R R A R R G \* F1  
 Y L Q A L K L P N Q T H P D V P V G D E F2  
 T C R R \* S C P T R P T Q T C P S G M R F3  
 541 CTACCTGCAGGCGCTGAAGCTGCCCAACCAGACCCACCCAGACGTGCCCGTCGGGGATGA 600  
 ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|

E P G S S A P H G R R Q A S F L L P T S F1  
 S Q A R V L H M V G D K P V F S F Q P R F2  
 A R L E C S T W S E T S Q F S P S N L G F3  
 601 GAGCCAGGCTCGAGTGCTCCACATGGTCGGAGACAAGCCAGTTTTCTCCTTCCAACCTCG 660  
 ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|

G P P G N W R E T R H H P S E A P V P R F1  
 G H L E I G E K L D I I R Q K R L S H V F2  
 A T W K L A R N S T S S V R S A C P T C F3  
 661 GGGCCACCTGGAAATTGGCGAGAACTCGACATCATCCGTCAGAAGCGCCTGTCCCACGT 720  
 ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|

V W P P V L L P A R G W S P P A A R P G F1  
 S G H R S Y Y L R G A G A L L Q H G L V F2  
 L A T G P I T C A G L E P S C S T A W S F3  
 721 GTCTGGCCACCGGTCTATTACCTGCGCGGGGCTGGAGCCCTCCTGCAGCACGGCCTGGT 780  
 ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|

Q L H I Q Q A S P P G L H P H D G A R P F1  
 N F T F N K L L R R G F T P M T V P D L F2  
 T S H S T S F S A G A S P P \* R C Q T F F3  
 781 CAACTTCACATTCAACAAGCTTCTCCGCCGGGGCTTCACCCCATGACGGTGCCAGACCT 840  
 ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|

S P R S S V \* R L W D D T K C Q P I P N F1  
 L R G A V F E G C G M T P N A N P S Q I F2  
 S A E Q C L K A V G \* H Q M P T H P K F F3  
 841 TCTCCGCGGAGCAGTGTTTGAAGGCTGTGGGATGACACCAAATGCCAACCCATCCCAAAT 900  
 ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|

L Q H R P C P L Q R S Q P G W N S G G G F1  
 Y N I D P A R F K D L N L A G T A E V G F2  
 T T S T L P A S K I S T W L E Q R R W G F3  
 901 TTACAACATCGACCCTGCCCGCTTCAAAGATCTCAACTGGCTGGAACAGCGGAGGTGGG 960  
 ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|

A C R L L H G P H R G L Q G P A S Q D G F1  
 L A G Y F M D H T V A F R D L P V R M V F2  
 L Q A T S W T T P W P S G T C Q S G W F F3  
 961 GCTTGCAGGCTACTTCATGGACCACACCGTGGCCTTCAGGGACCTGCCAGTCAGGATGGT 1020  
 ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|

L L Q H L L P G R D K H G T G T P G A V F1  
 C S S T C Y R A E T N T G Q E P R G L Y F2  
 A P A P A T G Q R Q T R D R N P G G C I F3  
 1021 TTGCTCCAGCACCTGCTACCGGGCAGAGACAAACACGGGACAGGAACCCCGGGGGCTGTA 1080  
 ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|

S S T P L H Q G G N V W G D R P W A G T F1  
 R V H H F T K V E M F G V T G P G L E Q F2  
 E Y T T S P R W K C L G \* Q A L G W N K F3  
 1081 TCGAGTACACCACTTCACCAAGGTGGAAATGTTTGGGGTGACAGGCCCTGGGCTGGAACA 1140  
 ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|

K L T A A G G I P V P S N G N L D K T G F1  
 S S Q L L E E F L S L Q M E I L T K L G F2  
 A H S C W R N S C P F K W K S \* Q N W A F3  
 1141 AAGCTCACAGCTGCTGAGGAATTCCTGTCCCTTCAAATGGAAATCTTGACAAAACCTGGG 1200  
 ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|

L G F P G P G Y A H Q E L G L P A N P N F1  
 L D F R V L D M P T K N W A S P L T Q I F2

W I S G S W I C P P R T G P P R \* P K F F3  
 1201 CTTGGATTTCCGGGTCCTGGATATGCCCAAGAAGTGGGCCTCCCGCTAACCCAAAT 1260  
 ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|

F T C K P G S Q P K P P W K S P L C L L F1  
 L H V S L D P N P S P L G K V P C V S X F2  
 Y M \* A W I P T Q A P L E K S P V S P F3  
 1261 TTTACATGTAAGCCTGGATCCCAACCAAGCCCCCTTGAAAAAGTCCCCTGTGTCTCCT 1319  
 ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|