

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Marta Bošnjaković i Andrea Hloušek-Kasun

**Minimalni analog tRNA^{Leu} koji se može uspješno
aminoacilirati leucil-tRNA-sintetazom**

Zagreb, 2017.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za biokemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc.dr.sc. Morane Dulić i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2016./2017.

Popis kratica

aaRS – aminoacil-tRNA-sintetaze

aaAMP – aminoacil-adenilat

AMP – adenzin-monofosfat

APS – amonijev-persulfat

ATP – adenzin-trifosfat

BSA – eng. *bovine serum albumin*

CP1 – *connective polypeptide 1*

dNTP smjesa – smjesa koja sadrži jednak maseni udio sva četiri tipa nukleotid trifosfata: dGTP-a, dATP-a, dCTP-a i dTTP-a

DTT – ditiotreititol

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

EtBr – etidijev bromid

GDP – gvanozin-monofosfat

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

IPTG – izopropil β -D-1-tiogalaktopiranozid

LB hranjiva podloga – Luria-Bertani hranjiva podloga

LSD – (eng. *leucine specific domain*), domena specifična za leucin

MCS – eng. *Multiple cloning site*, još se naziva i polilinker

NTA – nitrilo-trioctena kiselina

NTP smjesa – smjesa koja sadrži jednak maseni udio sva četiri tipa nukleotid trifosfata: GTP-a, ATP-a, CTP-a i UTP-a

PCR – eng. *polymerase chain reaction*, lančana reakcija polimerazom

PEI celuloza – polietilenimin celuloza

PMSF – fenilmetilsulfonil fluorid

RE – restrikcijski enzim

ReH₂O – redestilirana voda

TEMED- N,N,N',N'– tetrametiletilendiamin

TTP – tiamin-trifosfat

U – eng. *units*

UTP – uracil-trifosfat

ZN1 – cink vezujuća domena

Wt LeuRS – (eng. *Wild type leucyl-tRNA-synthetase*), divlji tip enzima leucil-tRNA-sintetaze

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Literaturni pregled.....	3
2.1. Aminoacil-tRNA-sintetaze.....	4
2.2. Leucil-tRNA-sintetaza (LeuRS) <i>E. coli</i>	8
2.3. Molekule tRNA.....	10
2.4. Elementi identiteta.....	11
2.5. Produktivan LeuRS: tRNA ^{Leu} aminoacilacijski kompleks.....	12
3. Ciljevi rada.....	15
4. Materijali i metode.....	16
4.1. Materijali.....	16
4.1.1. Standardne kemikalije.....	16
4.1.2. Aminokiseline i nukleotidi.....	16
4.1.3. Boje.....	16
4.1.4. Enzimi i proteini.....	16
4.1.5. Ostali materijali.....	17
4.1.6. Dimenzije korištenih elektroforetskih gelova.....	17
4.1.7. Komercijalni kompleti za pročišćavanje DNA.....	17
4.1.8. Hranjive podloge i mediji za uzgoj bakterije <i>E. coli</i>	17
4.1.9. Dizajnirani oligonukleotidi.....	17
4.1.10. Korišteni sojevi bakterije <i>E. coli</i>	18
4.1.11. Bakterijski plazmidni vektori.....	19
4.2. Metode.....	21
4.2.1. Metode rada s nukleinskim kiselinama.....	21
4.2.1.1. Izolacija plazmidne DNA.....	21
4.2.1.2. Agarozna gel-elektroforeza.....	21
4.2.1.3. Određivanje koncentracije nukleinskih kiselina.....	21
4.2.1.4. Priprema pUC18 vektora za ugradnju oligonukleotida koji nose gen za analoge tRNA.....	22

4.2.1.5. Priprema 5'- krajeva oligonukleotida za ugradnju u plazmidni vektor pUC18	22
4.2.1.6. Ligacija gena za analoge tRNA u plazmidni vektor pUC18	23
4.2.1.7. Transformacija bakterijskih stanica metodom elektroporacije.....	23
4.2.1.8. PCR na bakterijskim kolonijama (eng. colony PCR)	23
4.2.1.9. Provjera pravilne ugradnje oligonukleotida u plazmidni vektor restriksijskom analizom	25
4.2.1.10. Umnažanje i izolacija plazmidnih vektora koji sadrže gen za analog tRNA.....	25
4.2.1.11. Dobivanje DNA fragmenata koji kodiraju za željene analoge tRNA.....	25
4.2.1.12. Pročišćavanje nukleinskih kiselina ekstrakcijom fenol-kloroformom.....	26
4.2.1.13. Optimizacija uvjeta za reakciju <i>in vitro</i> transkripcije i preparativna <i>in vitro</i> transkripcija	27
4.2.1.14. Denaturirajuća poliakrilamidna gel-elektroforeza u prisustvu ureje	27
4.2.1.15. Elucija analoga tRNA ^{Leu} s poliakrilamidnog gela	29
4.2.1.16. Izmjena otapala tRNA dijalizom	29
4.2.1.17. Renaturacija tRNA	30
4.2.2. Metode rada s proteinima	31
4.2.2.1. Prekomjerna ekspresija proteina.....	31
4.2.2.2. Afinitetna kromatografija na Ni-NTA agarozu	32
4.2.2.3. Koncentriranje proteina ultrafiltracijom.....	34
4.2.2.4. Izmjena otapala proteina dijalizom.....	34
4.2.2.5. Određivanje koncentracije proteina pomoću spektrofotometra NanoDrop 1000	35
4.2.3. Ispitivanje aminoaciliranja analoga tRNA ^{Leu} leucil-tRNA-sintetazom	35
4.2.3.1. Reakcija aminoaciliranja	35
4.2.3.2. Elektroforeza na kiselim poliakrilamidnim gelovima	36
4.2.3.3. Bojanje RNA srebrom u poliakrilamidnim denaturirajućim gelovima	36
4.2.4.1. Gel-retardacijska elektroforeza kompleksa LeuRS i analoga tRNA	37
5. Rezultati	39
5.1. Dizajn analoga molekule tRNA ^{Leu}	39
5.2. Osmišljavanje početnica.....	40
5.3. Izolacija plazmidne DNA.....	42

5.4. Razgradnja plazmidne DNA, priprema ligacijske smjese i transformacija bakterijskih stanica metodom elektroporacije	43
5.5. PCR na bakterijskim kolonijama (<i>eng. colony PCR</i>)	43
5.6. Provjera pravilne ugradnje oligonukleotida u plazmidni vektor restrikcijskom analizom	46
5.7. Preparativna izolacija plazmida QIAfilter Plasmid Maxi Kit (<i>Qiagen</i>) kompletom	48
5.8. Dobivanje lineariziranih DNA kalupa za željene analoge tRNA	48
5.9. Optimizacija uvjeta za reakciju <i>in vitro</i> transkripcije i preparativna <i>in vitro</i> transkripcija	48
5.10. Proizvodnja i pročišćavanje proteina Wt LeuRS	56
5.11. Gel-retardacijska elektroforeza kompleksa LeuRS i analoga tRNA ^{Leu}	57
5.12. Praćenje reakcije aminoaciliranja na kiselim gelovima	59
6. Rasprava	62
7. Zaključak	66
8. Zahvale	67
9. Popis literature	68
10. Sažetak	71
11. Summary	72

1. Uvod

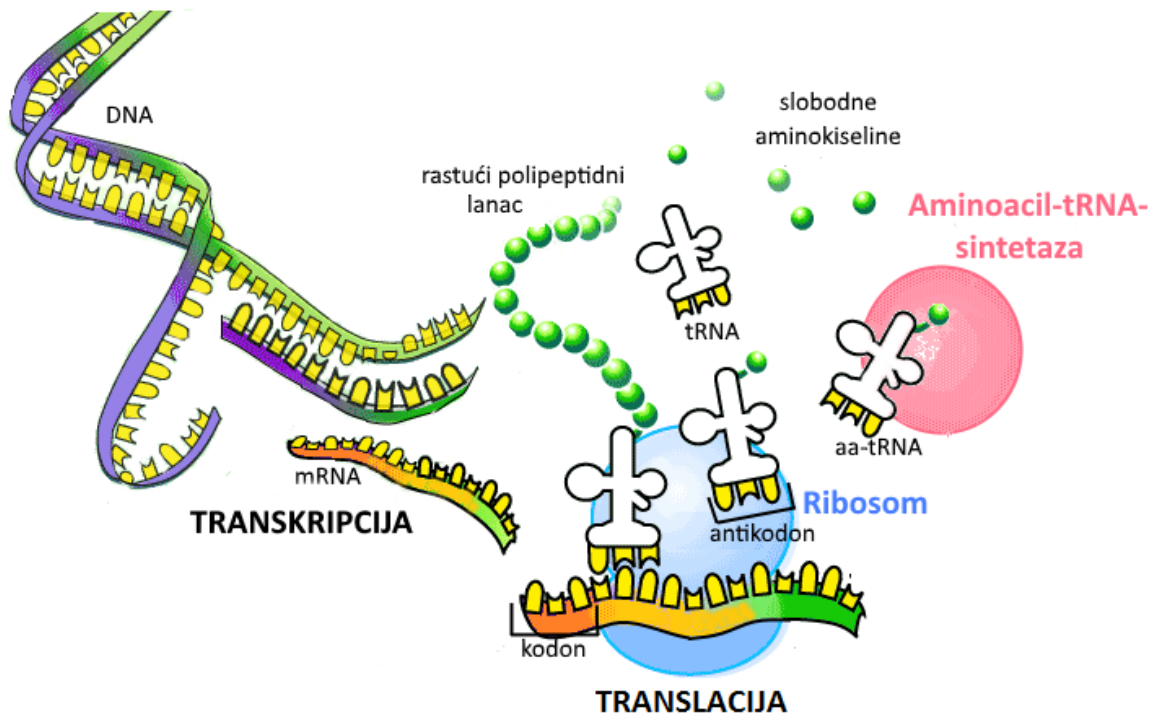
Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) su enzimi koji osiguravaju vjeran prijenos genetičke informacije kovalentnim sparivanjem aminokiselina s njihovim pripadnim molekulama tRNA. Aminoacil-tRNA-sintetaze su podijeljene u dva strukturno različita razreda: razred I koji sadrži 11 članova i razred II s 10 članova. Sve aaRS posjeduju katalitičku domenu koja veže ATP, aminokiselinu i 3' -OH kraj molekule tRNA, te kataliziraju karakterističnu kemijsku reakciju aminoaciliranja u dva koraka. U prvom koraku aminokiselina se aktivira uz pomoć energije pohranjene u ATP-u pri čemu nastaje aminoacil-adenilatni intermedijer (aa-AMP) i oslobođeni pirofosfat, dok se u drugom koraku katalizira prijenos aminokiseline na 3' -OH kraj molekule tRNA (Cusack, 1997). Nastala aminoacilirana molekula tRNA zatim sudjeluje u procesu sinteze proteina koja se odvija na ribosomima. Svaka aaRS je specifična za jednu aminokiselinu i jednu ili više tRNA koje vežu isti tip aminokiseline. Visoka razina točnosti sparivanja odgovarajuće aminokiseline s odgovarajućom molekulom tRNA osigurava ugradnju ispravne aminokiseline u rastući polipeptidni lanac, budući da se identitet aminokiseline više ne provjerava jednom kad aminoacilirana molekula tRNA dođe na ribosom (revijalno prikazano u Perona i Gruić-Sovulj, 2013). Povezivanje ispravne aminokiseline s tRNA osigurava se uz pomoć dva mehanizma. Prvi mehanizam temelji se na raspoznavanju pripadne od nepripadne aminokiseline i tRNA prilikom vezanja na enzim, dok drugi mehanizam obuhvaća različite načine popravka pogreške koji omogućuju hidrolizu pogrešno aktivirane aminokiseline ili pogrešno prenesene aminokiseline na tRNA (Slika 3) (Yadavalli i sur, 2012). Kako bi se omogućila reakcija aminoaciliranja prvo mora nastati produktivan kompleks tRNA:aaRS u kojem je 3' -OH skupina pripadne tRNA ispravno pozicionirana u aktivnom mjestu enzima. Prepoznavanje pripadne tRNA i njezino pravilno vezanje omogućuju nekovalentne interakcije određenih nukleotida tRNA i aminokiselina aaRS (Giege i sur, 1993). Naime, unutar sekvence svake molekule tRNA nalaze se elementi prepoznavanja s kojima aaRS direktno ili indirektno ulazi u interakciju. U elemente prepoznavanja ubrajamo nukleotide koje nedvosmisleno prepoznaju samo pripadne aaRS (identitetni elementi), i nukleotide koji ne ulaze u specifičnu interakciju s aaRS, ali imaju indirektan efekt, pozicionirajući identitetne elemente u pravilnu orijentaciju u kojoj mogu ostvariti specifičnu interakciju s enzimom (Normanly i sur, 1992).

Leucil-tRNA-sintetaza (LeuRS) *E. coli* katalizira reakciju kovalentnog povezivanja molekule tRNA^{Leu} s aminokiselinom leucinom. LeuRS aminoacilira pet izoakceptorskih molekula tRNA^{Leu} koje se razlikuju po antikodonskim nukleotidnim slijedovima koji dekodiraju kodone za aminokiselinu leucin na molekuli mRNA (Lincecum i Martinis, 2002). LeuRS može aktivirati nekoliko nepripadnih aminokiselina: izoleucin, valin, metionin i norvalin, zbog čega se evolucijski razvila dodatna deacilacijska domena u kojoj se odvija popravak pogreške nakon prijenosa nepripadne aminokiseline na tRNA^{Leu} (Boniecki i sur, 2008). U ovom radu napravljena su tri analoga molekule tRNA^{Leu} kojima

nedostaju pojedine domene u svrhu (1) pronalaska minimalne RNA molekule koju LeuRS može efikasno aminoacilirati i deacilirati te (2) za određivanje interakcijskog doprinosa vezane aminokiseline prilikom vezanja aminoacilirane tRNA u deacilacijsku domenu LeuRS. Analizi molekule tRNA^{Leu} su osmišljeni prema određenoj kristalnoj strukturi produktivnog aminoacilacijskog i deacilacijskog kompleksa LeuRS:tRNA^{Leu} s leucil-adenilatnim analogom u aktivnom mjestu (Palencia i sur, 2012), te kinetičkih podataka dobivenih praćenjem reakcije aminoacilacije i deacilacije serije analoga molekule tRNA^{Leu} prikazanih u radu Larkina i suradnika (2002).

2. Literaturni pregled

Za život svakog organizma iznimno je važna brza i regulirana biosinteza proteina kao jednih od osnovnih staničnih gradbenih jedinica. Biosinteza proteina je očuvani stanični proces kojeg sačinjava nekoliko koraka koji su zajednički svim živim organizmima, od bakterija do viših eukariota. Prvi korak u sintezi proteina je transkripcija gena s molekule DNA koji kodira za određeni protein u molekulu mRNA (eng. *messenger RNA*). Molekule mRNA su zapravo serija konsektivnih trinukleotidnih segmenata – kodona, pri čemu svaki kodon predstavlja jednu aminokiselinu.



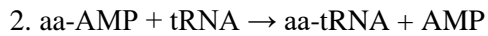
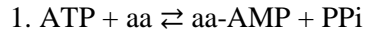
Slika 1. Shematski prikaz koraka u sintezi proteina. Prvo dolazi do prepisivanja gena za protein s DNA na mRNA molekulu u procesu transkripcije uz pomoć enzima RNA-polimeraze. U procesu translacije mRNA se na ribosomu prevodi u polipeptidni slijed uz pomoć molekula tRNA koje nose aminokiseline koje odgovaraju kodonima na molekuli mRNA. Aminoacil-tRNA-sintetaze omogućuju sparivanje tRNA koja nosi antikodon za određenu aminokiselinu s odgovarajućom aminokiselinom. Preuzeto i prilagođeno s <https://www.slideshare.net/doloresgowland/protein-synthesis>.

Tijekom druge faze sinteze proteina (translacije) kodoni se na ribosomima, na temelju mRNA, prevode u aminokiselinski slijed uz pomoć molekula tRNA (eng. *transfer RNA*) koje nose kovalentno vezane odgovarajuće aminokiseline (Slika 1). Povezivanje aminokiselina s odgovarajućim tRNA molekulama kataliziraju enzimi aminoacil-tRNA-sintetaze. Svaka aminoacil-tRNA-sintetaza je specifična za jednu aminokiselinu i jednu ili više odgovarajućih tRNA koje dekodiraju kodone za tu istu aminokiselinu (izoakceptorske tRNA) (Nelson i Cox, 2013).

2.1. Aminoacil-tRNA-sintetaze

Aminoacil-tRNA-sintetaze su enzimi koji osiguravaju vjeran prijenos genetičke informacije sparivanjem odgovarajuće aminokiseline s njoj pripadnom molekulom tRNA. Prema osnovnim razlikama u primarnoj i terciarnoj strukturi te prema razlikama u reakcijskom mehanizmu aaRS su podijeljene u dva razreda i nekoliko podrazreda (Tablica 1) (Cusack, 1997). aaRS razreda I su uglavnom monomerni enzimi koji s velikom površinom ulaze u interakciju s molekulom tRNA. Njihovo aktivno mjesto sastavljeno je od dva slična uzastopna β - α - β motiva koji čine šesterolančanu paralelnu β strukturu poznatu kao Rossmannova struktura. Rossmannova struktura karakteristična je za sve proteine koji vežu ATP ili NAD^+ i direktno sudjeluje u vezanju nukleotida. Za aaRS razreda IA karakteristična je CPI domena umetnuta u Rossmannovu strukturu. Unutar CPI domene nalazi se zasebno aktivno mjesto za popravak pogreške nakon prijenosa. Katalitička domena razreda II organizirana je kao sedmerostruka β -ploča premošćena α -uzvojnicom. Većina aaRS razreda II su homodimerni enzimi, no poznati su slučajevi monomerne i tetramerne kvaterne strukture (revijalno prikazano u Perona i Gruić-Sovulj, 2013).

Aminoacil-tRNA-sintetaze kataliziraju reakciju kovalentnog povezivanja 3' -OH kraja tRNA i odgovarajuće aminokiseline. Reakcija aminoaciliranja odvija se u 2 koraka: u 1. koraku aktivacije, aaRS koriste energiju pohranjenu u ATP-u kako bi sintetizirale aminoacil-adenilatni intermedijer, a u 2. koraku događa se prijenos aktivirane aminokiseline na odgovarajuću tRNA. Tijekom prvog koraka kisik karboksilne skupine aminokiseline nukleofilno napada fosfor α -fosfatne skupine ATP-a pri čemu nastaje anhidridna veza tj. miješani anhidrid aminoacil-adenilat (aa-AMP) uz oslobađanje pirofosfata. Nakon toga slijedi prijenos aktivirane aminokiseline na 2' -OH ili 3' -OH skupinu riboze terminalnog adenzina molekule tRNA, pri čemu nastaje esterska veza i konačni produkt aa-tRNA. Reakcijski mehanizam pretpostavlja nukleofilni napad kisika iz 2' -OH ili 3' -OH skupine riboze na α -karbonilni ugljikov atom aminoacil-adenilata. Oba koraka aminoaciliranja tRNA događaju se u sintetskom aktivnom mjestu aminoacil-tRNA-sintetaze (Cusack, 1997).



Tablica 1. Klasifikacija aminoacil-tRNA-sintetaza^a. Preuzeto iz revijalnog rada Perona i Gruić-Sovulj, 2013.

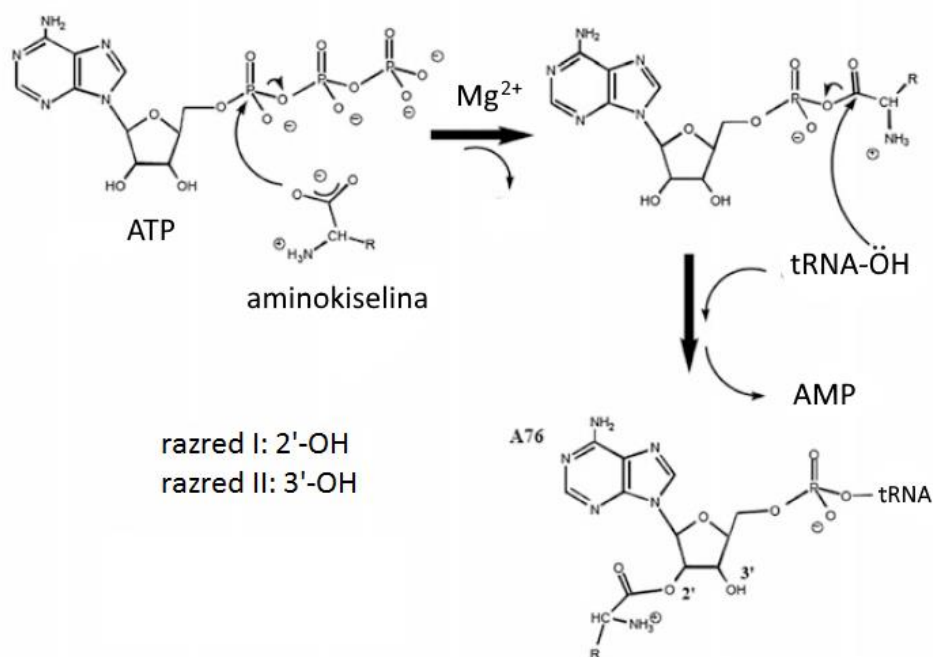
Razred I aaRS	Razred II aaRS
podrazred IA	podrazred IIA
MetRS	SerRS
LeuRS	ProRS
IleRS	ThrRS
ValRS	GlyRS
podrazred IB	HisRS
GlnRS	podrazred IIB
CysRS	AspRS
GluRS	AsnRS
podrazred IC	LysRS ^b
TyrRS	podrazred IIC
TrpRS	PheRS
podrazred ID	AlaRS
ArgRS	
podrazred IE	
LysRS ^b	

^a Svrstavanje u podrazrede je utemeljeno na filogeniji konstruiranoj prema strukturnom sravnivanju sekvenci (O'Donoghue i sur, 2003).

^b LysRS je jedina aaRS koja krši pravila razreda te ju možemo svrstati u razred I ili II, ovisno o tome iz kojeg je organizma.

Uz mnoge strukturne razlike, između aaRS razreda I i II, primijećene su i razlike u mehanizmu enzimske reakcije. Sve aaRS razreda I kataliziraju aminoacilaciju 2' -OH skupine A76 molekule tRNA, dok aaRS razreda II kataliziraju direktnu aminoacilaciju 3' -OH kraja. Za aaRS razreda I korak koji određuje brzinu enzimske reakcije je otpuštanje aminoacilirane tRNA, dok je kod aaRS razreda II

najsporiji korak nastajanje aminoacil-adenilatnog intermedijera (revijalno prikazano u Perona i Gruić-Sovulj, 2013).



Slika 2. Prikaz stereokemijskog mehanizma nastajanja aminoacil-adenilatnog intermedijera (gore desno) i aminoacilirane molekule tRNA (dolje desno). Nukleofil u drugom koraku enzimske katalizirane reakcije je kisik iz 2' - ili 3' -OH skupine ovisno o razredu aaRS. aaRS I kataliziraju nukleofilni napad kisika iz 2' -OH skupine A76 molekule tRNA, dok aaRS razreda II kataliziraju direktnu aminoacilaciju 3' -OH kraja. Preuzeto i prilagođeno iz Perona i Gruić-Sovulj, 2013.

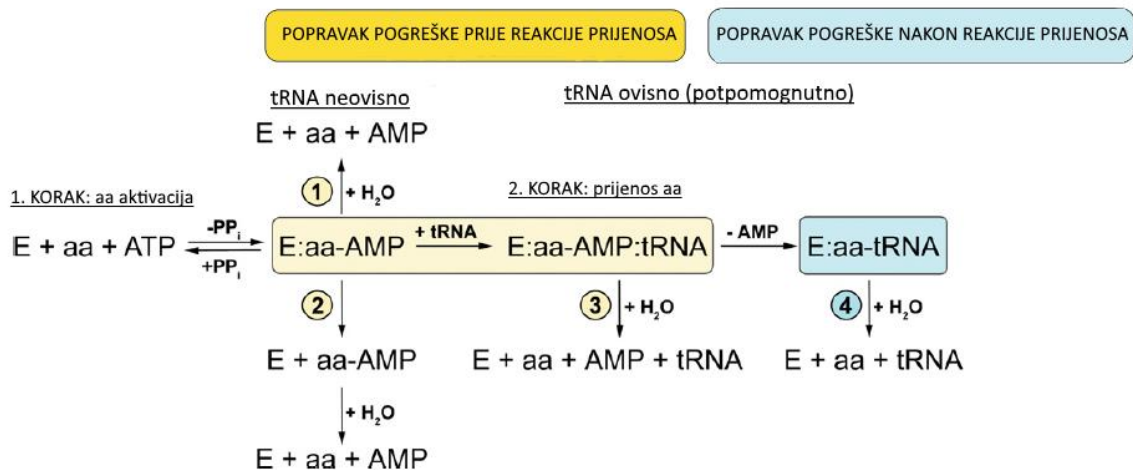
Povezivanje odgovarajuće aminokiseline s njenom pripadnom tRNA važan je mehanizam osiguravanja točnosti prevođenja slijeda nukleotida u slijed aminokiselina koje izgrađuju polipeptidne lance, stoga, aminoacil-tRNA-sintetaze ovu reakciju provode s velikom točnošću te je eksperimentalno pokazano da se pogreška događa jednom na 1000 - 10000 aminokiselina. Takva minimalna pogreška ne predstavlja problem biološkim sustavima i nije prijetnja funkcioniranju i životu stanice (Nelson i Cox, 2013). Problem prilikom prepoznavanja odgovarajuće tRNA od strane enzima nije toliko izražen budući da je tRNA veliki supstrat i posjeduje veliku dodirnu površinu s enzimom. U strukturi tRNA postoje pozitivni i negativni elementi identiteta kao odrednice koje pospješuju (pozitivni elementi) odnosno onemogućuju (negativni elementi) interakciju između tRNA i pripadne odnosno nepripadne aminoacil-tRNA-sintetaze. Upravo na temelju interakcije između identitetnih elemenata tRNA i enzima odabire se odgovarajuća tRNA molekula (Normanly i sur, 1992). Za razliku od tRNA, aminokiseline su manji supstrati koji se međusobno razlikuju samo prema građi bočnog ogranka. Upravo je iz tog razloga odabir odgovarajuće aminokiseline zahtjevniji te neke

aminoacil-tRNA-sintetaze griješe pri izboru pa aktiviraju i prenose nepripadne aminokiseline (Nelson i Cox, 2013). Kako bi se osigurala veća točnost povezivanja aminokiseline s pripadnom tRNA neke aaRS su evolucijski poboljšale mehanizam popravka vlastitih pogrešaka razvojem dodatnog aktivnog mjesta u kojem je moguć popravak pogreške nakon prijenosa krive aminokiseline na tRNA (aktivno mjesto popravka pogreške nakon prijenosa) (revijalno prikazano u Perona i Gruić-Sovulj, 2013).

Generalno, postoji nekoliko mehanizama kojim aaRS mogu popraviti svoju pogrešku: popravak pogreške prije reakcije prijenosa koji može biti tRNA-neovisan ili tRNA-ovisan te popravak pogreške nakon prijenosa nepripadne aminokiseline na tRNA (Slika 3).

Popravak pogreške prije reakcije prijenosa odvija se u sintetskom aktivnom mjestu katalitičke domene u kojem se događa i aktivacija aminokiseline. Ukoliko je brzina prijenosa aminokiseline na molekulu tRNA veća od brzine hidrolize nepripadnog intermedijera aa-AMP, krivo aktivirana aminokiselina može izbjeći popravak pogreške prije prijenosa i prenijeti se na molekulu tRNA. Misacilirana tRNA tada se deacilira u aktivnom mjestu za popravak pogreške nakon prijenosa koje se nalazi u istoimenoj specijaliziranoj domeni (Minajigi i sur, 2010, Splan i sur, 2008).

Također, poznat je još jedan mehanizam popravka pogreške prije prijenosa koji pretpostavlja selektivno otpuštanje aminoacil-adenilata u otopinu gdje se lako može dogoditi hidroliza aminoacilne veze neenzimskim putem (revijalno prikazano u Perona i Gruić-Sovulj, 2013).

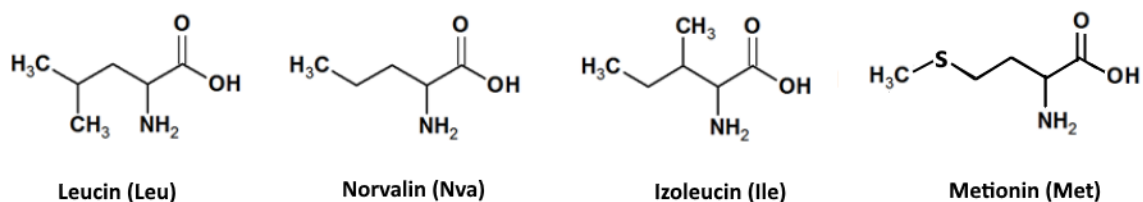


Slika 3. Shematski prikaz reakcije aminoaciliranja i tipova mehanizma popravka pogreške aminoacil-tRNA-sintetaza. Preuzeto i prilagođeno iz Cvetešić i sur, 2012.

2.2. Leucil-tRNA-sintetaza (LeuRS) *E. coli*

Leucil-tRNA-sintetaza *E. coli* je monomerni enzim koji se sastoji od više domena i provodi reakciju esterifikacije pripadnog leucina na izoakceptore tRNA^{Leu}. Sintetsko aktivno mjesto enzima smješteno je u središte molekule, a građeno je kao Rossmannova struktura. Okosnicu enzima čine aktivno mjesto i antikodon-vezujuća domena karakteristična za sintetaze razreda IA. Sintetsko aktivno mjesto LeuRS poprima dvije osnovne konformacije - u prisutnosti intermedijera (leucil-adenilata) poprima zatvorenu konformaciju, a u odsutnosti intermedijera ili supstrata otvorenu konformaciju. Zatvaranje aktivnog mjesta prilikom stvaranja intermedijera ima ulogu zaštite Leu-AMP od disocijacije u otopinu. Dodatne fleksibilne domene su: cink-vezujuća domena (ZN1), domena CP1, domena specifična za leucin (engl. *leucine specific domain*, LSD) i C-terminalna domena (Slika 5). Funkcija domene LSD nije još uvijek posve razjašnjena, no pokazano je da ima važnu ulogu u reakciji aminoaciliranja (Palencia i sur, 2012). C-terminalna domena također ima ulogu u aminoaciliranju, vjerojatno putem pozicioniranja tRNA, budući da njeno uklanjanje narušava aminoacilacijsku aktivnost enzima. Putem antikodon-vezujuće domene enzim ostvaruje interakcije s antikodonskom rukom tRNA^{Leu}. U slučaju LeuRS *E. Coli* antikodonska domena ne prepoznaje baze antikodonskog slijeda (Tukalo i sur, 2005), što nije neobično, budući da LeuRS *E. Coli* prepoznaje i aktivira pet izoakceptorskih molekula tRNA^{Leu} koje se razlikuju po antikodonskom nukleotidnom slijedu (Lincecum i Martinis, 2002).

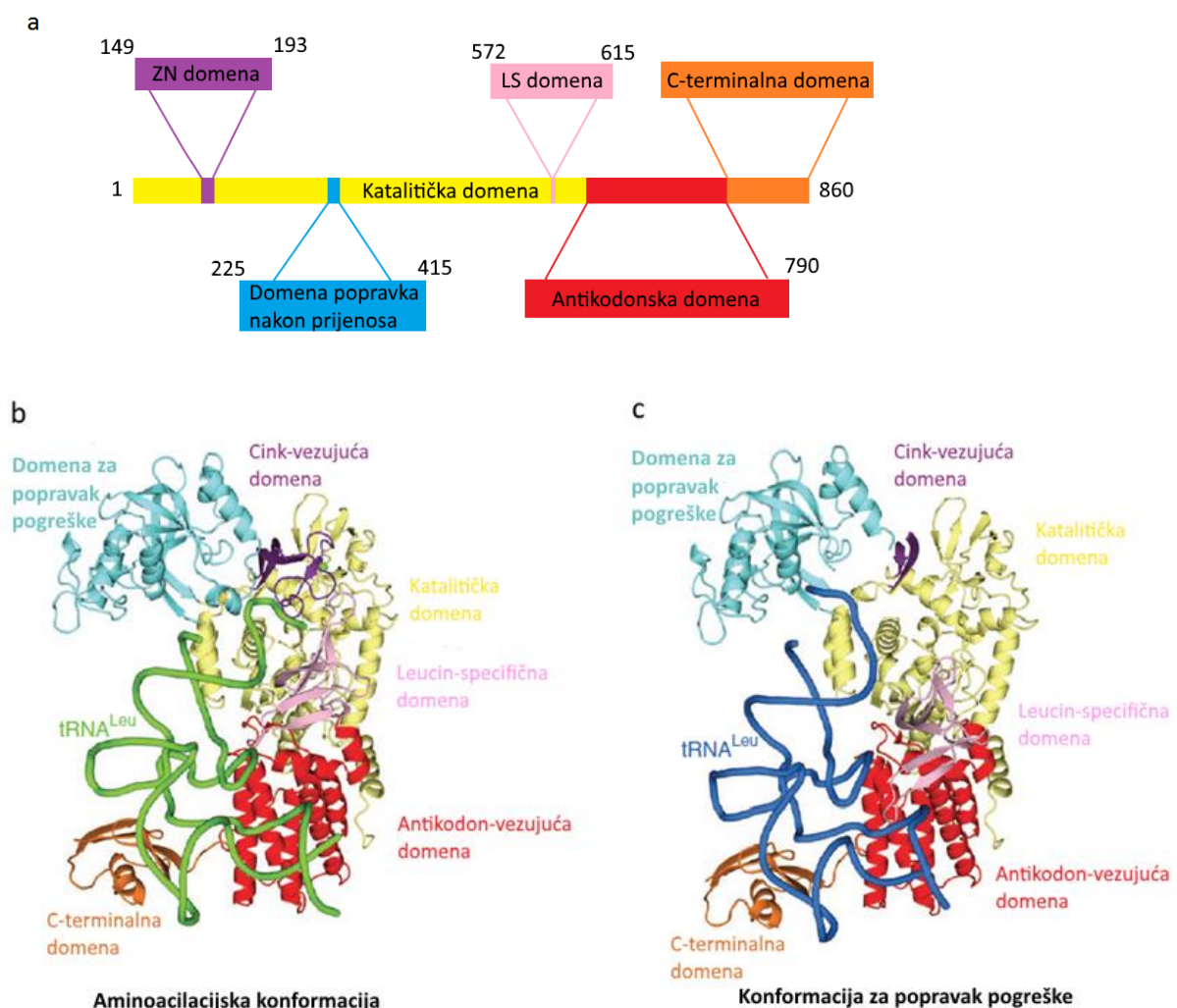
Kao i nekoliko drugih aminoacil-tRNA-sintetaza razreda IA (prvenstveno ValRS i IleRS) i LeuRS posjeduje aktivno mjesto za popravak pogreške nakon prijenosa čime se povećava specifičnost aminoacilacije, kao i točnost sinteze proteina. U aktivnom mjestu za popravak pogreške nakon prijenosa odvija se deacilacija tRNA^{Leu} na koju je prenesena nepripadna aminokiselina strukturno slična leucinu poput: izoleucina, metionina ili nekanonske aminokiseline norvalina (Slika 4) (Boniecki i sur, 2008).



Slika 4. Leucin i njemu strukturno slične aminokiseline – izoleucin, metionin i neproteinogena aminokiselina norvalin.

Nedavna istraživanja pokazala su da LeuRS iznimno dobro razlikuje leucin od strukturno sličnog izoleucina već prilikom vezanja u aktivno mjesto, a da najveću prijetnju u misacilaciji zapravo

predstavlja neproteinogena aminokiselina norvalin (Cvetešić i sur, 2014) koja nastaje kao jedan od nusprodukata u biosintetskom putu razgranatih aminokiselina (Umberger, 1997). Nakon prijenosa aminokiseline na tRNA u aktivnom sintetskom mjestu, 3' -kraj s kovalentno vezanom aminokiselinom se translocira u aktivno mjesto za popravak pogreške nakon prijenosa koje je udaljeno ~35 Å od sintetskog aktivnog mjesta i nalazi se u zasebno strukturiranoj CP1 fleksibilnoj domeni (Cusack i sur, 2000). U aktivnom mjestu za popravak pogreške nakon prijenosa prvo se vrši provjera produkta, ukoliko je na 3' -kraju vezana neprikladna aminokiselina dolazi do hidrolitičke deacilacije tRNA^{Leu}, nakon čega neaminoacilirana tRNA i neprikladna aminokiselina disociraju s enzima. Ukoliko je na 3' -kraju vezan leucin, aminoacilirana tRNA se otpušta s enzima, budući da Leu-tRNA^{Leu} nije dobar supstrat za reakciju popravka pogreške nakon prijenosa (Cvetešić i sur, 2014).



Slika 5. Struktura *E. coli* Wt LeuRS u aminoacilacijskoj konformaciji (b) i u konformaciji za popravak pogreške nakon prijenosa (c). (a) shema poretka i odnosa veličina domena enzima LeuRS. Brojevi označavaju redne brojeve aminokiselina na čijim pozicijama domene završavaju ili počinju. Žutom bojom označena je katalitička domena, ljubičastom cink-vezujuća domena, plavom domena popravka

pogreške nakon prijenosa, crvenom antikodon specifična domena, ružičastom leucin specifična domena, a narančastom C-terminalna domena. (b) kompleks LeuRS:tRNA^{Leu} u aminoacilacijskoj konformaciji (tRNA^{Leu} je prikazana zelenom bojom). (c) kompleks LeuRS:tRNA^{Leu} u konformaciji popravka pogreške nakon prijenosa (tRNA^{Leu} je prikazana plavom bojom). Preuzeto i prilagođeno iz Palencia i sur 2012.

2.3. Molekule tRNA

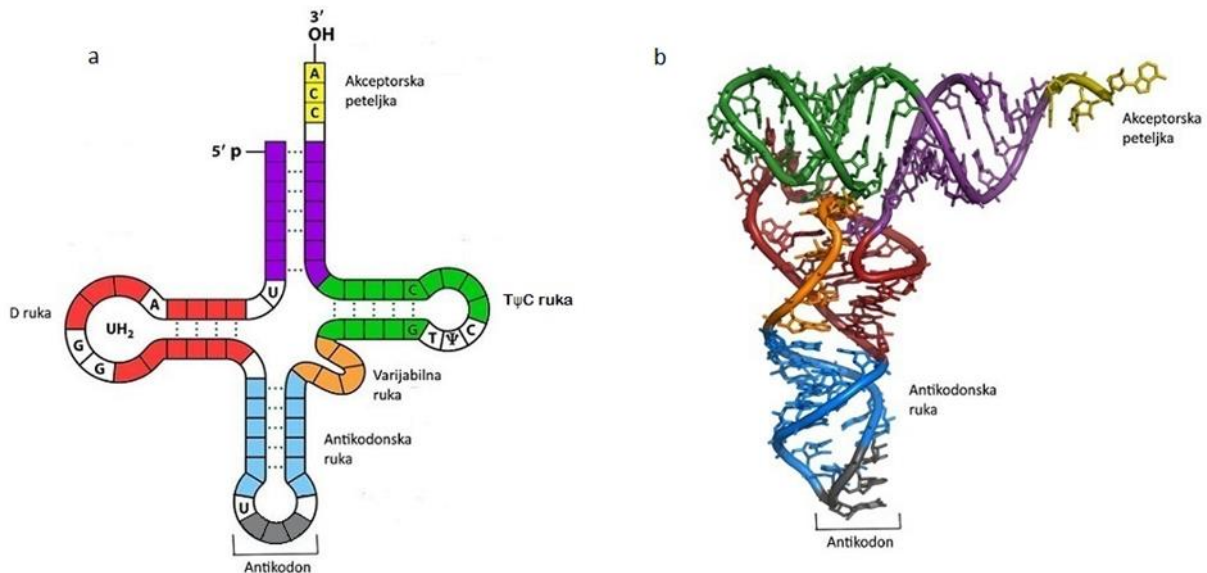
Svaka molekula tRNA je jednolančana RNA koja se sastoji od 50 do 100 nukleotida.

Komplementarnim sparivanjem nukleotida vodikovim vezama nastaju karakteristične sekundarne strukture: akceptorska peteljka, D-ruka, T Ψ C-ruka, antikodonska ruka koja sadrži antikodonski slijed i varijabilna ruka (Slika 6). Akceptorska peteljka je mjesto gdje se komplementarnim sparivanjem približavaju 5' - kraj i 3' - kraj molekule tRNA. Sve tRNA na svom 3' - kraju imaju triplet nukleotida slijeda CCA, a na terminalni adenzin, u reakciji esterifikacije kataliziranoj aaRS, veže se odgovarajuća aminokiselina (Nelson i Cox, 2013). D-ruka je dobila ime prema modificiranoj bazi dihidrouridinu koju sadrži. Obično se sastoji od 3 - 4 parova baza, a završava omčom duljine 5 do 7 nukleotida. Modificirani nukleotidi nalaze se i u T Ψ C-ruci - između nukleotida ribotimidina i ribocitidina nalazi se nukleotid pseudouridin. T Ψ C-ruka se najčešće sastoji od pet parova baza na koje se nastavlja omča. Do danas je poznato preko 90 različitih posttranskripcijskih modifikacija molekula tRNA. Još uvijek nije razjašnjena uloga svake pojedine modifikacije, ali je poznato da modifikacije često pogoduju kompaktnosti i stabilnosti nativne trodimenzionalne strukture tRNA, te da mogu imati ulogu u ostvarivanju specifičnih interakcija tRNA i pripadne aminoacil-tRNA-sintetaze (Agris, 2008). Varijabilna ruka je mjesto najveće raznolikosti među poznatim tRNA, a može sadržavati od 3 do 21 nukleotida. Prema duljini varijabilne ruke molekule tRNA se svrstavaju u dvije skupine: tip 1 i tip 2. Tip 1 čine molekule tRNA čija je varijabilna ruka duljine 3 - 5 nukleotida, dok se u drugu skupinu (tip 2) svrstavaju molekule tRNA s dugom varijabilnom rukom (Voet, 2011). Tipični predstavnici tRNA tipa 2 su tRNA^{Ser} i tRNA^{Leu}, dok kod nekih tRNA pripadnost pojedinom razredu ovisi o ishodišnom organizmu. Primjerice, tRNA^{Tyr} iz *E. coli* pripada tipu 2, dok se kvaščeve tRNA^{Tyr} svrstava u tip 1 (Cavarelli i Moras, 1993).

Uz sekundarnu strukturu, za sve molekule tRNA karakteristična je i očuvana tercijarna struktura u obliku slova „L“ što je pokazano usporedbom nekoliko dobivenih kristalnih struktura molekula tRNA (Slika 6) (Nelson i Cox, 2013).

Zbog degeneriranosti genetičkog koda za svaku aminokiselinu postoji skupina izoakceptorskih tRNA. Molekule tRNA koje pripadaju određenoj skupini izoakceptorskih tRNA, specifične su za istu

aminokiselinu, ali se razlikuju po antikodonskom slijedu kojim prepoznaju različite kodone na molekuli mRNA koji kodiraju za istu aminokiselinu. U *E. coli* šest kodona za leucin dekodira 5 izoakceptorskih molekula tRNA^{Leu}: tRNA^{Leu}CAG, tRNA^{Leu}UAA, tRNA^{Leu}CAA, tRNA^{Leu}GAG i tRNA^{Leu}UAG (Lincecum i Martinis, 2002).



Slika 6. Shema sekundarne i tercijarne strukture molekule tRNA. (a) prikaz sekundarne strukture tRNA. Vodikove veze koje se ostvaruju između nukleotida prikazane su s 3 točkice. Uspostavom vodikovih veza nastaju sekundarne strukture - četiri ruke i akceptorska peteljka (sekundarne strukture prikazane su različitim bojama: akceptorska peteljka prikazana je ljubičasto, D-ruka crveno, TψC-ruka zeleno, varijabilna ruka narančasto, antikodonska ruka plavo, antikodonska sekvenca sivo te očuvan motiv CCA na 3' -OH kraju žutom bojom). (b) trodimenzionalni prikaz tRNA. Odgovarajuće sekundarne strukture obojane su istom bojom kao na slici (a). Preuzeto i prilagođeno s

https://en.wikipedia.org/wiki/Transfer_RNA i

<http://oregonstate.edu/instruct/bb451/451material/lectures/translationoutline.html>.

2.4. Elementi identiteta

Za točnost sinteze proteina iznimno je važno da aaRS s velikom točnošću vežu pripadne tRNA i na njih vežu njima pripadne aminokiseline. Kako bi došlo do same reakcije aminoaciliranja mora nastati produktivni kompleks tRNA: aaRS u kojem je 3' -OH skupina tRNA pravilno pozicionirana u sintetskom aktivnom mjestu i spremna za katalitičku reakciju. Prepoznavanje i pravilno pozicioniranje

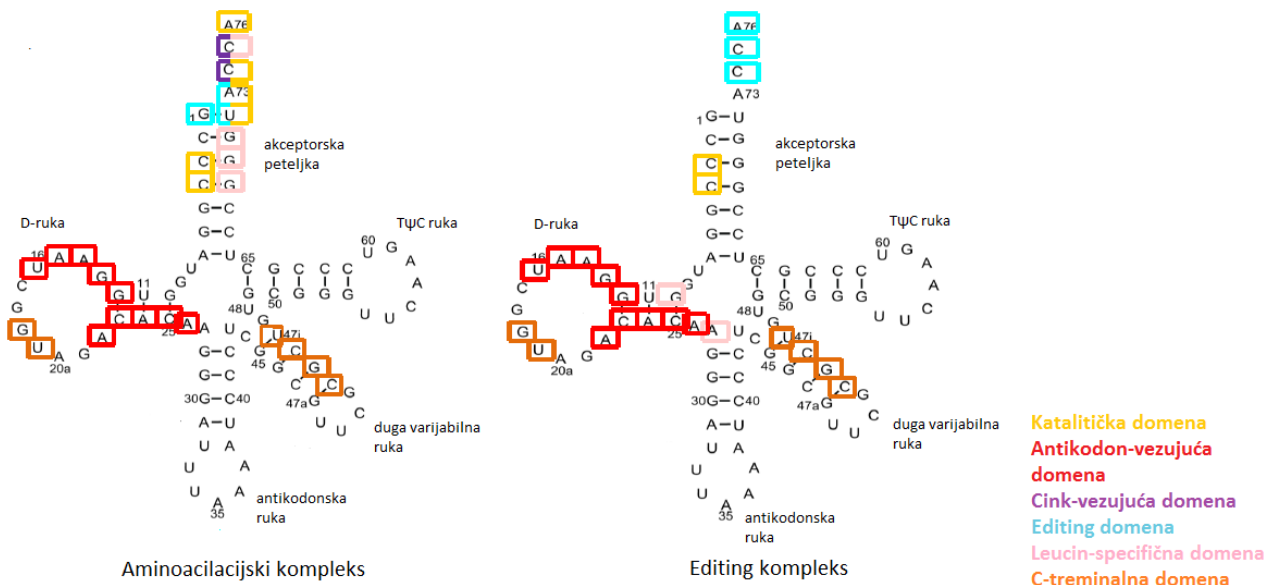
tRNA omogućuje interakcija pojedinih nukleotida tRNA i aaRS koja u konačnici omogućuje stvaranje produktivnog kompleksa i samo smještanje 3' -OH kraja u aktivno mjesto (revijalno prikazano u Perona i Gruić-Sovulj, 2013).

Prepoznavanje i pravilno vezanje tRNA omogućuju nekovalentne interakcije određenih nukleotida tRNA i aminokiselina aaRS (Giege i sur, 1993). Naime, kako ne bi došlo do pogrešne aminoacilacije unutar svake tRNA sekvence se nalaze elementi prepoznavanja u koje se ubrajaju nukleotidi koji se nedvosmisleno prepoznaju samo od strane pripadne aaRS (elementi identiteta) i nukleotidi koji se ne nalaze u specifičnoj interakciji s aaRS, ali imaju indirektan efekt pozicionirajući identitentne elemente u pravilnu orijentaciju koja omogućuje njihovu interakciju s enzimom (Normanly i sur, 1992).

Pozitivni elementi identiteta mogu se nalaziti bilo gdje u strukturi tRNA, a najčešće se nalaze u antikodonu. No, kod aminokiselina koje su kodirane s više kodona, primjerice leucin ili serin, gdje je raznolikost antikodona unutar izoakceptorske skupine tRNA jako velika, identitetni elementi se ne mogu nalaziti unutar antikodonskog slijeda. Ponekad i posttranskripcijske modifikacije mogu služiti kao pozitivni elementi identiteta. Uz pozitivne elemente identiteta postoje i negativni elementi identiteta koji osiguravaju da aaRS ne veže nepripadnu tRNA u produktivan kompleks (Cavarelli i Moras, 1993).

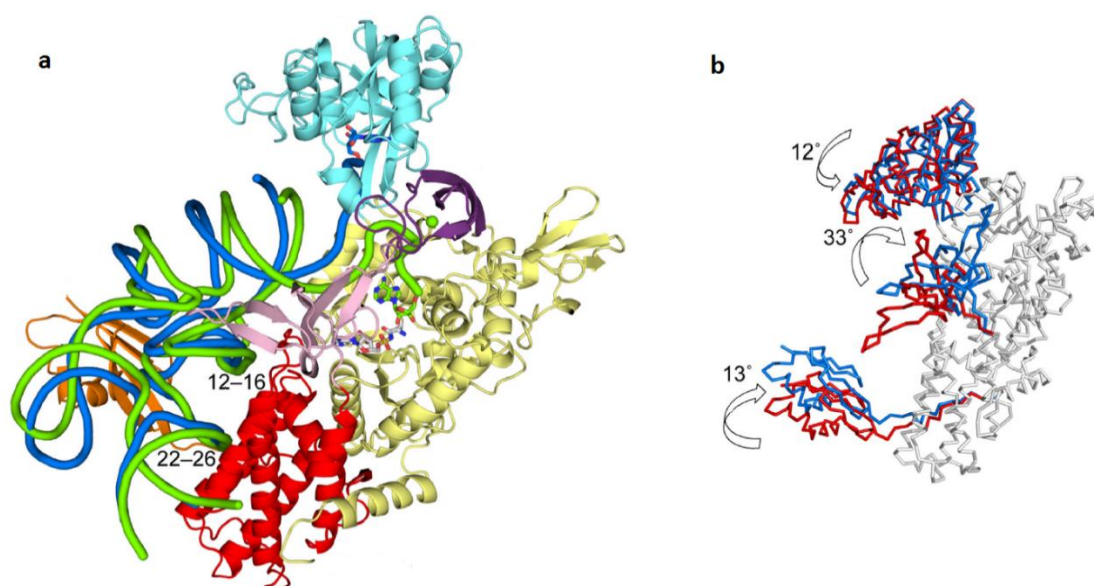
2.5. Produktivan LeuRS: tRNA^{Leu} aminoacilacijski kompleks

Dobivena je kristalna struktura funkcionalnog aminoacilacijskog kompleksa *E. coli* LeuRS u kojem je 3' -kraj tRNA^{Leu}UAA u sintetskom aktivnom mjestu pozicioniran za interakciju s nehidrolizabilnim analogom leucil-adenilata (Palencia i sur, 2012). Visoka difrakcijska rezolucija (2 Å) kristalne strukture daje nam uvid u nukleotide koji ostvaruju vodikove veze s proteinom i omogućuju nastajanje produktivnog aminoacilacijskog kompleksa. Otprije je poznato iz primarne i sekundarne strukture, a kasnije dokazano i dobivenom kristalnom strukturom, da su glavni elementi prepoznavanja: diskriminatorna baza A73, nukleotidi u regiji 69 - 76 (akceptorska peteljka) te nukleotidi C3, C4 i U16 (Slika 7).



Slika 7. Baze tRNA^{Leu} koje intragiraju s pojedinim domenama LeuRS u produktivnom aminoacilijском kompleksu i u kompleksu za popravak pogreške nakon prijenosa (deacilijском kompleksu). Baze koje interagiraju s katalitičkom domenom označene su žutom, s antikodon-vezujućom crvenom, s domenom za popravak pogreške nakon prijenosa plavom, s cink-vezujućom domenom ljubičastom, s C-terminalnom domenom narančastom, a baze koje interagiraju s leucin-specifičnom domenom ružičastom bojom. Preuzeto i prilagođeno iz rada Palencia i sur, 2012.

Uz kristalnu strukturu aminoacilijского kompleksa određena je i kristalna struktura kompleksa za popravak pogreške nakon prijenosa odnosno deacilijского kompleksa (Palencia i sur, 2012). Kristalne strukture su pokazale da je maksimalno uređenje proteinskih domena i maksimalna interakcija tRNA^{Leu} s enzimom ostvarena u aminoacilijской konformaciji upravo zbog interakcije između nukleotida u regiji 69 - 76 3' -kraja molekule tRNA^{Leu} s više domena LeuRS (Slika 7). Ti dodatni kontakti omogućuju odabir odgovarajuće tRNA, ali i odgovarajući rearanžman domena koji dovodi do katalitički aktivnog aminoacilijского stanja. Diskriminacija tRNA više nije nužna u deacilijской konformaciji stoga se gubi interakcija između diskriminatorne baze A73 i LeuRS (Slika 7). Prilikom prelaska iz aminoacilijской konformacije u deacilijскую dolazi do značajne promjene u orijentaciji molekule tRNA i fleksibilnih domena tRNA^{Leu} (Slika 8). Glavna promjena zahvaća leucin-specifičnu domenu koja se rotira za 33° prema sintetskom aktivnom mjestu. Također, uočeno je da se cijela tRNA rotira za 15° oko konzerviranih kontakata s antikodon vezujućom domenom, čime se 3' -kraj usmjerava prema aktivnom mjestu za popravak pogreške nakon prijenosa (Palencia i sur, 2012).



Slika 8. Usporedba aminoacilacijske konformacije i konformacije za popravak pogreške nakon prijenosa. (a) globalna usporedba dviju konformacija nakon superpozicije katalitičke i antikodon vezujuće domene dvaju kompleksa. tRNA^{Leu} koja se nalazi u aminoacilacijskom kompleksu prikazana je zelenom, a tRNA^{Leu} koja se nalazi u deacilacijskom kompleksu s LeuRS plavom bojom. Žutom bojom označena je katalitička domena, ljubičastom cink-vezujuća domena, plavom domena popravka pogreške nakon prijenosa, crvenom antikodon specifična domena, ružičastom leucin specifična domena, a narančastom C-terminalna domena. (b) prikaz rotacije fleksibilnih domena, nakon superpozicije tijela enzima (sivo) u deacilacijskom (crveno) i aminoacilacijskom (plavo) stanju. Preuzeto i prilagođeno iz Palencia i sur, 2012.

3. Ciljevi rada

Cilj rada je pronaći najmanji mogući analog molekule tRNA^{Leu} koji se može uspješno aminoacilirati kako bi se kasnije iskoristio za određivanje interakcijskog doprinosa vezane aminokiseline prilikom vezanja aminoaciliranog analoga tRNA^{Leu} u deacilacijsku domenu. Uspješnost aminoacilacije pratit će se vizualizacijom produkata reakcije aminoacilacije na kiselim gelovima koji osiguravaju stabilizaciju esterske veze između molekule RNA i aminokiseline. Također, cilj rada je i provjeriti stabilnost kompleksa analoga molekule tRNA^{Leu} i enzima LeuRS metodom gel-ratardacijske elektroforeze, ukoliko dolazi do njegovog nastajanja.

U svrhu provođenja reakcije aminoacilacije i provjere stabilnosti nastalog kompleksa potrebno je izolirati enzim Wt LeuRS iz bakterijskog soja BL21, te konstruirati analoge molekule tRNA^{Leu} koristeći saznanja o elementima prepoznavanja pokazanim u radovima Larkina i suradnika (2002.) i Palencie i suradnika (2012). Kako bismo dobili eksprimirane analoge tRNA^{Leu} potrebno je prvo izolirati plazmidnu DNA iz bakterijskog soja DH5α te u izolirane plazmidne vektore uklonirati DNA oligonuklotidne slijedove koji kodiraju za osmišljene tRNA^{Leu} analoge. Bakterijske stanice DH5α potrebno je transformirati dobivenim plazmidnim konstruktima metodom elektroporacije te potom iz uspješno transformiranih bakterijskih kolonija, nakon prekonoćne bakterijske kulture, izolirati dovoljnu količinu plazmidnih konstrukata koji sadrže nukleotidne slijedove za tRNA^{Leu} analoge. Ekspresija veće količine tRNA analoga postić će se postupkom *in vitro* transkripcije. Dobivene analoge molekule tRNA^{Leu} potrebno je zatim dodatno pročistiti i ukoncentrirati za daljnje eksperimente.

4. Materijali i metode

4.1. Materijali

4.1.1. Standardne kemikalije

Agar (*Sigma*), akrilamid (*Sigma*), ampicilin (*Sigma*), APS (*Sigma*), borna kiselina (*Zorka Šabac*), dimetilsulfoksid (DMSO) (*Sigma*), (DTT) (*Sigma*), etilendiamintetraoctena kiselina EDTA (*Sigma*), etanol, 96 % (*Kemika*), etidijev bromid (*Boehringer Mannheim*), fenol (*Kemika*), formaldehid (*Sigma*), glicerol (*Gram-Mol*), *N*-(2-hidroksietil)piperazin-*N'*-2-etansulfonska kiselina (HEPES) (*Sigma*), izopropanol (*Alkaloid*), kalcijev klorid (*Kemika*), kalijev dikromat (*Kemika*), kalijev klorid (*Kemika*), kanamicin (*Sigma*), kloroform (*Kemika*), kvaščevo ekstrakt (*BD Difco*), magnezijev klorid (*Fluka*), metanol (*Carlo Erba*), natrijev acetat (*Kemika*), natrijev karbonat ,bezvodni (*Kemika*), natrijev klorid (*Kemika*), natrijev hidroksid (*Kemika*), nitratna kiselina, 65 % (*Kemika*), octena kiselina, 99,5 % (*T.T.T. doo*), spermidin (*Sigma*), srebrov nitrat, 99 % (*Sigma Aldrich*), TEMED (*Sigma*), tripton (*Sigma*), Tris(hidroksimetil)-aminometan (Tris) (*Sigma*), urea (*Acros organics*).

4.1.2. Aminokiseline i nukleotidi

ATP (*Sigma*), GTP (*Sigma*), CTP (*Sigma*), TTP (*Sigma*), UTP (*Sigma*), leucin (*Sigma*), dNTP smjesa (*Sigma*).

4.1.3. Boje

Bromfenol plavo (*Serva*), Coomassie Brilliant Blue R-250 (*Merck*), etidijev bromid (*Boehringer Mannheim*), toluidinsko modriilo (*Sigma*).

4.1.4. Enzimi i proteini

Piruvat-kinaza (*Sigma*), restrikcijske endonukleaze (EcoRI, XbaI, BamHI, BstNI) s pripadnim puferima (*NEB*), RNasin (*Promega*), T4-DNA-ligaza (*Fermentas*), T7-RNA-polimeraza izolirana u laboratoriju, AmpliTaq Gold DNA Polymerase (*Thermo Fisher Scientific*) pufer za AmpliTaq Gold DNA-polimerazu (*Thermo Fisher Scientific*), anorganska termostabilna pirofosfataza (IPPaza) (*Sigma*), T4-polinukleotid-kinaza (*NEB*).

4.1.5. Ostali materijali

Izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid - IPTG (*Thermo Scientific*), centrikoni Amicon® Ultra centrifugal filters (*Milipore*), Ni-NTA agaroza (*Qiagen*), komorice za dijalizu Slide-A-Lyzer™ MINI Dialysis (*Thermo Scientific*), celulozna membrana za dijalizu (*Sigma*).

4.1.6. Dimenzije korištenih elektroforetskih gelova

Korišteni su gelovi *Bio rad* elektroforetskog sustava u tri dimenzije: mali gel: $7,3 \times 10$ cm, srednje veliki gel: $17 \times 16,5$ cm i veliki gel: $55,5 \times 27,3$ cm.

4.1.7. Komercijalni kompleti za pročišćavanje DNA

QIAprep Spin Miniprep Kit (*Qiagen*) za izolaciju plazmidne DNA, QIAfilter Plasmid Maxi Kit (*Qiagen*) za preparativnu izolaciju plazmidne DNA, QIAquick Gel Extraction Kit (*Qiagen*).

4.1.8. Hranjive podloge i mediji za uzgoj bakterije *E. coli*

Tekuća hranjiva podloga Luria-Bertani (LB): kvašćev ekstrakt ($\gamma = 5 \text{ g dm}^{-3}$), tripton ($\gamma = 10 \text{ g dm}^{-3}$), NaCl ($\gamma = 10 \text{ g dm}^{-3}$).

Kruta hranjiva podloga Luria-Bertani (LB): kvašćev ekstrakt ($\gamma = 5 \text{ g dm}^{-3}$), tripton ($\gamma = 10 \text{ g dm}^{-3}$), NaCl ($\gamma = 10 \text{ g dm}^{-3}$), agar ($\gamma = 15 \text{ g dm}^{-3}$).

Hranjive podloge su prije upotrebe sterilizirane autoklaviranjem. Nakon hlađenja dodan je antibiotik po potrebi. Antibiotik kanamicin se dodaje do konačne masene koncentracije $0,030 \text{ mg mL}^{-1}$, a ampicilin do $0,100 \text{ mg mL}^{-1}$.

4.1.9. Dizajnirani oligonukleotidi

Osmišljene početnice proizvedene su u *MacroGen* u Južnoj Koreji.

Tablica 2. Osmišljeni oligonukleotidi za dobivanje analoga tRNA^{Leu}.

Ime analoga tRNA ^{Leu}	Sekvenca	Broj nukleotida	Udio GC (%)	T _m (°C)
mikro tRNA ^{Leu}	F: 5'-AATTCTAATACGACTCACTATAGCCCCGGATCCG GGTACCAGGT-3'	43	48,84	79,9
	R: 5'-CTAGACCTGGTACCCGGATCCGGGCTATAGTGA GTCGTATTAG-3'	43	53,49	81,8
mini tRNA ^{Leu}	F: 5'-AATTCTAATACGACTCACTATAGCCCCGGATGGTG GAATCGGTAGACACAATTGCTCCGGGTACCAGGT-3'	68	53,49	86,6
	R: 5'- CTAGACCTGGTACCCGGAGCAATTGTGTCTACCG ATTCCACCATCCGGGCTATAGTGAGTCGTATTAG-3'	68	51,47	88,0
midi tRNA ^{Leu}	F: 5'- AATTCTAATACGACTCACTATAGCCCCGGATGGTG GAATCGGTAGACACAATCGGCGTTCGCGCTGTGCGGG TTCAAGTCCCCTCCGGGTACCAGGT-3'	97	55,67	93,3
	R: 5'- CTAGACCTGGTACCCGGAGCGGGACTTGAACCCG CACAGCGCGAACGCCGATTGTGTCTACCGATTCCACCA TCCGGGCTATAGTGAGTCGTATTAG-3'	97	57,73	94,1

Tablica 3. Početnice za pUC18 plazmidni vektor korištene za PCR na bakterijskim kolonijama.

Ime početnice	Sekvenca
Uzvodna početnica za pUC18	5'- GGATGTGCTGCAAGGCGATTAATTGG-3'
Nizvodna početnica za pUC18	5' – GAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGG-3'

4.1.10. Korišteni sojevi bakterije *E. coli*

DH5α ((*supE44 ΔlacU169 (Φ80 lacZ) ΔM15*) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi1 relA1*) soj je korišten za kloniranje i umnažanje plazmidne DNA. Zbog mutacije *recA1* gena onemogućena je homologna rekombinacija i popravak molekule DNA što je pogodno za stabilnost transformirane DNA.

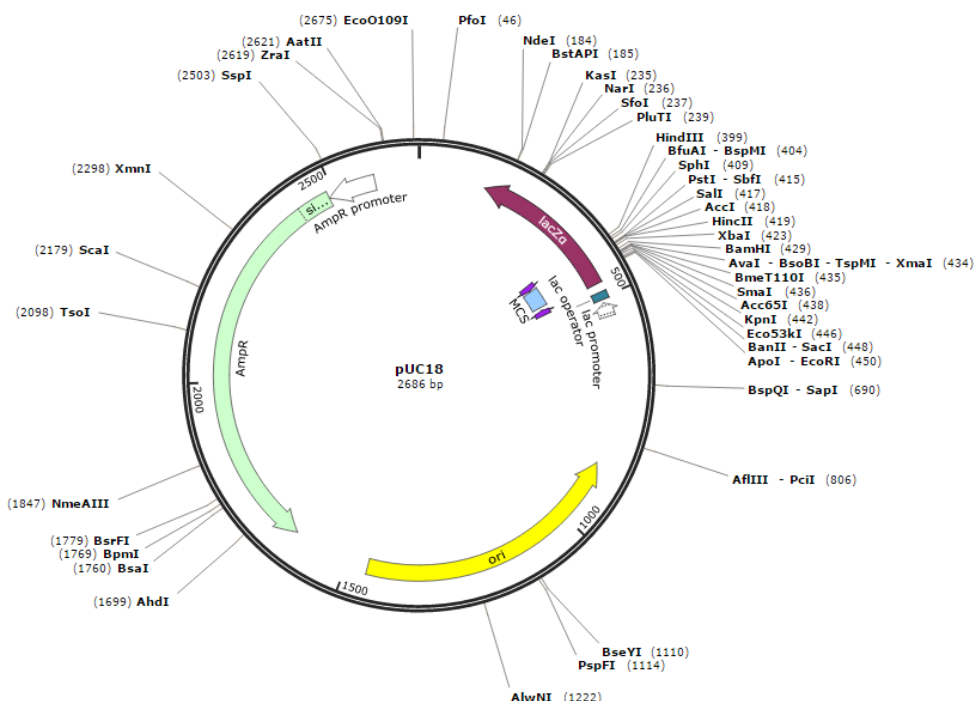
Mutacijom *endA1* gena koji kodira za endonukleazu I onemogućuje se nespecifična razgradnja DNA,

a mutacija $\Phi 80lacZ \Delta M15$ omogućuje α -komplementaciju s amino-krajem β -galaktozidaze iz pUC vektora.

BL21 (DE3) (*F- ompT hsdSB (rB- mB-) ga dcm* (DE3), Novagen) soj je korišten za prekomjernu ekspresiju gena ukloniranih u vektore iz serije pET, tj. za prekomjernu ekspresiju proteina Wt LeuRS. Soj sadrži gen za T7-RNA-polimerazu integriran u bakterijski kromosom pod kontrolom inducibilnog promotora *lacUV5* i ne ekspirira aktivne proteaze *lon* i *ompT*, zbog čega je pogodan za prekomjernu ekspresiju proteina induciranu dodatkom IPTG-a.

4.1.11. Bakterijski plazmidni vektori

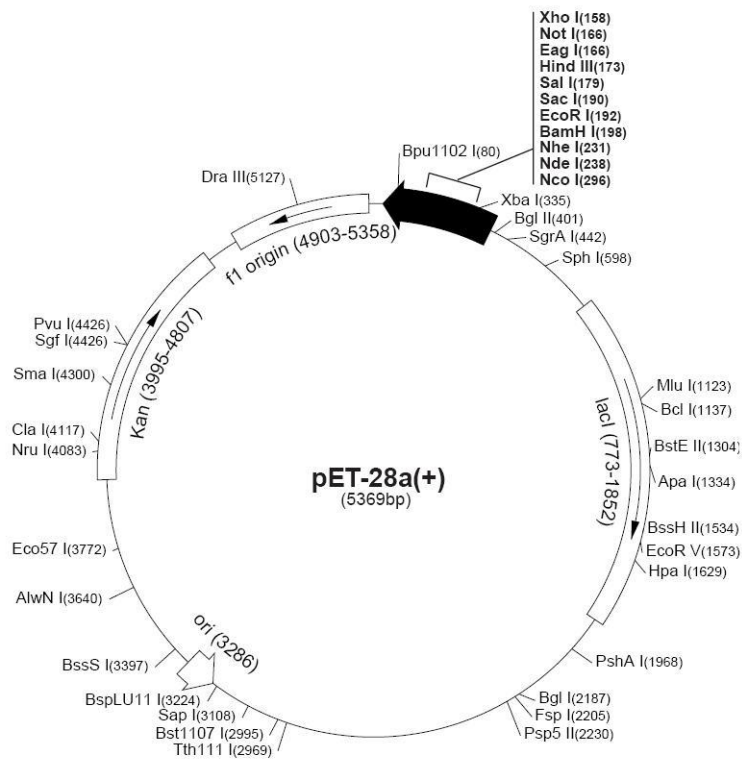
Za ekspresiju analoga tRNA^{Leu} korišten je plazmid **pUC18** (Slika 9). pUC18 je plazmid visokog broja kopija, često upotrebljavan za kloniranje ili sekvenciranje. Njegove osnovne značajke su: gen za rezistenciju na ampicilin, lac regija u kojoj se nalazi višestruko mjesto za kloniranje (engl. *multiple cloning site*, MCS) te početak replikacije *ori* iz plazmida pBR322. Ugradnjom željenog inserta u višestruko mjesto za kloniranje inaktivira se gen za β -galaktozidazu što omogućava selekciju rekombinantnih plazmida na temelju plave ili bijele boje kolonija na podlozi koja sadrži 5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktozid.



Slika 9. Bakterijski plazmidni vektor iz serije pUC18. Preuzeto i prilagođeno s

http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/basic_cloning_vectors/pUC18/.

Za prekomjernu ekspresiju proteina Wt LeuRS korišten je plazmidni vektor **pET28b** (Slika 10) koji već nosi gen za divlji tip proteina LeuRS pod inducibilnim promotorom *T7lac* (plazmidni vektor ustupila je doc.dr.sc. Morana Dulić). pET28b je plazmid iz serije vektora pET koji se koristi za prekomjernu ekspresiju proteina čiji gen se nalazi pod kontrolom inducibilnog promotora *T7lac*. Ovaj vektor omogućava ekspresiju rekombinantnih proteina s histidinskim privjeskom na N- ili C-kraju koji se pročišćavaju afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu. Plazmid je niskog broja kopija te nosi gen za rezistenciju na kanamicin.



Slika 10. Bakterijski plazmidni vektor iz serije pET28. Preuzeto i prilagođeno s [http://ecoliwiki.net/colipedia/index.php/pET-28a\(%2B\)](http://ecoliwiki.net/colipedia/index.php/pET-28a(%2B)).

4.2. Metode

4.2.1. Metode rada s nukleinskim kiselinama

4.2.1.1. Izolacija plazmidne DNA

Za izolaciju manje količine plazmidne DNA korišten je komercijalni QIAprep Spin Miniprep Kit (*Qiagen*), a izolacija je provedena prema uputama proizvođača. Komercijalni komplet se temelji na klasičnoj metodi alkalne lize. Iz staničnog lizata se uklanjaju genomska DNA i proteini, a plazmidna DNA se dodatno pročišćava na priloženoj kolonici.

Za preparativnu izolaciju plazmida korišten je komercijalni komplet QIAfilter Plasmid Maxi Kit (*Qiagen*) prema uputama proizvođača.

4.2.1.2. Agarozna gel-elektroforeza

Elektroforeza nukleinskih kiselina najčešće se provodi na gelu agaroze. Agarozna je linearni polimer s velikim porama koje omogućuju prolazak i razdvajanje velikih nukleinskih kiselina. Detekcija se u ovom slučaju najčešće vrši bojanjem fluorescentnom bojom – etidijevim bromidom. Elektroforezom na agaroznom gelu provjerena je čistoća izoliranog plazmidnog vektora. Agarozni gelovi s 1 % (w/v) agaroze pripremljeni su otapanjem 1 g agaroze u 100 mL pufera $1 \times$ TAE (40 mmol dm⁻³ Tris, 1 mmol dm⁻³ EDTA - titrirana octenom kiselinom do pH = 8,0 i 0,5 mg dm⁻³ etidijev bromid) i grijanjem u mikrovalnoj pećnici nekoliko minuta. Postupak elektroforeze provoden je u elektroforetskom puferu $1 \times$ TAE pri 130 V u trajanju 30 - 40 min pri čemu je jakost električnog polja iznosila oko 8 - 10 V cm⁻¹. Uz uzorke je na gel nanesen komercijalno dostupni marker 1 kb DNA Ladder (*NEB*) radi procjene veličine razdvojenih fragmenata. Uzorci su vizualizirani etidijevim bromidom koji je prisutan u gelu i puferu za elektroforezu. EtBr se interkalira između baza u molekuli DNA pri čemu dolazi do povećanja intenziteta fluorescencije pod UV svjetlom pri valnoj duljini od $\lambda = 302$ nm. Gelovi su analizirani i snimani pod UV svjetlom transiluminatora (DNR, *Bio-Imaging Systems Ltd.*) povezanog s računalom.

4.2.1.3. Određivanje koncentracije nukleinskih kiselina

Koncentracije dobivenih nukleinskih kiselina određivane su spektrofotometrijskim mjerenjem apsorbancije na uređaju NanoDrop 1000 pri valnoj duljini od 260 nm. Uz iznos koncentracije uzorka, uređaj daje i podatke o čistoći samog uzorka, stoga je važno uzeti u obzir i dobiveni omjer 260/280

(apsorbancija izmjerena pri valnoj duljini od 260 nm podijeljena s apsorbanzijom izmjerenoj pri 280 nm) koji direktno govori o čistoći uzorka DNA i RNA s obzirom na zaostale proteine, te omjer 260/230 koji služi kao sekundarna mjera provjere čistoće nukleinskih kiselina u odnosu na zaostali fenol. Vrijednost $260/280 = 1,8$ za DNA je općenito prihvaćena kao čista DNA, a $260/280 = 2,0$ za RNA kao čist uzorak RNA. Očekivana vrijednost omjera 260/230 za čiste nukleinske kiseline kreće se u omjeru 2,0 – 2,2.

4.2.1.4. Priprema pUC18 vektora za ugradnju oligonukleotida koji nose gen za analoge tRNA

Kako bi se oligonukleotidni konstrukti mogli ugraditi u vektor, plazmidni vektor pUC18 je razgrađen restrikcijским enzimima. Restrikcijски enzimi su dio restrikcijско-modifikacijског sustava bakterija, čija je uloga zaštita domaćina od stranih molekula DNA razgradnjom. Restrikcijске endonukleaze prepoznaju specifične sljedove nukleotida, palindrome, koji sadrže od 4 do 8 nukleotida, a nakon cijepanja ostavljaju tupe krajeve ili 3' - ili 5' - stršeće ljepljive krajeve. U laboratorijskim istraživanjima koriste se restrikcijске endonukleaze tipa II koje cijepaju DNA na mjestu prepoznavanja.

Za reakciju razgradnje plazmida korišteni su restrikcijски enzimi EcoRI i XbaI čime su unutar MCS dobiveni ljepljivi krajevi koji odgovaraju ljepljivim krajevima koji se dobivaju komplementarnim sparivanjem dizajniranih oligonukleotida. Reakcijska smjesa je sadržavala: $1 \times$ NEBuffer 3.1 (NEB), $10 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$ restrikcijског enzima EcoRI (NEB), $10 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$ restrikcijског enzima XbaI (NEB), $0,05 \text{ g L}^{-1}$ izoliranog plazmida. Reakcija je inkubirana 3 sata na 37°C . Smjesa razgrađenog plazmidnog vektora pročišćena je uz pomoć QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) kompleta za izolaciju DNA iz agaroznih gelova (bez prethodnog postupka razdvajanja dobivenih produkata razgradnje agaroznom gel-elektroforezom).

4.2.1.5. Priprema 5'- krajeva oligonukleotida za ugradnju u plazmidni vektor pUC18

Na 5' - krajeve oligonukleotida dodane su fosfatne skupine uz pomoć enzima T4-polinukleotid-kinaze (NEB) u svrhu pripreme oligonukleotida za ugradnju u MCS koji je prethodno pocijepan restrikcijским enzimima EcoRI i XbaI. Reakcijska smjesa je sadržavala: $1 \times$ pufer za T4-polinukleotid-kinazu (NEB), 1 mmol dm^{-3} ATP, $10 \mu\text{mol dm}^{-3}$ DTT, $20 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$ oligonukleotida i $0,25 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$ enzima T4-polinukleotid-kinaze. Reakcija je inkubirana 1 sat na 37°C .

4.2.1.6. Ligacija gena za analoge tRNA u plazmidni vektor pUC18

U svrhu povezivanja ljepljivih krajeva oligonukleotidnih konstrukata i razgrađenog plazmidnog vektora pUC18 napravljene su dvije ligacijske smjese, jedna u molarnom omjeru oligonukleotida prema plazmidu 5 : 1, a druga u molarnom omjeru 10 : 1. Prva reakcijska smjesa bila je sastava: 100 ng plazmidnog vektora pUC18, 1 × T4-DNA-ligaznog pufera (*Fermentas*), 0,01 U μL^{-1} T4-DNA-ligaze (*Fermentas*) i 2,5 pmol μL^{-1} oligonukleotida. Druga reakcijska smjesa omjera 10 : 1 bila je sastava: 100 ng plazmidnog vektora pUC18, 1 × T4-DNA-ligaznog pufera (*Fermentas*), 0,01 U μL^{-1} T4-DNA-ligaze (*Fermentas*) i 5 pmol μL^{-1} oligonukleotida. Reakcijske smjese su inkubirane 10 minuta pri 22 °C, a zatim je T4-DNA-ligaza inhibirana inkubiranjem reakcijske smjese 10 minuta pri 65 °C. Kao negativna kontrola za utvrđivanje kvalitete razgrađenog vektora, postavljena je reakcija ligacije u kojoj je umjesto inserta u ligacijsku smjesu stavljena redestilirana voda.

4.2.1.7. Transformacija bakterijskih stanica metodom elektroporacije

Elektroporacija je metoda unosa strane molekule DNA u bakterijske stanice koja se zasniva na kratkotrajnom povećanju propusnosti bakterijske stanične stijenke uslijed izlaganja bakterija električnom pulsu. U 40 μL elektrokompetentnih bakterija dodano je 10 ng plazmidne DNA koja je dobivena reakcijom ligacije. Smjesa je zatim prebačena u ohlađenu kivetu za elektroporaciju. Za elektroporaciju je korišten uređaj MicroPulser (*Biorad*). Na suspenziji stanica primijenjen je puls od 2,5 kV cm^{-1} u trajanju od 4,5 ms. Bakterijske stanice su zatim resuspendirane u 1 mL tekućeg medija LB, inkubirane 1 sat na 37 °C te nasađene na krutu hranjivu podlogu s ampicilinom.

4.2.1.8. PCR na bakterijskim kolonijama (eng. colony PCR)

Lančana reakcija polimeraze (PCR, eng. *polymerase chain reaction*) je metoda pomoću koje se može specifično umnožiti točno određeni segment DNA *in vitro*. Reakcija se temelji na izmjeni triju ciklusa: (1) denaturaciji kalupa, pri čemu dolazi do razdvajanja komplementarno sparenih lanaca dvolančane DNA pri visokoj temperaturi (oko 95 - 98 °C), (2) sparivanju početnica s komplementarnim slijedovima jednolančanih kalupa DNA (temperatura obično oko 45 - 70 °C), te (3) produljenju lanca DNA kataliziranog termostabilnom DNA-polimerazom (temperatura obično oko 70 °C). U svakom ciklusu se broj kopija gena povećava, te se nakon n ciklusa u reakcijskoj smjesi nalazi 2^n kopija gena od interesa.

Lančana reakcija polimeraze provođena je na transformiranim bakterijskim kolonijama *E. coli* soja DH5 α , u svrhu provjere ugrađivanja DNA fragmenta, koji kodira za željeni analog tRNA, u pUC18 plazmidni vektor. Nakon elektroporacije transformirane bakterijske stanice su nasadene na krutu LB hranjivu podlogu s ampicilinom. Na takvoj podlozi trebale bi narasti samo bakterijske kolonije koje su uspješno transformirane i sadrže pUC18 vektor sa željenom sekvencom. Reakcijska PCR smjesa sadržavala je: 1 \times PCR Gold buffer (*Thermo Fisher Scientific*), 10 mmol dm⁻³ dNTP smjese, 25 mmol dm⁻³ MgCl₂, 10 μ mol dm⁻³ uzvodne početnice, 10 μ mol dm⁻³ nizvodne početnice, 5 U μ L⁻¹ AmpliTaq Gold DNA Polymerase (*Thermo Fisher Scientific*) te su kao kalup korištene transformirane bakterijske kolonije prebačene vrhom sterilnog nastavka za pipetu u reakcijsku smjesu. Reakcija je provođena u uređaju za PCR (Thermal Cycler, *Eppendorf*) kroz 30 ciklusa denaturacije, sparivanja početnica i produljenja. Produkti lančane reakcije polimeraze provjereni su elektroforezom na 1 % agaroznom gelu (bakterijske kolonije transformirane s pUC18 vektorom koji sadrži gen za analog midi tRNA^{Leu} i analog mini tRNA^{Leu}) i 1,5 % agaroznom gelu (bakterijske kolonije transformirane s pUC18 vektorom koji sadrži gen za analog mikro tRNA^{Leu}).

Odabrane bakterijske kolonije koje sadrže plazmide od interesa uzgojene su prekonocnom kulturom u 5mL LB medija uz dodatak antibiotika ampicilina. Iz prekonocne kulture izolirana je plazmidna DNA pomoću kompleta QIAprep Spin Miniprep Kit (*Qiagen*).

Tablica 4. Uvjeti za PCR reakciju na bakterijskim kolonijama.

Korak	Temperatura/°C	Trajanje ciklusa	Broj ciklusa
Početna denaturacija	95	10 min	1
Denaturacija	95	15 s	30
Vežanje početnice na kalup	65	30 s	30
Produljenje lanca	72	1 min	30
Završno produljenje lanca	72	5 min	1

4.2.1.9. Provjera pravilne ugradnje oligonukleotida u plazmidni vektor restriksijskom analizom

U svrhu dodatne provjere ugradnje oligonukleotida u plazmidni vektor napravljena je razgradnja izolirane plazmidne DNA pomoću tri restriksijska enzima: BamHI, XbaI i EcoRI koji su pomiješani u dvije reakcijske smjese. Prva reakcijska smjesa bila je sastava: $10 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$ restriksijskog enzima BamHI, NEBuffer 3.1 (*NEB*) i $1 \mu\text{g}$ izolirane plazmidne DNA u ukupnom volumenu reakcijske smjese od $20 \mu\text{L}$. Druga reakcijska smjesa je u $20 \mu\text{L}$ sadržavala: $10 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$ restriksijskog enzima EcoRI, $10 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$ restriksijskog enzima XbaI, $1 \times$ NEBuffer 3.1 (*NEB*) i $1 \mu\text{g}$ izolirane plazmidne DNA. RE BamHI u slučaju pravilne ugradnje oligonukleotidne sekvence za mini tRNA^{Leu} i midi tRNA^{Leu} ne bi trebao cijepati plazmid jer se to restriksijsko mjesto izgubilo ugradnjom željenog oligonukleotidnog slijeda u MCS. S druge strane, gen za mikro tRNA^{Leu}, sadrži restriksijsko mjesto BamHI zbog čega će cijepanjem RE BamHI nastati lineariziran plazmid. EcoRI i XbaI cijepaju na granicama oligonukleotidnih slijedova tj. na mjestu ugradnje oligonukleotida u MCS, što omogućuje usporedbu duljine ugrađenog fragmenta između uzoraka.

Nakon razgradnje enzimima XbaI, BamHI i EcoRI plazmidni fragmenti su razdvojeni na 1,5 % agaroznom gelu i vizualizirani uz pomoć EtBr. U konačnici su od 6 bakterijskih kolonija, odabranih nakon PCR-a na bakterijskim kolonijama, odabrane 3 koje sadrže uspješno uklonirane sekvence za mini tRNA^{Leu}, midi tRNA^{Leu} i mikrotRNA^{Leu}.

Točnost ugrađenih fragmenata u plazmid dodatno je provjerena sekvenciranjem.

4.2.1.10. Umnažanje i izolacija plazmidnih vektora koji sadrže gen za analog tRNA

Bakterijske kolonije koje sadrže plazmide od interesa uzgojene su prekonoćnom kulturom u 100 mL LB medija u kojeg je dodan ampicilin. Iz prekonoćne bakterijske kulture je potom izolirana plazmidna DNA uz pomoć kompleta QIAfilter Plasmid Maxi Kit (*Qiagen*) prema uputama proizvođača.

4.2.1.11. Dobivanje DNA fragmenata koji kodiraju za željene analoge tRNA

Izolirana plazmidna DNA je pocijepana restriksijskim enzimom BstNI koji cijepa na krajevima gena koji kodiraju za analoge tRNA^{Leu} kako bi se dobio linearizirani kalup koji onda, zbog nepostojanja slijeda za terminaciju transkripcije unutar sekvence, omogućava zaustavljanje transkripcije.

Prije preparativne razgradnje plazmida RE BstNI, eksperimentalno je određeno da optimalna reakcijska smjesa treba sadržavati 1 µg plazmidne DNA, 1 U µL⁻¹ restrikcijskog enzima BstNI u 1 × NEBuffer 3.1 (podaci nisu prikazani).

Reakcijske smjesa za preparativnu razgradnja inkubirana je na 60 °C, 4 sata, uz miješanje jačine 300 rpm-a. Ovom razgradnjom dobiveni su linearizirani DNA kalupi za željene analoge tRNA, koji će se koristiti za reakciju *in vitro* transkripcije.

4.2.1.12. Pročišćavanje nukleinskih kiselina ekstrakcijom fenol-kloroformom

Nukleinske kiseline pročišćavane su ekstrakcijom sa smjesom fenola i kloroforma. Kod pročišćavanja lineariziranih kalupa DNA, dobivenih uz pomoć restrikcijskog enzima BstNI, dodana je fenol/kloroform smjesa u volumnom omjeru 1 : 1. U ovom slučaju korišten je lužnati fenol zasićen Trisom. Smjesa je vorteksirana 10 sekundi, a zatim centrifugirana 5 minuta na 10 000 × g pri 4 °C. Gornja vodena faza je odvojena u novu eprueticu i u nju je dodan kloroform u volumnom omjeru 1 : 1. Smjesa je ponovno vorteksirana 10 sekundi i zatim centrifugirana 5 minuta na 10 000 × g pri 4 °C. Gornji vodeni sloj je odvojen u novu eprueticu te je dodano 1/10 volumena 3 mol dm⁻³ natrijevog acetata pH 4,8 te hladni etanol φ = 96 % u omjeru 2,5 (volumen etanola) : 1 (volumen smjese). Smjesa je potom inkubirana 2 sata na -80°C kako bi se ubrzalo taloženje nukleinskih kiselina.

U slučaju pročišćavanja RNA korišten je kiseli fenol (fenol zasićen vodom) koji je u smjesu koja sadrži nepročišćenu RNA dodan u volumnom omjeru 1 : 1. Smjesa je kratko protresana rukom, a zatim centrifugirana 5 minuta na 10 000 × g pri 4 °C. Gornja vodena faza je odvojena u novu eprueticu i u nju je dodan fenol/kloroform u volumnom omjeru 1 : 1. Smjesa je ponovno kratko protresana rukom te centrifugirana 5 minuta na 10 000 × g pri 4 °C. Gornji vodeni sloj je odvojen u novu eprueticu te je dodano 1/10 volumena 3 mol dm⁻³ natrijevog acetata pH 4,8 te hladni etanol φ = 96 % u volumnom omjeru 2,5 : 1. Smjesa je i u ovom slučaju inkubirana 2 sata na -80°C.

Nukleinske kiseline su nakon inkubacije na -80°C istaložene centrifugiranjem 2 sata na 5 000 × g pri 4 °C. Potom je uklonjen supernatant, a preostali talog osušen i otopljen u minimalnom volumenu sterilne redestilirane vode.

4.2.1.13. Optimizacija uvjeta za reakciju *in vitro* transkripcije i preparativna *in vitro* transkripcija

Kako bi se iz lineariziranih DNA kalupa za željene analoge tRNA^{Leu} dobila RNA, korištena je metoda *in vitro* transkripcije. *In vitro* transkripcija je metoda dobivanja transkripata RNA prema kalupu DNA uz pomoć enzima T7-RNA-polimeraze izvan stanice, u epruveti. Da bi reakcija bila optimalna potrebno je dodati sve potrebne sastojke uključujući i ione koji su inače potrebni enzimu u stanici da bi optimalno provodio reakciju transkripcije.

U svrhu optimiziranja reakcije *in vitro* transkripcije napravljene su 3 serije uvjeta u kojima se provodila reakcija transkripcije T7-RNA-polimerazom (svi isprobani uvjeti navedeni su i objašnjeni u tablicama u poglavlju 5.9.). Uvjeti su se razlikovali u količini MgCl₂, GMP-a, T7-RNA-polimeraze, tipu pufera i prisutnosti spermidina. Sve su reakcijske smjese pripremane na ledu, a nakon dodatka enzima T7-RNA-polimeraze reakcijske smjese su inkubirane 4 sata na 37°C, pri stalnom miješanju od 300 rpm-a. Kako bi se utvrdili najbolji uvjeti, nakon reakcije probne *in vitro* transkripcije, produkti su razdvojeni na poliakrilamidnom gelu u prisustvu ureje. Onaj uvjet koji je dao najveću količinu transkribirane RNA odabran je za pripremu preparativne reakcijske smjese.

Optimizirana preparativna reakcijska smjesa je u konačnici sadržavala: 20 mmol dm⁻³ Tris, 4 mmol dm⁻³ NTP smjese, 0,1 g dm⁻³ lineariziranog DNA kalupa, 19,5 mmol dm⁻³ GMP, 4 mmol dm⁻³ DTT, 0,5 U mL⁻¹ anorganske IPP-aze, 0,5 µg mL⁻¹ BSA, 0,5 U µL⁻¹ RNazina i 3/100 volumena ukupne reakcijske smjese T7-RNA-polimeraze, izolirane u laboratoriju (nepoznate koncentracije). Reakcijska smjesa je inkubirana 4 sata na 37°C pri stalnom miješanju od 300 rpm-a.

Nakon preparativne reakcije *in vitro* transkripcije dobiveni produkti su pročišćeni ekstrakcijom fenol-kloroformom (postupak opisan u poglavlju 4.2.1.12.).

4.2.1.14. Denaturirajuća poliakrilamidna gel-elektroforeza u prisustvu ureje

Uzorci molekula RNA dobiveni *in vitro* transkripcijom pročišćeni su poliakrilamidnom gel-elektroforezom na velikim gelovima u prisutnosti denaturirajućeg sredstva – ureje. Dodatak ureje dovodi do razaranja sekundarne strukture nukleinskih kiselina pri čemu se dobiva jednak omjer naboja i mase, pa je temelj razdvajanja razlika u njihovoj molekulskoj masi. Sastav pripremljenih gelova je: 19:1 (10 - 15 % w/v) akrilamid:bisakrilamid, 6 mol dm⁻³ ureja, 90 mmol dm⁻³ Tris, 90 mmol dm⁻³ borna kiselina, 2 mmol dm⁻³ EDTA, pH = 8,0. Polimerizacija gela potaknuta je dodatkom 0,86 mg mL⁻¹ amonijevog peroksodisulfata (APS) i 0,05 % (w/v) N, N, N', N'-tetrametiletildiamina (TEMED). Uzorak mikro tRNA^{Leu} pročišćen je na 15 % poliakrilamidnom gelu, a uzorci za mini

tRNA^{Leu} i midi tRNA^{Leu} na 10 % gelu. Potreban postotak umreženosti gela određen je prema Tablici 5. Nakon polimerizacije gela i prije nanošenja uzorka, jažice su zbog nataložene ureje isprane elektroforetskim puferom 1 × TBE (90 mmol dm⁻³ Tris, 90 mmol dm⁻³ borna kiselina, 2 mmol dm⁻³ EDTA, pH = 8,0). Prije nanošenja na gel, svi uzorci su denaturirani inkubiranjem na 65 °C u trajanju od 3 minute nakon dodatka jednakog volumena pufera za nanošenje na gel sastava: 6 mol dm⁻³ ureja, 0,1 % bromfenol plavo, 0,1 % ksilencijanolfosfat, 0,5 % EDTA, pH = 8,0 (Summer, 2009). Elektroforeza je provedena u hladnoj sobi na 4 °C u trajanju od 2 do 3 sata (ovisno o duljini analoga tRNA^{Leu}) pri 600V. Dio gela u kojem se nalazi analog tRNA^{Leu} izrezan je pomoću skalpela pod UV lampom na pločici PEI-celuloze s fluorescentnim indikatorom (pozicija vrpce koja odgovara određenom analogu tRNA^{Leu} određena je prema Tablici 6).

Tablica 5. Preporučeni postotak umreženosti poliakrilamidnog gela za razdvajanje nukleinskih kiselina određenih duljina na denaturirajućim poliakrilamidnim gelovima.

% umreženosti poliakrilamidnog gela	Efektivni raspon razdvajanja /broj nukleotida
3,5	>500
5	151-500
10	61-150
15	30-60
20	<30

Tablica 6. Brzina putovanja ksilencijanola i bromfenol plave boje izražena u brzini putovanja nukleinske kiseline određenog broja nukleotida u denaturirajućim poliakrilamidnim gelovima različitog postotka umreženja.

% umreženosti poliakrilamidnog gela	Ksilencijanol /broj nuklotida	Bromfenol plavo /broj nuklotida
5	130	35
6	106	26
8	75	19
10	55	12
12	28	8

4.2.1.15. Elucija analoga tRNA^{Leu} s poliakrilamidnog gela

Izrezani komadići gela su inkubirani preko noći uz protresanje u 7 mL 3 mol dm⁻³ natrijevog acetata, pri 4°C, a zatim još 2 sata u istom volumenu novog obroka 3 mol dm⁻³ natrijevog acetata čime se postigla elucija analoga tRNA^{Leu} s gela.

Analozi tRNA^{Leu} su potom iz eluata istaloženi dodavanjem hladnog $\varphi = 70\%$ etanola u volumnom omjeru etanol : eluat = 2,5 : 1 ili dodavanjem izopropanola u volumnom omjeru izopropanol : eluat = 1 : 1. Uzorci su taloženi preko noći na -20 °C, a potom dodatno centrifugirani 2 sata na 5000 × g i 4 °C. Dobiveni talozi su osušeni i otopljeni u odgovarajućem volumenu sterilne redestilirane vode.

4.2.1.16. Izmjena otapala tRNA dijalizom

Dijaliza je tehnika izmjene pufera/otapala, u kojoj dolazi do promjene sastava otopine u kojoj se nalazi molekula od interesa, prolaskom molekula otapala kroz polupropusnu membranu.

Uzorci analoga tRNA^{Leu} su nakon elucije s gela dodatno dijalizirani prema redestiliranoj vodi u komoricama za dijalizu Slide-A-Lyzer™ MINI Dialysis (*Thermo Scientific*) kako bi se u potpunosti uklonili potencijalno zaostali natrijev acetat, etanol i boje.

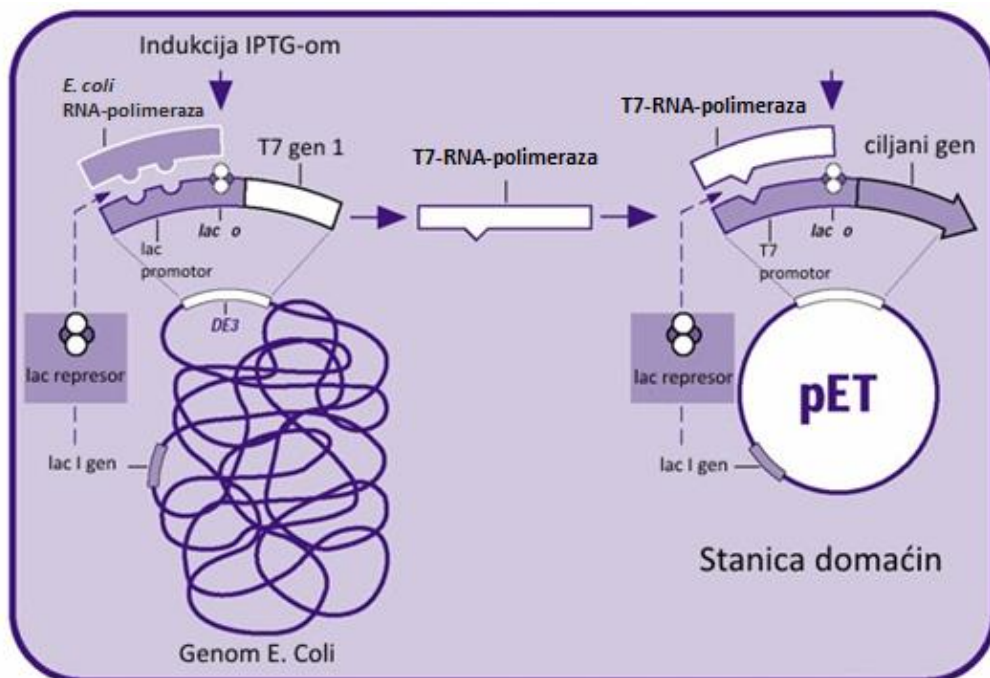
4.2.1.17. Renaturacija tRNA

Eksperimentalno je pokazano da je tRNA^{Leu} potrebno renaturirati u prisutnosti magnezija kako bi zauzela pravilnu tercijarnu konformaciju i mogla pravilno interagirati s enzimom LeuRS (Cvetešić i sur, 2012). tRNA^{Leu} i analozi tRNA^{Leu} su renaturirani inkubacijom 3 minute na termobloku pri 80°C. Uz tRNA je pri 80°C u zasebnoj epuveti inkubiran i 20 mmol dm⁻³ MgCl₂. Nakon inkubacije, tRNA i MgCl₂ su pomješani u volumnom omjeru 1 : 1, a smjesa je ostavljena da se polako hladi na termobloku do sobne temperature.

4.2.2. Metode rada s proteinima

4.2.2.1. Prekomjerna ekspresija proteina

Protein Wt LeuRS *E. coli* korišten u ovom radu izoliran je iz bakterijskog soja BL21 (DE3). Za prekomjernu ekspresiju proteina korišten je T7-ekspresijski sustav (Slika 11). Gen za protein LeuRS ukloniran je u ekspresijski vektor sustava pET iza T7-promotora. T7-RNA-polimeraza je RNA-polimeraza bakteriofaga koja se ne pojavljuje u bakteriji *E. coli*, već je u genom laboratorijskog soja BL21 uklonirana iza *lacUV5* promotora. Dodatakom IPTG-a aktivira se ekspresija T7-RNA-polimeraze te se omogućuje disocijacija lac represora koji je vezan na operator promotora ispred ciljnog gena koji kodira LeuRS. Nakon uklanjanja represora, ekspimirana T7-RNA-polimeraza može vezati T7-promotor te transkribirati gen Wt LeuRS.



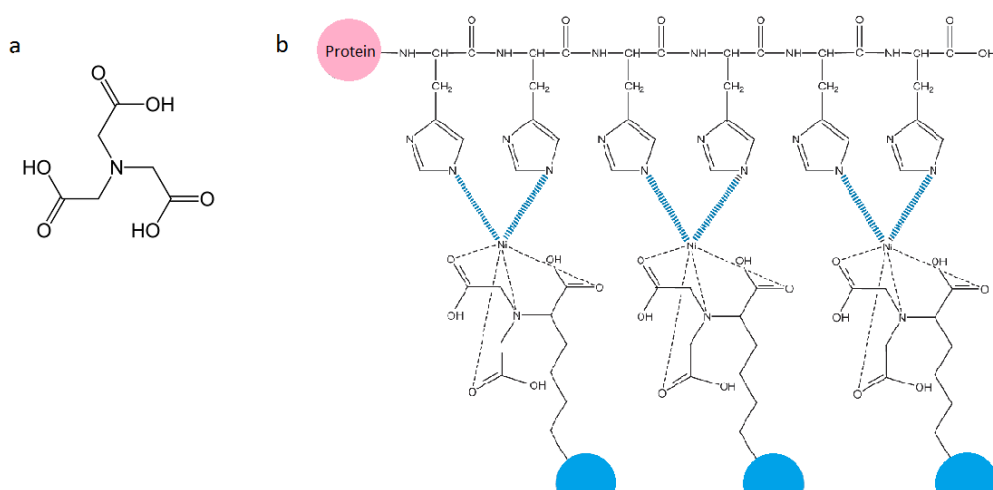
Slika 11. T7-ekspresijski sustav. Ciljni gen u našem slučaju je gen za Wt LeuRS. Gen koji kodira za T7-RNA-polimerazu u genomu sojeva BL21 soja je pod kontrolom *lacUV5* promotora. Dodatak IPTG-a aktivira ekspresiju T7-RNA-polimeraze te omogućuje disocijaciju lac represora koji je vezan na operator promotora ispred ciljnog gena. T7-RNA-polimeraza sad može vezati T7-promotor ciljnog gena što dovodi do transkripcije, a zatim i do translacije gena koji se nalaze pod kontrolom T7-promotora. Preuzeto i prilagođeno s <http://bbs.biogo.net/simple/?t164376.html>.

Bakterijske stanice soja BL21 transformirane su metodom elektroporacije (opisano u poglavlju 4.2.1.7.) plazmidima koji sadrže gene za proteine od interesa. Nakon sat vremena inkubacije transformiranih bakterijskih stanica na 37 °C, stanice su nasađene na krute hranjive podloge s

kanamicinom, budući da transformirane bakterije koje sadrže gen za protein od interesa sadrže i otpornost na kanamicin. Narasle bakterijske kolonije nasadene su u tekući LB medij s kanamicinom preko noći. Drugi dan prekonocne bakterijske kulture su razrijeđene u 500 mL LB medija s kanamicinom te inkubirane pri 37°C uz stalno protresanje. Rast bakterijskih kultura praćen je spektrofotometrijski. Kad je OD₆₀₀ dosegao vrijednost 0,5 inducirana je prekomjerna ekspresija proteina Wt LeuRS dodatkom IPTG do konačne koncentracije od 250 μmol dm⁻³. Bakterijske kulture su zatim inkubirane 3 sata na 37°C uz stalno protresanje. Nakon prekomjerne ekspresije proteina, bakterijske kulture su istaložene centrifugiranjem 15 minuta pri 5000 × g i temperaturi od 4°C.

4.2.2.2. Afinitetna kromatografija na Ni-NTA agarozu

Proteini obilježeni polihistidinskim privjeskom mogu se pročitati afinitetnom kromatografijom na nosaču s imobiliziranim metalnim ionom. Polihistidinski privjesak je aminokiselinski motiv koji se sastoji od najčešće 6 uzastopnih histidina koji se mogu nalaziti na C- ili N- kraju proteina. Budući da His-privjesak ne utječe na strukturu i funkcioniranje proteina u našem slučaju, izrazito je pogodan za odvajanje željenog proteina od ostatka proteinskog ekstrakta. Nitrilotriocetna kiselina (NTA) je tetradentatni kelirajući adsorbens koji zauzima četiri koordinacijska mjesta Ni²⁺ iona, dok dva koordinacijska mjesta ostaju slobodna za interakciju s imidazolnim prstenovima dvaju susjednih histidina sadržanih u polihistidinskom privjesku (Slika 12). Kao punilo za kolone koristi se Ni-NTA agaroz koji se sastoji od Sepharoze CL-6B na koju je vezana Ni-NTA. Kapacitet smole je 5 - 10 mg proteina po mililitru.



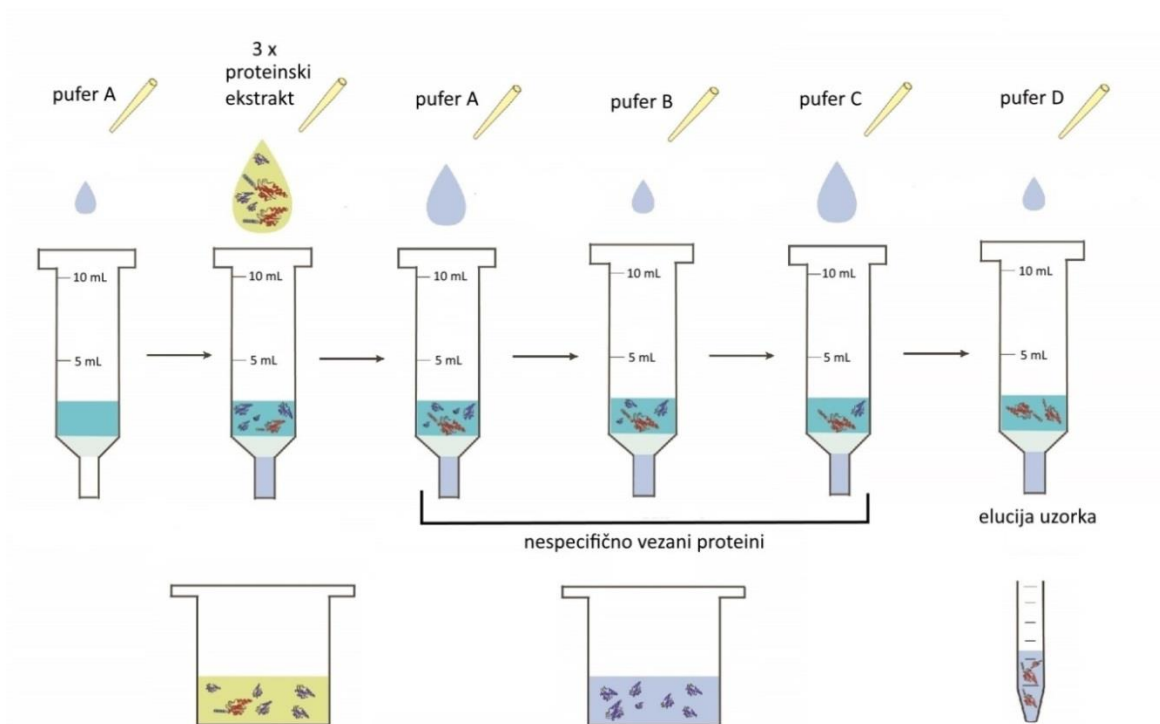
Slika 12. (a) struktura NTA (nitrilotriocetene kiseline). (b) prikaz interakcije bočnih ogranaka histidinskog privjeska s ionom nikla u Ni²⁺-NTA agarozu. Preuzeto i prilagođeno s http://www.nature.com/app_notes/nmeth/2008/081305/fig_tab/an5492_F1.html.

Elucija željenog proteina postiže se ispiranjem s puferom koji sadrži veliku koncentraciju imidazola koji se kompetitivno veže na Ni^{2+} ione te time omogućuje otpuštanje željenog proteina s kolone. Sva četiri pufera (A, B, C i D) korištena za pročišćavanje proteina imaju temeljno jednak sastav: 20 mmol dm^{-3} HEPES $\text{pH} = 7,5$, 500 mmol dm^{-3} NaCl, 5 mmol dm^{-3} MgCl_2 i 10 mmol dm^{-3} β -merkaptoetanol. Puferi se razlikuju samo po rastućoj koncentraciji imidazola. U puferu A koncentracija imidazola je 10 mmol dm^{-3} , u puferu B 20 mmol dm^{-3} , u puferu C 30 mmol dm^{-3} , a u puferu D 200 mmol dm^{-3} . Rastuće koncentracije imidazola u puferima A - C omogućuju ispiranje nespecifično vezanih proteina s kolone, dok velika koncentracija imidazola u posljednjem ispiranju s puferom D omogućuje eluciju željenog proteina s histidinskim privjeskom.

Prethodno dobiven talog stanica resuspendiran je u 10 mL pufera sastava: 20 mmol dm^{-3} HEPES $\text{pH} = 7,5$, 500 mmol dm^{-3} NaCl, 5 mmol dm^{-3} β -merkaptoetanol i 1 mmol dm^{-3} PMSF koji je inhibitor serinskih proteaza. Nakon resuspendiranja staničnog taloga dodana je DNaza-a do konačne koncentracije od 3 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ te lizozim do konačne koncentracije od 50 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$. Lizozim je dodan u svrhu boljeg razaranja stanica. Uzorak je potom soniciran u pet navrata po 30 sekundi s 30 sekundi pauze između obroka. Soniciranje je provedeno na ledu kako se uzorak ne bi previše zagrijao.

Dobiveni uzorak je centrifugiran 1 sat na $10000 \times g$, nakon čega je uzet supernatant i prebačen u čistu plastičnu epruveticu.

Kolona napunjena s 1 mL Ni-NTA prvo je isprana s 10 mL redestilirane vode te je potom uravnotežena u 10 mL pufera A. Da bi se postiglo što bolje vezanje proteina s histidinskim privjeskom, proteinski ekstrakt je 3 puta propušten kroz kolonu. Kako bi se uklonili nevezani proteini, kolona je isprana s 30 mL pufera A, a zatim s 10 mL pufera B i 10 mL pufera C čime su se uklonili i slabo vezani proteini (Slika 13). Željeni protein je s kolone eluiran s 6 mL pufera D. Postupak pročišćavanja proteina proveden je u hladnoj sobi na $4 \text{ }^\circ\text{C}$.



Slika 13. Shematski prikaz pročišćavanja proteina afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu. Preuzeto i prilagođeno s http://2015.igem.org/Team:Freiburg/Project/Protein_Purification.

4.2.2.3. Koncentriranje proteina ultrafiltracijom

Dobiveni proteinski uzorci su nakon afinitetne kromatografije bili previše razrijeđeni te ih je bilo potrebno ukoncentrirati metodom ultrafiltracije. Metoda ultrafiltracije zasniva se na filtraciji proteinskog uzorka kroz membranu koja sadrži pore određene veličine koje pod utjecajem centrifugalne sile propuštaju sve čestice manje od dimenzije pora, dok sve čestice veće od dimenzija pora zaostaju na površini membrane. Ultrafiltracija je provedena centrifugiranjem pri $5000 \times g$ i $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Korišten je Amicon® Ultra centrifugal filters (*Milipore*) s porama kroz koje prolaze samo čestice manje od 30 kDa.

4.2.2.4. Izmjena otapala proteina dijalizom

Proteinski uzorak je stavljen u celulozno crijevo za dijalizu i zatvoren sterilnim kvačicama. Cijeli sustav je potom smješten u čašu u kojoj se nalazi pufer za dijalizu sastava: 20 mmol dm^{-3} HEPES $\text{pH} = 7,5$, 50 mmol dm^{-3} NaCl, 20 mmol dm^{-3} MgCl₂ i glicerol $\varphi=10 \%$ (glicerol je dodan u svrhu

čuvanja proteina pri niskim temperaturama). Dijaliza je provedena preko noći u hladnoj sobi pri 4 °C, uz mješanje na magnetskoj mješalici. Proteini su nakon dijalize pohranjeni na -80 °C.

4.2.2.5. Određivanje koncentracije proteina pomoću spektrofotometra NanoDrop 1000

Koncentracija proteina mjerena je na spektrofotometru NanoDrop 1000 pri valnoj duljini od 280 nm. Za mjerenje koncentracije potrebno je nanijeti 2 µL uzorka na postolje instrumenta te u program spektrofotometra unijeti molarni ekstinkcijski koeficijent i molekulsku masu ispitivanog proteina. Kao slijepa proba za nuliranje instrumenta koristi se pufer u kojem se nalazi protein. Rezultati mjerenja su apsorpcijski spektar i koncentracija uzorka proteina izražena u mg mL⁻¹, izračunata pomoću Beer-Lambertovog zakona prema kojem je apsorbancija uzorka jednaka umnošku molarnog ekstinkcijskog koeficijenta, duljine puta koji svjetlost prelazi i koncentracije uzorka ($A = \epsilon \times I \times c$). Za Wt LeuRS molarni ekstinkcijski koeficijent iznosi 169765 M⁻¹ cm⁻¹, dok je vrijednost molarne mase 99397,08 g mol⁻¹ (vrijednosti su izračunate pomoću online alata ProtParam <http://web.expasy.org/protparam/>).

4.2.3. Ispitivanje aminoaciliranja analoga tRNA^{Leu} leucil-tRNA-sintetazom

4.2.3.1. Reakcija aminoaciliranja

Varshney i suradnici (1991.) su pokazali da je moguće odvojiti aminoaciliranu-tRNA od deacilirane tRNA uz pomoć poliakrilamidnih gelova u kiselim uvjetima pri čemu aminoacilirana tRNA putuje kroz gel sporije nego deacilirana tRNA. Kiseli uvjeti ovdje osiguravaju stabilizaciju esterske veze između aminokiseline i molekule RNA. Ova tehnika omogućuje praćenje uspješnosti aminoaciliranja analoga tRNA, bez upotrebe radioaktiviteta.

tRNA je renaturirana prethodno opisanim postupkom (poglavlje 4.2.1.17). Reakcijska aminoacilacijska smjesa u 10 µL ukupnog volumena sadržavala je: 5 × pufer (0,001 mol dm⁻³ DTT, 0,01 mol dm⁻³ KCl, 0,25 mol dm⁻³ HEPES, 0,02 MgCl₂ mol dm⁻³), 8,5 µmol dm⁻³ tRNA, 0,01 mol dm⁻³ ATP, 0,5 mmol dm⁻³ leucin i 0,25 µmol dm⁻³ Wt LeuRS. U slučaju kontrole je umjesto enzima dodana redestilirana voda. Reakcija je inkubirana 10 minuta na 37 °C. Po završetku reakcije, u reakcijsku smjesu je dodano 1 µL 3 mol dm⁻³ natrijevog acetata pH = 5,2 u svrhu zaustavljanja reakcije, te 10 µL boje za nanošenje na gel sastava: 100 mmol dm⁻³ natrijev acetat pH = 5,2, 7 mol dm⁻³ ureja, 0,05 % (w/v) bromfenol plavo, φ = 1 % glicerol.

4.2.3.2. Elektroforeza na kiselim poliakrilamidnim gelovima

Eksperimentalno je ustvrđeno da je za vizualizaciju sva tri analoga tRNA^{Leu} optimalan 6 % (w/v) poliakrilamidni kiselni gel koji sadrži: 100 mmol dm⁻³ natrijev acetat pH = 5,2, 6 mol dm⁻³ ureju, akrilamid:bisakrilamid 19 : 1, 6 % (w/v), 0,86 mg mL⁻¹ APS, TEMED 0,05 % (w/v). Korištene su razmaknice debljine 0,75 mm i gelovi dimenzije 10 × 7,3 i 17 × 16,5 cm. Jažice gela su prije nanošenje uzorka isprane elektroforetskim puferom koji sadrži 100 mmol dm⁻³ natrijev acetat pH vrijednosti 5,2.

Elektroforeza na gelu dimenzije 17 × 16,5 cm i debljine 0,75 mm provođena je 2 sata pri 400 V, a elektroforeza na malim gelovima sat vremena, pri 120 V dok je jakost električnog polja iznosila oko 10 - 12 V cm⁻¹.

Gel je nakon elektroforeze bojan srebrom (opisano u poglavlju 4.2.3.3.) ili toluidinskim modrilom. U slučaju bojanja toluidinskim modrilom gel je inkubiran u toluidinskom modrilu 15 minuta na tresilici, a odbojavan kuhanjem 10 minuta u destiliranoj vodi koja je prethodno zagrijana do temperature vrenja.

4.2.3.3. Bojanje RNA srebrom u poliakrilamidnim denaturirajućim gelovima

U svrhu bolje detekcije aminoaciliranih analoga tRNA^{Leu}, gel je nakon elektroforeze bojan srebrom. Bojanje srebrom je osjetljivija metoda bojanja koja ima osjetljivost od 1 ng RNA po vrpici.

U prvom koraku fiksacije gel je uronjen 3 minute u otopinu $\varphi = 50$ % etanola i $\varphi = 12$ % octene kiseline, dok je u drugom koraku fiksacije uronjen 30 minuta u otopinu $\varphi = 10$ % etanola i $\varphi = 5$ % octene kiseline. Gel je potom namakan 5 minuta u otopini koja sadrži 3,4 mol dm⁻³ kalijevog bikromata (K₂Cr₂O₇) i 3,2 mol dm⁻³ dušične kiseline, a zatim 20 minuta u vodenoj otopini 12 mmol dm⁻³ srebra. Između svakog od ovih koraka gel je ispran u redestiliranoj vodi, posebice nakon namakanja gela u otopini kalijevog bikromata gdje je potrebno ispirati gel sve dok se u potpunosti ne ukloni žuto obojenje.

Nakon ispiranja na gel je dodan predrazvijač, koji sadrži 0,28 mol dm⁻³ natrijev karbonat i $\varphi = 0,01$ % formaldehid, u tri obroka. Gel je protresan prilikom dodavanja svakog obroka predrazvijača dok se nije pojavio bijelo-sivi talog koji je odsisan vakuum-sisaljkom. Nakon toga gel je ispran u redestiliranoj vodi, nakon čega je dodan razvijač koji sadrži 0,28 mol dm⁻³ natrijevog karbonata i $\varphi = 0,05$ % formaldehid. Gel je protresan sve dok se nisu pojavile pruge. Razvijač je uklonjen

vakuum-sisaljkom te je dodana otopina za zaustavljanje razvijanja, koja sadrži $\varphi = 1\%$ octenu kiselinu. Nakon pet minuta gel je ispran u redestiliranoj vodi.

4.2.4.1. Gel-retardacijska elektroforeza kompleksa LeuRS i analoga tRNA

Za analizu kompleksa proteina i analoga tRNA^{Leu} korištena je gel-retardacijska elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u nativnim uvjetima. Ispitivanje interakcija proteina i nukleinskih kiselina ovom metodom temelji se na manjoj elektroforetskoj pokretljivosti nukleinske kiseline koja se nalazi u kompleksu s proteinom u odnosu na slobodnu nukleinsku kiselinu, te na većoj pokretljivosti proteina koji je u kompleksu s nukleinskom kiselinom, u odnosu na slobodan protein.

U svrhu dobivanja tRNA^{Leu} kompleksa i analoga tRNA^{Leu} isprobana su tri uvjeta u kojima je promijenjeno: elektroforetski pufer, pufer u kojem se provodi kompleksiranje, temperatura pri kojoj se odvijala elektroforeza te omjer molekula tRNA i enzima.

1. Uvjet: u prvom pokušaju reakcijska smjesa konačnog volumena od 10 μL sastojala se od: 0,35 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ cjelovite tRNA^{Leu} ili analoga tRNA^{Leu}, 1 \times pufera za kompleksiranje (sastav 5 \times pufera za kompleksiranje: 50 mmol dm^{-3} Tris pH = 8,0, 300 mmol dm^{-3} NaCl, 5 mmol dm^{-3} β -merkaptioetanol) i 0,1 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ enzima Wt LeuRS. Reakcija je inkubirana 10 minuta na sobnoj temperaturi, a potom je dodano 2 μL boje za nanošenje uzorka sastava: $\varphi = 25\%$ glicerol i 0,05 % (w/v) bromfenol plavo.

Za analizu kompleksa korišten je 9 % i 6 % gel debljine 0,75 mm. Sastava gela je: 6 % ili 9 % (w/v) akrilamid:bisakrilamid 29 : 1, 1 \times elektroforetski pufer (sastav 10 \times elektroforetskog pufera: 0,5 mol dm^{-3} Tris, 2,9 % (w/v) octena kiselina), 0,05 % (w/v) TEMED, 0,7 mg mL^{-1} APS. Korišten je elektroforetski pufer sastava: 0,025 mol dm^{-3} Tris titriran octenom kiselinom do pH vrijednosti 8,0.

Elektroforeza je provedena na sobnoj temperaturi, 1 sat i 30 minuta pri 120 V. Gel je bojan toluidinom 15 minuta uz stalno protresanje, a zatim odbojan kuhanjem u vodi prethodno zagrijanoj do temperature vrenja.

2. Uvjet: u drugom pokušaju reakcijska smjesa konačnog volumena od 12 μL je sadržavala: 0,35 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ cjelovite tRNA^{Leu} ili analoga tRNA^{Leu} (renaturiranog postupkom opisanim u poglavlju 4.2.1.17.), 0,1 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ enzima Wt LeuRS i pufer za kompleksiranje sastava: 0,1 mol dm^{-3} HEPES pH 7,0, 1 mmol dm^{-3} DTT, 10 mmol dm^{-3} KCl, 20 mmol dm^{-3} MgCl₂. Reakcija je nakon miješanja ohlađene renaturirane tRNA, enzima i pufera za kompleksiranje inkubirana 10 minuta na 37 °C.

Nakon inkubacije uzorci su pomiješani s 2 μL boje za nanošenje uzoraka sastava $\varphi = 25\%$ glicerol i 0,05 % (w/v) bromfenol plavo.

Uzorci su nanoseni na poliakrilamidni gel debljine 1,5 mm sastava: 9 % (w/v) akrilamid:bisakrilamid 29:1, 1 \times koncentriran Tris-acetatni pufer za elektroforezu u nativnim uvjetima (sastav 20 \times koncentriranog pufera: 0,5 mol dm^{-3} Tris, 0,1 mol dm^{-3} MgCl_2 , 2,9 % (w/v) octene kiseline), 0,07 % (w/v) APS i 0,1 % (w/v) TEMED. Korišten je elektroforetski pufer sastava: 0,025 mol dm^{-3} Tris (titrirano octenom kiselinom do pH vrijednosti 6,17 na sobnoj temperaturi) i 5 mmol dm^{-3} MgCl_2 .

Elektroforeza je provedena na sobnoj temperaturi pri 120 V, 2 sata. Poliakrilamidni gel je bojan u Coomassie BB boji 15 minuta uz stalno protresanje. Gel je odbojan kuhanjem 10 minuta u destiliranoj vodi prethodno zagrijanoj do temperature vrenja.

3. Uvjet: prije inkubiranja s enzimom, tRNA je renaturirana kao i u 2. uvjetu. Nakon što se tRNA ohladila do sobne temperature pomiješana je s enzimom Wt LeuRS i puferom za kompleksiranje sastava: 0,1 mol dm^{-3} HEPES pH 7,0, 1 mmol dm^{-3} DTT, 10 mmol dm^{-3} KCl, 20 mmol dm^{-3} MgCl_2 . U konačnici je reakcijska smjesa konačnog volumena od 12 μL sadržavala: 2,5 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ tRNA^{Leu}, 3,4 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ Wt LeuRS i pufer za kompleksiranje.

Reakcijska smjesa je prije miješanja s bojom za nanošenje na gel inkubirana 10 minuta pri 37 °C. Uzorci su potom pomiješani s 2 μL boje za nanošenje uzoraka sastava $\varphi = 25\%$ glicerol i 0,05 % (w/v) bromfenol plavo te nanoseni na 9 % gel, debljine 1,5 mm istog sastava kao i u drugom uvjetu. Korišten je elektroforetski pufer sastava 0,025 mol dm^{-3} Tris (titrirano octenom kiselinom do pH vrijednosti 6,68, pri 4 °C) i 5 mmol dm^{-3} MgCl_2 . Gel-elektroforeza je u ovom slučaju provedena u hladnoj sobi na 4°C, pri 120 V, 2 sata.

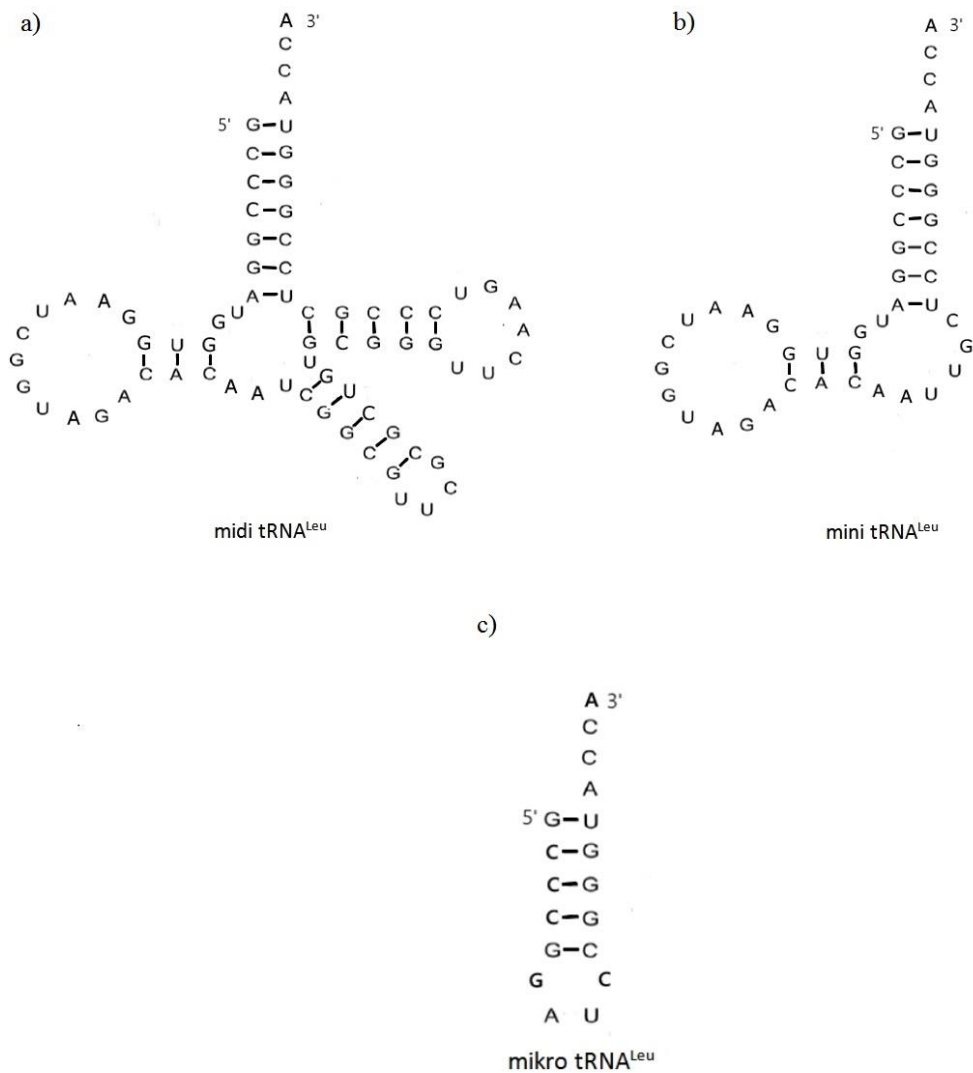
Kompleksi su ponovno detektirani bojanjem Coomassie BB bojom prema prethodno opisanom postupku.

Cijeli eksperiment je ponovljen, ovoga puta s oba analoga tRNA i cjelovitom tRNA^{Leu}. Gel je obojan srebrom prema postupku opisanom u poglavlju 4.2.3.3.

5. Rezultati

5.1. Dizajn analoga molekule tRNA^{Leu}

Analozi tRNA^{Leu} dizajnirani su prema saznanjima dobivenim iz kristalne strukture kompleksa tRNA^{Leu}:LeuRS (Palencia i sur, 2012) te prema prije određenim kinetičkim parametrima reakcije aminoacilacije serije analoga tRNA^{Leu} enzimom LeuRS (Larkin i sur, 2002). Iz primarne i sekundarne strukture je poznato, a kristalnom strukturom i potvrđeno, da antikodonska ruka i T ψ C-ruka ne sudjeluju u direktnoj interakciji s enzimom. Glavni identitetni elementi, važni za prepoznavanje pripadne tRNA^{Leu} (nukleotid A73 i nukleotid U16) nalaze se u akceptorskoj peteljci odnosno u D-ruči. Zanimljivo je da iako kristalna struktura pokazuje interakciju varijabilne ruke tRNA^{Leu} s enzimom u aminoacilacijskom produktivnom kompleksu, kinetički podaci analoga bez varijabilne ruke (- Δ VT) pokazuju da se on može vrlo uspješno aminoacilirati (Tablica 12) (Larkin i sur, 2002). Također, dobiveni kinetički podaci za analog kojem nedostaje D-ruka ukazivali su na važnost očuvanja tercijalne interakcije između T ψ C-ruke i D-ruke (rezultati nisu prikazani) (Larkin i sur, 2002). S obzirom na te podatke, dizajnirali smo tri analoga: (1) analog kojem nedostaje antikodonska ruka (nazvan midi tRNA^{Leu}), (2) analog koji sadrži D-ruku i akceptorsku peteljku (mini tRNA^{Leu}), (3) analog koji sadrži samo akceptorsku peteljku (mikro tRNA^{Leu}) (Slika 14). Treći osmišljeni analog koji sadrži samo akceptorsku peteljku dizajnirali smo u svrhu pronalaska najmanje moguće molekule RNA, koja sadrži važnu diskriminatorSKU bazu A73, a koja može sudjelovati u reakciji aminoacilacije i deacilacije koju provodi LeuRS.



Slika 14. Sekundarne strukture analoga tRNA^{Leu} konstruiranih na temelju radova Palencia i sur. (2012) te Larkina i sur. (2002); (a) midi tRNA^{Leu}, (b) mini tRNA^{Leu}, (c) mikro tRNA^{Leu}.

5.2. Osmišljavanje početnica

Osmišljene su uzvodne i nizvodne oligonukleotidne početnice za svaki od dizajniranih analoga. Komplementarnim sparivanjem naručenih oligonuklotidnih sljedova dobiveni su ljepljivi krajevi koji odgovaraju ljepljivim krajevima koji nastaju cijepanjem restrikcijским enzimima EcoRI i XbaI. Nakon sekvence koja kodira za mjesto cijepanja RE EcoRI umetnut je promotorski slijed za T7-RNA-polimerazu što omogućuje umnažanje željene sekvence analoga molekule tRNA^{Leu} postupkom *in vitro* transkripcije uz T7-RNA-polimerazu. Budući da je plazmidni vektor pUC18 u svrhu ugradnje

oligonukleotida pocijepan RE EcoRI i XbaI osigurano je očuvanje tih restrikcijskih mjesta nakon ugradnje komplementarno sparenih oligonukleotida u plazmidni vektor. Nakon umnažanja plazmida prekonocnom bakterijskom kulturom plazmidni vektor je pročišćen i pocijepan RE BstNI koji cijepa nakon nukleotidnog slijeda za željeni analog čime je osigurana terminacija transkripcije i dobivanje finalnog nukleotida A76. Ukoliko plazmid ne bi bio pocijepan iza posljednjeg nukotida sekvence koja kodira za pojedini analog ne bi bilo moguće ostvariti terminaciju transkripcije jer u ovom sustavu nema slijeda za transkripcijski terminator, te bi se transkripcija nastavila sve do slučajne disocijacije T7-RNA-polimeraze s plazmidnog vektora.

mikro tRNA^{Leu}

uzvodna početnica: 5'- AATTCTAATACGACTCACTATAGCCCGGATCCGGGTACCAGGT – 3'

nizvodna početnica: 5'- CTAGACCTGGTACCCGGATCCGGGCTATAGTGAGTCGTATTAG - 3'

mini tRNA^{Leu}

uzvodna početnica: 5'-

AATTCTAATACGACTCACTATAGCCCGGATGGTGGGAATCGGTAGACACAATT

GCTCCGGGTACCAGGT -3'

nizvodna početnica: 5'-

CTAGACCTGGTACCCGGAGCAATTGTGTCTACCGATTCCACCATCCGGGCTA

TAGTGAGTCGTATTAG -3'

midi tRNA^{Leu}

uzvodna početnica: 5'-

AATTCTAATACGACTCACTATAGCCCGGATGGTGGGAATCGGTAGACACAATC

GGCGTTCGCGCTGTGCGGGTTCAAGTCCCGCTCCGGGTACCAGGT -3'

nizvodna početnica: 5'-

CTAGACCTGGTACCCGGAGCGGGACTTGAACCCGCACAGCGGAACGCCGA

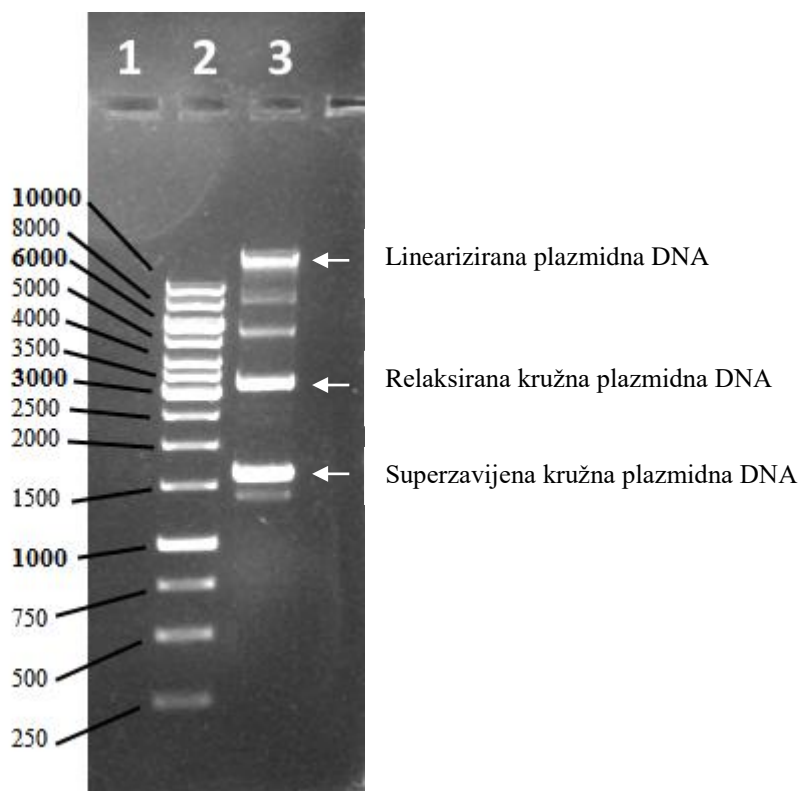
TTGTGTCTACCGATTCCACCATCCGGGCTATAGTGAGTCGTATTAG -3'

Legenda:

- EcoRI
- promotor T7-RNA- polimeraze
- BstNI
- XbaI
- sekvenca analoga tRNA^{leu}

5.3. Izolacija plazmidne DNA

Plazmidna DNA (plazmidni vektor pUC18) je iz bakterijskog soja DH5 α prvo izolirana komercijalnim kompletom QIAprep Spin Miniprep Kit prema uputama proizvođača. Dobivena koncentracija pročišćenog pUC18 plazmida izmjerena je na uređaju NanoDrop 1000 pri valnoj duljini od 260 nm te iznosi 15,17 μ g ($260/280 = 1,6$; $260/230 = 1,88$). Uspješnost izolacije i čistoća dobivenog uzorka dodatno je provjerena na 1 % agaroznom gelu bojanjem s EtBr (Slika 15). Elektroforezom je potvrđeno da je plazmidna DNA dobro izolirana.



Slika 15. Provjera čistoće izoliranog plazmida na 1 % agaroznom gelu bojanjem s EtBr. U jažicu označenu brojem 2 nanesen je standard *Thermo Scientific GeneRuler 1kb DNA Ladder*, u jažicu označenu brojem 3 nanesen je uzorak s izoliranom plazmidnom DNA. Jažica 1 je služila kao

negativna kontrola. Gel je snimljen pod UV svjetlom ($\lambda = 302 \text{ nm}$) transiluminatora DNR, *Bio-Imaging Systems Ltd.* povezanog s računalom.

5.4. Razgradnja plazmidne DNA, priprema ligacijske smjese i transformacija bakterijskih stanica metodom elektroporacije

Nakon pročišćavanja QIAprep Spin Miniprep Kit kompletom, plazmidna DNA je razgrađena restriktivnim enzimima EcoRI i XbaI u svrhu dobivanja ljepljivih krajeva koji će omogućiti ugradnju dizajniranih oligonukleotida. Smjesa razgrađenog plazmidnog vektora pročišćena je uz pomoć QIAquick Gel Extraction Kit (*Qiagen*) kompleta za izolaciju DNA iz agaroznih gelova (bez prethodnog postupka razdvajanja dobivenih produkata razgradnje agaroznom gel elektroforezom). Dobivena masa pročišćenog i razgrađenog plazmida, izmjerena na uređaju NanoDrop 1000 pri 260 nm iznosila je 1,6 μg ($260/280 = 1,88$; $260/230 = 0,09$).

Na 5' -krajeve oligonukleotida dodane su fosfatne skupine kako bi se omogućila ugradnja u linearizirani plazmidni vektor. Nakon toga pripremljena je ligacijska smjesa koja omogućuje ugradnju dizajniranih oligonukleotida u MCS plazmidnog vektora.

Bakterije su transformirane dobivenim plazmidnim konstruktima metodom elektroporacije, nakon čega su nasadene na krutu hranjivu podlogu s ampicilinom. Time su odmah eliminirane bakterijske stanice koje nisu primile nitikakav plazmid, budući da se upravo na plazmidu pUC18 nalazi gen za otpornost na ampicilin. Na pločama s ampicilinom odabrano je po 10 bakterijskih kolonija za svaki plazmidni konstrukt na kojima će se provesti PCR reakcija.

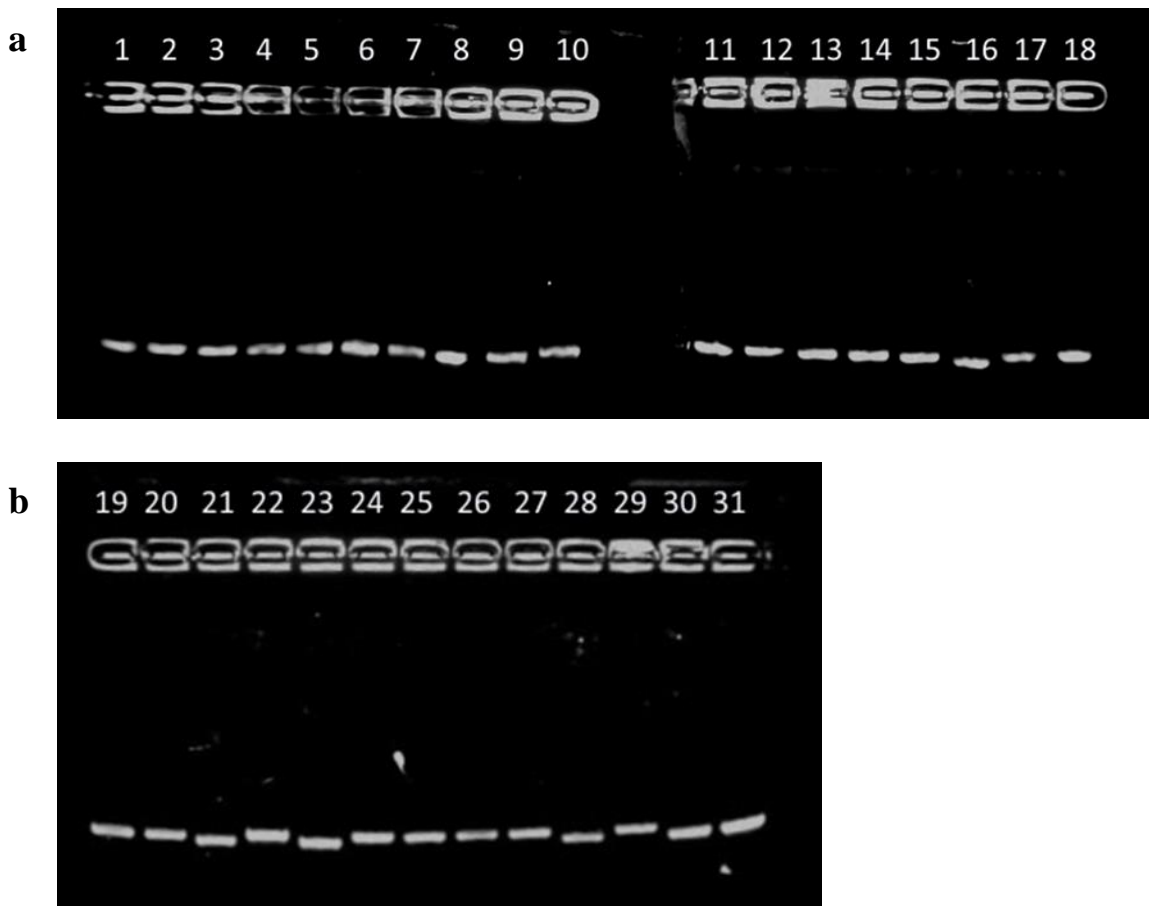
5.5. PCR na bakterijskim kolonijama (eng. colony PCR)

PCR reakcijom je provjerena ugradnja inserta za analoge mikro tRNA^{Leu}, mini tRNA^{Leu} i midi tRNA^{Leu} u plazmidni vektor pUC18. Za PCR reakciju korištene su početnice (Tablica 3), koje se vežu ispred MCS plazmidnog vektora pUC18 i omogućuju umnožavanje samo MCS-a odnosno inserta ugrađenog u MCS. Nakon PCR reakcije dobiveni produkti razdvojeni su na 1 % agaroznom gelu. Prema razlici u duljini dobivenog produkta (tj. prema razlici u brzini putovanja produkta na agaroznom gelu) može se uočiti razlika između intaktnog MCS-a i MCS-a u kojemu se ugradio oligonukleotid koji kodira za određeni analog tRNA^{Leu}.

Na slikama agarozne gel-elektroforeze (Slika 16 (a) i (b)) PCR produkata vidljiva je razlika u brzini putovanja na gelu između kontrolnog uzorka i nekih PCR produkata u kojima je došlo do ugradnje željenog inserta. Kontrolni uzorak sadrži samo plazmidnu DNA s intaktnim MCS-om.

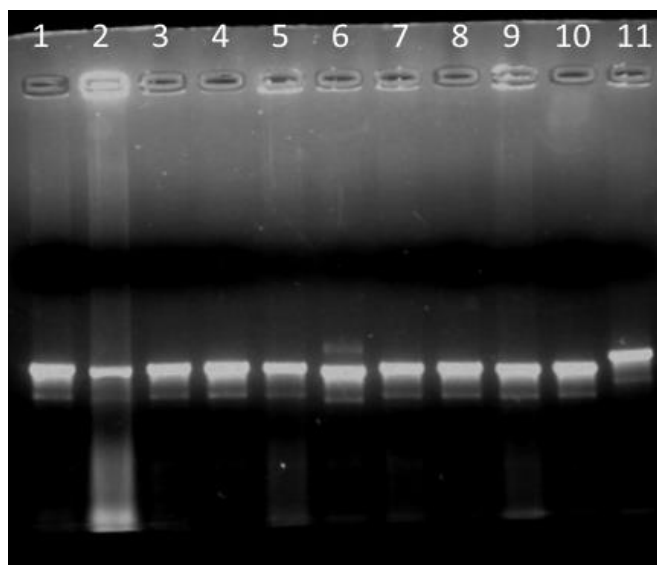
Rezultati nisu bili sasvim jasni za plazmid u kojem se očekivao insert za mikro tRNA^{Leu}, budući da je razlika u duljini intaktnog MCS-a i MCS-a s ugrađenom sekvencom za mikro tRNA^{Leu} mala. Stoga je elektroforeza ponovljena na 1,5 % gelu. Rezultati ponovljene agarozne gel-elektroforeze prikazani su na Slici 17.

Zaključeno je da je u slučaju analoga mini tRNA^{Leu} do ugradnje došlo u svim slučajevima osim u uzorku nanesenom u jažicu 16 (Slika 16). Oligonukleotid koji kodira za midi tRNA^{Leu} nije se ugradio jedino u bakterijskim kolonijama pod brojem 21, 23, 28 i 30 (Slika 16). Nakon ponovljene elektroforeze inserta za mikro tRNA^{Leu} zaključeno je da je do ugradnje došlo u bakterijskim kolonijama nanesenim u jažice 1, 3, 4, 5, 7, 8 i 11 (Slika 17), premda su rezultati bili prilično nejasni.



Slika 16. Elektroforeza uzoraka dobivenih PCR reakcijom na 1 % agaroznom gelu. Plazmidi u kojima se očekuju inserti za mikro tRNA^{Leu} nalaze se u jažicama označenim brojevima od 2 do 10 (a). Bakterijske kolonije nanesene u jažice pod rednim brojevima od 11 do 15 i od 17 do 20 primile su

plazmid koji sadrži insert za mini tRNA^{Leu} (a i b). Također, bakterijske kolonije nanese u jažice označene bojevima 22, 24 , 25, 26, 27, 29 uspješno transformirane plazmidnim konstruktom koji sadrži insert za midi tRNA^{Leu}. U jažice označene brojevima 1 i 31 nanese su kontrolni uzorci (plazmid pUC18 s intaktnim MCS). Uzorci su detektirani bojanjem etidijevim bromidom te promatranjem pod UV svjetlom ($\lambda = 302 \text{ nm}$) transiluminatora DNR, *Bio-Imaging Systems Ltd.* povezanog s računalom.



Slika 17. Elektroforeza uzoraka dobivenih PCR reakcijom na 1,5 % agaroznom gelu. Plazmidi u kojima se očekuju inserti za mikro tRNA^{Leu} nalaze se u jažicama označenima brojevima 1,3, 4, 5 te u jažicama 7, 8 i 11. U jažicu 6 nanese je kontrolni uzorak (pUC18 s intaktnim MCS). Uzorci su detektirani bojanjem etidijevim bromidom te promatranjem pod UV svjetlom ($\lambda = 302 \text{ nm}$) transiluminatora DNR, *Bio-Imaging Systems Ltd.* povezanog s računalom.

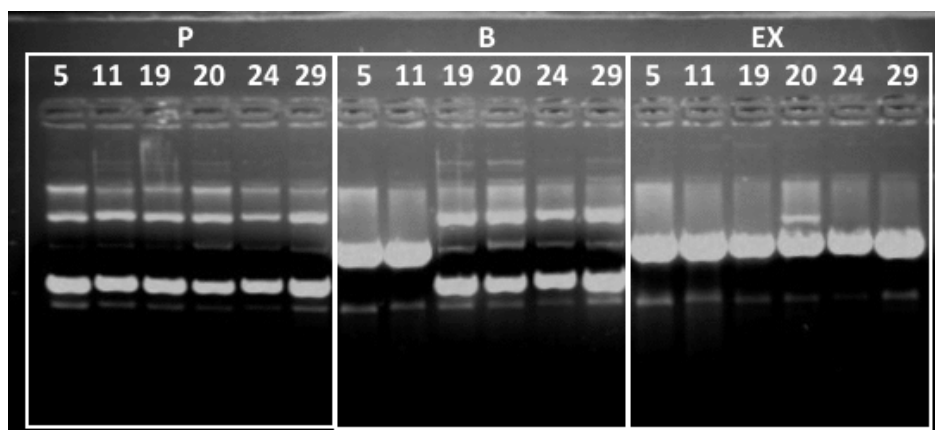
Prema rezultatima prikazanim na Slici 17 odabrane su bakterijske kolonije 5 i 10 za mikro tRNA^{Leu}, a prema rezultatima sa Slike 16 bakterijske kolonije 19 i 20 za mini tRNA^{Leu}, te 24 i 29 za midi tRNA^{Leu}. Odabrane kolonije su uzgojene prekonoćnom kulturom u 5 mL LB medija s ampicilinom, nakon čega je izolirana plazmidna DNA te provjerena ugradnja oligonukleotida restrikcijskom analizom.

5.6. Provjera pravilne ugradnje oligonukleotida u plazmidni vektor restriksijskom analizom

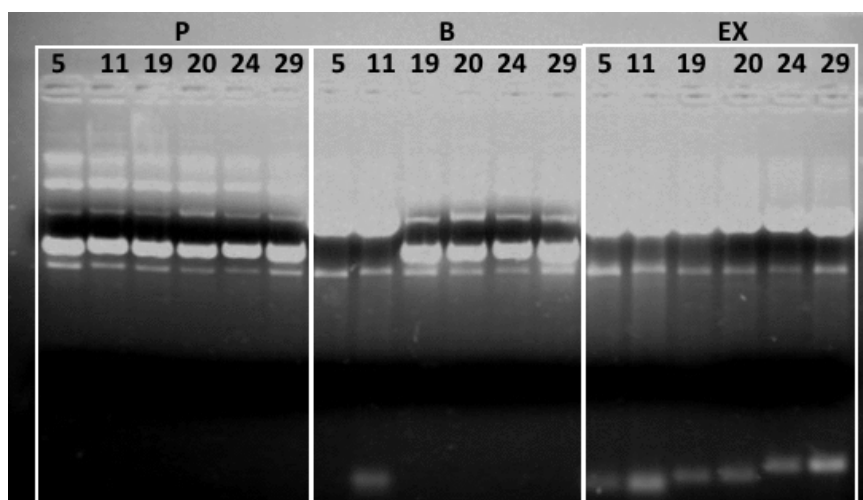
Kako bi se dodatno provjerila pravilna ugradnja oligonukleotida u plazmidni vektor napravljena je razgradnja plazmidne DNA, izolirane iz bakterijskih kolonija odabranih nakon PCR reakcije na bakterijskim kolonijama, uz pomoć tri restriksijska enzima: BamHI, XbaI i EcoRI. Prva reakcijska smjesa sadržavala je RE EcoRI i XbaI (označeno kao reakcijska smjesa EX). Druga reakcijska smjesa sadržavala je RE BamHI (označeno kao reakcijska smjesa B). RE BamHI u slučaju pravilne ugradnje oligonukleotidne sekvence za mini tRNA^{Leu} i midi tRNA^{Leu} ne bi trebao cijepati plazmid, budući da se to restriksijsko mjesto izgubilo ugradnjom željenog oligonukleotida. Mikro tRNA^{Leu} sekvenca, s druge strane, sadrži restriksijsko mjesto BamHI zbog čega će se cijepanjem RE BamHI plazmidni konstrukt linearizirati. XbaI i EcoRI u slučaju pravilne ugradnje oligonukleotida koji kodiraju za pojedine analoge cijepaju na krajevima oligonukleotidne sekvence što omogućuje usporedbu duljine ugrađenog fragmenta između uzoraka na agaroznoj gel elektroforezi.

Prema rezultatima na Slici 18 za dobivanje mikro tRNA^{Leu} odabrana je bakterijska kolonija čiji je plazmidni konstrukt nanesen u jažicu označenu brojem 5, budući da se na gelu pri većoj ekspoziciji vidi dodatna pruga u uzorku nanesenom u jažicu 10 (dodatna pruga vidljiva je na Slici 19). Dodatna pruga može biti posljedica dvostruke ugradnje oligonukleotidne sekvence. Takav plazmidni konstrukt tada bi sadržavao dva restriksijska mjesta za BamHI, što u konačnici dovodi do dobivanja manjeg fragmenta cijepanjem RE BamHI koji na gelu putuje izrazito brzo. Za dobivanje mini tRNA^{Leu} odabrana je bakterijska kolonija čiji je plazmidni konstrukt nanesen u jažicu označenu brojem 19 zbog nepoznate dodatne pruge u uzorku nanesenom u jažicu 20 (Slika 18). Za dobivanje midi tRNA^{Leu} nasumično je odabrana bakterijska kolonija čiji je plazmidni konstrukt nanesen u jažicu označenu brojem 24, budući da obje kolonije sadrže ispravno ugrađenu oligonukleotidnu sekvencu.

Ispravnost odabranih plazmidnih konstrukata označenih brojevima dodatno je potvrđena sekvenciranjem.



Slika 18. Rezultati razdvajanja uzoraka dobivenih razgradnjom RE agaroznom gel-elektroforezom na 1,5 % agaroznom gelu. Prvih šest uzoraka nije tretirano restrikcijским enzimima (označeno slovom P), drugih šest je tretirano RE BamHI (označeno sa slovom B), a posljednjih šest sa smjesom RE EcoRI i XbaI (označeno s EX). Prve dvije jažice označene brojevima 5 i 11 u svakoj grupi sadrže uzorak plazmida za kojeg se pretpostavlja da sadrži sekvencu koja kodira za mikro tRNA^{Leu}, druge dvije jažice označene brojevima 19 i 20 sadrže uzorak plazmida za kojeg se pretpostavlja da sadrži sekvencu koja kodira za mini tRNA^{Leu}, a posljednje dvije jažice označene brojevima 24 i 29 sadrže uzorak plazmida za koje se pretpostavlja da sadrže sekvencu koja kodira za midi tRNA^{Leu}. Uzorci su detektirani bojanjem etidijevim bromidom te promatranjem pod UV svjetlom ($\lambda = 302 \text{ nm}$) transiluminatora DNR, *Bio-Imaging Systems Ltd.* povezanog s računalom.



Slika 19. Rezultati agarozne gel elektroforeze uzoraka dobivenih razgradnjom plazmida restrikcijским enzimima na 1,5 % agaroznom gelu. Slika prikazuje iste uzorke kao i na Slici 18 osim što je u ovom slučaju povećana ekspozicija prilikom snimanja gela.

5.7. Preparativna izolacija plazmida QIAfilter Plasmid Maxi Kit (*Qiagen*) kompletom

Bakterijske kolonije označene brojevima 19, 24 i 5 na Slici 18, koje sadrže sekvence za analoge tRNA^{Leu} su uzgojene prekonocnom kulturom u 250 mL tekućeg LB medija s ampicilinom, pri 37 °C uz stalno protresanje. Iz dobivenih prekonocnih kultura plazmida su izolirani QIAfilter Plasmid Maxi Kit (*Qiagen*) kompletom.

Dobivene su slijedeće količine plazmida: 780,43 µg mikro tRNA^{Leu} (260/280 = 1,85; 260/230 = 2,30), 505,53 µg mini tRNA^{Leu} (260/280 = 1,92; 260/230 = 2,59), 524,57 µg midi tRNA^{Leu} (260/280 = 1,88; 260/230 = 2,30).

5.8. Dobivanje lineariziranih DNA kalupa za željene analoge tRNA

U svrhu dobivanja lineariziranih DNA kalupa, plazmide pročišćene QIAfilter Plasmid Maxi Kit (*Qiagen*) kompletom smo razgradili restrikcijom enzimom BstNI koji cijepa na krajevima sekvenci za analoge tRNA^{Leu}. Time smo osigurali zaustavljanje T7-RNA-polimeraze nakon transkripcije gena za analoge tRNA^{Leu}.

Nakon razgradnje plazmida restrikcijom enzimom BstNI, te pročišćavanja dobivenih produkata ekstrakcijom fenol-kloroformom, dobivene su sljedeće količine lineariziranih DNA kalupa: 325,34 µg mikro tRNA^{Leu} (260/280 = 1,79; 260/230 = 2,19), 403,85 µg mini tRNA^{Leu} (260/280 = 1,821; 260/230 = 2,27), te 314,22 µg midi tRNA^{Leu} (260/280 = 1,60; 260/230 = 1,98).

5.9. Optimizacija uvjeta za reakciju *in vitro* transkripcije i preparativna *in vitro* transkripcija

U svrhu dobivanja analoga tRNA^{Leu} iz prethodno dobivenih lineariziranih DNA kalupa napravljena je reakcija *in vitro* transkripcije uz pomoć enzima T7-RNA-polimeraze, čiji je promotor ugrađen u plazmid ispred same sekvence za željeni analog tRNA^{Leu} (detaljno objašnjeno u poglavlju 5.2.). U svrhu postizanja optimalne enzimske aktivnosti isprobano je nekoliko uvjeta za reakciju *in vitro* transkripcije. Uvjeti su se razlikovali u količini MgCl₂, GMP-a, T7-RNA-polimeraze, tipu pufera i prisutnosti spermidina. Sve su reakcijske smjese nakon dodatka enzima T7-RNA-polimeraze inkubirane 4 sata na 37°C, pri stalnom miješanju od 300 rpm-a.

Probne *in vitro* transkripcije, u kojima se vršila optimizacija uvjeta, napravljene su samo s uzorkom mini DNA, iz razloga što je taj linearizirani DNA kalup izoliran u najvećoj količini u prethodnom koraku. Prvo su isprobani uvjeti navedeni u Tablici 7.

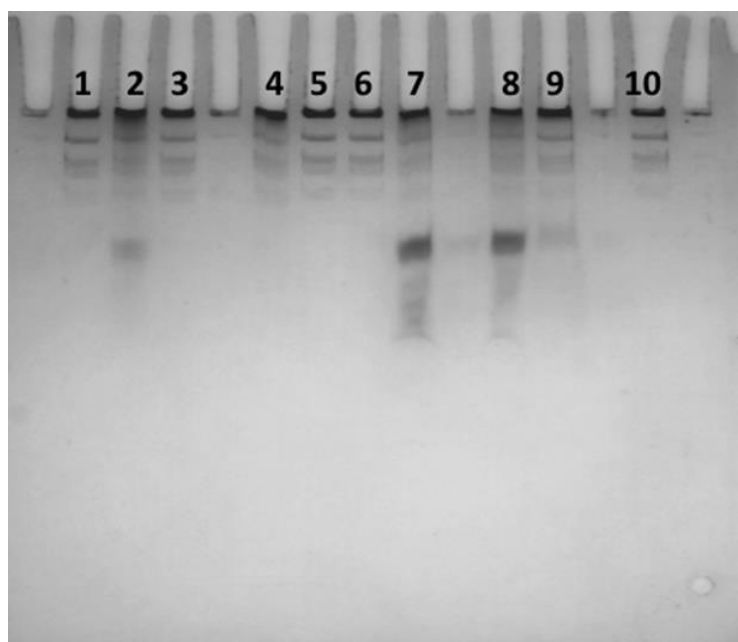
Produkti prve probne *in vitro* transkripcije analizirani su poliakrilamidnom gel-elektroforezom u denaturirajućim uvjetima (Slika 20) kako bi se dobio uvid u količinu nastalog produkta. Prema rezultatima prikazanim na Slici 20 je vidljivo da su uvjeti označeni brojevima 2,7 i 8 bili najuspješniji i dali najveći prinos RNA.

Tablica 7. Uvjeti za prvu seriju probne *in vitro* transkripcije. Dodana je i proteinska smjesa u konačnim koncentracijama prikazanim u Tablici 8. Ružičastom bojom je naznačeno što je promijenjeno u odnosu na uvjete pod brojem jedan.

UVJETI	NTP smjesa/ mmol dm ⁻³	Kalup/ g dm ⁻³	GMP/ mol dm ⁻³	MgCl ₂ / mol dm ⁻³	Tris/ mol dm ⁻³ , pH=8,0	Hepes/ mol dm ⁻³ , pH=7,6	Spermidin/ mol dm ⁻³
1.	4	0,1	0,0195	0,02	0,04	-	0,002
2.	2		0,0195	0,034	0,04	-	0,002
3.	6		0,0195	0,05	0,04	-	0,002
4.	4		0,0195	0,05	0,04	-	0,002
5.	4		-	0,02	0,04	-	0,002
6.	4		0,009	0,02	0,04	-	0,002
7.	4		0,0195	0,02	0,04	-	-
8.	4		0,0195	0,02	0,02	-	0,002
9.	4		-	0,012	-	0,1	0,002
10.	6		0,285	0,02	0,04	-	0,002

Tablica 8. Konačne koncentracije sastojaka proteinske smjese u reakcijskoj smjesi *in vitro* transkripcije.

Sastojak proteinske smjese	Konačna koncentracija
DTT	4 mmol dm ⁻³
BSA	0,5 mg dm ⁻³
Anorganska IPP-aza	0,5 U mL ⁻¹
RNazin	0,5 U μL ⁻¹
T7-RNA-polimeraza	3/100 ukupnog volumena reakcijske smjese (nepoznate koncentracije)

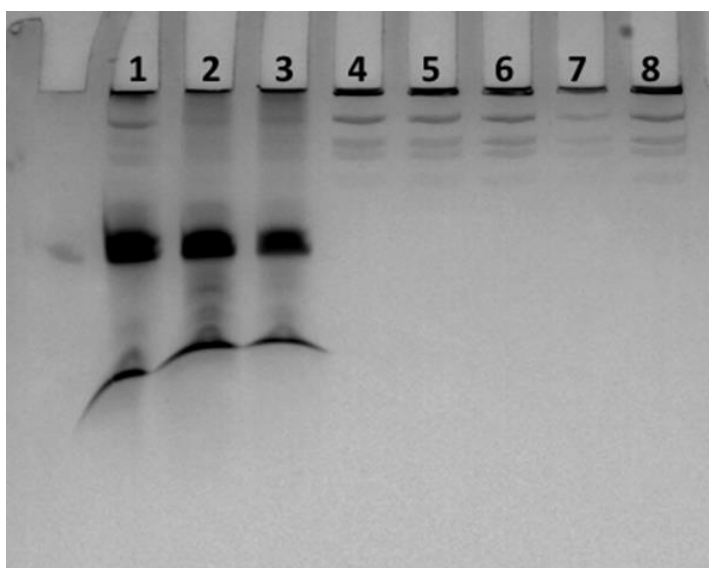


Slika 20. Produkti probne *in vitro* transkripcije lineariziranog DNA kalupa za mini tRNA^{Leu} pri različitim uvjetima navedenim u Tablici 7, razdvojeni na 15 % poliakrilamidnom gelu. Jažice označene brojevima od jedan do deset odgovaraju rednom broju isprobanog uvjeta navedenog u Tablici 7. Gel je bojan toluidinom te promatran i snimljen pri valnim duljinama vidljive svjetlosti na transiluminatoru DNR, *Bio-Imaging Systems Ltd.* povezanim s računalom.

U svrhu dobivanja još veće količine produkta, modificirani su uvjeti 2, 7 i 8, te je napravljena nova serija probnih *in vitro* transkripcija u kojoj su uz nove uvjete (navedene u Tablici 9) ponovljeni i uvjeti 2,7 i 8 (Tablica 7) kako bi se mogla bolje usporediti količina nastalih produkata. Produkti druge serije probnih *in vitro* transkripcija ponovno su analizirani na poliakrilamidnom gelu (Slika 21). Dobiveni rezultati pokazuju da uvjeti 2, 7 i 8 i dalje daju najveće prinose.

Tablica 9. Uvjeti za drugu seriju probne *in vitro* transkripcije. Dodana je i proteinska smjesa s konačnim koncentracijama prikazanim u Tablici 8. osim ako nije navedeno drugačije. Ružičastom bojom je naznačeno što je promijenjeno u odnosu na uvjet pod brojem 10.

UVJETI	NTP smjesa/ mmol dm ⁻³	Kalup/ g dm ⁻³	GMP/ mmol dm ⁻³	MgCl ₂ / mol dm ⁻³	Tris/mol dm ⁻³ pH=8,0	ostalo
10.	4	0,1	0,195	0,02	0,02	-
11.		0,1	0,195	0,01		-
12.		0,1	-	0,02		-
13.		0,06	0,195	0,02		-
14.		0,1	0,195	0,02		*proteinska smjesa s duplo manje polimeraze



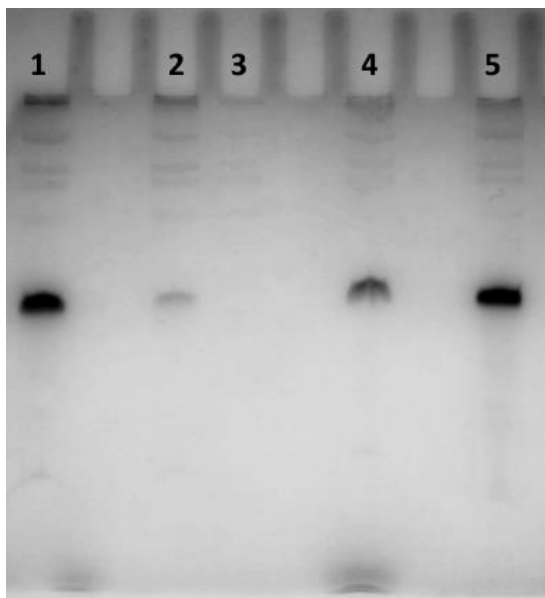
Slika 21. Produkti druge serije probne *in vitro* transkripcije lineariziranog DNA kalupa koja kodira za analog mini tRNA^{Leu} pri različitim uvjetima navedenim u Tablici 9, razdvojeni na 15 % poliakrilamidnom gelu. Jažice označene brojevima od jedan do tri odgovaraju uvjetima 2, 7 i 8 opisanim u Tablici 7. U jažicu označenu brojem 4 nanesen su produkti uvjeta 11, u jažicu 5 produkti uvjeta 12, u jažicu 6 produkti uvjeta 13, u jažicu 7 produkti uvjeta 14, a u jažicu 8 produkti uvjeta 15 (Tablica 9). Gel je bojan toluidinom te promatran i snimljen pri valnim duljinama vidljive svjetlosti na transiluminatoru *DNR, Bio-Imaging Systems Ltd.* povezanim s računalom.

Naposljetku je odabran uvjet označen brojem 8 (naveden u Tablici 7), te je dodatno modificiran prema Tablici 10. Produkti treće serije probne *in vitro* transkripcije ponovno su analizirani gel-elektroforezom (Slika 22). Prema Slici 22 je vidljivo da je modificiranim uvjetom 19 u kojem je korišteno duplo manja količine T7-RNA-polimeraze nego u uvjetu 8, dobivena gotovo jednaka količina produkta. Prema dobivenim rezultatima za preparativnu *in vitro* transkripciju odabran je uvjet 19 koji sadrži: 20 mmol dm⁻³ Tris, 4 mmol dm⁻³ NTP smjese, 0,1 g dm⁻³ linearizirane DNA, 19,5 mmol dm⁻³ GMP, 4 mmol dm⁻³ DTT, 0,5 U mL⁻¹ anorganske IPP-aze, 0,5 µg mL⁻¹ BSA, 0,5 U µL⁻¹ RNazina i 3/100 volumena ukupne reakcijske smjese T7-RNA-polimeraze.

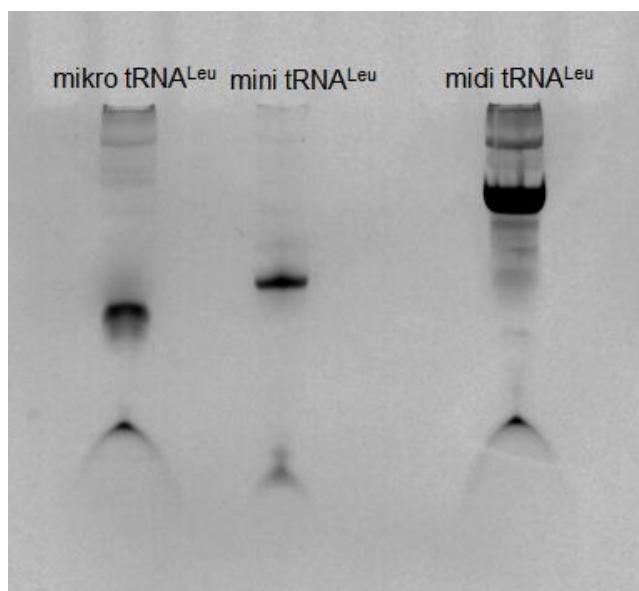
Na kraju je provjereno da li su odabrani uvjeti *in vitro* transkripcije dovoljno dobri za linearizirane DNA kalupe za analoge mikro tRNA^{Leu} i midi tRNA^{Leu}. Rezultati su bili zadovoljavajući te su prikazani na Slici 23.

Tablica 10. Uvjeti za treću seriju probne *in vitro* transkripcije. Dodana je i proteinska smjesa u konačnim koncentracijama prikazanim u Tablici 8. osim ako nije navedeno drugačije. Uvjet 8 je najbolji uvjet odabran iz prethodne serije *in vitro* transkripcijskih uvjeta, pod (16.) je modificiran uvjet 8 s $10 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ MgCl}_2$, pod (17.) modificiran uvjet 8 bez GMP-a, pod (18.) modificiran uvjet 8 s duplo manjom količinom kalupa te naposljetku pod (19.) modificiran uvjet 8 s duplo manje T7-RNA-polimeraze. Ružičastom bojom je naznačeno što je promijenjeno u odnosu na uvjet 8.

UVJETI	NTP smjesa/ mmol dm^{-3}	Kalup/ g dm^{-3}	GMP/ mmol dm^{-3}	MgCl_2 / mol dm^{-3}	Tris/ mol dm^{-3} , pH=8,0	Spermidin/ mol dm^{-3}	ostalo
8.	4	0,1	0,195	0,02	0,02	0,002	-
16.			0,195	0,01			-
17.			-	0,02			-
18.			0,195	0,02			*protein smjesa s duplo manje kalupa
19.			0,195	0,02			*protein smjesa s duplo manje polimeraze



Slika 22. Produkti treće serije probne *in vitro* transkripcije lineariziranog DNA kalupa koja kodira za analog mini tRNA^{Leu} pri različitim uvjetima (Tablica 10) razdvojeni na 15 % poliakrilamidnom gelu. Jažice označene brojevima od jedan do pet odgovaraju uvjetima prikazanim u Tablici 10. Gel je bojan toluidinom te promatran i snimljen pri valnim duljinama vidljive svjetlosti na transiluminatoru *DNR, Bio-Imaging Systems Ltd.* povezanom s računalom.



Slika 23. Produkti probne *in vitro* transkripcije lineariziranih DNA kalupa za mini tRNA^{Leu}, midi tRNA^{Leu} i mikro tRNA^{Leu} pri prethodno odabranom uvjetu 19 (Tablica 10, uvjet 19 označen je narančastom bojom), razdvojeni na 15 % poliakrilamidnom gelu. Na gelu je vidljivo da odabrani

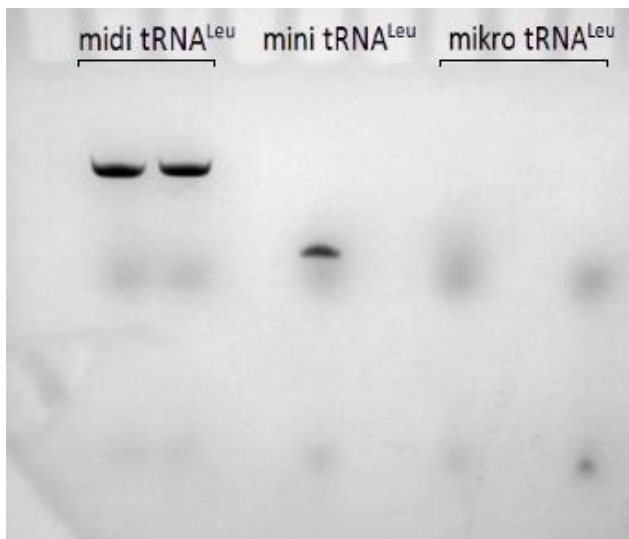
uvjet za reakciju *in vitro* transkripcije odgovara za transkripciju svih linariziranih DNA kalupa. Gel je bojan toluidinom te promatran i snimljen pri valnim duljinama vidljive svjetlosti na transiluminatoru *DNR, Bio-Imaging Systems Ltd.* povezanim s računalom.

U svrhu preparativne *in vitro* transkripcije ponovno su preparativno izolirani plazmidi koji sadrže inserte za željene analoge tRNA^{Leu} QIAfilter Plasmid Maxi Kit (*Qiagen*) kompletom. Plazmidi su ponovno razgrađeni RE BstNI te je provedena preparativna reakcija *in vitro* transkripcije.

Produkti preparativne *in vitro* transkripcije pročišćeni su na velikom poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima (opisano u poglavlju 4.2.1.14.). Dobiveni analozi tRNA^{Leu} razdvojeni su na 15% poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima u svrhu provjere kvalitete pročišćavanja (Slika 24), a konačne dobivene koncentracije prilazane su u Tablici 11.

Tablica 11. Dobivene koncentracije analoga tRNA^{Leu} nakon preparativne *in vitro* transkripcije, izolacije na velikom poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima i ukoncentriravanja uzorka:

tRNA	Y (ng μL^{-1})	m (μg)	260/280	260/230
mikro tRNA ^{Leu}	52,79	2,67	2,03	1,60
mini tRNA ^{Leu}	554,97	31,32	2,00	1,35
midi tRNA ^{Leu}	400,91	107,70	2,10	2,05

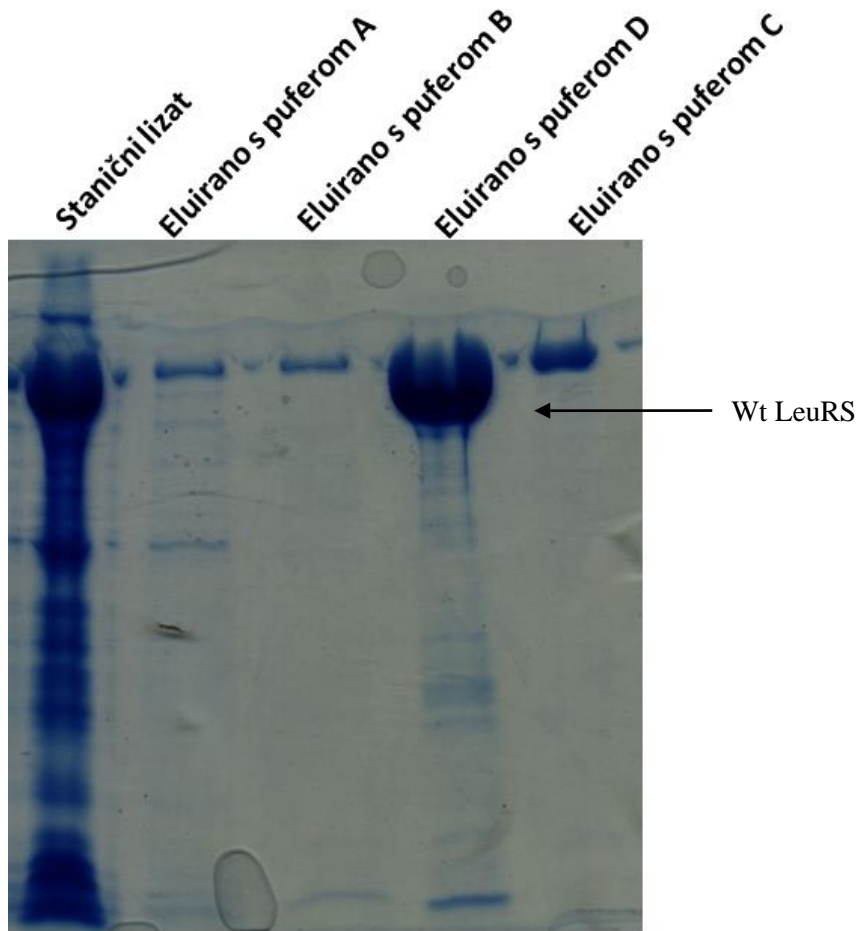


Slika 24. tRNA^{Leu} analozi razdvojeni na 10 % poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima. U jažicama broj 1 i 2 nanesen je uzorak midi tRNA^{Leu}, u jažicu 3 nanesen je mini tRNA^{Leu}, a u jažice 4 i 5 nanesen je uzorak mikro tRNA^{Leu}. Tamne pruge u jažicama 1, 2 i 3 predstavljaju dobivene analoge. Najniže pruge (koje putuju najbrže) u svakoj jažici predstavljaju slobodne nukleotide zaostale u smjesi nakon reakcije *in vitro* transkripcije. Na gelu je vidljivo da nije dobiveno gotovo ništa analoga mikro tRNA^{Leu} već da se u toj smjesi nalaze uglavnom nukleotidi. Mini tRNA^{Leu} i midi tRNA^{Leu} analozi dobiveni su u zadovoljavajućoj količini. Gel je bojan toluidinom te promatran i snimljen pri valnim duljinama vidljive svjetlosti na transiluminatoru DNR, *Bio-Imaging Systems Ltd.* povezanim s računalom.

5.10. Proizvodnja i pročišćavanje proteina Wt LeuRS

Za prekomjerna ekspresiju proteina Wt LeuRS korišten je bakterijski soj BL21 (DE3) *E.coli* prethodno transformiran plazmidnim vektorom iz serije pET28b koji sadrži gen za protein od interesa. Ekspresija proteina je inducirana dodatkom IPTG-a do konačne koncentracije od 0,25 mol dm⁻³ te inkubacijom bakterijske kulture 3 sata pri 37 °C uz stalno protresanje.

Pročišćavanjem nadeksprimiranih proteina afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA-agarozu (postupak opisan u poglavlju 4.2.2.2.) iz 2 litre bakterijskih kultura dobiveno je 18 mg proteina Wt LeuRS. Koncentracija proteina izmjerena je na uređaju NanoDrop 1000 pri 280 nm (postupak opisan u poglavlju 4.2.2.5). Čistoća eluata i prinos proteina provjereni su gel-elektroforezom na pilakrilamidnom gelu (Slika 25).



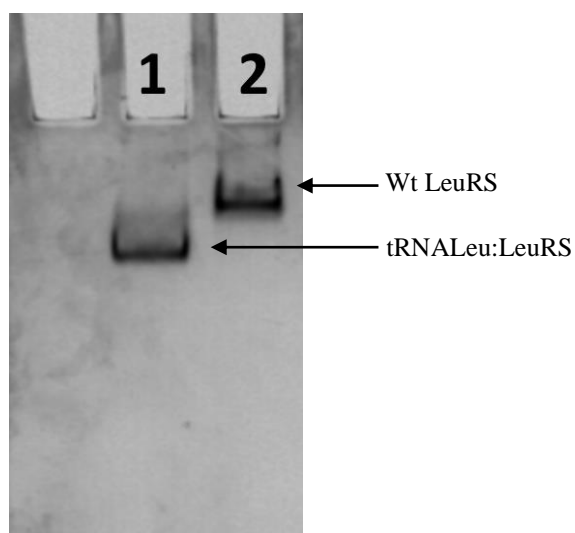
Slika 25. Rezultati pročišćavanja proteina Wt LeuRS. U prvu jažicu nanesen je stanični lizat dobiven nakon soniciranja bakterijskog uzorka. U drugu jažicu nanesen je eluat dobiven ispiranjem nespecifično vezanih proteina puferom A, u treću jažicu nanesen je eluat dobiven ispiranjem nespecifično vezanih proteina puferom B, u četvrtu jažicu eluat proteina od interesa puferom D i u petu jažicu nanesen je eluat dobiven ispiranjem nespecifično vezanih proteina puferom C. Gel je bojan Coomassie BB bojom.

5.11. Gel-retardacijska elektroforeza kompleksa LeuRS i analoga tRNA^{Leu}

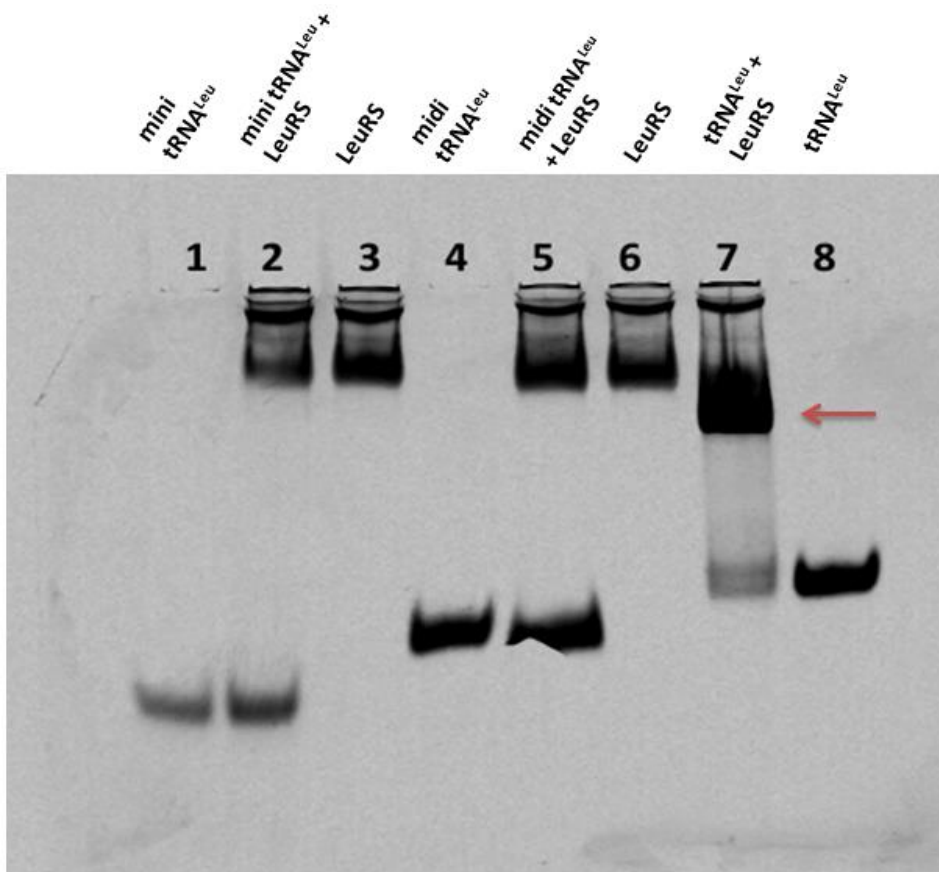
U svrhu detekcije kompleksa LeuRS i analoga tRNA^{Leu} korištena je metoda gel-retardacijske elektroforeze. Dobivanja kompleksa prvo je optimizirano uz pomoć Wt LeuRS i cjelovite tRNA^{Leu} pri različitim uvjetima (opisano u poglavlju 4.2.4.1.).

Optimizirani uvjeti navedeni u poglavlju 4.2.4.1. bili su uspješni za praćenje nekovalentnog LeuRS:tRNA^{Leu} kompleksa (Slika 26).

Pretpostavka je da ukoliko uvjeti omogućuju nastajanje kompleksa između enzima i cjelovite tRNA^{Leu} trebaju omogućavati i nastajanje kompleksa enzima i analoga tRNA^{Leu} (ukoliko on uopće nastaje). Stoga su isti optimizirani uvjeti isprobani za provjeru nastajanja kompleksa između analoga tRNA^{Leu} i Wt LeuRS. Na gelu je detektiran pomak tj. nastajanje kompleksa LeuRS:tRNA^{Leu}, no nije detektiran kompleks između midi tRNA^{Leu} i enzima, ni mini tRNA^{Leu} i enzima (Slika 27).



Slika 26. Optimiziranje uvjeta za gel-retardacijsku elektroforezu uz pomoć cjelovite tRNA^{Leu} i Wt LeuRS. Dobiveni kompleks je vizuliziran na 9 % poliakrilamidnom gelu. U jažicu jedan nanesen je uzorak cjelovite tRNA^{Leu} s Wt LeuRS, a u jažicu označenu brojem 2 samo Wt LeuRS. Gel je bojan s Coomassie BB bojom te promatran i snimljen pri valnim duljinama vidljive svjetlosti na transiluminatoru DNR, *Bio-Imaging Systems Ltd.* povezanim s računalom.

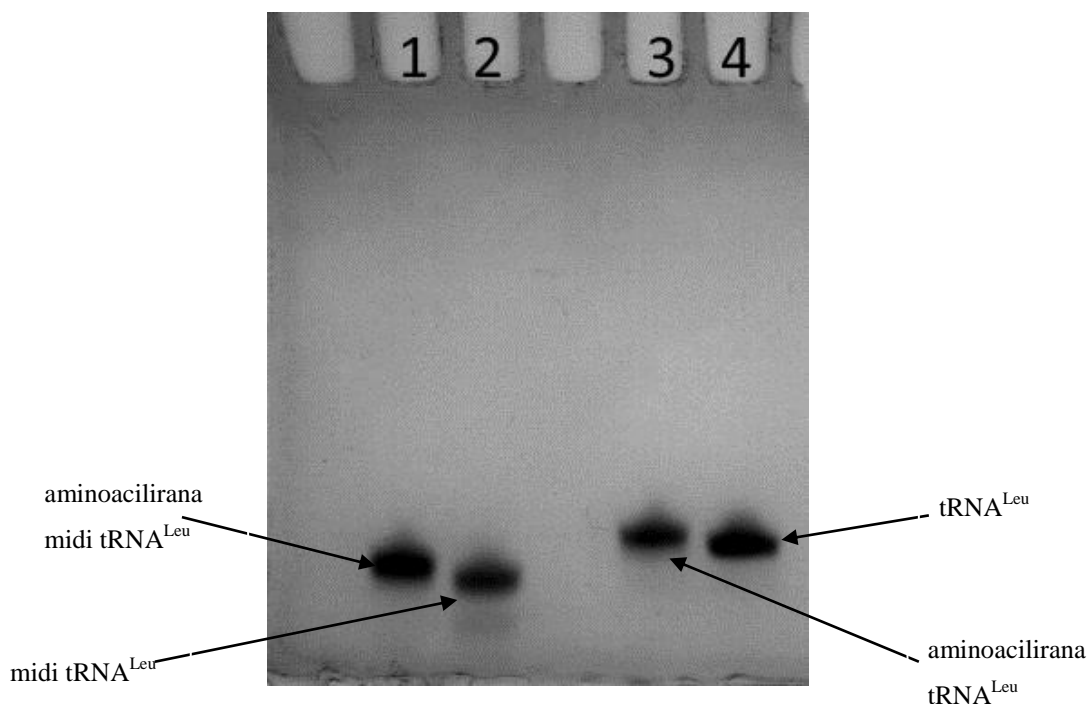


Slika 27. Gel-retardacijska elektroforeza na 9 % poliakrilamidnom gelu. U jažicu označenu brojem 1 nanosen je uzorak mini tRNA^{Leu}, u jažicu 2 nanesena je smjesa mini tRNA^{Leu} i Wt LeuRS, u jažicu 3 nanosen je uzorak Wt LeuRS, u jažicu 4 uzorak midi tRNA^{Leu}, u jažicu 5 uzorak midi tRNA^{Leu} s Wt LeuRS, u jažicu 6 Wt LeuRS, u jažicu pod brojem 7 cjelovita tRNA^{Leu} s Wt LeuRS, dok posljednja, osma, jažica sadrži uzorak cjelovite tRNA^{Leu}. Crvenom strelicom označen je jedini detektiran kompleks cjelovita tRNA^{Leu}:LeuRS. Niti jedan analog nije pokazao stabilan nekovalentni kompleks s Wt LeuRS. Gel je bojan srebrom te promatran i snimljen pri valnim duljinama vidljive svjetlosti na transiluminatoru DNR, *Bio-Imaging Systems Ltd.* povezanom s računalom.

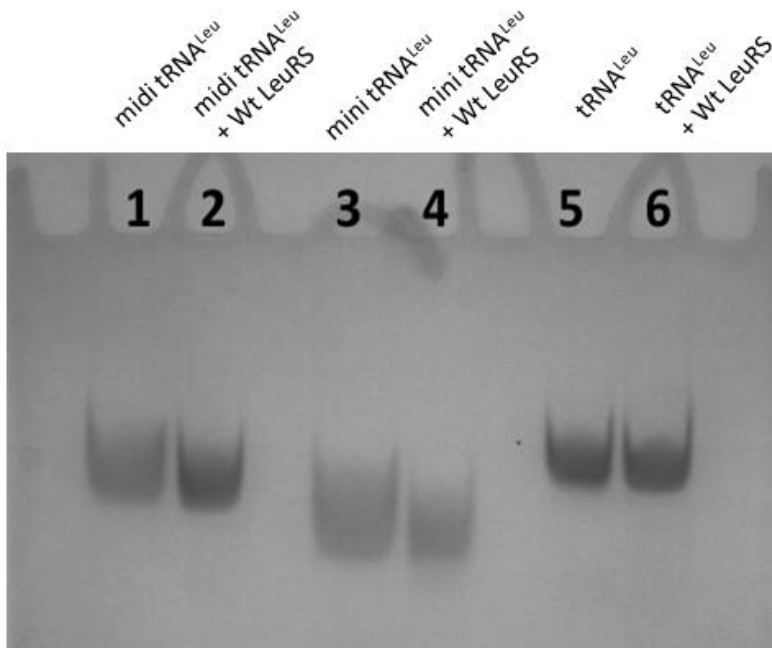
5.12. Praćenje reakcije aminoaciliranja na kiselim gelovima

Poliakrilamidna gel-elektroforeza u kiselim uvjetima omogućuje stabilizaciju esterske veze aminokiseline i molekule RNA te detekciju sporijeg kretanja aminoacilirane RNA na gelu. Prilikom praćenja reakcije aminoacilacije isprobana je uspješnost aminoaciliranja analoga tRNA^{Leu} s i bez njihove prethodne renaturacije.

Na Slici 28 prikazani su rezultati kada je tRNA prije reakcije aminoaciliranja renaturirana prema postupku opisanom u poglavlju 4.2.1.17. U ovom slučaju na gelu je lijepo vidljiv pomak između neaminoacilirane tRNA koja putuje brže i aminoacilirane tRNA koja putuje sporije. Na Slici 29 prikazani su rezultati elektroforeze na kiselom gelu u slučaju kad analozi tRNA^{Leu} nisu prethodno renaturirani. Dobiveni rezultati ukazuju da je za reakciju aminoaciliranja analoge molekule tRNA^{Leu} potrebno renaturirati baš kao i cjelovitu tRNA^{Leu}.



Slika 28. Rezultati elektroforeze na 6% kiselom gelu u slučaju kada je tRNA prethodno renaturirana. U jažici pod brojem 1 se nalazi uzorak midi tRNA^{Leu} koji je prethodno inkubiran s Wt LeuRS, u jažicu 2 nanesen je uzorak midi tRNA^{Leu}, u jažicu 3 cjelovita tRNA^{Leu} prethodno inkubirana s Wt LeuRS te u jažicu 4 cjelovita tRNA^{Leu}. Gel je bojan toluidinskim modrilom te promatran i snimljen pri valnim duljinama vidljive svjetlosti na transiluminatoru DNR, *Bio-Imaging Systems Ltd.* povezanim s računalom.

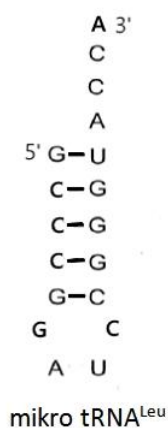


Slika 29. Rezultati poliakrilamidne gel-elektroforeze na 6 % kiselom gelu u slučaju kada tRNA nije prethodno renaturirana. U jažicama označenim brojevima 1, 3 i 5 nanese su redom uzorci: midi tRNA^{Leu}, mini tRNA^{Leu} te cjelovita tRNA^{Leu}. U jažicu označenu brojem 2 nanese je analog midi tRNA^{Leu} prethodno inkubiran s enzimom Wt LeuRS, u jažicu označenu brojem 4 analog mini tRNA^{Leu} prethodno inkubiran s Wt LeuRS, a u jažicu označenu brojem 6 cjelovita tRNA^{Leu} prethodno inkubirana s enzimom Wt LeuRS. Gel je bojan toluidinskim modrilom te promatran i snimljen pri valnim duljinama vidljive svjetlosti na transiluminatoru DNR, *Bio-Imaging Systems Ltd.* povezanim s računalom.

6. Rasprava

Leucil-tRNA-sintetaza iz *E. coli* već je dugi niz godina predmet brojnih istraživanja. Čak dvije svjetski poznate grupe, predvođene s dr. sc. En Duo Wang, odnosno s dr. sc. Susan Martinis, intenzivno se bave kinetikom, mehanizmom i ulogom sintetskih i hidrolitičkih reakcija. Iako je puno rezultata i primarnih znanstvenih publikacija proizvedeno, glavne značajke LeuRS ostale su nejasne.

Ispitivanje sudjelovanja analoga mikro tRNA^{Leu} u reakciji aminoacilacije enzimom LeuRS nije bilo moguće, budući da je provođenjem reakcije *in vitro* transkripcije dobiven izrazito mali prinos mikro tRNA^{Leu}. Razlozi malog prinosa nisu posve razjašnjeni, no postoji mogućnost da je takav RNA produkt, zbog malog broja ostvarenih vodikovih veza između komplementarnih nukleotida, prilično nestabilan i dinamičan (Slika 30). Takva bi nestabilnost mogla dovesti do njegove denaturacija i oštećenja, te u konačnici do onemogućavanja izolacije jedinstvenog produkta poliakrilamidnom gel-elektroforezom na velikom gelu. Tom objašnjenju ide u prilog i nekoliko nejasnih, detektiranih, pruga na velikom gelu s kojeg smo eluirali RNA produkt (podaci nisu prikazani).



Slika 30. Sekundarna struktura analoga mikro tRNA^{Leu}. Vodikove veze između komplementarnih nukleotida označene su crticom.

Također, jedno od mogućih objašnjenja malog prinosa mikro tRNA^{Leu} može biti i nestabilniji kompleks lineariziranog DNA kalupa i T7-RNA-polimeraze, budući da se nakon promotora za T7-RNA-polimerazu nalazi izrazito kratak slijed od 18 nukleotida koji kodira za mikro tRNA^{Leu} nakon kojeg kalup završava. Takav kratki kalup ne stvara dovoljno stabilan kompleks s enzimom, što rezultira njegovom češćom disocijacijom i stvaranjem RNA transkripata različite duljine. Za povećanje prinosa takve *in vitro* transkripcije bilo bi potrebno povećati koncentraciju lineariziranog DNA kalupa ili produljiti vrijeme inkubacije reakcije. U konačnici dobivena količina analoga mikro

tRNA^{Leu} nije bila dovoljna za daljnju analizu reakcije aminoaciliranja na kiselim gelovima ni provjeru kompleksiranja s LeuRS gel-retardacijskom elektroforezom.

Reakciju aminoaciliranja analoga midi tRNA^{Leu} i mini tRNA^{Leu} pratili smo vizualizacijom produkata aminoacilacijske reakcije na kiselim gelovima. Naime, poliakrilamidna gel-elektroforeza u kiselim uvjetima omogućuje očuvanje kovalentne esterske veze između aminokiseline i molekule RNA te detekciju sporijeg kretanja aminoacilirane RNA na gelu (Varshney i sur, 1991). Potaknuti rezultatima kristalne strukture kompleksa tRNA^{Leu}:LeuRS (Palencia i sur, 2012) koja pokazuje da nukleotidi T ψ C-ruke ne sudjeluju u interakciji s enzimom, te kinetičkim rezultatima Larkina i sur. (2002.) koji govore da se analog koji sadrži T ψ C-ruku, varijabilnu ruku i akceptorsku peteljku ne može uspješno aminoacilirati, dok je analog koji ne sadrži varijabilnu ruku, aminoacilacijski aktivan (analog nazvan tRNA^{Leu}- Δ AC), dizajnirali smo analog mini tRNA^{Leu} koji sadrži samo D-ruku i akceptorsku peteljku. Ovime smo htjeli provjeriti da li je analog koji sadrži sve potrebne identitetne elemente, koji se nalaze u D-ruci i akceptorskoj peteljci, aminoacilacijski aktivan. Dobiveni rezultati ukazuju da se takav analog ne može uspješno prepoznati i aminoacilirati leucil-tRNA-sintetazom kada se prethodno ne renaturira. Naime, u tom slučaju na kiselim gelovima nije detektiran nikakav pomak koji bi ukazivao na vezanu aminokiselinu.

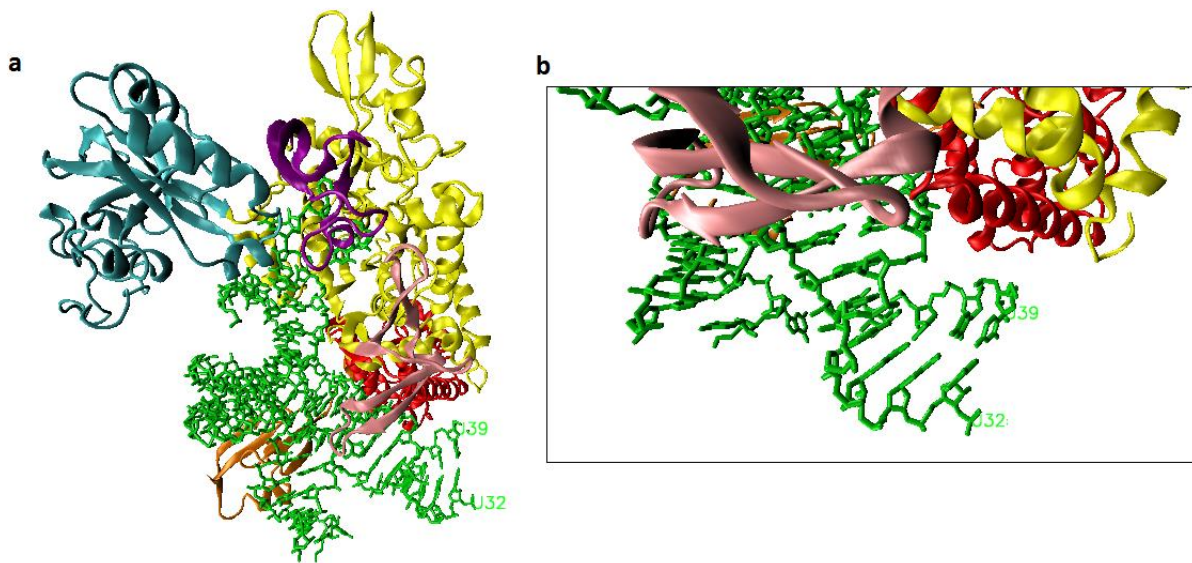
Reakcija aminoaciliranja napravljena je i u uvjetima kad je mini tRNA prethodno renaturirana (postupkom opisanim u poglavlju 4.2.1.17.), no dobivena količina produkta je bila premala i nije se mogla jasno vizualizirati na poliakrilamidnom kiselom gelu, čak ni bojanjem srebrom (podaci nisu prikazani). Nadalje, rezultati gel-retardacijske elektroforeze ukazuju na to da ne nastaje stabilan i dugoživi kompleks analoga mini tRNA^{Leu} i Wt LeuRS. Dobiveni rezultati mogu ukazivati na dvije stvari (1) analog mini tRNA^{Leu} se zaista ne može uspješno vezati u aktivno mjesto enzima LeuRS, budući da mu nedostaje važna tercijarna interakcija između D-ruke i T ψ C-ruke, a samim time ni aminoacilirati; (2) analog ne može ostvariti stabilan kompleks s LeuRS zbog brze disocijacije, ali se može aminoacilirati s izrazito malom uspješnosti koja se ne može detektirati vizualizacijom produkta reakcije aminoaciliranja na kiselim gelovima. Budući da su prethodno dobiveni kinetički rezultati pokazali da analog koji sadrži samo T ψ C-ruku, varijabilnu ruku i akceptorsku peteljku nije aminoacilacijski aktivan (Larkin i sur, 2002) možemo pretpostaviti da uistinu postoje tercijarne interakcije između D-ruke i T ψ C-ruke koje su nužne za ostvarivanje pravilne 3D strukture molekule tRNA i izlaganje identitetnih elemenata D-ruke enzimu. Narušavanje takve interakcije vjerojatno onemogućuje pravilno pozicioniranje analoga molekule tRNA^{Leu} te njegovo prepoznavanje od strane enzima LeuRS.

Tablica 12. Kinetička analiza leucilacije analoga tRNA^{Leu} enzimom LeuRS *E.coli*. Larkin i suradnici (2002).

analog tRNA ^{Leu}	K _M (μmol dm ⁻³)	k _{cat} (min ⁻¹)	k _{cat} /K _M (μmol dm ⁻³ min ⁻¹)
*tRNA ^{Leu} (UAA)	0,9	0,345	3,9 × 10 ⁻¹
tRNA ^{Leu} -ΔAC	7,8	0,188	2,4 × 10 ⁻²
tRNA ^{Leu} -ΔVL	23,5	0,071	3,0 × 10 ⁻³

*cjelovita molekula tRNA^{Leu}

Vizualizacija produkta reakcije aminoaciliranja analoga midi tRNA^{Leu} na kiselim gelovima govori da antikodonska ruka doista ne sudjeluje u prepoznavanju pripadne tRNA^{Leu}, te da se analog mini tRNA^{Leu} koji ne sadrži tu domenu može i dalje uspješno aminoacilirati. Na Slici 28 je vidljivo da doista dolazi do aminoaciliranja analoga i njegovog sporijeg putovanja na kiselom gelu kad nosi kovalentno vezan leucin. Takvi rezultati sukladni su s kinetičkim rezultatima reakcije aminoaciliranja Larkina i suradnika (2002.) koji su pokazali da se reakcija prijenosa aminokiseline na analog midi tRNA^{Leu} odvija uspješno, pri čemu je dobivena vrijednost obrtnog broja k_{cat} = 0,188 min⁻¹, što se minimalno razlikuje od obrtnog broja reakcije aminoaciliranja cjelovite tRNA^{Leu} čiji k_{cat} iznosi 0,354 min⁻¹ (Tablica 12). Nadalje, naši rezultati gel-retardacijske elektroforeze ukazuju na to da ne nastaje stabilan i dugoživići kompleks analoga midi tRNA^{Leu} i Wt LeuRS, što je donekle sukladno s prethodno dobivenom vrijednosti K_M koja za analog mini tRNA^{Leu} iznosi 7,8 μmol dm⁻³, dok za cjelovitu tRNA^{Leu} iznosi 0,9 μmol dm⁻³ (Larkin i sur, 2002). Takvi rezultati upućuju na činjenicu da nastali kompleks analog midi tRNA^{Leu}:LeuRS nije stabilan te da često dolazi do njegove disocijacije iz aktivnog mjesta enzima (Tablica 12). I u ovom slučaju smo isprobali da li renaturacija molekule analoga utječe na nastajanje kompleksa analoga midi tRNA^{Leu} i enzima, no niti u jednom slučaju nismo uspjeli detektirati stabilni nekovalentni kompleks. Važno je napomenuti da rezultati gel-retardacijske elektroforeze ne moraju nužno biti komplementarni s rezultatima reakcije aminoaciliranja (Gruić-Sovulj i sur, 2006). Postoji mogućnost da je kompleks koji nastaje produktivan te da se reakcija prijenosa događa brzo, no sam kompleks nije stabilan i dugoživići, što dovodi do brze disocijacije molekule analoga tRNA^{Leu} koji još nije aminoaciliran. Za dokazivanje nastajanja takvih kratkoživićih kompleksa bilo bi potrebno napraviti kovalentno povezivanje analoga tRNA^{Leu} i enzima oksidacijom perjodatnim tretmanom. Takvo tretiranje bi „zamrznulo“ kompleks jednom kada on nastane, što bi omogućilo njegovu vizualizaciju na gelu u nativnim ili denaturirajućim uvjetima.



Slika 31. Kristalna struktura produktivnog aminoacilacijskog kompleksa tRNA^{Leu}:LeuRS *E.coli* (Palencia i sur, 2012) prikazana i obrađena u programu VMD. Iz slike je vidljivo da antikodonska ruka ne sudjeluje u interakciji s proteinom. Budući da antikodonska ruka molekule tRNA^{Leu} nije stabilizirana interakcijom s proteinom ona je vrlo dinamična zbog čega nije bilo moguće odrediti precizne koordinate za atome nukleotida U33, U34, A35, A36, A37 i A38. Na slici (b) vidljiva je nepotpuna struktura antikodonske omče. (PDB kod: 4AQ7).

7. Zaključak

- Analog koji sadrži samo akceptorsku peteljku (mikro tRNA^{Leu}) teško je dobiti u zadovoljavajućem prinosu postupkom *in vitro* transkripcije i pročišćavanjem na poliakrilamidnim gelovima. Vjerojatno zbog nestabilnosti samog analoga te zbog nestabilnog kompleksa lineariziranog DNA kalupa i T7-RNA-polimeraze, što u konačnici dovodi do nastajanja kraćih RNA produkta.
- Analog koji sadrži samo akseptorku peteljku i D-ruku (mini tRNA^{Leu}) ne stvara stabilan nekovalentni kompleks s LeuRS neovisno o prethodnoj renaturaciji u prisutnosti magnezija. Također se, nerenaturiran analog mini tRNA^{Leu}, ne može uspješno aminoacilirati leucil-tRNA-sintetazom. Za dodatnu provjeru aminoaciliranja takvog analoga potrebno ga je ponovno izolirati u većoj količini i prije reakcije aminoaciliranja renaturirati u prisutnosti magnezija.
- Analog kojem nedostaje samo antikodonska ruka (midi tRNA^{Leu}) može se uspješno aminoacilirati leucil-tRNA-sintetazom samo ukoliko se prethodno renaturira u prisutnosti magnezija, ali i uz pethodnu renaturaciju ne može stvoriti stabilan nekovalentni kompleks s LeuRS koji bi se mogao detektirati gel-retardacijskom elektroforezom. Takvi rezultati ukazuju na činjenicu da je reakcija aminoaciliranja analoga midi tRNA^{Leu} brza, ali je afinitet enzima prema njemu manji nego prema cjelovitoj tRNA^{Leu}, čiji je kompleks s LeuRS stabilan te uspješno detektiran gel-retardacijskom elektroforezom.
- Kratkoživući kompleksi ovih analoga mogli bi se detektirati kovalentnim povezivanjem analoga i enzima oksidacijom perjodatnim tretmanom. Takvo tretiranje „zamrznulo“ bi kompleks u trenutku kad bi se analog tRNA^{Leu} vezao na LeuRS, što bi u konačnici omogućilo vizualizaciju kompleksa na gelu u nativnim ili denaturirajućim uvjetima.

8. Zahvale

Od srca se zahvaljujemo...

... mentorici doc.dr.sc. Morani Dulić na vodstvu u izradi ovoga rada, pomoći pri osmišljavanju i izvođenju eksperimenta, brojnim savjetima, strpljivosti i odličnoj radnoj atmosferi.

... izv. prof. dr. sc. Iti Gruić-Sovulj što nam je usadila ljubav prema biokemiji i dala brojne savjete i prijedloge za učinkovitije izvođenje eksperimenata.

... dr. sc. Nini Franičević, dr. sc. Neveni Cvetešić i dr. sc. Mirni Biluš na brojnim savjetima, bodrenju i ugodnoj radnoj atmosferi u laboratoriju.

... tehničarki Maji Barači na brojnim savjetima.

...ostalim zaposlenicima Zavoda za biokemiju Kemijskog odsjeka PMF-a na ustupljenom prostoru i uređajima.

...obitelji na podršci i razumijevanju.

... i za kraj Andrea se posebno zahvaljuje Ivanu na podršci i razumijevanju zbog izbivanja iz svakodnevnog života.

9. Popis literature

- Agris, P.F. Bringing order to translation: the contributions of transfer RNA anticodon-domain modifications. *EMBO Rep.* **9**, 629-635 (2008).
- Boniecki, M.T., Vu, M.T., Betha, A.K. i Martinis, S.A. CP1-dependent partitioning of pretransfer and post-transfer editing in leucyltRNA synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 19223–19228 (2008).
- Cavarelli, J. i Moras, D. Electrostatic potential of aminoacyl-tRNA synthetase navigates tRNA on its pathway to the binding site. *Faseb Journal.* **7**, 79-86 (1993).
- Cusack, S. Aminoacyl-tRNA synthetases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 881–889 (1997).
- Cusack, S., Yaremchuk, A. i Tukalo, M. The 2 Å crystal structure of leucyl-tRNA synthetase and its complex with a leucyl-adenylate analogue. *EMBO J.* **19**, 2351 – 2361 (2000).
- Cvetešić, N., Palencia, A., Halasz, I., Cusac, S. i Gruić-Sovulj, I. The physiological target for LeuRS translational quality control is norvaline. *EMBO J.* **33**, 1639-1653 (2014).
- Cvetešić, N., Perona, J.J. i Gruić-Sovulj, I. Kinetic partitioning between synthetic and editing pathways in class I aminoacyl-tRNA synthetases occurs at both pre-transfer and post-transfer hydrolytic steps. *J. Biol. Chem.* **287**, 25381-25394 (2012).
- Giegé, R., Puglisi, J.D. i Florentz, C. tRNA structure and aminoacylation efficiency. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **45**, 129-206 (1993).
- Gruić-Sovulj, I., Jarić, J., Dulic, M., Cindric, M. i Weygand-Durasevic, I. Shuffling of discrete tRNA^{Ser} regions reveals differently utilized identity elements in yeast and methanogenic Archaea. *J. Mol. Biol.* **361**, 128–139 (2006).
- Larkin, D.C., Williams, A.M., Martinis, S.A. i Fox, G.E. Identification of essential domains for *Escherichia coli* tRNA^{Leu} aminoacylation and amino acid editing using minimalist RNA molecules. *Nucleic Acid Res.* **30**, 2103-2113 (2002).
- Lincecum, T.L., Jr i Martinis, S.A. Leucyl-transfer ribonucleic acid synthetases. In Cusack, S., Franklyn, C. And Ibba, M.(ed), *Aminoacyl-tRNA Synthetases*, in press (2002).
- Minajigi, A. i Franklyn C.S. Aminoacyl transfer rate dictates choice of editing pathway in threonyl-tRNA synthetase. *J. Biol. Chem.* **285**, 23810 – 23817 (2010).

Nelson, D.L. i Cox M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry. 6th ed.* W.H. Freeman& Co., New York, (2013). 945-1154.

Normanly, J., Ollick, T. i Abelson, J. Eight base changes are sufficient to convert a leucine-inserting tRNA into a serine-inserting tRNA. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 5680-5684 (1992).

O'Donoghue, P. i Luthey-Schulten, Z. On the evolution of structure in aminoacyl-tRNA synthetases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 550–573 (2003).

Palencia, A., Crepin T., Vu, M.T., Lincecum, T.L., Martinis, S.A. i Cusac, S. Structural dynamics of the aminoacylation and proofreading functional cycle of bacterial leucyl-tRNA synthetase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 677-684 (2012).

Perona, J.J. i Gruić-Sovulj, I. Synthetic and Editing Mechanisms of Aminoacyl-tRNA Synthetases. *Topics in current chemistry* **344**, 1-41 (2013).

Splan, K.E., Ignatov M.E. i Musier-Forsyth, K. Transfer RNA modulates the editing mechanism used by class II prolyl-tRNA synthetase. *J Biol. Chem.* **283**, 7128 – 7134 (2008).

Summer, H., Grämer, R. i Dröge, P. Denaturing urea polyacrylamide gel electrophoresis (Urea PAGE). *J. Vis. Exp.* 3-5 (2009).

Tukalo, M., Yaremchuk, A., Fukunaga, R., Yokoyama, S. i Cusack, S. The crystal structure of leucyl-tRNA synthetase complexed with tRNA^{Leu} in the post-transfer–editing conformation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 923-930 (2005).

Umbarger, H.E. Amino acid biosynthesis and its regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **47**, 532 – 606 (1978).

Varshney, U., Lee, C.I, Seong, B.L. i Rajbhandry, U.L. Mutants of initiator transfer RNA that function both as initiators and elongators. *J. Biol Chem.* **266**, 18018-18024 (1991).

Voet, D. i Voet, J.G. *Biochemistry. 4th ed.* J.Wiley and Sons, New York. (2011). 1145-1398.

Yadavalli, S.S. i Ibba, M. Quality control in aminoacyl-tRNA synthesis, Its role in translational fidelity. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* **86**, 1–43 (2012).

<https://www.slideshare.net/doloresgowland/protein-synthesis>

http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/basic_cloning_vectors/pUC18/

www.addgene.org

<http://bbs.biogo.net/simple/?t164376.html>

http://2015.igem.org/Team:Freiburg/Project/Protein_Purification

<http://oregonstate.edu/instruct/bb451/451material/lectures/translationoutline.html>

https://en.wikipedia.org/wiki/Transfer_RNA

<http://web.expasy.org/protparam/>

10. Sažetak

Marta Bošnjaković i Andrea Hloušek-Kasun: Minimalni analog tRNA^{Leu} koji se može uspješno aminoacilirati leucil-tRNA-sintetazom

Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) su enzimi koji osiguravaju vjeran prijenos genetičke informacije u stanicama svih živih organizama, kovalentnim sparivanjem aminokiselina s njihovom pripadnom molekulom tRNA. Nastale aminoacilirane tRNA zatim služe kao prekursori za sintezu proteina na ribosomima.

Cilj ovog rada bio je pronaći najmanji mogući analog molekule tRNA^{Leu} koji se može uspješno aminoacilirati, kako bi se kasnije iskoristio za određivanje interakcijskog doprinosa vezane aminokiseline prilikom vezanja aminoaciliranog analoga tRNA^{Leu} u deacilacijsku domenu LeuRS.

Konstruirana su tri analoga tRNA^{Leu}: midi tRNA^{Leu} s uklonjenom antikodonskom rukom, mini tRNA^{Leu} kojoj nedostaje varijabilna ruka, T ψ C-ruka i antikodonska ruka, te mikro tRNA^{Leu} koja sadrži samo akceptorosku peteljku. Uspješnost aminoacilacije detektirana je vizualizacijom produkata reakcije aminoacilacije na kiselim gelovima koji omogućavaju razdvajanje aminoacilirane od neaminoacilirane tRNA stabilizacijom esterske veze između molekule RNA i aminokiseline. Također, promatrano je nastajanje stabilnog kompleksa analoga molekule tRNA^{Leu} i enzima LeuRS metodom gel-retardacijske elektroforeze.

Midi tRNA^{Leu} se uspješno aminoacilirala leucil-tRNA-sintetazom, iako kompleks, do čijeg nastanka nužno dolazi, nije bio dovoljno stabilan za detekciju na gelu. Mini tRNA^{Leu} također nije formirala dovoljno stabilan kompleks s leucil-tRNA sintetazom za detekciju gel-retardacijskom elektroforezom, a nije bilo moguće niti detektirati njezino aminoaciliranje na kiselim poliakrilamidnim gelovima. Eksperimenti vezanja i aminoacilacije mikro tRNA^{Leu} leucil-tRNA-sintetazom nisu mogli biti izvedeni zbog preniskog prinosa ove RNA reakcijom *in vitro* transkripcije. Vjerojatno zbog prekratke sekvence. Dobiveni rezultati poslužit će kao temelj daljnjim istraživanjima minimalne RNA koja interagira i reagira s leucil-tRNA-sintetazom, ali i interakcijskog doprinosa aminokiseline kovalentno vezane na analog prilikom vezanja u deacilacijsku domenu.

Ključne riječi: leucil-tRNA-sintetaza, analozi tRNA^{Leu}, reakcija *in vitro* transkripcije, gel-retardacijska elektroforeza, kiseli poliakrilamidni gelovi.

11. Summary

Marta Bošnjaković i Andrea Hloušek-Kasun: Minimal tRNA^{Leu} analog that can be efficiently aminoacylated by leucyl-tRNA synthetase

Aminoacyl-tRNA synthetases (aaRS) are enzymes that ensure faithful transmission of genetic information in all living cells by covalent pairing of amino acids with their cognate tRNA molecule to provide precursors for ribosomal protein synthesis.

The purpose of this research was to find and describe the smallest tRNA^{Leu} analog that can be successfully aminoacylated and deacylated by LeuRS. Obtained results will provide substrates for later experiments of interactional contribution of different amino acids from aminoacylated tRNA^{Leu} when bound in deacylation domain. Three analogs were constructed: midi tRNA^{Leu} in which anticodon arm was removed, mini tRNA^{Leu} in which anticodon arm, T ψ C arm and variable arm were deleted and micro tRNA^{Leu}, which contains only acceptor arm.

Aminoacylation efficiency was detected by product visualization of aminoacylation reaction by using acid gels which provide separation of aminoacylated tRNA from deacylated, by stabilization of ester bond between amino acid and tRNA. In addition, we tried to observe stable non-covalent complex between tRNA^{Leu} analogs and enzyme LeuRS by gel-retardation electrophoresis.

Midi tRNA^{Leu} analog was successfully aminoacylated by LeuRS. However, the complex midi tRNA^{Leu} and Wt LeuRS was not stable enough to allow detection by gel-retardation assay. Likewise, mini tRNA^{Leu} did not form stable complex with leucyl-tRNA synthetase and its aminoacylation was undetectable by acid gel electrophoresis. Experiments of complexing and aminoacylation micro tRNA^{Leu} by leucyl-tRNA synthetase could not be performed because of low yield of *in vitro* transcription reaction, presumably because of analog's small sequence size. Obtained results will serve as a basis for further research of the minimal RNA which interacts with leucyl-tRNA synthetase, but also for determining the contribution of the bound amino acids to the interaction of aminoacylated analog with the deacylation domain.

Key words: leucyl-tRNA synthetase, tRNA^{Leu} analogs, *in vitro* transcription, gel-retardation assay, acid gel electrophoresis.