

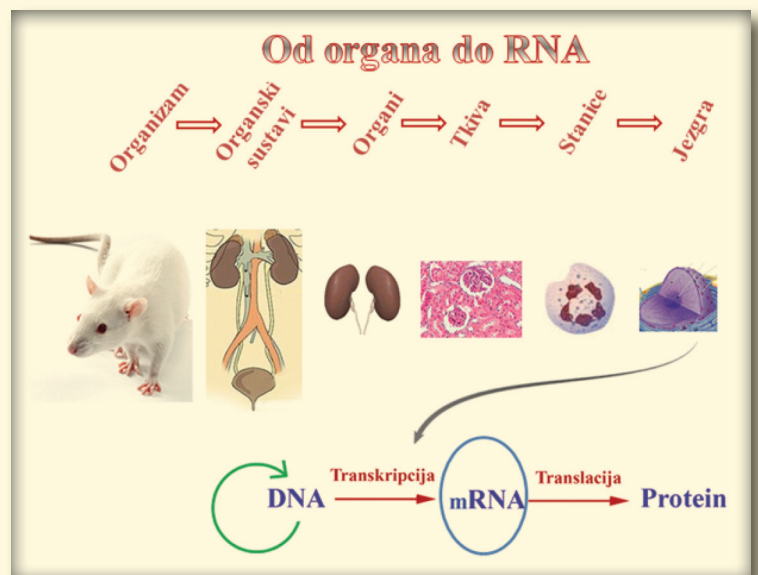
Od organa do RNA

Davorka BRELJAK, Zagreb

Izdvajanje RNA (*engl.* ribonucleic acid; *hrv.* ribonukleinska kiselina) iz organa jedna je od mnogobrojnih molekularno-bioloških metoda koja se rabi tijekom eksperimentalnih istraživanja. RNA je makromolekula građena od ribonukleotida koji su međusobno povezani 3'-5'-fosfodieterskim vezama. Svaki ribonukleotid građen je od dušične baze (adenin, citozin, gvanin i uracil), pentoze (riboze) i fosfatne skupine (PO_4^{3-}). Tako molekule RNA formiraju kraće ili dulje ribonukleotidne lance građene od nekoliko desetaka, stotina ili tisuća ribonukleotida. Molekule RNA sintetiziraju se na kalupu DNA (*engl.* deoxiribonucleic acid; *hrv.* deoksiribonukleinska kiselina) pomoću enzima RNA-polimeraza, tj. procesom transkripcije (*lat.* transcriptio; *hrv.* prepisivanje). Transkripcija je jedan od osnovnih biokemijskih procesa koji se događa u svakoj živoj stanici. Ona je ujedno i vrlo složen biokemijski proces koji se događa u jezgrama eukariotskih stanica. Tijekom tog procesa

TKO JE AUTORICA OVOG ČLANKA?

Dr. sc. Davorka Breljak je znanstvena savjetnica na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada i voditeljica njegove Jedinice za molekularnu toksikologiju. Bavi se staničnom lokalizacijom i regulacijom ekspresije membranskih prijenosnika u tkivima čovjeka i glodavaca (miš, štakor) na razini mRNA i proteina



Slika 1. Shematski prikaz teorijskog koncepta *Od organa do RNA*

nastaju mnogobrojne kodirajuće i nekodirajuće molekule RNA koje sve zajedno čine transkriptom, tj. skup svih molekula RNA u jednoj stanici. Svaka od sintetiziranih molekula RNA ima specifičnu biološku funkciju kojom, na izravan ili neizravan način, regulira ekspresiju gena, tj. nastajanje proteina u živim stanicama. Stoga je istraživanje molekula RNA presudno za razumijevanje temeljnih bioloških procesa koji se neprekidno događaju u stanicama svakog organizma.



Slika 2. Praktična primjena koncepta *Od organa do RNA*

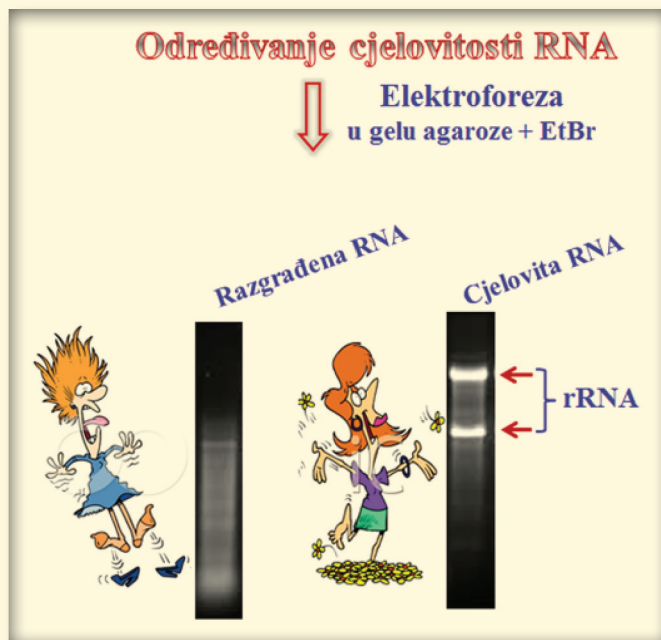
Ali, put od organizma do RNA je dug. Svaki organizam skladna je cjelina koja se sastoji od različitih organskih sustava. Svaki od tih organskih sustava izgrađen je od različitih organa, a svaki organ od različitih tkiva. No ni tu nije kraj! Sva tkiva izgrađena su od različitih stanica, a sve stanice od različitih organela. A od svih organela bitna nam je jezgra jer se u njoj događa proces transkripcije. I to je ono što nas zanima jer tijekom procesa transkripcije nastaju različite molekule RNA, uključujući i molekule mRNA (engl. *messenger RNA*; hrv. glasnicička RNA). Ova ideja poznata je i kao teorijski koncept *Od organa do RNA* i shematski je prikazana slikom 1. Molekule mRNA nose informaciju potrebnu za sintezu specifičnih proteina koji se sintetiziraju tijekom procesa translacije.

Temeljni preduvjet za istraživanje molekula RNA je izdvajanje čiste i cjelovite, tj. nerazgrađene RNA. Izdvajanje molekula RNA iz organa sisavaca je zahtjevan postupak koji se sastoji od nekoliko koraka (sl. 2.):

- 1) uzorkovanje organa i pohrana u otopinu RNAlater,
- 2) izdvajanje molekula RNA pomoću otopine TRIzola,
- 3) pročišćavanje molekula RNA pomoću kromatografskih kolona,
- 4) spektrofotometrijsko određivanje čistoće i koncentracije izdvojenih molekula RNA i
- 5) određivanje cjelovitosti uzorka RNA elektroforezom izdvojenih molekula RNA u gelu agaroze.

Međutim, ovaj sažeti opis samo je naizgled jednostavan. U praksi je izdvajanje molekula RNA iz organa (tkiva) zapravo pravi izazov jer su molekule RNA vrlo nestabilne. Naime, enzimi koji razgrađuju RNA, tzv. ribonukleaze (RNaze), su tzv. ubikvitarni (sveprisutni) enzimi. Kako im i samo ime kaže oni su prisutni u svakoj stanici (endogene RNaze) i u međustaničnim tekućinama kao što su znoj, slina, suze, sluz (egzogene RNaze). Unatoč sveprisutnim RNazama*, ipak uspijevamo izdvojiti RNA iz te šume zamki, a kad to uspijemo onda im moramo provjeriti cjelovitost, tj. sačuvanost. To se određuje elektroforezom uzorka RNA u agaroznom gelu u prisustvu fluorescentne boje – etidijevog bromida (EtBr). Nakon elektroforeze, gelovi agaroze fotografiraju se digitalnom kamerom pod UV-svjetlom, a fotografije potom obrađuju računalnim programom *Adobe Photoshop*. Kada je izdvojena RNA cjelovita (sačuvana), na fotografiji se uočavaju dvije pruge koje potječu od molekula rRNA (engl. *ribosomal RNA*; ribosomska RNA). To su najzastupljenije molekule RNA u stanicama, a grade ribosome. Kada uzorak RNA nije cjelovit, na snimci elektroforetskog gela se, umjesto dobro definiranih pruga, vidi »razmaz« koji se sastoji od mnoštva razgrađenih molekula RNA (sl. 3.).

Očito, da bismo iz organa izdvojili RNA potrebno je mnogo znanja i vještine, ali zato na kraju ipak uspijevamo pa sve bolje i bolje razumijemo proces transkripcije i regulaciju ekspresije gena.



Slika 3. Određivanje cjelovitosti molekula RNA

* Oni koji se tim poslom bave (izdvajanjem RNA iz tkiva) vole reći: »RNase lurks around every corner-like a gremlin!« (Iza svakog ugla, poput dobro skrivenog gremlina, vrebaju neke RNaze!)