

Abstrakt (CZ)

V naší laboratoři byl nedávno objeven nový typ nekanonických RNA čepiček, obsahujících dinukleosid polyfosfáty. Abychom mohli objasnit jejich fyziologickou roli, je potřeba získat více informací o jejich syntéze v buňkách. Na základě nedávno publikovaných výsledků, dinukleosid polyfosfátové RNA ($N_{p_n}N$ -RNA) mohou vznikat při transkripci přímou inkorporací dinukleosid polyfosfátů pomocí RNA polymerázy na počátek nově vznikajícího transkriptu (takzvaný nekanonický iniciační nukleotid). Nelze vyloučit i jiné možnosti syntézy $N_{p_n}N$ čepičkované RNA, především jejich enzymatickou post-transkripční syntézu. Jedny z nejpravděpodobnějších kandidátů pro enzym vytvářející $N_{p_n}N$ -RNA jsou aminoacyl-tRNA syntetázy. Tyto enzymy jsou, kromě své esenciální role v translaci, odpovědné za syntézu volných dinukleosid polyfosfátů v buňce. V této práci jsme vybrali čtyři tRNA syntetázy, klonovali je do plazmidů a purifikovali pomocí proteinové kapalinové chromatografie (fast protein liquid chromatography – FPLC). Následně byly tRNA syntetázy testovány pro syntézu volných dinukleosid polyfosfátů, díky čemuž jsme zjistili optimální reakční podmínky. Za daných reakčních podmínek jsme následně testovali, zda jsou tRNA syntetázy schopny vytvořit $N_{p_n}N$ -RNA, a to pomocí reakce tRNA syntetáz s radioaktivně značenou RNA. Získané výsledky naznačují, že tRNA syntetázy nemohou vytvářet RNA čepičkovanou s dinukleosid polyfosfáty. Tyto výsledky byly následně potvrzeny pomocí analýzy založené na kapalinové chromatografii spojené s hmotnostní spektrometrií.

Klíčová slova: Nekanonické RNA čepičky, dinukleosid polyfosfáty, Ap_4A , Ap_4A -RNA, aminoacyl-tRNA syntetázy, LysU